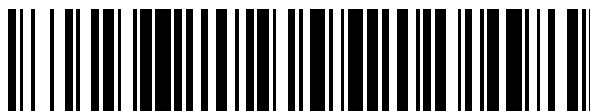


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 842**

51 Int. Cl.:

C12N 9/12

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2013 PCT/US2013/037139**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.10.2013 WO13158859**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2013 E 13778278 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2017 EP 2838998**

54 Título: **EGFR y ROS1 en el cáncer**

30 Prioridad:

18.04.2012 US 201261635057 P
15.03.2013 US 201361787033 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
21.02.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

CROSBY, KATHERINE, ELEANOR;
MCGUINNESS RIMKUNAS, VICTORIA;
SILVER, MATTHEW, REN y
HAACK, HERBERT

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 655 842 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

EGFR y ROS1 en el cáncer

Antecedentes

5 La presente divulgación versa en general sobre proteínas y genes implicados en el cáncer (por ejemplo, el cáncer humano), y sobre la detección, el diagnóstico y el tratamiento del cáncer.

Muchos cánceres se caracterizan por alteraciones en los sistemas de señalización celular que llevan a un control aberrante de los procesos celulares, incluyendo el crecimiento y la proliferación. Estas alteraciones son causadas a menudo por cambios en la actividad de proteínas de señalización concretas, tales como las quinasas.

10 En algunos casos, la expresión o actividad aberrante de las proteínas quinasa puede ser el agente causativo del cáncer (y un motor del mismo). La expresión o actividad aberrante puede ser causada, por ejemplo, por mutaciones activadoras que aumenten la actividad quinasa de la proteína, la fusión de la proteína (o de la porción quinasa de la misma) con una proteína secundaria (o porción de la misma), la expresión de una porción truncada de la proteína, o mediante la regulación anormal de la expresión de la proteína de longitud máxima.

15 El papel oncogénico de los receptores de tirosina quinasa (RTK) ha sido implicado en cánceres sanguíneos tales como el linfoma y la leucemia, así como en muchos tipos de cánceres tumorales sólidos, incluyendo el cáncer de pulmón, el cáncer de colon, el cáncer hepático, el cáncer cerebral y el cáncer de mama. Desgraciadamente, el cáncer de tumores sólidos, a menudo, no es diagnosticado en una fase temprana, y, a menudo, no responde por completo a la cirugía, ni siquiera cuando es combinada con quimioterapia o radioterapia. Por ejemplo, el carcinoma no microcítico de pulmón NSCLC es la causa principal de fallecimiento por cáncer en los Estados Unidos, y
20 representa aproximadamente el 87% de todos los cánceres de pulmón. Véase *"Cancer Facts and Figures 2005"*, American Cancer Society.

Por ello, sería útil descubrir nuevas formas de identificar el cáncer en una fase temprana, y nuevas maneras (y nuevos reactivos) de tratar el cáncer.

25 Chenguang Li et al. "Spectrum of Oncogenic Driver Mutations in Lung Adenocarcinomas from East Asian Never Smokers", PLOS ONE, vol. 6, nº 11, 30 de noviembre de 2011, página e28204, divulga la detección, en una muestra biológica de un paciente que tiene cáncer, de la presencia de un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad quinasa ROS1 y de la presencia de un EGFR mutante.

Compendio

La invención es según se reivindica en las reivindicaciones 1-13.

30 Esta divulgación se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que en los tumores pueden coexpresarse mutaciones del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y fusiones del oncogén 1 c-ros (ROS1). Este descubrimiento puede permitir la identificación de pacientes cuyos tumores pueden beneficiarse de una terapia con uno o ambos de un producto terapéutico inhibidor de EGFR o un producto terapéutico inhibidor de ROS1.

35 En consecuencia, en un aspecto, la divulgación presenta métodos que incluyen detectar, en una muestra biológica de un paciente que tiene o se sospecha que tiene cáncer, la presencia de un polipéptido que tiene actividad quinasa ROS1 o de un polinucleótido que codifique al mismo, y detectar, en la muestra biológica, la presencia de un polipéptido EGFR mutante o de un polinucleótido que codifique al mismo. En algunas realizaciones, la muestra procede de un tumor. En algunas realizaciones, la muestra procede del pulmón del paciente. La muestra puede proceder de un cáncer o carcinoma; por ejemplo, un cáncer de pulmón (por ejemplo, un cáncer no microcítico de
40 pulmón).

El polipéptido que tiene actividad quinasa ROS1 puede ser, por ejemplo, una fusión ROS1. Fusiones ROS1 ejemplares incluyen proteínas de fusión SLC34A2-ROS1, proteínas de fusión CD74-ROS1 y proteínas de fusión FIG-ROS1, proteínas de fusión TPM3-ROS1 (Takeuchi et al., 2012, Nat. Med., 18:378-381), proteínas de fusión SDC4-ROS1 (id.), proteínas de fusión EZR-ROS1 (id.) y proteínas de fusión LRIG3-ROS1 (id.).

45 El polipéptido EGFR mutante puede incluir una mutación en el dominio quinasa del EGFR. Mutaciones ejemplares incluyen delecciones en el exón 19 y la mutación de la leucina del residuo 858 en arginina (L858R).

Una o ambas de la detección de la presencia de un polipéptido que tiene actividad quinasa ROS1 y la detección de la presencia de un polipéptido EGFR mutante pueden incluir, por ejemplo, el uso de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo específico a una fusión ROS1 o a un EGFR mutante) y/o el uso de espectrometría de masas. Una o
50 ambas de la detección de la presencia de un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad quinasa ROS1 y la detección de la presencia de un polinucleótido que codifica un polipéptido EGFR mutante pueden incluir, por ejemplo, el uso de una o más de una hibridación *in situ*, una amplificación de ácidos nucleicos y una secuenciación de ácidos nucleicos.

En algunas realizaciones, los métodos incluyen, además, tratar al paciente con uno o ambos de un inhibidor de la actividad quinasa ROS1 y un inhibidor de EGFR. En algunas realizaciones, el paciente es tratado con un compuesto que inhibe la actividad quinasa ROS1 y EGFR; por ejemplo, AP26113.

En otro aspecto, la divulgación presenta métodos de tratamiento de cáncer en un paciente que incluyen determinar que una muestra biológica procedente de un tumor del paciente incluye un polipéptido que tiene actividad quinasa ROS1 o un polinucleótido que codifica al mismo y un polipéptido EGFR mutante o un polinucleótido que codifica al mismo y administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de ROS1 (por ejemplo, crizotinib, ASP3026, NVP TAE-684, CH5424802 y AP26113) y un inhibidor de EGFR (por ejemplo, gefitinib, erlotinib, cetuximab, afatinib, necitumumab, nimotuzumab, PF299804, RO5083945, ABT-806 y AP26113), tratando con ello de cáncer al paciente.

En algunas realizaciones, el tumor es un cáncer de pulmón; por ejemplo, un carcinoma o cáncer no microcítico de pulmón.

El polipéptido que tiene actividad quinasa ROS1 puede ser, por ejemplo, una fusión ROS1. Fusiones ROS1 ejemplares incluyen proteínas de fusión SLC34A2-ROS1, proteínas de fusión CD74-ROS1, y proteínas de fusión FIG-ROS1.

El polipéptido EGFR mutante puede incluir una mutación en el dominio quinasa del EGFR. Mutaciones ejemplares incluyen delecciones en el exón 19 y la mutación de la leucina del residuo 858 en arginina (L858R).

En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos de tratamiento de cáncer en un paciente que incluyen: detectar la presencia, en una muestra biológica de un paciente que tiene o se sospecha que tiene cáncer, de uno o más polipéptidos seleccionados del grupo constituido por un polipéptido que tiene actividad quinasa ROS1, un polipéptido que tiene actividad quinasa de la quinasa de linfoma anaplásico (ALK) y un polipéptido EGFR mutante; y administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más de un producto terapéutico inhibidor de ALK/ROS1 y un producto terapéutico inhibidor de EGFR, tratando con ello de cáncer al paciente. En algunas realizaciones, la etapa de detección se lleva a cabo usando un reactivo que se une específicamente a un polipéptido que tiene actividad quinasa ROS1, a un polipéptido que tiene actividad quinasa ALK o a un polipéptido EGFR mutante.

En algunas realizaciones, la etapa de detección se lleva a cabo usando un reactivo que se une específicamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad quinasa ROS1, a un polipéptido que tiene actividad quinasa ALK o a un polipéptido EGFR mutante.

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona métodos para identificar a un paciente con cáncer o que se sospecha que tiene cáncer como un paciente que es probable que responda a un producto terapéutico inhibidor de ALK que incluyen: poner en contacto una muestra biológica del paciente con un primer reactivo que se une específicamente a un polipéptido que tiene actividad quinasa ROS1 y con un segundo reactivo que se une específicamente a un polipéptido que tiene actividad quinasa ALK, y detectar si el primer reactivo o el segundo reactivo se une específicamente a la muestra biológica, identificando la detección de la unión a la muestra biológica ya sea del primer reactivo o del segundo reactivo al paciente como un paciente que es probable que responda a un producto terapéutico inhibidor de ALK.

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona métodos para identificar a un paciente con cáncer o que se sospecha que tiene cáncer como un paciente que es probable que responda a un producto terapéutico inhibidor de ALK que incluyen: poner en contacto una muestra biológica del paciente con un primer reactivo que se une específicamente a un polipéptido que tiene actividad quinasa ROS1 o que se une específicamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad quinasa ROS1 y con un segundo reactivo que se une específicamente a un polipéptido que tiene actividad quinasa ALK o que se une específicamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad quinasa ALK, y detectar si el primer reactivo o el segundo reactivo se une específicamente a la muestra biológica, identificando la detección de la unión a la muestra biológica ya sea del primer reactivo o del segundo reactivo al paciente como un paciente que es probable que responda a un producto terapéutico inhibidor de ALK.

En diversas realizaciones, el primer reactivo se une específicamente a una proteína quinasa ROS1 de longitud máxima. En diversas realizaciones, el segundo reactivo se une específicamente a una proteína quinasa ALK de longitud máxima. En diversas realizaciones, el primer reactivo se une específicamente al dominio quinasa de la proteína quinasa ROS1. En diversas realizaciones, el segundo reactivo se une específicamente al dominio quinasa de la proteína quinasa ALK. En algunas realizaciones, el primer reactivo es un anticuerpo. En algunas realizaciones, el segundo reactivo es un anticuerpo.

En diversas realizaciones de los métodos anteriores, el paciente es un paciente humano y el cáncer (o presunto cáncer) es de un ser humano. En algunas realizaciones, el producto terapéutico inhibidor de ROS1 o el producto terapéutico inhibidor de ALK es PF-02341066, NVP TAE-684 o AP26113. En algunas realizaciones, el producto terapéutico inhibidor de ROS1 o el producto terapéutico inhibidor de ALK es AP26113, CEP-14083, CEP-14513, CEP11988, CH5424802, WHI-P131 y WHI-P154.

En diversas realizaciones de los anteriores métodos, la muestra biológica es del cáncer o presunto cáncer del paciente. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer tumoral sólido. En algunas realizaciones, el cáncer es leucemia. En algunas realizaciones, el cáncer es linfoma. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer de pulmón (por ejemplo, un carcinoma no microcítico de pulmón o un carcinoma microcítico de pulmón). En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer cerebral (por ejemplo, glioblastoma). En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer hepático (por ejemplo, colangiocarcinoma). En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de colon. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de mama. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de ovario.

En realizaciones adicionales de los anteriores métodos, la muestra biológica se selecciona del grupo constituido por una biopsia tumoral, un lavado broncoalveolar, una célula tumoral circulante, una resección tumoral, una muestra aspirativa con aguja fina, un nodo linfático, una muestra de médula ósea y un derrame (por ejemplo, un derrame pleural).

En algunas realizaciones de los anteriores métodos, los reactivos de detección (por ejemplo, anticuerpos) están marcados de manera detectable. En otra realización, un reactivo (o primer reactivo) se une específicamente a un polipéptido ROS1 de longitud máxima. En otra realización, un reactivo (o primer reactivo) se une específicamente a un dominio quinasa ROS1. En otra realización, un reactivo (o primer reactivo) se une específicamente a un polipéptido de fusión ROS1 (por ejemplo, se une específicamente a un polipéptido de fusión CD74-ROS1, un polipéptido SLC34A2-ROS1(S), un polipéptido SLC34A2-ROS1(L), un polipéptido SLC34A2-ROS1(VS), un polipéptido FIG-ROS1(L), un polipéptido FIG-ROS1(S) o un polipéptido FIG-ROS1(VL). En diversas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad quinasa ROS1 (al que se une específicamente un reactivo de detección) incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 24, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 5, o la SEQ ID NO: 11. Estas fusiones ROS1 han sido descritas anteriormente (véanse las publicaciones de patentes estadounidenses n^{os} 20100221737 y 20100143918, y la publicación de PCT n^o WO2010/09392).

En algunas realizaciones de los anteriores métodos, un reactivo (o primer reactivo, por ejemplo) se une específicamente a un polipéptido ALK de longitud máxima. En algunas realizaciones, el reactivo se une específicamente a un dominio quinasa ALK. En algunas realizaciones, el reactivo (o segundo reactivo) se une específicamente a un polipéptido de fusión ALK seleccionado del grupo constituido por NPM-ALK, ALO17-ALK, TFG-ALK, MSN-ALK, TPM3-ALK, TPM4-ALK, ATIC-ALK, MYH9-ALK, CLTC-ALK, SEC31L1-ALK RANBP2-ALK CARS-ALK EML4-ALK, KIF5B-ALK y TFG-ALK.

En diversas realizaciones de los anteriores métodos, el polipéptido que tiene actividad quinasa ROS1 es un polipéptido ROS1 de longitud máxima. En otra realización, el polipéptido es un polipéptido de fusión ROS1. En otra realización, el polipéptido de fusión ROS1 se selecciona del grupo constituido por un polipéptido de fusión CD74-ROS1, un polipéptido SLC34A2-ROS1(S), un polipéptido SLC34A2-ROS1(L), un polipéptido SLC34A2-ROS1(VS), un polipéptido FIG-ROS1 (L), un polipéptido FIG-ROS1(S) y un polipéptido FIG-ROS1(VL). En diversas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad quinasa ROS1 incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 24, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 26, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 11.

En diversas realizaciones de los anteriores métodos, el polipéptido que tiene actividad quinasa ALK es un polipéptido ALK de longitud máxima. En otra realización, el polipéptido es un polipéptido de fusión ALK. En otra realización, el polipéptido de fusión ALK se selecciona del grupo constituido por NPM-ALK, ALO17-ALK, TFG-ALK, MSN-ALK, TPM3-ALK, TPM4-ALK, ATIC-ALK, MYH9-ALK, CLTC-ALK, SEC31L1-ALK, RANBP2-ALK, CARS-ALK, EML4-ALK, KIF5B-ALK y TFG-ALK.

En algunas realizaciones, los anteriores métodos son implementados en un formato seleccionado del grupo constituido por un ensayo de citometría de flujo, un ensayo de quinasa *in vitro*, un ensayo de inmunohistoquímica (IHC), un ensayo de inmunofluorescencia (IF), un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y un ensayo de análisis por transferencia de tipo Western.

En algunas realizaciones de los anteriores métodos, se detecta la actividad quinasa de un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido que tenga actividad quinasa ALK, un polipéptido que tenga actividad quinasa ROS1 o un polipéptido EGFR mutante). En realizaciones adicionales, un reactivo de detección es un péptido marcado con isótopos pesados (AQUA). En otra realización, el péptido marcado con isótopos pesados (AQUA) incluye una secuencia de aminoácidos que incluye una unión de la fusión de un polipéptido de fusión ROS1, una unión de la fusión de un polipéptido de fusión ALK o un fragmento de un polipéptido EGFR mutante que incluya una secuencia mutante de aminoácidos. En otra realización, el método es implementado usando un análisis de espectrometría de masas.

En algunas realizaciones, cuando se detecta el polinucleótido, un reactivo de detección (o el primer reactivo y el segundo reactivo, por ejemplo) es una sonda de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, el reactivo está marcado de manera detectable. En otra realización, la sonda de ácidos nucleicos es una sonda de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y dicho método es implementado en un ensayo FISH. En otra realización, la sonda de ácidos nucleicos es una sonda de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y dicho método es implementado en un ensayo PCR.

En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos para inhibir el avance de un cáncer en un mamífero o de un presunto cáncer en un mamífero que exprese uno o más de un polipéptido que tiene actividad quinasa ROS1, un polipéptido que tiene actividad quinasa ALK y un polipéptido EGFR mutante, incluyendo dichos métodos la etapa de inhibir la expresión y/o la actividad de uno o más del polipéptido que tiene actividad quinasa ROS1, el polipéptido que tiene actividad quinasa ALK y el polipéptido EGFR mutante en dicho cáncer en un mamífero o presunto cáncer en un mamífero.

En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos para inhibir el avance de un cáncer en un mamífero o de un presunto cáncer en un mamífero que exprese uno o más polinucleótidos que codifiquen un polipéptido que tiene actividad quinasa ROS1, un polipéptido que tiene actividad quinasa ALK y un polipéptido EGFR mutante que incluyen una etapa de inhibir la expresión de uno o más de los polinucleótidos en dicho cáncer en un mamífero o presunto cáncer en un mamífero.

En aspectos adicionales, la divulgación proporciona métodos para determinar si un compuesto inhibe el avance de un cáncer de pulmón en un mamífero o presunto cáncer de pulmón en un mamífero caracterizado por la expresión de un primer polipéptido con actividad ROS1, de un segundo polipéptido con actividad ALK, y/o de un tercer polipéptido con actividad EGFR que incluyen una etapa de determinar si dicho compuesto inhibe la expresión de dicho primer, segundo o tercer polipéptido en dicho cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer procede de un ser humano.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1F son fotografías que muestran resultados de inmunohistoquímica y FISH de proteína ROS1 y ácido nucleico ROS1 en tejidos tumorales FFPE de cáncer no microcítico de pulmón (NSCLC). La variación en la localización de la proteína ROS1 es mostrada como sigue: (A) Citoplasmática difusa, indicando las flechas amarillas del recuadro (A) la translocación equilibrada del locus *c-ros* mediante FISH. (B) Localización punteada con intensidad de ROS1 en un adenocarcinoma, con ampliación (es decir, una imagen ampliada) en el recuadro. (C) Localización citoplasmática de la tinción de ROS1 en un carcinoma megacítico y correspondiente a la tinción con hematoxilina y eosina en el panel E. (D) Adenocarcinoma con tinción citoplasmática única y localización de la membrana, con ampliación en el recuadro que muestra la tinción de la membrana. (E) Tinción con hematoxilina y eosina correspondiente a la tinción de ROS1 en el panel C. (F) Tinción vesicular punteada con ampliación en el recuadro que muestra la tinción vesicular.

Las Figuras 2A y B son imágenes que muestran la detección específica de la fusión/translocación ROS1 (en una línea celular de NSCLC humano) mediante FISH usando una sonda bicolor de escisión. La Figura 2A muestra las localizaciones en el gen ROS1 en las que se hibridan las sondas FISH, y la Fig. 2B muestra la reordenación del gen ROS1 en una línea celular de NSCLC humano (izquierda) y en un tumor de NSCLC humano, dando como resultado señales anaranjada y verde separadas.

La Fig. 3 es un diagrama esquemático que muestra dónde se hibridan las sondas de ADN de los dos conjuntos de sondas con el gen ROS1 y el gen FIG. La sonda proximal de ambos conjuntos de sondas, concretamente la RP1-179P9, dará una señal anaranjada, mientras que las tres sondas distales darán una señal verde. El conjunto 1 de sondas se derivó de *c-ros*, y si se produce una translocación equilibrada, el anaranjado se separará del verde; sin embargo, si se produce una translocación FIG-ROS1, la señal verde desaparecerá. El conjunto 2 de sondas se derivó de *c-ros* (RP1-179P9 anaranjada) y *fig* (RP11-213A17 verde).

Las Figuras 4A-4F son fotografías que muestran los resultados de un análisis FISH de células HCC78 (paneles A y B), células U118MG (paneles C y D) y células tumorales FFPE con ID 749 (paneles E y F). Las células HCC78 sometidas a sondeo con el conjunto 1 de sondas (A) y el conjunto 2 de sondas (B) muestran los resultados previstos de la fusión SLC34A2-ROS1 presente en estas células. Las flechas amarillas apuntan a señales de escisión indicativas de una translocación equilibrada en las células HCC78, y las flechas blancas apuntan a un cromosoma intacto. Las células U118MG sometidas a sondeo con el conjunto 1 de sondas (C) y el conjunto 2 de sondas (D) muestran los resultados previstos de la fusión FIG-ROS1 presente en estas células. El tumor 749 FFPE sometido a sondeo con el conjunto 1 de sondas (E) y el conjunto 2 de sondas (F) es idéntico a las células U118MG. Tanto en U-118 MG como en el tumor ID 749 sometidos a sondeo con el conjunto 1 de sondas solo se hibrida la sonda *c-ros* (anaranjada), y la región eliminada (sonda verde) no está presente (paneles C y E, respectivamente). En U-118 MG y el tumor ID 749 sometidos a sondeo con el conjunto 2 de sondas (paneles E y F, respectivamente), se juntan las sondas *c-ros* (anaranjada) y *fig* (verde), indicación una fusión *fig-ros*.

La Figura 5 muestra los resultados de la secuenciación de ADNc de la proteína de fusión ROS1 a partir del tumor 749 (en la línea "sujeto") y su alineamiento con la secuencia de nucleótidos FIG-ROS1(S) (como "consulta").

La Fig. 6 es un gráfico de líneas que muestra la respuesta de crecimiento celular en presencia de 0nM, 3nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM o 1000 nM de TAE-684 de BaF3 que expresan FIG-ROS1(S) (cuadrados rojos), BaF3 que expresan FIG-ROS1(L) (rombos azules), BaF3 que expresan FLT3ITD (triángulos verdes), y células Karpas 299 (equis moradas).

La Fig. 7 es un gráfico de barras que muestra que las BaF3 que expresan ya sea FIG-ROS1(S) o FIG-ROS1(L) mueren por apoptosis en presencia de TAE-684.

La Fig. 8 es una representación de un análisis por transferencia de tipo Western que muestra que TAE-684 inhibe la fosforilación tanto de FIG-ROS1(S) como de FIG-ROS1(L), así como de sus moléculas de señalización subsiguientes.

Las Figuras 9A y 9B son gráficos de líneas que muestran la respuesta de crecimiento celular en presencia de TAE-684 (Fig. 9A) o crizotinib (Fig. 9B) a 0uM, 0,01uM, 0,03uM, 0,10uM, 0,3uM, 1,0uM de células BaF3 transducidas con neo-myc (control negativo; rombos azules); BaF3 que expresan FIG-ROS1(S) (equis moradas), BaF3 que expresan FIG-ROS1(L) (triángulos verdes), BaF3 que expresan FLT3ITD (cuadrados rojos), y células Karpas 299 (asteriscos azules).

La Fig. 10 es una representación de un análisis por transferencia de tipo Western que muestra que el crizotinib inhibe la fosforilación tanto de FIG-ROS1(S) como de FIG-ROS1(L), así como de ALK y de moléculas de señalización adicionales.

Las Figuras 11A-D son fotomicrografías que representan la tinción inmunohistoquímica de EGFR mutante del caso 147 de adenocarcinoma de pulmón, positivo a ROS1/L858R, tincionado con anticuerpos ROS1 D4D6 (11A), EGFR total (11B), EGFR L858R (11C) y EGFR A746-E750del (11D).

Las Figuras 11E-H son fotomicrografías que representan la tinción inmunohistoquímica de EGFR mutante del caso 702 de adenocarcinoma de pulmón, positivo a ROS1/EGFR A746-E750del, tincionado con anticuerpos ROS1 D4D6 (11E), EGFR total (11F), EGFR A746-E750 (11G) y EGFR L858R (11H).

Descripción detallada de las realizaciones preferentes

Esta se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que en los tumores pueden coexpresarse mutaciones de EGFR y fusiones de ROS1. Este descubrimiento puede permitir la identificación de pacientes cuyos tumores pueden beneficiarse de una terapia con uno o ambos de un producto terapéutico inhibidor de los sistemas del EGFR o un producto terapéutico inhibidor de los sistemas de ROS1.

A continuación, se describen con mayor detalle aspectos, ventajas y realizaciones adicionales. Cualquier conflicto entre una definición de una palabra o frase según se entiende en la técnica y una definición de una palabra o frase según se enseña específicamente en esta memoria será resuelta a favor de esta. Según se usan en la presente memoria, los siguientes términos tienen los significados indicados. Según se usan en esta memoria, las formas singulares, “un”, “una” y “el” y “la” también abarcan, específicamente, las formas plurales de los términos a los que se refieren, a no ser que el contexto dicte claramente algo distinto. En la presente memoria, la expresión “alrededor de” es usada con el significado de aproximadamente, en las inmediaciones de, en líneas generales o en el entorno de. Cuando se usa el término “aproximadamente” junto con un intervalo numérico, modifica ese intervalo extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos expresados. En general, el término “aproximadamente” es usado en la presente memoria para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor indicado con 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 divulgación, a no ser que se defina algo distinto. En la presente memoria se hace referencia a diversas metodologías y a diversos materiales conocidos a los expertos en la técnica. Obras estándar de referencia que presentan los principios generales de la tecnología de anticuerpos de ADN recombinante incluyen Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1988), Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, Nueva York (1989 y actualizaciones hasta septiembre de 2010), Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1989); Kaufman et al., ed., *Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology in Medicine*, CRC Press, Boca Ratón (1995); McPherson, ed., *Directed Mutagenesis: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford (1991). Obras estándar de referencia que presentan los principios generales de farmacología incluyen Goodman y Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11ª ed., McGraw Hill Companies Inc., Nueva York (2006).

En consecuencia, en un primer aspecto, la divulgación proporciona métodos de tratamiento de cáncer en un paciente que incluyen: detectar, en una muestra biológica de un paciente que tiene o se sospecha que tiene cáncer, la presencia de uno o más de un polipéptido seleccionado del grupo constituido por un polipéptido que tiene actividad quinasa ROS1 y un polipéptido EGFR mutante; y administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o ambos de un producto terapéutico inhibidor de los sistemas del EGFR o un producto terapéutico inhibidor de los sistemas de ROS1, tratando con ello el cáncer del paciente. En algunas realizaciones, la etapa de detección se lleva a cabo usando un reactivo que se une específicamente ya sea a un polipéptido que tiene actividad quinasa ROS1 o a un polipéptido EGFR mutante.

La proteína quinasa ROS1 humana (codificada por el gen ROS1) es una tirosina quinasa receptora de 2347 aminoácidos de longitud que es propensa a una expresión aberrante, que conduce al cáncer. Puede encontrarse

una descripción de la quinasa ROS1 humana de longitud máxima (con la secuencia de aminoácidos de la proteína ROS1 humana) en el n° de acceso P08922 de UniProt. Según se muestra en la Tabla 1, los dominios de péptidos señal, extracelular, transmembranoso y quinasa de ROS1 se encuentran en los siguientes residuos de aminoácidos en la SEQ ID NO: 1:

5

Tabla 1

Dominio	Residuos de aminoácidos en la SEQ ID NO: 1
Péptido señal	1-27
Dominio extracelular	28-1859
Dominio transmembranoso	1860-1882
Dominio quinasa	1945-2222

En la presente memoria, se proporciona la secuencia de ADN codificante de ROS1 humano como la SEQ ID NO: 2.

Además, hay múltiples variantes conocidas de ROS1 que se presentan de forma natural (véase, por ejemplo, Greenman et al., Nature 446: 153-158, 2007). Se conocen las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de ROS1 murino de longitud máxima (véase, por ejemplo, el n° de acceso Q78DX7 de UniProt). Usando experimentación rutinaria, el biólogo con un dominio normal de la técnica sería fácilmente capaz de determinar las secuencias correspondientes en homólogos ROS1 en mamíferos no humanos.

10

Con ROS1 en su "forma natural" se quiere decir la expresión y/o la activación de la quinasa ROS1 de longitud máxima (es decir, para el ROS1 humano, el polipéptido de 2347 aminoácidos de longitud o el polipéptido de 2320 aminoácidos de longitud tras la eliminación de la secuencia de péptidos señal) en tejido sano (o normal) (por ejemplo, tejido no canceroso) de un individuo normal (por ejemplo, un individuo normal que no padezca cáncer). No parece que la quinasa ROS1 (de longitud máxima o troncada) sea expresada en tejido pulmonar normal en seres humanos (por ejemplo, véase posteriormente en los Ejemplos). Sin embargo, usando los métodos descritos en los posteriores Ejemplos, los inventores han hecho el sorprendente descubrimiento de la expresión de la quinasa ROS1 en el cáncer de pulmón. Tal expresión en una célula atípica (en este caso, una célula cancerosa) cuando no se ve expresión alguna en una célula típica (por ejemplo, una célula no cancerosa del pulmón) es aberrante.

15

20

Se ha documentado la quinasa ROS1 expresada aberrantemente, en forma de una fusión con otra proteína, concretamente FIG, en una línea celular de glioblastoma (véanse Charest et al., Genes Chromosomes Cancer 37: 58-71, 2003; Charest et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 916-921, 2003) y en cáncer hepático (véase, por ejemplo, la publicación de PCT n° WO2010/093928).

25

Según se la usa aquí, la expresión "fusión ROS1" se refiere a una porción del polipéptido ROS1 que incluye el dominio quinasa de la proteína ROS1 (o el polinucleótido que codifica la misma) fusionada a la totalidad o a una porción de otro polipéptido (o polinucleótido que codifique el mismo), nombrándose en la fusión el nombre de ese segundo polipéptido o polinucleótido. (El término "fusión" significa simplemente la totalidad o una porción de un polipéptido o polinucleótido del primer gen fusionada a la totalidad o a una porción de un polipéptido o un polinucleótido de un segundo gen). Por ejemplo, una fusión SLC34A2-ROS1 es una fusión entre una porción del polipéptido SLC34A2 (o del polinucleótido que codifica el mismo) y una porción del polipéptido ROS1 (o del polinucleótido que codifica el mismo) que incluye el dominio quinasa ROS1. Una fusión ROS1 resulta a menudo de una translocación o inversión cromosómica. Hay numerosas fusiones ROS1 conocidas, resultando útiles en la presente memoria la totalidad de las fusiones ROS1, e incluyen, sin limitación, las proteínas de fusión SLC34A2-ROS1, cuyos miembros incluyen SLC34A2-ROS1(VS), SLC34A2-ROS1(S), SLC34A2-ROS1(L) (véase la publicación de patente estadounidense n° 20100143918), CD74-ROS1 (véase la publicación de patente estadounidense n° 20100221737), las proteínas de fusión FIG-ROS1, cuyos miembros incluyen FIG-ROS1(S), FIG-ROS1(L) y FIG-ROS1(XL) (véase la publicación de PCT n° WO2010/093928), las proteínas de fusión TPM3-ROS1 (Takeuchi et al., 2012, Nat. Med., 18:378-381), las proteínas de fusión SDC4-ROS1 (id.), las proteínas de fusión EZR-ROS1 (id.) y las proteínas de fusión LRIG3-ROS1 (id.). Véase también el documento WO 2011/0162295.

30

35

40

Todas las proteínas de fusión ROS1 conocidas incluyen el dominio quinasa completo de ROS1 de longitud máxima. Así, según se usa la expresión en la presente memoria, con "polipéptido con actividad quinasa ROS1" (o "polipéptido que tiene actividad quinasa ROS1") se quiere decir una proteína (o un polipéptido) que incluye el dominio quinasa completo de la proteína ROS1 de longitud máxima y que, así, retiene la actividad quinasa ROS1. Ejemplos no limitantes de proteínas con actividad quinasa ROS1 incluyen, sin limitación, la proteína ROS1 de longitud máxima, las proteínas de fusión SLC34A2-ROS1, cuyos miembros incluyen SLC34A2-ROS1(VS), SLC34A2-ROS1(S), SLC34A2-ROS1(L) (véase la publicación de patente estadounidense n° 20100143918), CD74-ROS1 (véase la publicación de patente estadounidense n° 20100221737) y las proteínas de fusión FIG-ROS1, cuyos miembros incluyen FIG-ROS1 (S), FIG-ROS1 (L) y FIG-ROS1 (XL) (véase la publicación de PCT n° WO2010/093928), y cualquier forma troncada o mutada de la quinasa ROS1 que retenga el dominio quinasa de la proteína quinasa ROS1 de longitud máxima. Dado que el dominio quinasa de ROS1 está definido en la SEQ ID NO: 27, un

45

50

“polipéptido con actividad quinasa ROS1” es aquel cuya secuencia de aminoácidos incluya la SEQ ID NO: 27 o una secuencia idéntica a la SEQ ID NO: 27 en al menos un 95%.

La ALK (quinasa de linfoma anaplásico) es una tirosina quinasa receptora de 1620 aminoácidos de longitud que es propensa a una expresión aberrante, que conduce al cáncer. Puede encontrarse una descripción de la quinasa ALK humana de longitud máxima (con la secuencia de aminoácidos de la proteína ALK humana) en el n° de acceso Q9UM73 de UniProt (véase también la patente estadounidense n° 5.770.421, titulada “Human ALK Protein Tyrosine Kinase”). Según se muestra en la Tabla 2, los dominios de péptidos señal, extracelular, transmembranoso y quinasa de ALK se encuentran en los siguientes residuos de aminoácidos en la SEQ ID NO: 35:

Tabla 2

Dominio	Residuos de aminoácidos en la SEQ ID NO: 71
Péptido señal	1-18
Dominio extracelular	19-1038
Dominio transmembranoso	1039-1059
Dominio quinasa	1116-1392

Además, hay múltiples variantes conocidas de ALK que se presentan de forma natural (véase, por ejemplo, Greenman et al., Nature 446: 153-158, 2007). Se conocen las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de ALK murino de longitud máxima (véase, por ejemplo, lawahara et al., Oncogene 14: 439-449, 1997). Usando experimentación rutinaria, el biólogo con un dominio normal de la técnica sería fácilmente capaz de determinar las secuencias correspondientes en homólogos ALK en mamíferos no humanos.

Con ALK en su “forma natural” se quiere decir la expresión y/o la activación de la quinasa ALK de longitud máxima (es decir, el polipéptido de 1620 aminoácidos de longitud o el polipéptido de 1602 aminoácidos de longitud tras la eliminación de la secuencia de péptidos señal) en tejido sano (o normal) (por ejemplo, tejido no canceroso) de un individuo normal (por ejemplo, un individuo normal que no padezca cáncer). Pulford et al., J. Cell. Physiol., 199:330-358, 2004, proporciona una reseña exhaustiva relativa a polipéptidos ALK y de fusión que incluyen porciones del polipéptido ALK de longitud máxima. En seres humanos normales, la expresión de ALK de longitud máxima ha sido detectada en el cerebro y en el sistema nervioso central, y ha sido documentada en el intestino delgado y el testículo (véase, por ejemplo, Morris et al., Oncogene 14:2175-88, 1997). Sin embargo, no parece que la quinasa ALK (de longitud máxima o truncada) sea expresada en tejido ovárico normal en seres humanos, hallazgo que los inventores han confirmado usando diversos anticuerpos específicos al ALK disponibles comercialmente (por ejemplo, los n°s de catálogo 3791, 3633 y 3333 de Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Massachusetts). Sin embargo, usando los métodos descritos en los posteriores Ejemplos, los inventores han hecho el sorprendente descubrimiento de la expresión de la quinasa ALK en el cáncer de ovario. Tal expresión en una célula atípica (en este caso, una célula cancerosa) cuando no se ve expresión alguna en una célula típica (por ejemplo, una célula no cancerosa del ovario) es aberrante.

Se han encontrado en otros cánceres numerosos ejemplos de la quinasa ALK expresada aberrantemente. Por ejemplo, se han encontrado mutaciones puntuales dentro del dominio quinasa en el neuroblastoma, se ha encontrado sobreexpresión de ALK en numerosos cánceres (incluyendo, por ejemplo, retinoblastoma, cáncer de mama y melanoma), y se han descubierto proteínas de fusión que incluyen el dominio quinasa (pero no el dominio transmembranoso) de ALK fusionadas con la totalidad o una porción de una segunda proteína en diversos cánceres, incluyendo el cáncer no microcítico de pulmón (NSCLC) en el tumor miofibroblástico inflamatorio. Véase la reseña en Palmer et al., Biochem. J. 420: 345-361 (2009).

En consecuencia, según se la usa aquí, la expresión “fusión ALK” se refiere a una porción del polipéptido ALK que incluye el dominio quinasa de ALK (o el polinucleótido que codifica la misma) fusionada a la totalidad o a una porción de otro polipéptido (o polinucleótido que codifique el mismo), nombrándose en la fusión el nombre de ese segundo polipéptido o polinucleótido. (El término “fusión” significa simplemente la totalidad o una porción de un polipéptido o polinucleótido del primer gen fusionada a la totalidad o a una porción de un polipéptido o un polinucleótido de un segundo gen). Por ejemplo, una fusión NPM-ALK es una fusión entre una porción del polipéptido o polinucleótido NPM y una porción del polipéptido ALK (o del polinucleótido que codifica el mismo) que incluye el dominio quinasa de ALK. Una fusión ALK resulta a menudo de una translocación o inversión cromosómica. Hay numerosas fusiones ALK conocidas, resultando útiles en la presente memoria la totalidad de las fusiones ALK, e incluyen, sin limitación, NPM-ALK, AL017-ALK, TFG-ALK, MSN-ALK, TPM3-ALK, TPM4-ALK, ATIC-ALK, MYH9-ALK, CLTC-ALK, SEC31L1-ALK, RAKBP2-ALK, CARS-ALK, EML4-ALK KIF5B-ALK y TFG-ALK (véanse, por ejemplo, Palmer et al., Biochem. J. 420:345-361, 2009 (y los artículos ahí citados), la patente estadounidense n° 5.770.421; Rikova et al., Cell 131: 1190-1203, 2007; Soda et al., Nature 448: 561-566, 2007; Morri et al., Science 263: 1281-84, 1994; Du et al., J. Mol. Med 84: 863-875, 2007; Panagopoulos et al., Int. J. Cancer 118: 1181-86, 2006; Cools et al., Genes

Chromosomes Cancer 34: 354-362, 2002; Debelenko et al., Lab. Invest. 83: 1255-65, 2003; Ma et al., Genes Chromosomes Cancer 37: 98-105, 2003; Lawrence et al., Am. J. Pathol. 157: 377-384, 1995; Hernández et al., Blood 94: 3265-68, 1999; Takeuchi K., Clin Cancer Res. 15:3143-49, 2009; Tort et al., Lab. Invest. 81: 419-426, 2001; Trinei et al., Cancer Res. 60: 793-798, 2000; y Touriol et al., Blood 95: 3204-07, 2000. Algunas de estas fusiones

5 ALK tienen múltiples variantes, la totalidad de las cuales son consideradas fusiones ALK y, así, están incluidas en la definición de fusión ALK. Por ejemplo, hay múltiples variantes de TFG-ALK (véase, por ejemplo, Hernández et al., Amer. J. Pathol. 160: 1487-94, 2002) y al menos nueve variantes conocidas de EML4-ALK (véase, por ejemplo, Horn et al., J. of Clinical Oncology 27(26): 4232-35, 2009, las patentes estadounidenses n^{os} 7.700.339 y 7.728.120 y la patente EP n^o 1914240).

10 Según se usa la expresión en la presente memoria, con "polipéptido con actividad quinasa ALK" se quiere decir un polipéptido que incluye el dominio quinasa completo de ALK y que, así, tiene activada la quinasa ALK. Polipéptidos no limitantes con actividad quinasa ALK incluyen ALK de longitud máxima, polipéptidos de fusión ALK (por ejemplo, la fusión NPM-ALK, diversas fusiones EML4-ALK, la fusión ATIC-ALK, la fusión CARS-ALK, la fusión ALO17-ALK, la fusión TFG-ALK, la fusión MSN-ALK, la fusión TPM3-ALK, la fusión TPM4-ALK, la fusión MYH9-ALK, la fusión

15 CLTC-ALK, la fusión SEC31L1-ALK, la fusión RANBP2-ALK, la fusión KIF5B-ALK y la fusión TFG-ALK).

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR; también denominado ErbB-1 y HER1 en seres humanos) es el receptor de superficie celular para miembros de la familia del factor de crecimiento epidérmico (familia EGF) de los ligandos proteínicos extracelulares. En la presente memoria se proporciona la secuencia de aminoácidos de un

20 EGFR humano ejemplar en su forma natural (incluyendo la secuencia de señales) como SEQ ID NO: 3; la secuencia de aminoácidos de human EGFR humano en su forma natural (menos la secuencia de señales) es proporcionada en la presente memoria como SEQ ID NO: 4. La secuencia de nucleótidos de un ARNm de EGFR humano ejemplar en su forma natural es proporcionada en la presente memoria como SEQ ID NO: 9. Se ha demostrado que los pacientes que tienen un cáncer no microcítico de pulmón (NSCLC) que porta una mutación somática del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) son hipersensibles a los inhibidores de la tirosina quinasa de EGFR

25 Gefitinib [Lynch, T.J., et al., N Engl J Med, 2004. 350(21): p. 2129-39, y Páez, J.G., et al., Science, 2004. 304(5676): p. 1497-500] y Erlotinib [Pao, W., et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2004. 101(36): p. 13306-11].

Es sabido que en la molécula de EGFR surgen mutaciones. Tal como se lo usa en la presente memoria, el término "mutante" o "mutación" se refiere a una molécula (por ejemplo, un polipéptido o un polinucleótido) que tiene una estructura diferente de la de la molécula en su forma natural. Esa diferencia en estructura con respecto a la molécula

30 en su forma natural incluye, sin limitación, una secuencia diferente (por ejemplo, una secuencia diferente de aminoácidos o de nucleótidos), secuencias adicionales, secuencias ausentes (es decir, falta una porción de la secuencia), cambios en la modificación (metilación, fosforilación, etc.), y/o fusión de la totalidad o parte de la molécula en su forma natural con otra molécula. Con "forma natural" se quiere decir aquella forma de la molécula que se presenta de manera natural en la mayoría de individuos de la especie de la que se deriva la molécula

35 mutante, y/o la forma de la molécula que se presenta de manera natural en un individuo sano (por ejemplo, no canceroso) de una especie de la que se deriva la molécula mutante. La secuencia de la molécula en su forma natural es la normalmente proporcionada en la base de datos de GenBank. Por ejemplo, se proporciona una secuencia de aminoácidos de EGFR humano en su forma natural en la SEQ ID NO: 3 (sin la secuencia de señales de 24 aminoácidos de longitud) y en la SEQ ID NO: 4 (con la secuencia de señales).

40 Tal como se lo usa en la presente memoria, un "EGFR mutante" incluye cualquier tipo de mutación (es decir, cambio) en una molécula de EGFR que haga que el EGFR mutante sea diferente del EGFR en su forma natural. En algunas realizaciones, la mutación aumenta la actividad quinasa de la molécula de EGFR y/o vuelve una célula tumoral sensible a uno o más inhibidores de EGFR. En algunas realizaciones, la mutación es en el dominio quinasa del EGFR. En algunas realizaciones, la mutación es en uno de los exones 18 a 21 del gen de EGFR humano. Las

45 mutaciones más comunes del EGFR son delecciones dentro del exón 19 (por ejemplo, una delección dentro del marco de 15 pb de nucleótidos en el exón 19 (Del E746-A750) y una mutación puntual que sustituye la leucina con arginina en el codón 858 del exón 21 (L858R). Estas dos clases de EGFR mutantes representan el 85-90% de las mutaciones activantes del EGFR [Riely, G.J., et al, Clin Cancer Res, 2006.12:7232-41]. Las delecciones del exón 19 incluyen: Del E746_A750; Del E746_S752>V; Del E746_T751>A; Del E746_T751; Del L747_A750>P; Del

50 L747_E749; Del L747_P753>Q; Del L747_P753>S; Del L747_S752; Del L747_T751>P; Del L747_T751 y Del S752_I759. Otras mutaciones incluyen T790M, S768I, L861Q, 2240de112, G719C (Lynch et al., supra), G791A y G719S (Páez et al., 2004, Science, 304:1497-1500), y las inserciones en el exón 19 (He et al., 2011, Clin. Cancer Res., 18:1790-97). La capacidad de detectar productos génicos mutados en células cancerosas puede identificar a pacientes con máxima probabilidad de beneficiarse de tales terapias, y hacer ensayos clínicos más eficaces e

55 informativos.

Los EGFR mutantes pueden ser detectados por medios estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden detectarse mutantes en el ámbito de nucleótidos mediante secuenciación, amplificación de ácidos nucleicos usando cebadores y/o sondas específicos a la secuencia de la forma natural o de la mutante, y análisis de amplificación y longitud para detectar mutantes delecionales. Se dan a conocer métodos ejemplares para determinar el estado

60 mutacional del EGFR en Rosell et al., 2009, N. Engl. J. Med., 361:958-967 y Li et al., 2011, PLoS ONE, 6: e28204. Hay conjuntos de reactivos para análisis de ácidos nucleicos disponibles comercialmente; por ejemplo, EGFR Pyro Kit (QIAGEN), EGFR PCR Kit (QIAGEN) y EGFR RGQ PCR Kit (QIAGEN). El conjunto de reactivos EGFR RGQ

PCR es capaz de detectar 29 mutaciones en el gen del EGFR, incluyendo 19 deleciones en el exón 19, T790M, L858R, L861A, S768I y G719X (detecta la presencia de G719S, G719A o G719C, pero no distingue entre ellos).

Pueden detectarse EGFR mutantes específicos en el ámbito polipeptídico (por ejemplo, mediante transferencia de tipo Western o inmunohistoquímica) usando anticuerpos específicos al mutante; por ejemplo, el AcM XP® de conejo del receptor de EGF (específico a E746-A750del) (6B6) o el AcM de conejo del receptor de EGF (específico al mutante L858R) (43B2), ambos de Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, Massachusetts) o péptidos AQUA específicos a la mutación (Stemmann et al., 2001, Cell, 107: 715-726). Pueden prepararse anticuerpos específicos al mutante que se unan específicamente a otros polipéptidos EGFR mutantes identificados. En el documento WO 2009/126306 se dan a conocer anticuerpos ejemplares específicos a mutantes.

Tal como se usa el término en la presente memoria, “polipéptido” (o “secuencia de aminoácidos” o “proteína”) se refiere a un polímero formado a partir del enlace, en un orden definido, de, preferentemente, α -aminoácidos, D-, L-aminoácidos, y combinaciones de los mismos. El enlace entre un residuo de aminoácido y el siguiente se denomina enlace amídico o enlace peptídico. Ejemplos no limitantes de polipéptidos incluyen un oligopéptido, un péptido, un polipéptido o una secuencia de proteínas y fragmentos o porciones de los mismos, y se refieren a moléculas que se presentan de forma natural o sintéticas. Los polipéptidos también incluyen moléculas derivatizadas tales como glicoproteínas y lipoproteínas, así como polipéptidos de menor peso molecular. No se pretende que “secuencia de aminoácidos” y expresiones similares, tales como “polipéptido” o “proteína”, limiten la secuencia indicada de aminoácidos a la secuencia completa nativa de aminoácidos asociada con la molécula proteínica enumerada.

Se reconoce en la técnica que puede hacerse que algunas secuencias de aminoácidos de un polipéptido indicado (por ejemplo, un polipéptido FIG-ROS1(S)) varíen sin efecto significativo en la estructura o en la función de la proteína mutante. Si se contemplan tales diferencias en secuencia, debería recordarse que habrá áreas críticas en la proteína que determinen la actividad (por ejemplo, el dominio quinasa de ROS1). En general, es posible sustituir residuos que forman la estructura terciaria, siempre y cuando se usen residuos que realicen una función similar. En otros casos, el tipo de residuo puede carecer por completo de importancia si la alteración se produce en una región no crítica de la proteína.

Así, un polipéptido con actividad ROS1 o un polipéptido con actividad ALK incluye, además, variantes de los polipéptidos descritos en la presente memoria que presentan actividad quinasa ROS1 o actividad quinasa ALK sustanciales. Algunas sustituciones conservadoras no limitantes incluyen el intercambio de uno por otro entre los aminoácidos alifáticos Ala, Val, Leu e Ile; el intercambio de los residuos de hidroxilo Ser y Thr; el intercambio de los residuos ácidos Asp y Glu; el intercambio de los residuos amídicos Asn y Gln; el intercambio de los residuos básicos Lys y Arg; y el intercambio de los residuos aromáticos Phe y Tyr. Ejemplos adicionales de sustituciones conservadoras de aminoácidos conocidos a los expertos en la técnica son: Aromáticos: fenilalanina triptófano tirosina (por ejemplo, un residuo de triptófano es sustituido con una fenilalanina); Hidrófobos: leucina isoleucina valina; Polar: glutamina asparagina; Básicos: arginina lisina histidina; Ácidos: ácido aspártico ácido glutámico; Pequeños: alanina serina treonina metionina glicina. Según se ha indicado anteriormente con detalle, en Bowie *et al.*, Science 247, *supra*, puede encontrarse orientación adicional en cuanto a qué cambios en aminoácidos es probable que sean fenotípicamente silentes (es decir, no es probable que tengan un efecto perjudicial significativo sobre una función).

En algunas realizaciones, una variante puede tener cambios “no conservadores”; por ejemplo, la sustitución de una glicina con un triptófano. Variantes similares también pueden incluir deleciones o inserciones de aminoácidos, o ambas. Usando programas informáticos muy conocidos en la técnica —por ejemplo, el soporte lógico DNASTAR—, puede encontrarse orientación para determinar qué residuos de aminoácidos pueden ser sustituidos, insertados o eliminados sin abolir la actividad biológica o inmunológica.

Los polipéptidos que tienen actividad quinasa ROS1 pueden incluir la proteína ROS1 humana de longitud máxima (que tiene una secuencia de aminoácidos expresada en la SEQ ID NO: 1), y los polipéptidos de fusión ROS1 que tienen las secuencias de aminoácidos expresadas en las SEQ ID Nos. 5, 7, 11, 13, 22, 24 y 26 (incluyan o no una secuencia líder), una secuencia de aminoácidos que codifica un polipéptido que incluye al menos seis aminoácidos contiguos que abarcan la unión de la fusión (es decir, las secuencias en la unión entre la proteína socia no ROS1 y la proteína ROS1 —véase la Tabla 3—, así como polipéptidos que tienen una similitud de al menos el 90%, más preferentemente una similitud de al menos el 95%, y aún más preferentemente una similitud de al menos el 96%, el 97%, el 98% o el 99% con los descritos anteriormente.

Los polipéptidos que tienen actividad quinasa ALK incluyen la proteína ALK humana de longitud máxima (que tiene una secuencia de aminoácidos expresada en la SEQ ID NO: 35) y los diversos polipéptidos de fusión ALK descritos en la presente memoria, una secuencia de aminoácidos que codifica un polipéptido que incluye al menos seis aminoácidos contiguos que abarcan la unión de la fusión (es decir, las secuencias en la unión entre la proteína socia no ALK y la proteína ALK, así como polipéptidos que tienen una similitud de al menos el 90%, más preferentemente una similitud de al menos el 95%, y aún más preferentemente una similitud de al menos el 96%, el 97%, el 98% o el 99% con los descritos anteriormente.

Los reactivos específicos al ROS1 de longitud máxima y los reactivos específicos al polipéptido de fusión ROS1 (tales como anticuerpos policlonales y monoclonales) o los reactivos específicos a la ALK de longitud máxima y los reactivos específicos al polipéptido de fusión ALK (tales como anticuerpos policlonales y monoclonales) que son útiles en ensayos para detectar la expresión de polipéptidos ROS1 o ALK y/o actividad quinasa ROS1 o ALK según se describe posteriormente, o como productos terapéuticos inhibidores de ROS1 o productos terapéuticos inhibidores de ALK capaces de inhibir la función/actividad de la proteína ROS1 y/o la función/actividad de la proteína ALK. Además, tales polipéptidos pueden ser usados en el sistema de doble híbrido en levadura para "capturar" proteínas de unión, que son también productos terapéuticos candidatos inhibidores de ROS1 o productos terapéuticos inhibidores de ALK según la presente divulgación. Fields y Song, Nature 340: 245-246 (1989), describen el sistema de doble híbrido en levadura.

En algunas realizaciones, un reactivo de detección puede incluir, además, una marca detectable (por ejemplo, una marca fluorescente o una marca infrarroja). "Marca detectable", con respecto a un polipéptido, un polinucleótido o un reactivo (por ejemplo, un anticuerpo o una sonda FISH) divulgados en la presente memoria significa una modificación química, biológica o de otro tipo del o al polipéptido, polinucleótido o anticuerpo, incluyendo, sin limitación, modificaciones de fluorescencia (por ejemplo, FITC o ficoeritrina), infrarrojas, de masa (por ejemplo, un marcaje isobárico), de residuo, de tinción (tinción cromófora), radioisotópica (por ejemplo, ^{32}P), de marca o marcaje (marcaje myc o marcaje GST), etc., mediante la cual se puede detectar la presencia de la molécula de interés. Tal polipéptido, polinucleótido o reactivo es denominado, así, "marcado de manera detectable". La marca detectable puede estar unida al polipéptido, polinucleótido o agente de unión mediante un enlace químico covalente (por ejemplo, un enlace peptídico o un enlace de fosfodiéster) o no covalente (por ejemplo, un enlace iónico).

Los reactivos útiles en los métodos dados a conocer en la presente memoria incluyen, sin limitación, reactivos tales como anticuerpos, o fracciones de unión de los mismos, que se unan específicamente a la proteína ROS1 de longitud máxima o a una de las muchas proteínas de fusión ROS1, o a una proteína ROS1 de longitud máxima o a una de las muchas proteínas de fusión ROS1 expresadas en un cáncer, o a un polipéptido EGFR mutante. "Que se une específicamente" significa que un reactivo o agente de unión (por ejemplo, una sonda de ácidos nucleicos, un anticuerpo) interactúa con su molécula diana, dependiendo la interacción de la presencia de una estructura particular (por ejemplo, el determinante antigénico o epítipo en el polipéptido o la secuencia de nucleótidos del polinucleótido); en otras palabras, el reactivo reconoce y se une a un polipéptido específico o a una estructura de polinucleótidos, en vez de a todos los polipéptidos o polinucleótidos en general. "Fragmento de unión del mismo" significa un fragmento o porción de un reactivo que se une específicamente a la molécula diana (por ejemplo, un fragmento F_{ab} de un anticuerpo).

Un reactivo que se une específicamente a la molécula diana puede ser denominado reactivo específico a la diana o reactivo antidiana. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido FIG-ROS1(L) puede ser denominado anticuerpo específico a FIG-ROS1(L) o anticuerpo anti FIG-ROS1(L). De manera similar, una sonda de ácidos nucleicos que se une específicamente a un polinucleótido FIG-ROS1(L) puede ser denominada sonda de ácidos nucleicos específica a FIG-ROS1(L) o sonda de ácidos nucleicos anti FIG-ROS1(L).

En algunas realizaciones, cuando la molécula diana es un polipéptido, un reactivo que se une específicamente a una molécula diana tiene una afinidad de unión (K_D) hacia su molécula diana de 1×10^{-6} M o menos. En algunas realizaciones, un reactivo que se une específicamente a una molécula diana tiene hacia su molécula diana una K_D de 1×10^{-7} M o menos, o una K_D de 1×10^{-8} M o menos, o una K_D de 1×10^{-9} M o menos, o una K_D de 1×10^{-10} M o menos, o una K_D de 1×10^{-11} M o menos, o una K_D de 1×10^{-12} M o menos. En ciertas realizaciones, la K_D de un reactivo que se une específicamente a una molécula diana es de 1 pM a 500 pM, o está entre 500 pM y 1 μM , o entre 1 μM y 100 nM, o entre 100 nM y 10 nM hacia su molécula diana. Ejemplos no limitantes de una molécula diana a la que se une específicamente un reactivo incluyen el polipéptido ROS1 de longitud máxima, el polipéptido ALK de longitud máxima, una de las muchas proteínas de fusión ALK y/o los polipéptidos de fusión ROS1 descritos en la presente memoria, o un polipéptido EGFR mutante.

En algunas realizaciones, cuando la molécula diana es un polinucleótido, un reactivo que se une específicamente a su molécula diana es un reactivo que se hibrida en condiciones estrictas con su polinucleótido diana. La expresión "condiciones estrictas" con respecto a condiciones de hibridación con secuencias de nucleótidos o sondas de nucleótidos es el "rigor" que se produce dentro de un intervalo desde aproximadamente T_m menos 5°C (es decir, 5°C por debajo de la temperatura de fusión (T_m) del reactivo o de la sonda de ácidos nucleicos) hasta aproximadamente 20°C a 25°C por debajo de T_m . Condiciones estrictas típicas son: incubación a 42°C durante la noche en una solución que comprende: formamida al 50%, $5 \times \text{SSC}$ (750 mM NaCl, 75 mM citrato trisódico), 50 mM fosfato sódico (pH 7,6), $5 \times$ solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10%, y 20 microgramos/ml de ADN de esperma desnaturalizado cizallado de salmón, seguido por el lavado de los filtros en $0,1 \times \text{SSC}$ a aproximadamente 65°C . Según entenderán los expertos en la técnica, el rigor de la hibridación puede ser alterado para identificar o detectar secuencias idénticas o afines de polinucleótidos. Con "reactivo (por ejemplo, una sonda de polinucleótidos o nucleótidos) que se hibrida en condiciones estrictas con un polinucleótido diana (por ejemplo, un polinucleótido ROS1 de longitud máxima)" se pretende que el reactivo (por ejemplo, la sonda de polinucleótidos o nucleótidos (por ejemplo, ADN, ARN, o un híbrido de ADN-ARN)) se hibride en toda la longitud del polinucleótido de referencia o se hibride con una porción del polinucleótido de referencia que es de al menos aproximadamente 15 nucleótidos (nt), o con al menos aproximadamente 20 nt, o con al menos aproximadamente 30 nt, o con aproximadamente 30-70 nt del

polinucleótido de referencia. Estas sondas de nucleótidos son útiles como sondas diagnósticas (por ejemplo, para FISH) y cebadores (por ejemplo, para PCR), según se expone en la presente memoria.

Los reactivos útiles en la puesta en práctica de los métodos divulgados, incluyen, entre otros, anticuerpos específicos a ROS1 de longitud máxima y específicos al polipéptido de fusión ROS1, anticuerpos específicos a ALK de longitud máxima y específicos al polipéptido de fusión ALK, anticuerpos específicos al EGFR mutante, y péptidos AQUA (péptidos marcados con isótopos pesados) correspondientes a —y adecuados para— la detección y la cuantificación de la expresión del polipéptido indicado en una muestra biológica. Así, un “reactivo específico al polipéptido ROS1” es cualquier reactivo —biológico o químico— capaz de unirse específicamente con el polipéptido ROS1 expresado en una muestra biológica, de detectarlo y/o de cuantificar la presencia o el nivel del mismo. Asimismo, un “reactivo específico al polipéptido ALK” es cualquier reactivo —biológico o químico— capaz de unirse específicamente con el polipéptido ALK expresado en una muestra biológica, de detectarlo y/o de cuantificar la presencia o el nivel del mismo. Un “reactivo específico al polipéptido EGFR mutante” es cualquier reactivo —biológico o químico— capaz de unirse específicamente con el polipéptido EGFR mutante expresado en una muestra biológica, de detectarlo y/o de cuantificar la presencia o el nivel del mismo. Los términos incluyen, sin limitación, los anticuerpos y reactivos peptídicos AQUA presentados posteriormente, y agentes de unión equivalentes que estén dentro del alcance de la presente divulgación.

Los anticuerpos que se unen específicamente a una proteína ROS1 de longitud máxima, a uno de los polipéptidos de fusión ROS1, a una proteína ALK de longitud máxima, a uno de los polipéptidos de fusión ALK, o a un polipéptido EGFR mutante en un cáncer también se pueden unir a secuencias peptídicas epitópicas altamente homólogas y equivalentes en otras especies de mamíferos; por ejemplo, murinas o de conejo, y viceversa. Anticuerpos útiles en la puesta en práctica de los métodos divulgados en la presente memoria incluyen (a) anticuerpos monoclonales, (b) anticuerpos policlonales purificados que se unen específicamente al polipéptido diana (por ejemplo, la unión de la fusión del polipéptido de fusión, (c) anticuerpos descritos anteriormente en (a)-(b) que se unen específicamente a epítomos equivalentes y muy homólogos o a sitios de fosforilación en otras especies no humanas (por ejemplo, ratón, rata), y (d) fragmentos de los anteriores (a)-(c) que se unen específicamente al antígeno (o, más preferentemente, al epítipo) unidos por los anticuerpos ejemplares dados a conocer 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 los 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 los 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 pueden derivarse de cualquier especie de animal, tal como un mamífero. Anticuerpos naturales ejemplares no limitantes incluyen anticuerpos derivados de seres humanos, pollos, cabras y roedores (por ejemplo, ratas, ratones, hámsteres y conejos), incluyendo roedores transgénicos modificados genéticamente para producir anticuerpos humanos (véanse, por ejemplo, Lonberg et al., WO93/12227; la patente estadounidense nº 5.545.806; y Kucherlapati, et al., WO91/10741; la patente estadounidense nº 6.150.584). Los anticuerpos también pueden ser anticuerpos quiméricos. Véanse, por ejemplo, M. Wroser et al., *Molec. Immunol.* 26: 403-11 (1989); Morrison et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 81: 6851 (1984); Neuberger et al., *Nature* 312: G04 (1984)). Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales recombinantes producidos según los métodos dados a conocer en la patente estadounidense nº 4.474.93 (Reading) o la patente estadounidense nº 4.16.567 (Cabilly et al.). Los anticuerpos también pueden ser anticuerpos específicos construidos químicamente creados según el método dado a conocer en la patente estadounidense nº 4.676.980 (Segel et al.).

Anticuerpos naturales son los anticuerpos producidos por un animal anfitrión; sin embargo, la divulgación también contempla anticuerpos alterados genéticamente en los que se ha hecho que la secuencia de aminoácidos varíe con respecto a la de un anticuerpo nativo. Debido a la relevancia de las técnicas de ADN recombinantes para esta solicitud, no es preciso limitarse a las secuencias de aminoácidos encontradas en anticuerpos naturales; los anticuerpos pueden ser rediseñados para obtener las características deseadas. Las posibles variaciones son muchas y oscilan entre el cambio de solo uno o algunos aminoácidos y el rediseño completo de, por ejemplo, la región variable o la constante. En general, los cambios en la región constante se realizarán para mejorar o alterar características, tales como complementar la fijación, la interacción con membranas y otras funciones efectoras. Los cambios en la región variable se realizarán para mejorar las características de unión a antígenos. La expresión “anticuerpo humanizado”, usado en la presente memoria, se refiere a moléculas de anticuerpos en las que se han sustituido aminoácidos en las regiones no de unión de antígenos para que se asemejen más estrechamente a un anticuerpo humano, mientras sigan conservando la capacidad de unión original. Otros anticuerpos específicamente contemplados son los anticuerpos oligoclonales. Según se usa en la presente memoria, la expresión “anticuerpos oligoclonales” se refiere a una mezcla predeterminada de diferentes anticuerpos monoclonales. Véanse, por ejemplo, la publicación de PCT WO 95/20401; las patentes estadounidenses nºs 5.789.208 y 6.335.163. En una realización, se generan en una única célula anticuerpos oligoclonales consistentes en una mezcla predeterminada de anticuerpos contra uno o más epítomos. En otras realizaciones, los anticuerpos oligoclonales incluyen varias cadenas pesadas capaces de emparejarse con una cadena ligera común para generar anticuerpos con especificidades múltiples (por ejemplo, la publicación de PCT WO 04/009618). Los anticuerpos oligoclonales son particularmente útiles cuando se desee seleccionar como blancos múltiples epítomos en una única molécula diana. En vista de los ensayos y de los epítomos dados a conocer en la presente memoria, los expertos en la técnica

pueden generar o seleccionar anticuerpos o mezclas de anticuerpos que son aplicables para un propósito previsto y una necesidad deseada.

En la presente divulgación también se incluyen anticuerpos recombinantes. Estos anticuerpos recombinantes tienen la misma secuencia de aminoácidos que los anticuerpos naturales o tienen secuencias de aminoácidos de los anticuerpos naturales alteradas. Pueden ser creados en cualquier sistema de expresión, incluyendo sistemas de expresión tanto procariotas como eucariotas o usando métodos de expresión en fagos (véanse, por ejemplo, Dower et al., WO91/17271 y McCafferty et al., WO92/01047, patente estadounidense nº 5.969.108). Los anticuerpos pueden ser diseñados de numerosas formas. Pueden ser creados como anticuerpos monocatenarios (incluyendo inmunofármacos modulares pequeños o SMIP™), fragmentos F_{ab} y F(ab')₂, etc. Los anticuerpos pueden ser humanizados, quimerizados, desinmunizados, o ser plenamente humanos. Numerosas publicaciones presentan los muchos tipos de anticuerpos y los métodos de diseño de tales anticuerpos. Por ejemplo, véanse las patentes estadounidenses n^{os} 6.355.245, 6.180.370, 5.693.762, 6.407.213, 6.548.640, 5.565.332, 5.225.539, 6.103.889 y 5.260.203. Los anticuerpos alterados genéticamente pueden ser funcionalmente equivalentes de los anticuerpos naturales anteriormente mencionados. En ciertas realizaciones, anticuerpos modificados pueden proporcionar estabilidad o/y eficacia terapéutica mejoradas.

Ejemplos no limitantes de anticuerpos modificados incluyen aquellos con sustituciones conservadoras de residuos de aminoácidos, y una o más delecciones o adiciones de aminoácidos que no alteran de forma significativamente perjudicial la función de unión a antígenos. Las sustituciones pueden abarcar desde cambiar o modificar uno o más residuos de aminoácidos hasta el rediseño completo de una región, siempre y cuando se mantenga la utilidad terapéutica. Los anticuerpos pueden ser modificados después de su traducción (por ejemplo, acetilación y/o fosforilación) o pueden ser modificados sintéticamente (por ejemplo, la fijación de un grupo marcador). Los anticuerpos con regiones constantes o Fc diseñadas o variantes pueden resultar útiles en la modulación de funciones efectoras, tales como, por ejemplo, la citotoxicidad dependiente del antígeno (ADCC) y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Tales anticuerpos con regiones constantes o Fc diseñadas o variantes pueden resultar útiles en casos en los que se expresa una proteína de individualización parental en tejido normal; en estos casos, los anticuerpos variantes sin función efectora pueden provocar la respuesta terapéutica deseada sin dañar el tejido normal. En consecuencia, ciertos aspectos y métodos de la presente divulgación están relacionados con anticuerpos con funciones efectoras alteradas que incluyen una o más sustituciones, inserciones y/o delecciones de aminoácidos. La expresión "biológicamente activa" se refiere a una proteína que tiene funciones estructurales, reguladoras o bioquímicas de una molécula que se da de forma natural. Asimismo, "inmunológicamente activa" se refiere a la capacidad del polipéptido natural, recombinante o sintético (por ejemplo, uno de los polipéptidos de fusión ROS1 o ALK descritos en la presente memoria), o de cualquier oligopéptido de los mimos, de inducir una respuesta inmunitaria específica en animales o células apropiados y de unirse con anticuerpos específicos.

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

Un sitio epitópico no limitante de un anticuerpo específico al polipéptido de fusión es un fragmento peptídico que consiste esencialmente en aproximadamente de 11 a 17 aminoácidos de una secuencia de polipéptidos de fusión, fragmento que abarca la unión de la fusión entre la porción ROS1 o ALK de la molécula y la porción de la molécula del socio de fusión no ROS1 o no ALK. Se apreciará que los anticuerpos que se unen específicamente con péptidos/epítomos más cortos o más largos que abarcan la unión de la fusión de un polipéptido de fusión ROS1 o ALK están dentro del alcance de la presente divulgación.

La divulgación no está limitada 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 forma específica a la proteína ROS1 o ALK o específica a la proteína de fusión ROS1 o ALK o específica al EGFR mutante, con esencialmente el mismo epítipo al que se une un anticuerpo útil en los métodos divulgados. Véase, por ejemplo, Neuberger et al., Nature 312: 604 (1984). En los métodos dados a conocer en la presente memoria se pueden emplear adecuadamente tales reactivos equivalentes no anticuerpos.

Los anticuerpos policlonales útiles en la puesta en práctica de los métodos dados a conocer en la presente memoria pueden producirse según técnicas estándar inmunizando a un animal adecuado (por ejemplo, conejo, cabra, etc.) con un antígeno que abarque un epítipo específico a una proteína de fusión o a una proteína mutante deseadas (por ejemplo, la unión de la fusión entre el socio proteínico no ROS1 o no ALK y el socio proteínico ROS1 o ALK en un polipéptido de fusión ROS1 o ALK o un fragmento de un polipéptido EGFR mutante que incluya uno o más residuos mutantes), recogiendo suero inmune del animal y separando del suero inmune los anticuerpos policlonales, y purificando los anticuerpos policlonales que tengan la especificidad deseada, según procedimientos conocidos. El antígeno puede ser un antígeno peptídico sintético que incluya la secuencia epitópica deseada seleccionado y

construido según técnicas muy conocidas. Véanse, por ejemplo, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, capítulo 5, p. 75-76, Harlow & Lane ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Czernik, *Methods In Enzymology*, 201: 264-283 (1991); Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 21-49 (1962)). Los anticuerpos policlonales producidos según se describe en la presente memoria pueden ser filtrados y aislados según se describe adicionalmente más abajo.

En los métodos divulgados en la presente memoria también pueden emplearse de forma beneficiosa anticuerpos monoclonales, y pueden ser producidos en líneas celulares de hibridoma según la conocidísima técnica de Kohler 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. ed. (Wiley and Sons, Nueva York, Nueva York, 1989 y las actualizaciones anuales hasta 2010, inclusive). Los anticuerpos monoclonales así producidos son muy específicos, y mejoran la selectividad y la especificidad de los métodos de ensayo proporcionados por la presente divulgación. Por ejemplo, una solución que contenga el antígeno apropiado (por ejemplo, un péptido sintético que incluya la unión de la fusión del polipéptido de fusión ROS1) puede ser inyectada en un ratón y, después de un tiempo suficiente (en consonancia con las técnicas convencionales), sacrificado el ratón y obtenidas células de su bazo. A continuación, las células del bazo son inmortalizadas fusionándolas con células de mieloma, normalmente en presencia de polietilenglicol, para producir células de hibridoma. Por ejemplo, pueden producirse hibridomas de fusión de conejo según se describe en la patente estadounidense nº 5.675.063. A continuación, las células de hibridoma son cultivadas en un caldo de cultivo adecuado de selección, tal como hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT), y el sobrenadante es filtrado para obtener anticuerpos monoclonales que tienen la especificidad deseada, según se describe posteriormente. El anticuerpo segregado puede ser recuperado del sobrenadante del cultivo tisular por métodos convencionales tales como precipitación, intercambio de iones o cromatografía de afinidad, o similares.

También se pueden producir fragmentos F_{ab} monoclonales en *Escherichia coli* mediante técnicas recombinantes conocidas a los expertos en la técnica. Véanse, por ejemplo, W. Huse, *Science* 246: 1275-81 (1989); Mullinax et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 87: 8095 (1990). Si se desean anticuerpos monoclonales de un isotipo para una aplicación particular, pueden prepararse directamente isotipos particulares mediante selección a partir de la fusión inicial, o ser preparados de forma secundaria, a partir de un hibridoma parental que segregue un anticuerpo monoclonal de isotipo diferente usando la técnica de selección endogámica para aislar variantes de conmutación de clase (Steplewski, et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci.*, 82: 8653 (1985); Spira et al., *J. Immunol. Methods*, 74: 307 (1984)). El sitio de combinación con antígenos del anticuerpo monoclonal puede ser clonado por PCR y anticuerpos monocatenarios producidos como anticuerpos recombinantes de expresión en fagos o anticuerpos solubles en *E. coli* (véase, por ejemplo, ANTIBODY ENGINEERING PROTOCOLS, 1995, Humana Press, Sudhir Paul, editor).

Además, la patente estadounidense nº 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 del epítipo (es decir, un "mimótopo") que es complementario de un parátipo particular (sitio de unión a antígenos) de un anticuerpo de interés. Más en general, este método implica la detección o la determinación de una secuencia de monómeros que es un equivalente topográfico de un ligando que es complementario del sitio de unión a ligandos de un receptor particular de interés. De manera similar, la patente estadounidense nº 5.480.971, Houghten et al. (1996), da a conocer oligopéptidos perrosilados lineales de rosilo C₁-C y conjuntos y bibliotecas de tales péptidos, así como métodos para emplear dichos conjuntos y bibliotecas de oligopéptidos para determinar la secuencia de un oligopéptido perrosilado que se une preferentemente a una molécula aceptora de interés. Así, también pueden prepararse de forma rutinaria análogos no peptídicos de los péptidos que portan el epítipo mediante estos métodos.

Los anticuerpos útiles en los métodos dados a conocer en la presente memoria, tanto policlonales como monoclonales, pueden explorarse respecto de su especificidad de epítipo y de proteína de fusión según técnicas convencionales. Véase, por ejemplo, Czernik et al., *Methods in Enzymology*, 201: 264-283 (1991). Por ejemplo, los anticuerpos pueden compararse con una biblioteca de péptidos mediante ELISA para asegurar la especificidad tanto hacia el antígeno deseado como, si se desea, para la reactividad solo con la proteína ROS1 o ALK de longitud máxima, un polipéptido particular de fusión ROS1 o ALK (por ejemplo, un polipéptido SLC34A2-ROS1(S)), un polipéptido particular EGFR mutante, o fragmentos de los mismos. Los anticuerpos también pueden analizarse mediante un análisis de la transferencia de tipo Western frente a preparaciones de células que contienen la proteína diana para confirmar la reactividad solo con la diana deseada y para asegurarse de que no se produce una unión apreciable con otras proteínas. La producción, la exploración y el uso de anticuerpos específicos a proteínas de fusión es conocido por los expertos en la técnica y se han sido descritos. Véase, por ejemplo, la publicación de patente estadounidense nº 20050214301.

Los anticuerpos útiles en los métodos dados a conocer en la presente memoria pueden mostrar cierta reactividad cruzada limitada con epítipos similares en otras proteínas o polipéptidos, tales como polipéptidos de fusión similares. Esto no resulta inesperado, puesto que la mayoría de los anticuerpos muestra algún grado de reactividad cruzada, y los anticuerpos anti-peptídicos a menudo tienen reactividad cruzada con epítipos que tienen una alta homología o identidad con el péptido inmunizante. Véase, por ejemplo, Czernik, *supra*. La reactividad cruzada con otras proteínas de fusión puede caracterizarse con facilidad mediante una transferencia de tipo Western junto con marcadores de peso molecular conocido. La reactividad cruzada no deseada puede eliminarse mediante selección negativa empleando purificación de anticuerpos sobre columnas de péptidos.

Los anticuerpos específicos a ROS1 y los anticuerpos específicos al polipéptido de fusión ROS1 que son útiles para practicar los métodos divulgados en la presente memoria son específicos, de manera ideal para el polipéptido de fusión humano, pero no se limitan solo a la unión con la variedad humana, *per se*. La divulgación incluye la producción y el uso de anticuerpos que también se unen a epítomos conservados y altamente homólogos o idénticos en otras especies de mamífero (por ejemplo, ratón, rata, mono). Las secuencias altamente homólogas o idénticas en otras especies pueden identificarse con facilidad mediante comparaciones de secuencias convencionales, tales como el empleo de BLAST, con la secuencia de la proteína ROS1 humana (SEQ ID NO: 1), y las secuencias del polipéptido de fusión ROS1 humano de la presente memoria (SEQ ID NO: 5, 7, 11, 13, 22, 24 y 26).

Los anticuerpos específicos a ALK y los anticuerpos específicos al polipéptido de fusión ALK que son útiles para practicar los métodos divulgados en la presente memoria son específicos, de manera ideal para el polipéptido de fusión humano, pero no se limitan solo a la unión con la variedad humana, *per se*. La divulgación incluye la producción y el uso de anticuerpos que también se unen a epítomos conservados y altamente homólogos o idénticos en otras especies de mamífero (por ejemplo, ratón, rata, mono). Las secuencias altamente homólogas o idénticas en otras especies pueden identificarse con facilidad mediante comparaciones de secuencias convencionales, tales como el empleo de BLAST, con la secuencia de la proteína ALK humana (SEQ ID NO: 35), y las secuencias de polipéptidos de fusión ALK humano descritas previamente.

Los anticuerpos específicos al polipéptido EGFR mutante de la divulgación que son útiles para practicar los métodos divulgados en la presente memoria son específicos, de manera ideal para el polipéptido de fusión humano, pero no se limitan solo a la unión con la variedad humana, *per se*. La divulgación incluye la producción y el uso de anticuerpos que también se unen a epítomos conservados y altamente homólogos o idénticos en otras especies de mamífero (por ejemplo, ratón, rata, mono). Las secuencias altamente homólogas o idénticas en otras especies pueden identificarse con facilidad mediante comparaciones de secuencias convencionales, tales como el empleo de BLAST, con la secuencia de la proteína EGFR humana (SEQ ID NO: 3), y las secuencias de polipéptidos de EGFR mutante humano descritas previamente.

Los anticuerpos empleados en los métodos dados a conocer en la presente memoria también pueden caracterizarse y validarse para su uso en un formato de ensayo concreto, por ejemplo, FC, IHC, y/o ICC. En la presente memoria, se describe más a fondo el uso de anticuerpos específicos a la proteína ROS1 de longitud máxima y/o los anticuerpos específicos al polipéptido de fusión ROS1 y/o EGFR mutante en tales métodos. Los anticuerpos descritos en la presente memoria, usados solos o en los ensayos descritos a continuación, también pueden conjugarse de modo ventajoso con tinciones fluorescentes (por ejemplo, ALEXA FLUOR 488, ficoeritrina), o con 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 marcadores celulares (citoqueratina), según se describe más a fondo posteriormente.

En la práctica de los métodos dados a conocer en la presente memoria, la expresión y/o la actividad de un polipéptido de fusión ROS1 y/o ROS1 de longitud máxima en una muestra biológica concreta también puede estudiarse de modo ventajoso empleando anticuerpos específicos (es decir, que se unen específicamente) para la proteína ROS1 de longitud máxima o anticuerpos específicos a polipéptidos de fusión ROS1. Por ejemplo, hay disponibles comercialmente anticuerpos específicos a ROS1 (es decir, anticuerpos que se unen específicamente a ROS1 de longitud máxima) (véanse Santa Cruz Biotech, Inc. (Santa Cruz, California) n° de catálogo sc-6347; Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, Massachusetts), n°s de catálogo 3078, 3266, y 3287); y Abcam (Cambridge, Massachusetts), n°s de catálogo ab5512 y ab108492, por ejemplo). En algunas realizaciones, los anticuerpos específicos a ROS1 utilizados en los métodos dados a conocer en la presente memoria se unen específicamente al dominio quinasa ROS1 y, así, detectarán ROS1 de longitud máxima y todos los polipéptidos de fusión ROS1 descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, los anticuerpos específicos a ROS1 utilizados en los métodos dados a conocer en la presente memoria se unen específicamente a una región en la proteína ROS1 que está en el extremo C del dominio quinasa de ROS1 y, así, detectarán ROS1 de longitud máxima y todos los polipéptidos de fusión ROS1 descritos en la presente memoria. Tales anticuerpos pueden producirse también según métodos estándar.

Asimismo, la expresión y/o la actividad de un polipéptido de fusión ALK y/o ALK de longitud máxima en una muestra biológica concreta también puede estudiarse de modo ventajoso empleando anticuerpos específicos (es decir, que se unen específicamente) para la proteína ALK de longitud máxima o anticuerpos específicos a polipéptidos de fusión ALK. Por ejemplo, hay disponibles comercialmente anticuerpos específicos a ALK (es decir, anticuerpos que se unen específicamente a ALK de longitud máxima) (véanse CELL SIGNALING TECHNOLOGY, INC., Danvers, Massachusetts, n°s de catálogo 3333, 3633 y 3791; Abcam, catálogo de 2010, n°s ab17127, ab59286, y Sigma-Aldrich, catálogo de 2010, n° HPA010694, por ejemplo). En algunas realizaciones, los anticuerpos específicos a ALK utilizados en los métodos dados a conocer en la presente memoria se unen específicamente al dominio quinasa ALK y, detectarán ALK de longitud máxima y los polipéptidos de fusión ALK descritos en la presente memoria. Además, hay disponibles comercialmente anticuerpos ALK específicos para ALK fosforilado o regiones del extremo C de ALK (por ejemplo, en proteínas de fusión ALK) (véanse CELL SIGNALING TECHNOLOGY, INC., Beverly, Massachusetts, n°s de catálogo 3343S (fosfo-ALK), 3983 (fosfo-ALK), Abcam, catálogo de 2010, n° ab4061 (extremo C de ALK), y Thermo Scientific, catálogo de 2010, n° PA1-37060 (extremo C de ALK), por ejemplo). Tales anticuerpos pueden producirse también según métodos estándar, según se ha descrito anteriormente.

La detección de la expresión y/o la actividad de la expresión de ROS1 de longitud máxima y/o una expresión del polipéptido de fusión ROS1 o una expresión del polipéptido EGFR mutante, en una muestra biológica (por ejemplo, una muestra tumoral) pueden proporcionar información sobre si la proteína quinasa está dirigiendo por sí sola el tumor, o si también está presente y dirigiendo el tumor un ROS1 de longitud máxima o un EGFR mutante. Tal información es clínicamente útil para evaluar si dirigirse a la proteína de fusión o a la proteína (o proteínas) de longitud máxima, o a ambas, o si es probable que sea más beneficioso para inhibir el avance del tumor, y para seleccionar un producto terapéutico adecuado o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, un reactivo que puede ser usado para detectar un ROS1 de longitud máxima o un polipéptido de fusión ROS1, un ALK de longitud máxima o un polipéptido de fusión ALK, o un polipéptido EGFR mutante es un péptido marcado con isótopos pesados (es decir, un péptido AQUA) que, por ejemplo, corresponde a una secuencia peptídica que comprende la unión de la fusión de un polipéptido de fusión de ROS1 o ALK o una secuencia específica a mutantes de un polipéptido EGFR mutante. Tal péptido AQUA puede ser adecuado para la cuantificación absoluta de un polipéptido de fusión ROS1 o ALK expresado o un polipéptido EGFR mutante en una muestra biológica. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "péptido marcado con isótopos pesados" se usa indistintamente con "péptido AQUA". Se ha descrito la producción y el uso de péptidos AQUA para la cuantificación absoluta o la 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. U.S.A.* 100: 6940-5 (2003). La expresión "detecta específicamente" con respecto a tal péptido AQUA significa que el péptido solo detecta y cuantifica polipéptidos y proteínas que contienen la secuencia del péptido AQUA y sustancialmente no detecta polipéptidos ni proteínas que no contienen la secuencia del péptido AQUA.

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

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

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

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

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

5 cuantificar las formas modificadas y no modificadas del sitio en una muestra biológica.

También pueden generarse patrones internos de péptidos estudiando la secuencia de aminoácidos primaria de una proteína y determinando los límites de los péptidos producidos mediante escisión con proteasas. Como alternativa, una proteína puede digerirse realmente con una proteasa y después puede secuenciarse un fragmento peptídico

10 concreto producido. Las proteasas adecuadas incluyen, sin limitaciones, serina proteasas (por ejemplo, tripsina, hepsina), metaloproteasas (por ejemplo, PUMP1), quimotripsina, catepsina, pepsina, termolisina, carboxipeptidasas, etc.

Se selecciona una secuencia peptídica dentro de una proteína diana según uno o más criterios para optimizar el uso del péptido como patrón interno. Preferiblemente, el tamaño del péptido se selecciona para minimizar las probabilidades de que la secuencia peptídica se repita en otro punto en otras proteínas que no son la diana. Así, un

15 péptido tiene 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, no es más largo de aproximadamente 20 aminoácidos. En algunas realizaciones, el péptido es de aproximadamente 7 a 15 aminoácidos de longitud. También se selecciona la secuencia del péptido que no es probable que sea químicamente reactiva durante la espectrometría de masas, y así se evitan secuencias que comprendan cisteína, triptófano o metionina.

Puede seleccionarse una secuencia peptídica que no incluya una región modificada de la región diana, de modo que el patrón interno de péptido puede utilizarse para determinar la cantidad de todas las formas de la proteína. Como alternativa, un patrón interno de péptido que incluya un aminoácido modificado puede ser deseable para detectar y

25 cuantificar solo la forma modificada de la proteína diana. Los patrones de péptidos para las regiones modificadas y no modificadas pueden utilizarse juntos, para determinar el grado de modificación en una muestra concreta (es decir, para determinar qué fracción de la cantidad total de proteína está representada por la forma modificada). Por ejemplo, pueden utilizarse patrones de péptidos para las formas fosforilada y no fosforilada de una proteína que se sabe que está fosforilada en un sitio concreto, para cuantificar la cantidad de la forma fosforilada en una muestra.

El péptido se marca empleando uno o más aminoácidos marcados (o sea, el marcador es una parte real del péptido) o, menos preferiblemente, los marcadores pueden unirse después de la síntesis según métodos convencionales.

30 Preferiblemente, el marcador es un marcador que altera la masa en función de las siguientes consideraciones: la masa debe ser exclusiva para las masas de los fragmentos de desplazamiento producidos mediante el análisis MS con regiones del espectro con bajo fondo; el componente de firma de masas iónicas es la porción del resto marcador que preferiblemente presenta una firma de masa iónica exclusiva en el análisis MS; preferiblemente, la suma de las masas de los átomos constituyentes del marcador preferiblemente es exclusivamente diferente de los fragmentos

35 de todos los aminoácidos posibles. Como resultado, los péptidos y aminoácidos marcados pueden distinguirse con facilidad de los no marcados por el patrón de iones/masas en el espectro de masas resultante. Preferiblemente, el componente de firma de masas iónicas imparte una masa a un fragmento de proteína que no se corresponde con la masa del resto para ninguno de los 20 aminoácidos naturales.

El marcador debe ser robusto bajo las condiciones de fragmentación de MS y no sufrir una fragmentación desfavorable. La química de marcaje debe ser eficaz bajo una serie de condiciones, en particular condiciones

40 desnaturalizantes, y la marca del marcaje preferiblemente permanece soluble en el sistema de tampón de MS elegido. El marcador preferiblemente no suprime la eficacia de ionización de la proteína y no es químicamente reactivo. El marcador puede contener una mezcla de dos o más especies isotópicamente diferenciadas para generar un patrón espectrométrico de masas exclusivo en cada posición del fragmento marcada. Los isótopos estables, tales como ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O o ^{34}S , son algunos marcadores no limitantes. También pueden prepararse parejas de

45 patrones internos de péptidos que incorporen un marcador de isótopo diferente. Los restos de aminoácidos no limitantes en los que pueden incorporarse un marcador de isótopo pesado incluyen leucina, prolina, valina y fenilalanina.

Los patrones internos de péptidos se caracterizan según su proporción de masa a carga (m/z), y preferiblemente, también según su tiempo de retención en una columna cromatográfica (por ejemplo, una columna de HPLC). Los

50 patrones internos que coeluyen con péptidos no marcados de secuencia idéntica se seleccionan como los patrones internos óptimos. Después, el patrón interno se analiza mediante la fragmentación del péptido por cualquier medio adecuado; por ejemplo, mediante disociación inducida por colisión (CID) empleando, por ejemplo, argón o helio como gas de colisión. A continuación, los fragmentos se analizan; por ejemplo, mediante espectrometría de masas de múltiples etapas (MS^n) para obtener un espectro iónico del fragmento, para obtener una firma de fragmentación

55 del péptido. Preferiblemente, los fragmentos peptídicos tienen diferencias significativas en las proporciones de m/z para que los picos que se corresponden con cada fragmento estén bien separados, y se obtiene una firma que es exclusiva para el péptido diana. Si no se obtiene una firma del fragmento adecuada en la primera etapa, se realizan más etapas de la MS hasta que se obtenga una firma exclusiva.

Los iones del fragmento en los espectros de MS/MS y MS³ generalmente son muy específicos para el péptido de interés y, junto con los métodos de LC, permiten un medio muy selectivo para detectar y cuantificar un péptido/proteína diana en una mezcla de proteínas compleja, tal como un lisado de células, que contiene muchos miles o decenas de miles de proteínas. Puede ensayarse cualquier muestra biológica que contenga potencialmente una proteína/péptido diana de interés. Preferiblemente se emplean extractos de células en bruto o parcialmente purificados. En general, la muestra contiene al menos 0,01 mg de proteína, generalmente una concentración de 0,1-10 mg/mL, y puede ajustarse a un pH y concentración del tampón deseados.

Después se añade una cantidad conocida de un patrón interno de péptido marcado, preferiblemente aproximadamente 10 femtomoles, que se corresponde con una proteína diana que va a detectarse/cuantificarse, a una muestra biológica, tal como un lisado de células. La muestra sembrada se digiere a continuación con una o más proteasas durante un periodo de tiempo adecuado para permitir la digestión. Después se realiza una separación (por ejemplo, mediante HPLC, HPLC en fase inversa, electroforesis capilar, cromatografía de intercambio iónico, etc.) para aislar el patrón interno marcado y su correspondiente péptido diana de los otros péptidos en la muestra. La LC microcapilar es un método no limitante.

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

Idealmente, pueden producirse patrones de péptidos internos AQUA (péptidos marcados con isótopos pesados), según se ha descrito anteriormente, para detectar y cuantificar cualquier sitio único (por ejemplo, la zona de unión de la fusión dentro de un polipéptido de fusión ROS1 o ALK o una secuencia específica a mutantes dentro de un polipéptido EGFR mutante) dentro de un polipéptido dado a conocer en la presente memoria. Por ejemplo, puede prepararse un fosfopéptido AQUA que se corresponda con la secuencia de la zona de unión de la fusión de uno de los polipéptidos de fusión ROS1 o ALK. Pueden producirse patrones de péptidos para la unión de la fusión, y estos patrones pueden emplearse en la metodología AQUA para detectar y cuantificar la unión de la fusión (es decir, la presencia del polipéptido de fusión) en una muestra biológica.

Por ejemplo, un péptido AQUA no limitante incluye la secuencia de aminoácidos AGSTLP (SEQ ID NO: 32), que corresponde a los tres aminoácidos inmediatamente flanqueantes a cada lado de la unión de la fusión en la variante corta del polipéptido de fusión FIG-ROS1 (es decir, el polipéptido de fusión de FIG-ROS1(S)), donde los aminoácidos codificados por el gen FIG están en cursiva y los aminoácidos codificados por el gen ROS1 están en negrita. Se apreciará que también pueden construirse péptidos AQUA más grandes que incluyan la secuencia de la unión de la fusión (y residuos adicionales cadena abajo o arriba de ella). De modo similar, puede construirse, como alternativa, un péptido AQUA más pequeño que comprenda menos de todos los residuos de dicha secuencia (pero que comprenda el punto de la propia unión de la fusión). Dichos péptidos AQUA más grandes o más cortos están dentro del alcance de la presente invención y la selección y la producción de los péptidos AQUA preferidos puede realizarse como se ha descrito anteriormente (véanse Gygi *et al.*, Gerber *et al.*, *supra*).

Debe observarse que, debido a que la secuencia del péptido AQUA abarca la unión de fusión de una de las proteínas de fusión ROS1 descritas en la presente memoria, también puede estar (o incluirse en) el epítipo al que un anticuerpo específico de fusión de ROS1 se une específicamente. Un "epítipo" se refiere a un epítipo inmunogénico (es decir, capaz de provocar una respuesta inmunitaria) o un epítipo antigénico (es decir, la región de una molécula de proteína a la que un anticuerpo puede unirse específicamente). El número de epítipos inmunogénicos de una proteína en general es menor que el número de epítipos antigénicos. Véase, por ejemplo, Geysen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:3998-4002 (1983).

La Tabla 3 proporciona una lista de las secuencias de todas las uniones de fusión de los polipéptidos de fusión ROS1 ejemplares, donde los aminoácidos codificados por el gen no ROS1 están en cursiva y los aminoácidos codificados por el gen ROS1 están en negrita.

Tabla 3

Fusión	Secuencia de unión	SEQ ID NO:
SLC34A2-ROS1 (muy corta)	VG V WHR	28
SLC34A2-ROS1 (corta)	LV G DDF	29
SLC34A2-ROS1 (larga)	LV G AGV	30

Fusión	Secuencia de unión	SEQ ID NO:
CD74-ROS1	<i>PPKDDF</i>	31
FIG-ROS1 (corta)	<i>AGSTLP</i>	32
FIG-ROS1 (larga)	<i>LQVWHR</i>	33
FIG-ROS1 (extralarga)	<i>VLQAGV</i>	34

En la SEQ ID NO: 15 se proporciona una representación de la secuencia de CD74-ROS1 que incluye la unión de la fusión.

En algunas realizaciones, el cáncer de mamífero es de un ser humano. En algunas realizaciones, la muestra biológica es del cáncer o presunto cáncer del paciente. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer tumoral sólido. En algunas realizaciones, el cáncer es leucemia. En algunas realizaciones, el cáncer es linfoma. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer de pulmón (por ejemplo, un carcinoma no microcítico de pulmón o un carcinoma microcítico de pulmón). En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer cerebral (por ejemplo, glioblastoma). En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer hepático (por ejemplo, colangiocarcinoma). En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de colon. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de mama. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de ovario.

En algunas realizaciones, el cáncer de pulmón de mamífero es NSCLC (carcinoma no microcítico de pulmón). En algunas realizaciones, el cáncer de pulmón de mamífero es SCLC (carcinoma microcítico de pulmón). En realizaciones adicionales de los métodos dados a conocer en la presente memoria, el mamífero es un ser humano, y el ser humano puede ser un candidato para un producto terapéutico inhibidor de ROS1, un producto terapéutico inhibidor de EGFR, o ambos, para el tratamiento de un cáncer de pulmón. El candidato humano puede ser un paciente que está siendo tratado en la actualidad, o considerado para un tratamiento con un inhibidor de la quinasa ROS1 o un inhibidor de la quinasa EGFR. En otra realización, el mamífero es un animal grande, tal como un caballo o una vaca, mientras que en otras realizaciones el mamífero es un animal pequeño, tal como un perro o un gato, de los cuales se sabe que todos desarrollan cánceres de pulmón, tales como NSCLC y SCLC.

Tal como se utiliza a lo largo de la memoria descriptiva, la expresión "muestra biológica" se utiliza en su sentido más amplio y significa cualquier muestra biológica sospechosa de contener un polipéptido con actividad quinasa ROS1, un polipéptido con actividad quinasa ALK o un polipéptido EGFR mutante, incluyendo, sin limitaciones, un polipéptido de fusión ROS1 o ALK o una proteína ROS1 o ALK de longitud máxima (con o sin la secuencia de péptidos señal) o fragmentos de los mismos que tienen actividad quinasa ROS1 o ALK. Las muestras biológicas incluyen, sin limitación, saliva, moco, lágrimas, sangre, células tumorales circulantes, suero, tejidos, médula ósea, fluidos linfáticos/intersticiales, células bucales, células mucosas, líquido cefalorraquídeo, semen, heces, plasma, orina, una suspensión de células, o una suspensión de células y virus o extractos de la misma, y pueden comprender una célula, cromosomas aislados de una célula (por ejemplo, una dispersión 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 de Northern), ADNc (en solución o unido a un soporte sólido). En algunas realizaciones, la muestra biológica contiene células pulmonares sospechosas de ser cancerosas.

Los métodos dados a conocer en la presente memoria pueden incluir la detección de dos o más analitos (por ejemplo, un polipéptido con actividad quinasa ROS1, un polipéptido con actividad quinasa ALK y un polipéptido EGFR mutante (y ácidos nucleicos que codifican los mismos)) en la misma muestra biológica. En estos métodos, una muestra biológica puede ser dividida en una o más fracciones (por ejemplo, porciones de una muestra líquida o secciones de una muestra tisular) antes de la detección, y cada analito ser detectado en una fracción separada. Los métodos no requieren la detección de los analitos en la misma fracción de una muestra o en la misma célula dentro de una muestra. En otras realizaciones, los métodos dados a conocer en la presente memoria pueden ser usados para detectar dos o más analitos (por ejemplo, un polipéptido con actividad quinasa ROS1, un polipéptido con actividad quinasa ALK y un polipéptido EGFR mutante (y ácidos nucleicos que codifican los mismos)) en muestras biológicas separadas procedentes del mismo sujeto. Por ejemplo, dos muestras obtenidas por separado del mismo tumor o del mismo órgano o tejido de un paciente pueden ser estudiadas independientemente para cada uno de los dos o más analitos. Las muestras obtenidas por separado pueden ser obtenidas aproximadamente al mismo tiempo o en momentos diferentes (por ejemplo, separados entre sí por días, semanas, meses o años).

Cualquier muestra biológica que incluya células (o extractos de células) procedentes de un cáncer de mamífero es adecuada para su uso en los métodos dados a conocer en la presente memoria. En una realización, la muestra biológica incluye células obtenidas a partir de una biopsia tumoral o una resección tumoral. La biopsia o resección puede obtenerse, según las técnicas clínicas convencionales, a partir de tumores primarios que aparezcan en un órgano de un mamífero, o de tumores secundarios que han metastatizado en otros tejidos. En algunos casos, la biopsia o resección es congelada o fijada con formol y embebida en parafina. Las muestras congeladas o fijadas pueden ser seccionadas para un análisis adicional.

En otra realización, la muestra biológica comprende células obtenidas a partir de una muestra aspirativa con aguja fina extraída de un tumor, y las técnicas para obtener tales aspirados son muy conocidas en la técnica (véase Cristallini et al., *Acta Cytol.* 36(3): 416-22 (1992)). En ciertas realizaciones, la muestra biológica incluye un raspado bronquial.

- 5 La muestra biológica también puede comprender células obtenidas de un derrame, tal como un derrame pleural. Se sabe que se forman derrames pleurales (el líquido que se forma fuera del pulmón en la cavidad torácica y que contiene células cancerosas) en muchos pacientes con cáncer de pulmón avanzado (incluyendo el NSCLC), y la presencia de tal derrame es predictiva de un mal resultado y de un tiempo de supervivencia corto. Las técnicas convencionales para obtener muestras de derrames pleurales han sido descritas y son muy conocidas en la técnica (véase Sahn, *Clin. Chest. Med.*, 3(2): 443-52 (1982)).

La muestra biológica puede incluir células obtenidas de un lavado broncoalveolar. El lavado broncoalveolar es un procedimiento médico estándar en el cual se hace pasar un broncoscopio a través de la boca o la nariz hasta los pulmones y se inyecta líquido en una pequeña parte del pulmón y luego se lo recolecta para su examen.

- 15 En algunas realizaciones, la muestra biológica incluye células tumorales circulantes. Las células tumorales circulantes ("CTC") pueden purificarse, por ejemplo, utilizando los *kits* y reactivos vendidos bajo las marcas registradas Vita-Assays™, Vita-Cap™ y CellSearch® (comercialmente disponible de Vitatex, LLC (una sociedad anónima de Johnson and Johnson)). Se describen otros métodos para aislar CTC (véanse, por ejemplo, la publicación de PCT n° 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
- 20 circulante ("CTC") puede aislarse e identificarse como originada en el pulmón.

En consecuencia, la invención proporciona un método para aislar un CTC y, después, seleccionar una CTC en uno o más formatos de ensayo para identificar la presencia de un polipéptido con actividad quinasa ROS1, un polipéptido EGFR mutante o una molécula de ácido nucleico que codifica cualquiera de los dos en la CTC.

- 25 Pueden prepararse extractos celulares de las muestras biológicas descritas en la presente memoria, en bruto o parcial (o totalmente) purificadas, según técnicas convencionales, y emplearse en los métodos dados a conocer en la presente memoria. Como alternativa, pueden utilizarse muestras biológicas que incluyen células completas en formatos de ensayo preferidos, tales como ensayo de quinasa *in vitro*, ensayos ELISA, inmunohistoquímica (IHC), citometría de flujo (FC) e inmunofluorescencia (IF), inmunohistoquímica (IHC), hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de acuerdo con métodos estándar tales como los descritos a continuación (véase, también, por ejemplo, Ausubel et al., *supra*). Tales ensayos de células completas son
- 30 ventajosos, puesto que minimizan la manipulación de la muestra de células tumorales y, así, reducen los riesgos de alterar el estado de señalización/activación *in vivo* de las células y/o la introducción de señales accidentales. Los ensayos de células completas son ventajosos porque caracterizan la expresión y la señalización solo en células tumorales, en lugar de una mezcla de células tumorales y normales.

- 35 Por tanto, las muestras biológicas útiles en la práctica de los métodos dados a conocer en la presente memoria pueden obtenerse de cualquier mamífero en el que esté presente o pudiera estar presente o desarrollándose un cáncer o presunto cáncer caracterizado por la presencia de un polipéptido que tiene actividad quinasa ROS1, un polipéptido que tiene actividad quinasa ALK o un polipéptido EGFR mutante. Como se usa en la presente memoria, la frase "caracterizado por" con respecto a un cáncer (o presunto cáncer) y la molécula indicada (por ejemplo, un
- 40 polipéptido con actividad quinasa ROS1 o un polipéptido con actividad quinasa ALK), significa un cáncer (o presunto cáncer) en el que una translocación o mutación génica y/o un polipéptido expresado están presentes, en comparación con otro cáncer o un tejido normal en el que tal translocación o expresión aberrante no está presente. La presencia de tales translocación o expresión aberrante puede dar lugar (es decir, estimular o ser el agente causal de), en su totalidad o en parte, al crecimiento y la supervivencia de dicho cáncer o presunto cáncer.

- 45 Por consiguiente, cualquier muestra biológica (por ejemplo, CTC, derrame pleural, aspiración con aguja, biopsia tumoral) de un paciente que se identifica como que comprende un polipéptido con actividad quinasa ROS1, un polipéptido EGFR mutante, o un polinucleótido que codifica el mismo (por ejemplo, un polipéptido o polinucleótido ROS1 de longitud máxima o un polipéptido o polinucleótido de fusión ROS1) puede indicar que el cáncer originario del paciente (por ejemplo, un cáncer de pulmón tal como NSCLC o SCLC) está siendo dirigido por el polipéptido con
- 50 actividad quinasa ROS1 y/o el polipéptido EGFR mutante y, por tanto, es probable que responda a un régimen de tratamiento que incluya uno o ambos de un producto terapéutico inhibidor de la quinasa ROS1 y un producto terapéutico inhibidor de la quinasa EGFR.

- Tal como se utiliza en la presente memoria, por "probable que responda" se quiere decir que un cáncer es más probable que muestre ralentización o anulación del crecimiento en respuesta a (por ejemplo, tras el contacto o el
- 55 tratamiento con) un producto terapéutico inhibidor de ROS1 y/o un producto terapéutico inhibidor de EGFR. En algunas realizaciones, un cáncer que es probable que responda a un producto terapéutico inhibidor de ROS1 y/o a un producto terapéutico inhibidor de EGFR es aquel que muere (por ejemplo, apoptosis de las células cancerosas) en respuesta al producto terapéutico inhibidor de ROS1 y/o al producto terapéutico inhibidor de EGFR.

Para evaluar la presencia de un polipéptido con actividad quinasa ROS1, un polipéptido con actividad quinasa ALK o un polipéptido EGFR mutante (o polinucleótidos que codifiquen los mismos) en una muestra biológica que comprende células procedentes de un tumor canceroso de mamífero, puede emplearse de modo deseable, con fines comparativos, una muestra de control que representa una célula en la que tal polipéptido no se presenta (por ejemplo, células pulmonares sanas). Idealmente, la muestra control comprende células de un subconjunto del cáncer concreto (por ejemplo, cáncer de pulmón) que es representativo del subconjunto en el que no se produce el polipéptido (o el polinucleótido que codifica el mismo). Así, comparar el nivel en la muestra control con la muestra biológica de ensayo identifica si el polipéptido y/o el polinucleótido mutantes están presentes. Como alternativa, puesto que un polipéptido con actividad quinasa ROS1, un polipéptido con actividad quinasa ALK o un polipéptido EGFR mutante (o polinucleótidos que codifican los mismos) pueden no estar presentes en la mayoría de los cánceres, puede emplearse como control cualquier tejido que, de forma similar, no exprese el polipéptido con actividad quinasa ROS1, un polipéptido con actividad quinasa ALK o un polipéptido EGFR mutante (o polinucleótidos que codifiquen los mismos).

Los métodos descritos en la presente memoria tienen una función diagnóstica valiosa para cánceres caracterizados por la presencia de un polipéptido con actividad quinasa ROS1, un polipéptido con actividad quinasa ALK o un polipéptido EGFR mutante, y para las decisiones de tratamiento que pertinentes a los mismos. Por ejemplo, pueden obtenerse muestras biológicas de un sujeto que no ha sido previamente diagnosticado con un cáncer que se caracteriza por la presencia de un polipéptido con actividad quinasa ROS1 y/o un polipéptido EGFR mutante, ni que se haya sometido todavía a un tratamiento para tal cáncer, y el método se emplea para determinar diagnósticamente que un tumor en tal sujeto pertenece a un subconjunto de tumores (por ejemplo, NSCLC o SCLC) en los que un polipéptido con actividad quinasa ROS1 y/o un polipéptido EGFR mutante (o un polinucleótido que codifique los mismos) estén presentes/se expresen.

Como alternativa, puede obtenerse una muestra biológica de un sujeto que ha sido diagnosticado con un cáncer caracterizado por la presencia de un tipo de quinasa, tal como EGFR, y que ha estado recibiendo terapia, tal como terapia inhibidora de EGFR (por ejemplo, erlotinib, gefitinib), para el tratamiento de tal cáncer, y emplearse un método dado a conocer en la presente memoria para identificar si el tumor del sujeto también se caracteriza por la presencia de un polipéptido con actividad quinasa ROS1 (o de un polinucleótido que codifique el mismo), tal como proteína ROS1 de longitud máxima o uno de los muchos polipéptidos de fusión de ROS1 (por ejemplo, SLC34A2-ROS1(S)), y si, por tanto, es probable que responda completamente a la terapia existente y/o si resulta deseable o se justifica una terapia alternativa o adicional inhibidora de ROS1. Los métodos dados a conocer en la presente memoria también pueden emplearse para controlar el avance o la inhibición de un cáncer que expresa un polipéptido con actividad quinasa ROS1 después del tratamiento de un sujeto con una composición que incluye un producto terapéutico o una combinación de productos terapéuticos inhibidores de ROS1.

Tal ensayo diagnóstico puede realizarse después o antes de una evaluación preliminar o de procedimientos de vigilancia quirúrgica. Los métodos de identificación dados a conocer en la presente memoria pueden emplearse de modo ventajoso como diagnóstico para identificar pacientes que tienen cáncer, tal como cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico), o cáncer de colon, caracterizado por la presencia de un polipéptido con actividad quinasa ROS1 o actividad quinasa ALK, o de un polipéptido EGFR mutante, para saber cuáles son los pacientes que es más probable que respondan a productos terapéuticos dirigidos a la inhibición de la actividad quinasa ROS1 o ALK o la actividad quinasa EGFR. La capacidad de seleccionar dichos pacientes también será útil en la evaluación clínica de la eficacia de futuros productos terapéuticos inhibidores de ROS1, ALK, y/o EGFR, así como en la futura prescripción de dichos fármacos a pacientes.

La capacidad de identificar selectivamente cánceres en los que un polipéptido con actividad quinasa ROS1 (o un polinucleótido que codifique el mismo) o un polipéptido con actividad quinasa ALK (o un polinucleótido que codifique el mismo) o un polipéptido EGFR mutante (o un polinucleótido que codifique el mismo) están presentes permite desarrollar nuevos métodos importantes para la identificación precisa de tales tumores con fines de diagnóstico, así como obtener información útil para determinar si es probable que tal tumor responda a una composición terapéutica inhibidora de ROS1, ALK, y/o EGFR, o si es probable que no responda parcial o totalmente a un inhibidor que se dirija a una quinasa diferente cuando se administra como agente único para el tratamiento del cáncer.

Tal como se usa en la presente memoria, por “cáncer” o “canceroso” se entiende una célula que presenta un crecimiento anormal en comparación con una célula normal (es decir, no cancerosa) del mismo tipo de célula. Por ejemplo, una célula cancerosa puede ser metastásica o no metastásica. Una célula cancerosa también puede presentar falta de inhibición de contacto, en la que una célula normal de ese mismo tipo de célula muestra inhibición de contacto. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer no microcítico de pulmón o cáncer microcítico de pulmón). Tal como se usa en la presente memoria, por “presunto cáncer” (como en “presunto cáncer de pulmón de mamífero”) o “tejido sospechoso de ser canceroso” se entiende una célula o un tejido que tiene algunas características aberrantes (por ejemplo, hiperplasia o falta de inhibición de contacto) en comparación con células o tejidos normales de ese mismo tipo de célula o de tejido que el posible cáncer, pero donde la célula o el tejido aún no han sido confirmados por un médico o patólogo como cancerosos.

En algunas realizaciones, los diversos métodos dados a conocer en la presente memoria pueden realizarse en una diversidad de formatos de ensayo diferentes 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 dados a conocer en la presente memoria pueden ser inmunoensayos homogéneos o inmunoensayos heterogéneos. En un ensayo homogéneo, la reacción inmunológica habitualmente implica a un reactivo específico (por ejemplo, un anticuerpo específico a ROS1, un anticuerpo específico a ALK, o un anticuerpo específico al EGFR mutante), un analito marcado, y la muestra biológica de interés. La señal que surge del marcador se modifica, directa o indirectamente, después de la unión del anticuerpo al analito marcado. Tanto la reacción inmunológica como la detección del grado de la misma se realizan en una disolución homogénea. Los marcadores inmunoquímicos que pueden emplearse incluyen radicales libres, radioisótopos, tinciones fluorescentes, enzimas, bacteriófagos, coenzimas, etcétera. También pueden emplearse de modo ventajoso marcadores de nanocristales semiconductores, o "puntos cuánticos", y su preparación y su uso han sido bien descritos. Véase, en general, K. Barovsky, *Nanotech. Law & Bus.* 1(2): artículo 14 (2004) y las patentes citadas en ese documento.

En la estrategia del ensayo heterogéneo, los materiales suelen ser la muestra biológica, un reactivo de unión (por ejemplo, un anticuerpo), y un medio adecuado para producir una señal detectable. Pueden emplearse las muestras biológicas tal como se describe adicionalmente a continuación. El anticuerpo en general se inmoviliza sobre un soporte, tal como una esfera, una placa o un portaobjetos, y se lo pone en contacto con la muestra sospechosa de contener el antígeno en una fase líquida. Después, el soporte se separa de la fase líquida, y la fase del soporte o la fase líquida se estudia para descubrir una señal detectable empleando medios para producir tal señal. La señal se relaciona 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 enzimáticos, puntos cuánticos, etcétera. Por ejemplo, si el antígeno que se va a detectar contiene un segundo sitio de unión, un anticuerpo que se une a ese sitio puede conjugarse con un grupo detectable y ser añadido a la disolución de reacción en fase líquida antes de la etapa de separación. La presencia del grupo detectable sobre el soporte sólido indica la presencia del antígeno en la muestra de ensayo. Ejemplos de inmunoensayos adecuados son el radioinmunoensayo, métodos de inmunofluorescencia, inmunoensayos ligados a enzimas y similares.

Los formatos de inmunoensayos y las variaciones de los mismos que pueden ser útiles para realizar los métodos dados a conocer en la presente memoria son muy conocidos en la técnica. Véase, en general, E. Maggio, *Enzyme-Immunoassay* (1980) (CRC Press, Inc., Boca Ratón, Florida); véanse también, por ejemplo, la patente estadounidense nº 4.727.022 (Skold et al., "Methods for Modulating Ligand-Receptor Interactions and their Application"); la patente estadounidense nº 4.659.678 (Forrest et al., "Immunoassay of Antigens"); la patente estadounidense nº 4.376.110 (David et al., "Immunoassays Using Monoclonal Antibodies"). Las condiciones adecuadas para la formación de complejos de reactivo-anticuerpo son muy conocidas por los expertos en la técnica. Véase id. Los anticuerpos específicos a ROS1 pueden emplearse en un ensayo de "dos sitios" o "sándwich", con una única línea celular de hibridoma sirviendo de fuente para el anticuerpo monoclonal marcado y el anticuerpo monoclonal unido. Tales ensayos son descritos en la patente estadounidense nº 4.376.110. La concentración del reactivo detectable debería ser suficiente para que la unión del antígeno de interés sea detectable en comparación con el fondo.

Los anticuerpos útiles en la práctica de los métodos dados a conocer en la presente memoria pueden conjugarse con un soporte sólido adecuado para un ensayo diagnóstico (por ejemplo, esferas, placas, portaobjetos o pocillos formados por materiales tales como látex o poliestireno) según técnicas conocidas, tales como precipitación. Los anticuerpos u otros reactivos de unión al polipéptido pueden asimismo conjugarse con grupos detectables, tales como radiomarcadores (por ejemplo, ^{35}S , ^{125}I , ^{131}I), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa de rosalina), y marcadores fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína) según técnicas conocidas.

Los ensayos basados en células, tales como la citometría de flujo (FC), la inmunohistoquímica (IHC) o la inmunofluorescencia (IF), son particularmente deseables en la práctica de los métodos dados a conocer en la presente memoria, puesto que dichos formatos de ensayo son adecuados desde el punto de vista clínico, permiten la detección de la expresión de una proteína con actividad quinasa ROS1 o de una proteína con actividad quinasa ALK *in vivo*, y evitan el riesgo de cambios accidentales en la actividad resultantes de la manipulación de células obtenidas, por ejemplo, de una muestra tumoral para obtener extractos. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los métodos dados a conocer en la presente memoria son implementados en un formato de ensayo de citometría de flujo (FC), inmunohistoquímica (IHC) o inmunofluorescencia (IF).

La citometría de flujo (FC) puede emplearse para determinar la expresión de un polipéptido con actividad quinasa ROS1 o actividad quinasa ALK o de un polipéptido EGFR mutante en un tumor de mamífero antes, durante y después del tratamiento con un fármaco dirigido a la inhibición de la actividad quinasa ROS1, ALK, y/o EGFR. Por ejemplo, pueden analizarse células tumorales procedentes de muestra aspirativa con aguja fina mediante citometría de flujo en busca de la expresión y/o la activación de un polipéptido con actividad quinasa ROS1 o actividad quinasa ALK o de un polipéptido EGFR mutante o de un polinucleótido que codifique los mismos, así como de marcadores

que identifiquen tipos de células cancerosas, etc., si así se desea. La citometría de flujo puede realizarse según métodos convencionales. Véase, por ejemplo, Chow et al., *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)* 46: 72-78 (2001). Sucintamente y a título de ejemplo, puede emplearse el siguiente protocolo para el análisis citométrico: fijación de las células con paraformaldehído al 2% durante 10 minutos a 37°C, seguido de permeabilización en metanol al 90% durante 10 minutos en hielo. Las células pueden teñirse después con el anticuerpo primario (por ejemplo, un anticuerpo específico a ROS1 de longitud máxima o específico al polipéptido de fusión ROS1 o un anticuerpo específico a EGFR mutante), lavarse y marcarse con un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia. Las células después se analizarían en un citómetro de flujo (por ejemplo, un Beckman Coulter FC500) según los protocolos específicos del instrumento empleado. Tal análisis identificaría el nivel del ROS1 o ALK de longitud máxima o de un polipéptido de ROS1 o de fusión ALK o de un polipéptido EGFR mutante expresados en el tumor. Análisis similares después del tratamiento del tumor con uno o más productos terapéuticos inhibidores de ROS1, ALK o EGFR revelarían el grado de respuesta del tumor al inhibidor dirigido de quinasa ROS1 o ALK o de quinasa EGFR.

La tinción inmunohistoquímica (IHC) también puede emplearse para determinar el estado de expresión y/o activación de un polipéptido con actividad quinasa ROS1 o de un polipéptido EGFR mutante en un cáncer de mamífero (por ejemplo, un cáncer de pulmón) antes, durante y después del tratamiento con un producto terapéutico dirigido a la inhibición de la actividad quinasa ROS1 y/o de la actividad quinasa EGFR. La IHC puede realizarse según técnicas muy conocidas. Véase, por ejemplo, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, capítulo 10, Harlow & Lane eds., Cold Spring Harbor Laboratory (1988). Sucintamente, y a título de ejemplo, se prepara tejido introducido en parafina (por ejemplo, un tejido tumoral procedente de una biopsia) para una tinción inmunohistoquímica desparafinando secciones de tejido con xileno, seguido de etanol; hidratando en agua y después en PBS; revelando el antígeno mediante el calentamiento del portaobjetos en tampón citrato de sodio; incubando secciones en peróxido de hidrógeno; bloqueando en disolución bloqueante; incubando el portaobjetos en un anticuerpo primario (por ejemplo, un anticuerpo específico a ROS1 o un anticuerpo específico a EGFR mutante) y un anticuerpo secundario; y, por último, detectando mediante el método de avidina/biotina.

Los ensayos de inmunofluorescencia (IF) también pueden emplearse para determinar el estado de expresión y/o activación de un polipéptido con actividad quinasa ROS1 (por ejemplo, un polipéptido ROS1 de longitud máxima o un polipéptido de fusión ROS1) o de un polipéptido EGFR mutante en un cáncer de mamífero antes, durante y después del tratamiento con un producto terapéutico dirigido a la inhibición de la actividad quinasa ROS1 y/o la actividad quinasa EGFR. La IF puede realizarse según técnicas muy conocidas. Véanse, por ejemplo, J. M. Polak y S. Van Noorden (1997) INTRODUCTION TO IMMUNOCYTOCHEMISTRY, 2ª ed.; ROYAL MICROSCOPY SOCIETY MICROSCOPY HANDBOOK, 37, BioScientific/Springer-Verlag. Sucintamente, y a título de ejemplo, las muestras del paciente pueden fijarse en paraformaldehído, seguido de metanol, bloquearse con una solución de bloqueo, tal como suero de caballo, incubarse con un anticuerpo primario contra (es decir, que se une específicamente a) un polipéptido con actividad quinasa ROS1 (por ejemplo, un polipéptido de fusión CD74-ROS1) o un polipéptido con actividad quinasa ALK (por ejemplo, un polipéptido de fusión EML4-ALK) o un polipéptido EGFR mutante, seguido de un anticuerpo secundario marcado con una tinción fluorescente, tal como ALEXA FLUOR 488, y analizarse con un microscopio de epifluorescencia.

En la técnica se conocen diversos protocolos adicionales, que incluyen el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), análisis de transferencia de tipo Western, ensayo de quinasa *in vitro*, y clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), para medir la expresión y/o la actividad de un polipéptido con actividad quinasa ROS1, y proporcionan una base para diagnosticar la presencia del polipéptido con actividad quinasa ROS1 (por ejemplo, un polipéptido ROS1 de longitud máxima, o un polipéptido de fusión ROS1, tal como un polipéptido de fusión FIG-ROS1(S)) o la presencia de un polipéptido con actividad quinasa ALK (por ejemplo, un ALK de longitud máxima o un polipéptido de fusión ALK tal como el polipéptido de fusión NPM-ALK) o la presencia de un polipéptido EGFR mutante. Se establecen unos valores normales o estándar para la expresión del polipéptido ALK o ROS1 (de longitud máxima o de fusión) combinando los fluidos corporales o extractos celulares obtenidos de sujetos mamíferos normales, preferiblemente seres humanos, con un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido con actividad quinasa ROS1 o a un polipéptido con actividad quinasa ALK en condiciones adecuadas para la formación de complejos. La cantidad de formación de complejo de patrón puede cuantificarse mediante diversos métodos, pero preferiblemente por medios fotométricos. Las cantidades del polipéptido ROS1 de longitud máxima expresado en muestras presentes de control y de la enfermedad procedentes de los tejidos de biopsia son comparados con los valores estándar. La desviación entre los valores de los patrones y presentes establece los parámetros para diagnosticar la enfermedad. Obsérvese que, en algunos tejidos (por ejemplo, cáncer de pulmón), dado que se descubrieron en el tejido canceroso proteínas con actividad quinasa ROS1 o proteínas con actividad quinasa ALK (por ejemplo, SLC34A2-ROS1(S) y EML4-ALK (variante 796aa)) o polipéptidos EGFR mutantes, no se espera que muestras biológicas de tejido pulmonar normal contengan estas proteínas con actividad quinasa ROS1 o actividad quinasa ALK (o los polinucleótidos que codifican las mismas) o estos polipéptidos EGFR mutantes.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para detectar la presencia de un polinucleótido que codifica un polipéptido con actividad quinasa ROS1 o actividad quinasa ALK o un polinucleótido que codifica un polipéptido EGFR mutante en una muestra biológica procedente de un cáncer de pulmón de mamífero o presunto cáncer de pulmón de mamífero, comprendiendo dicho método las etapas de: (a) obtener una muestra biológica de un cáncer de pulmón en un mamífero o presunto cáncer de pulmón en un mamífero y (b) utilizar un reactivo que se une

específicamente a dicho polinucleótido que codifica dicho polipéptido para determinar si dicho polinucleótido está presente en dicha muestra biológica, en donde la detección de la unión específica de dicho reactivo a dicha muestra biológica indica que dicho polinucleótido que codifica dicho polipéptido con actividad quinasa ROS1 o actividad quinasa ALK o que dicho polipéptido EGFR mutante está presente en dicha muestra biológica.

- 5 La presencia de un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad quinasa ROS1 o actividad quinasa ALK o un polipéptido EGFR mutante puede ser evaluada por cualquier método convencional. Además, estos métodos pueden combinarse con métodos para detectar el polipéptido que tiene actividad quinasa ROS1 o actividad quinasa ALK o un polipéptido EGFR mutante según se ha descrito anteriormente.

Ensayos de nucleótidos

- 10 Los reactivos de unión específicos al polinucleótido ROS1 de longitud máxima o al polinucleótido de fusión ROS1, los reactivos de unión específicos al polinucleótido ALK de longitud máxima o al polinucleótido de fusión ALK y reactivos de unión específicos al polinucleótido EGFR mutante útiles la puesta en práctica de los métodos dados a conocer en la presente memoria también pueden ser sondas de ARNm, oligonucleótidos o ADN que pueden hibridar directamente con, y detectar, transcritos de expresión de polipéptido de fusión o truncado en una muestra biológica.
- 15 Tales sondas son estudiadas con detalle en la presente memoria. Sucintamente, y a título de ejemplo, muestras de un paciente fijadas en formol e incluidas en parafina (PPFE) 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.

- También pueden usarse con fines diagnóstico polinucleótidos que codifican un polipéptido con actividad quinasa ROS1 o ALK o un polipéptido EGFR mutante. Los polinucleótidos que pueden emplearse incluyen secuencias de oligonucleótidos, moléculas de ADN y ARN antisentido, y PNA. Los polinucleótidos pueden emplearse para detectar y cuantificar la expresión génica en tejidos de biopsia en los que la expresión de un polipéptido con actividad quinasa ROS1 o ALK (por ejemplo, un polipéptido de fusión ROS1 o ALK o un ROS1 o ALK de longitud máxima) o de un polipéptido EGFR mutante puede ser correlacionada con una enfermedad. El ensayo diagnóstico puede emplearse para distinguir entre la ausencia, la presencia y un exceso de expresión de un polipéptido con actividad
- 20 quinasa ROS1 o ALK o de un polipéptido EGFR mutante, y para monitorizar la regulación de los niveles de un polipéptido con actividad quinasa ROS1 o ALK o de un polipéptido EGFR mutante 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 con actividad quinasa ROS1 o ALK o un polipéptido EGFR mutante puede ser utilizada para identificar secuencias de ácidos nucleicos que codifican dichos polipéptidos con actividad quinasa ROS1 o ALK o dichos polipéptidos EGFR mutantes. La especificidad de la sonda, tanto si se produce a partir de una región muy específica —por ejemplo, 10 nucleótidos exclusivos en la zona de unión de la fusión— o de una región menos específica —por ejemplo, la región codificante 3'—, y el rigor de la hibridación o la amplificación (máxima, alta, intermedia o baja) determinará si la sonda identifica
- 30 solo a las secuencias que se dan en la naturaleza que codifican polipéptidos quinasa ROS1 o ALK (por ejemplo, ROS1 o ALK de longitud máxima o una proteína de fusión ROS1 o ALK) o polipéptidos EGFR mutantes, alelos o secuencias relacionadas.

- Las sondas también pueden emplearse para la detección de secuencias relacionadas. Las sondas de hibridación (por ejemplo, sondas FISH o sondas de transferencia de tipos Southern o Northern) de los presentes métodos pueden ser ADN o ARN y derivadas de las secuencias de nucleótidos de los polipéptidos con actividad quinasa ROS1, polipéptidos con actividad quinasa ALK, o de los polipéptidos EGFR mutantes codificantes. En algunas realizaciones, en las que el polipéptido que tiene actividad quinasa ROS1 o ALK es una proteína de fusión, las sondas de hibridación que incluyen la zona de unión de la fusión o de la secuencia genómica que incluya un promotor, elementos potenciadores e intrones del gen ROS1 o ALK que se presenta de forma natural y el gen socio de fusión (por ejemplo, para ROS1, SLC34A2, FIG, o CD74; para ALK, NPM, EML4, TFG, etc.).
- 40
- 45

- Puede usarse un polinucleótido de fusión de ROS1 (es decir, un polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión ROS1, tal como FIG-ROS1(S) o CD74-ROS1), un polinucleótido ROS1 de longitud máxima, un polinucleótido de fusión ALK (es decir, un polinucleótido que codifica un polinucleótido de fusión ALK, tal como EML4-ALK(variante 796aa), un polinucleótido ALK de longitud máxima, o un polinucleótido EGFR mutante) en análisis de tipo 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 empleando fluidos o tejidos procedentes de biopsias de pacientes para detectar una expresión alterada de un polipéptido con actividad quinasa ROS1 o la expresión de un polipéptido EGFR mutante. Tales métodos cualitativos o cuantitativos son muy conocidos en la técnica. En un aspecto particular, las secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido con actividad quinasa ROS1 o ALK o un polipéptido EGFR mutante pueden ser útiles en ensayos que detectan la activación o la inducción de diversos cánceres, incluyendo cáncer de pulmón (por ejemplo, el carcinoma no microcítico de pulmón (NSCLC) y el carcinoma microcítico de pulmón) y el cáncer de colon. Los polinucleótidos que codifican un polipéptido con actividad quinasa ROS1 o un polipéptido EGFR mutante pueden ser marcados de forma detectable mediante métodos convencionales, y ser añadidos a una muestra de fluido o tejido procedente de un paciente en condiciones adecuadas para la formación de complejos de hibridación. Después de un periodo de incubación adecuado, la
- 50
- 55
- 60

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 control comparable, las secuencias de nucleótidos han hibridado con las secuencias de nucleótidos en la muestra, y la presencia de niveles alterados de secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido con actividad quinasa ROS1 o ALK (por ejemplo, un polipéptido de fusión ROS1 o ALK o un polipéptido ROS1 o ALK de longitud máxima) o un polipéptido EGFR mutante en la muestra indica la presencia de la enfermedad asociada. Estos ensayos también pueden utilizarse para evaluar la eficacia de un régimen de tratamiento terapéutico concreto en estudios animales, en ensayos clínicos, o en la monitorización del tratamiento de un paciente individual.

En algunas realizaciones, los métodos dados a conocer en la presente memoria se llevan a cabo usando un formato de ensayo de amplificación de ácidos nucleicos (por ejemplo, PCR). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es estándar para los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2ª edición, Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T., ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989). Los cebadores (también denominados oligómeros) para PCR pueden ser sintetizados químicamente, generados enzimáticamente, o producidos a partir de una fuente recombinante. Los oligómeros consistirán preferentemente 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 gen o una afección específicos. Los mismos dos oligómeros, conjuntos anidados de oligómeros, o incluso una agrupación degenerada de oligómeros pueden ser empleados en condiciones menos estrictas para la detección y/o la cuantificación de secuencias de ADN o ARN estrechamente relacionadas.

Métodos que también pueden emplearse para cuantificar la expresión de un nucleótido que codifica un polipéptido con actividad quinasa ROS1 o ALK (por ejemplo, un polipéptido de fusión ROS1 o ALK o un polipéptido ROS1 o ALK entero) o un polipéptido EGFR mutante incluyen el radiomarcado o la biotinilación de nucleótidos, la coamplificación de un ácido nucleico de control, y las curvas patrón en las cuales se interpolan los resultados experimentales (Melby I., *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, los polinucleótidos que codifican un polipéptido con actividad quinasa ROS1 o ALK o un polipéptido EGFR mutante pueden ser usados para generar sondas de hibridación que son útiles para el cartografiado de la secuencia genómica natural. Las secuencias pueden cartografiarse en un cromosoma particular o en una región específica del cromosoma empleando técnicas muy conocidas. Tales técnicas incluyen hibridación fluorescente *in situ* (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, tal como se reseña en Price, C. M., *Blood Rev.*, 7: 127-134 (1993); y Trask, B. J., *Trends Genet.*, 7: 149-154 (1991).

En realizaciones adicionales, se usa hibridación fluorescente *in situ* (FISH) en los métodos dados a conocer en la presente memoria (como se describe en Verma et al. HUMAN CHROMOSOMES: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUES, Pergamon Press, Nueva York, Nueva York (1988)). En algunas realizaciones, el ensayo FISH puede correlacionarse con otras técnicas de correlación de cromosomas físicos y datos de mapa genético. La técnica FISH es muy conocida (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n^{os} 5.756.696, 5.447.841, 5.776.688 y 5.663.319). Pueden encontrarse ejemplos de datos de mapas genéticos en el número de 1994 dedicado al genoma en la revista *Science* (265: 1981s). La correlación entre la localización del gen que codifica la proteína ROS1 o ALK y/o, en el caso de los polipéptidos de fusión, el gen que codifica el socio de fusión de una proteína de fusión ROS1 o ALK (por ejemplo, para ROS1, el gen FIG, el gen SLC34A2 o el gen CD74; para ALK, el gen EML4, el gen NPM, el gen ATIC, el gen CARS, etc.) sobre un mapa cromosómico físico y una enfermedad específica, o predisposición a una enfermedad específica, puede contribuir a delimitar la región del ADN asociada con esa enfermedad genética. Las secuencias de nucleótidos pueden utilizarse para detectar diferencias en las secuencias génicas entre individuos normales, portadores o afectados.

La hibridación *in situ* de preparaciones cromosómicas y las técnicas de cartografiado físico, tales como el análisis de conexiones empleando marcadores cromosómicos establecidos, pueden emplearse para extender los mapas genéticos. A menudo, la colocación de un gen sobre el cromosoma de otra especie de mamífero, tal como un ratón, puede revelar marcadores asociados, aunque se desconozca el número o el brazo de un cromosoma humano particular. Pueden asignarse nuevas secuencias a brazos cromosómicos, o a partes de los mismos, mediante cartografiado físico. Esto proporciona información valiosa a los investigadores que buscan genes de enfermedades empleado clonación posicional u otras técnicas de descubrimiento de genes. Una vez que se ha localizado de forma general la enfermedad o el síndrome mediante vinculación genética con una región genómica concreta —por ejemplo, AT con 11q22-23 (Gatti et al. *Nature* 336: 577-580 (1988)), cualquier correlación de secuencias con esa área puede representar genes asociados o reguladores para una investigación ulterior. La secuencia de nucleótidos también puede ser usada para detectar diferencias en la localización cromosómica debidas a translocación, inversión, etc., entre individuos normales, portadores o afectados.

Los polinucleótidos que codifican un polipéptido con actividad quinasa ROS1 o ALK o un EGFR mutante pueden ser detectados mediante secuenciación de nucleótidos; por ejemplo, de ácidos nucleicos cromosómicos o expresados (por ejemplo, ARNm, ADNc). Los métodos de secuenciación de ácidos nucleicos son muy conocidos e incluyen la secuenciación de la terminación de cadenas y otras técnicas de secuenciación, tales como la secuenciación de moléculas individuales en tiempo real, la secuenciación por semiconductores iónicos, la pirosecuenciación, la secuenciación por síntesis (ofrecida, por ejemplo, por Illumina), y la secuenciación por ligadura (secuenciación SOLiD).

Se entenderá que todos los métodos (por ejemplo, secuenciación PCR y FISH) que detectan polinucleótidos que codifican un polipéptido con actividad quinasa ROS1 o ALK o un polipéptido EGFR mutante, se pueden combinar con otros métodos que detectan polipéptidos con actividad quinasa ROS1 o ALK o un polipéptido EGFR mutante. Por ejemplo, la detección de un polinucleótido de fusión FIG-ROS1(S) en el material genético de una muestra biológica (por ejemplo, FIG-ROS1(S) en una célula tumoral circulante) puede ser seguida por un análisis de transferencia de tipo Western o análisis inmunohistoquímica (IHC) de las proteínas de la muestra para determinar si el polinucleótido FIG-ROS1(S) se expresaba realmente como un polipéptido de fusión FIG-ROS1(S) en la muestra biológica. Tales análisis de transferencia de tipo Western o IHC pueden realizarse usando un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido codificado por el polinucleótido FIG-ROS1(S) detectado, o los análisis pueden realizarse usando anticuerpos que se unen específicamente ya sea al FIG de longitud máxima (por ejemplo, uniéndose al extremo N de la proteína) o a ROS1 de longitud máxima (por ejemplo, uniéndose a un epítipo en el dominio quinasa ROS1). Dichos ensayos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente estadounidense 7.468.252).

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

Otro aspecto de la divulgación proporciona métodos para diagnosticar a un paciente cáncer o un presunto cáncer dirigido por una quinasa ROS1, una quinasa ALK o un polipéptido EGFR mutante. Los métodos incluyen la puesta en contacto de una muestra biológica de dicho cáncer o presunto cáncer (en donde la muestra biológica contiene al menos una molécula de ácido nucleico) con una sonda que hibrida en condiciones estrictas con una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad quinasa ROS1 o ALK o un polipéptido EGFR mutante, 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 presunto cáncer dirigido por una quinasa ROS1 o un polipéptido EGFR mutante.

Otro aspecto adicional de la divulgación proporciona un método para diagnosticar que un paciente tiene un cáncer o un presunto cáncer dirigido por una quinasa ROS1 o una quinasa ALK o un polipéptido EGFR mutante. El método incluye la puesta en contacto de una muestra biológica de dicho cáncer o presunto cáncer (en donde dicha muestra biológica contiene al menos un polipéptido) con un reactivo que se une específicamente a un polipéptido con actividad quinasa ROS1 o ALK o a un polipéptido EGFR mutante, en donde la unión específica de dicho reactivo a al menos un polipéptido en dicha muestra biológica identifica que dicho paciente tiene un cáncer de pulmón o un presunto cáncer de pulmón dirigido por una quinasa ROS1 o una quinasa ALK o un polipéptido EGFR mutante.

En diversas realizaciones, la identificación de que un cáncer de pulmón o presunto cáncer de pulmón está dirigido por una quinasa ROS1 o un polipéptido EGFR mutante identificará que es probable que el paciente que tiene ese cáncer de pulmón o presunto cáncer de pulmón responda a un producto terapéutico inhibidor de ROS1, a un producto terapéutico inhibidor de EGFR o a ambos.

Para proporcionar una base para el diagnóstico de una enfermedad (por ejemplo, un cáncer de pulmón) caracterizada por la expresión de un polipéptido con actividad quinasa ROS1 o ALK o de un polipéptido EGFR mutante, puede establecerse un perfil normal o estándar para la expresión. Esto puede lograrse combinando fluidos corporales o extractos de células obtenidos de sujetos normales, tanto animales como humanos, con una secuencia de polinucleótidos, o un fragmento de la misma, que codifica el polipéptido con actividad quinasa ROS1 o ALK o un polipéptido EGFR mutante, en condiciones adecuadas para la hibridación o la amplificación. La hibridación convencional puede cuantificarse comparando los valores obtenidos de sujetos normales con los de un experimento en el que se emplea una cantidad conocida de un polinucleótido sustancialmente purificado. Los valores patrón obtenidos de las muestras normales pueden compararse con los valores obtenidos de muestras de pacientes que son sintomáticos para la enfermedad. Se emplea la desviación entre los valores patrón y del sujeto para establecer la presencia de enfermedad.

Una vez que se ha establecido la enfermedad y se inicia un protocolo de tratamiento, los ensayos de hibridación pueden repetirse de modo regular para evaluar si el nivel de expresión en el paciente empieza a aproximarse al observado en el paciente normal. Los resultados obtenidos de ensayos sucesivos pueden ser empleados para demostrar la eficacia del tratamiento a lo largo de un periodo de varios días a meses.

Puede establecerse un perfil normal o estándar similar para la expresión o el nivel de actividad de un polipéptido que tiene actividad quinasa ROS1 o ALK o un polipéptido EGFR mutante. Por ejemplo, para la expresión de proteínas, el

perfil puede establecerse utilizando un reactivo que se une específicamente al polipéptido; también puede establecerse utilizando, por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido (por ejemplo, uniéndose a la unión de fusión de un polipéptido de fusión ROS1) y comparando los niveles de unión en sujetos normales con niveles de unión en pacientes sintomáticos para cáncer de pulmón. De manera similar, para los niveles de actividad quinasa ROS1, ALK o EGFR, se puede realizar un ensayo estándar de quinasa *in vitro* (véanse Ausubel et al., *supra*; Sambrook et al., *supra*) en muestras tomadas de pacientes normales en comparación con muestras tomadas de pacientes sintomáticos para cáncer de pulmón.

En diversas realizaciones, la inhibición de la expresión o de la actividad quinasa ROS1 o ALK se determina usando un reactivo que se une específicamente a un polinucleótido de fusión ROS1 o ALK, un reactivo que se une específicamente a un polipéptido de fusión ROS1 o ALK, un reactivo que se une específicamente a un polinucleótido ROS1 o ALK de longitud máxima, o a un reactivo que se une específicamente a un polipéptido ROS1 o ALK de longitud máxima. En algunas realizaciones adicionales, la inhibición de la expresión o de la actividad quinasa ROS1 o ALK se determina usando un reactivo que se une específicamente a la proteína de longitud máxima de un socio de fusión de un polipéptido de fusión ROS1 o a una proteína de fusión ALK. Por ejemplo, para ROS1, el reactivo puede unirse específicamente al polinucleótido FIG o CD74 o SLC34A2 o se une específicamente a un polipéptido FIG o CD74 o SLC34A2 de longitud máxima. Para ROS1, el reactivo puede unirse específicamente a un polinucleótido NPM o EML4 o ATIC o CARS o TFG o KIF5B o RANBP2 o TPM3, o ALO17 o MSN o TPM4 o ATIC o MYH9 o CLTC o SEC31L1 de longitud máxima, o puede unirse específicamente a un polipéptido NPM o EML4 o ATIC o CARS o TFG o KIF5B o RANBP2 o TPM3, o ALO17 o MSN o TPM4 o ATIC o MYH9 o CLTC o SEC31L1 de longitud máxima.

En diversas realizaciones, la expresión y/o la actividad de dicho polipéptido ALK o ROS1 son inhibidas con una composición que incluye un producto terapéutico seleccionado del grupo constituido por crizotinib (también denominado PF-02341066), ASP3026, NVP TAE-684, AP26113, CEP-14083, CEP-14513, CEP11988, WHI-P131 y WHI-P154.

Tal como se utiliza en la presente memoria, “inhibidor de ROS1” o “compuesto inhibidor de ROS1” significa cualquier composición que incluya uno o más compuestos, químicos o biológicos, que inhiben, directa o indirectamente, la expresión y/o la actividad de un polipéptido con actividad quinasa ROS1. Tal inhibición puede ser *in vitro* o *in vivo*. “Producto terapéutico inhibidor de ROS1” o “producto terapéutico que inhibe a ROS1” significa un compuesto inhibidor de ROS1 utilizado como producto terapéutico para tratar a un paciente que alberga un cáncer (por ejemplo, un cáncer de pulmón, tal como NSCLC o SCLC) caracterizado por la presencia de un polipéptido con actividad quinasa ROS1, tal como una proteína ROS1 de longitud máxima expresada de forma aberrante o un polipéptido de fusión ROS1 (por ejemplo, una de las proteínas de fusión FIG-ROS1) descritas en la presente memoria.

En algunas realizaciones de la divulgación, el inhibidor de ROS1 es un reactivo que se une específicamente a un polipéptido de fusión ROS1 (por ejemplo, FIG-ROS1(S), FIG-ROS1(L), FIG-ROS1(XL), SLC34A2-ROS1(VS), SLC34A2-ROS1(S), SLC34A2-ROS1(L) o CD74-ROS1), un reactivo que se une específicamente a un polipéptido ROS1 de longitud máxima, un ARNip dirigido a un polinucleótido de fusión ROS1 (por ejemplo, un polinucleótido de fusión SLC34A2-ROS1(S)) o un ARNip dirigido a un polinucleótido ROS1 de longitud máxima. Los siguientes son ARNip no limitantes para inhibir la expresión de la proteína ROS1:

5'AAGCCCGGACGGCAACGUUTT3' (ROS 1(6318-6340) (SEQ ID NO: 16)); o

5'AAGCCLGAAGGCCUGAACUTT3' (ROS 1(7181-7203) (SEQ ID NO: 17)).

La capacidad de estos dos ARNip de inhibir la actividad quinasa ROS1 ha sido descrita (véase la publicación de patente estadounidense nº 20100221737).

En algunas realizaciones, un inhibidor de ROS1 se selecciona del grupo constituido por crizotinib (también denominado PF-02341066), ASP3026 (identificador de ClinicalTrials.gov: NCT01284192), NVP TAE-684 (Gu et al., 2011, PLoS ONE, 6:e15640), CH5424802 (Sakamoto et al., 2011, *Cancer Cell*, 19:679-690) y AP26113 (identificador de ClinicalTrials.gov: NCT01449461; Katayama et al., 2011, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108:7535-40). Se dan a conocer inhibidores adicionales de ROS1, por ejemplo, en WO 2012/016133, 'CS 2012/0065233 y El-Deeb et al., 2009, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19:5622-26.

Tal como se utiliza en la presente memoria, “inhibidor de ALK” o “compuesto inhibidor de ALK” significa cualquier composición que incluya uno o más compuestos, químicos o biológicos, que inhiben, directa o indirectamente, la expresión y/o la actividad de un polipéptido con actividad quinasa ALK. Tal inhibición puede ser *in vitro* o *in vivo*. “Producto terapéutico inhibidor de ALK” o “producto terapéutico que inhibe a ALK” significa un compuesto inhibidor de ALK utilizado como producto terapéutico para tratar a un paciente que alberga un cáncer (por ejemplo, un cáncer de pulmón, tal como NSCLC o SCLC) caracterizado por la presencia de un polipéptido con actividad quinasa ALK, tal como una proteína ALK de longitud máxima expresada de forma aberrante o un polipéptido de fusión ALK (por ejemplo, una de las proteínas de fusión EM4-ALK) descritas en la presente memoria.

El producto terapéutico inhibidor de ALK y/o de ROS1 puede ser, por ejemplo, un inhibidor de la quinasa, 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 a una quinasa. Dado que ROS1, ALK, LTK, InsR e IGF1R pertenecen a la misma familia de tirosina quinasas, pueden compartir una estructura similar en el dominio quinasa. Así, en algunas realizaciones, un inhibidor de ALK y/o ROS1 también inhibe la actividad de una quinasa ALK, una quinasa LTK, un receptor de insulina o un receptor de IGF1. Los compuestos inhibidores de ROS1 son estudiados con más detalle a continuación. Las muestras biológicas de los pacientes pueden tomarse antes y después del tratamiento con el inhibidor y después ser analizadas, empleando los métodos descritos anteriormente, para el efecto biológico del inhibidor sobre la actividad quinasa ALK o ROS1, que incluye la fosforilación de la proteína sustrato corriente abajo. Tal ensayo farmacodinámico puede ser útil para determinar la dosis biológicamente activa del fármaco, que puede ser preferible a una dosis máxima tolerable. Tal información también sería útil en propuestas para la aprobación de fármacos demostrando el mecanismo de acción del fármaco.

En otra realización, la expresión y/o la actividad de dicho polipéptido se inhibe con una composición que incluye un producto terapéutico inhibidor de ROS1 o ALK seleccionado del grupo constituido por PF-02341066, NVP TAE-684, AP26113, CEP-14083, CEP-14513, CEP11988, WHI-P131 y WHI-P154.

Diversos inhibidores de EGFR son conocidos y pueden ser usados en los métodos dados a conocer en la presente memoria, incluyendo gefitinib, erlotinib, cetuximab, afatinib, necitumumab, nimotuzumab, PF299804 (Jänne et al., 2011, *Clin. Cancer Res.*, 17:1131-39), RO5083945 (anticuerpo monoclonal glicosidizado anti EGFR; Hoffmann-La Roche); Markman et al., 2010, *J. Clin. Oncol.*, 28:15s, abstr 2522), ABT-806 (anticuerpo monoclonal humanizado anti EGFR; Abbott), NVP-TAE684 (Katayama et al., 2011, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108:7535-40), y AP26113 (ibíd.).

Según la presente divulgación, el polipéptido con actividad quinasa ROS1 o ALK o el polipéptido EGFR mutante pueden darse en al menos un subgrupo de cáncer humano. En consecuencia, el avance un cáncer de mamífero en el que se expresa un polipéptido con actividad quinasa ROS1 o ALK o un polipéptido EGFR mutante puede inhibirse, *in vivo*, inhibiendo la actividad de la quinasa ROS1 o ALK o del polipéptido EGFR mutante en tal cáncer. La actividad ROS1 o ALK en los cánceres caracterizados por la expresión de un polipéptido con actividad quinasa ROS1 o ALK puede inhibirse poniendo en contacto el cáncer con una cantidad terapéuticamente eficaz de un producto terapéutico inhibidor de ROS1 y/o inhibidor de ALK. Además, la actividad EGFR mutante puede ser inhibida poniendo en contacto el cáncer con una cantidad terapéuticamente eficaz de un producto terapéutico inhibidor de EGFR. En consecuencia, la divulgación proporciona, en parte, un método para inhibir el avance de cánceres (por ejemplo, cánceres de pulmón) que expresan un polipéptido con actividad quinasa ROS1 o ALK y un polipéptido EGFR mutante inhibiendo la expresión y/o la actividad de la quinasa ROS1 o ALK y el polipéptido EGFR mutante en el cáncer poniendo en contacto el cáncer (por ejemplo, un cáncer de pulmón) con una cantidad terapéuticamente eficaz de un producto terapéutico inhibidor de ROS1 y/o un producto terapéutico inhibidor de EGFR.

Tal como se utiliza en la presente memoria, por "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad farmacéuticamente eficaz" se entiende una cantidad de un producto terapéutico inhibidor de ROS1, un producto terapéutico inhibidor de ALK, y/o un producto terapéutico inhibidor de EGFR es adecuada para inhibir el cáncer (o una célula del mismo) o presunto cáncer (o células del mismo), en comparación con un cáncer o presunto cáncer no tratados, ya sea ralentizando el crecimiento del cáncer o presunto cáncer, reduciendo la masa del cáncer o presunto de cáncer, reduciendo el número de células del cáncer o presunto cáncer, o matando el cáncer. Cuando se administran en combinación dos o más productos terapéuticos a un paciente, la cantidad eficaz de cada producto terapéutico puede ser menor que si el producto terapéutico hubiera de ser administrado solo.

Un producto terapéutico inhibidor de ROS1 y/o un producto terapéutico inhibidor de ALK pueden ser cualquier composición que incluya al menos un inhibidor de ROS1 o ALK. Tales composiciones también comprenden composiciones que incluyen solamente un único compuesto inhibidor de ROS1 o ALK, así como composiciones que incluyen múltiples productos 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.

En algunas realizaciones, un producto terapéutico inhibidor de ROS1 y/o un producto terapéutico inhibidor de ALK útiles en la práctica de los métodos dados a conocer en la presente memoria son un inhibidor de molécula pequeña dirigido. Los inhibidores dirigidos de molécula pequeña son una clase de moléculas que generalmente inhiben la actividad de su enzima diana uniéndose de forma específica, y a menudo irreversible, con el sitio catalítico de la enzima y/o uniéndose a una hendidura de unión a ATP u otro sitio de unión dentro de la enzima que evite que la enzima adopte una conformación necesaria para su actividad. Debido a la estrecha similitud en la estructura y la función entre la quinasa ROS 1 y la quinasa ALK, se prevé que cualquier inhibidor de la quinasa ALK también inhiba la quinasa ROS1.

En consecuencia, en otro aspecto, la divulgación proporciona métodos de tratamiento de cáncer de pulmón en un paciente que incluyen: detectar la presencia, en una muestra biológica de un pulmón de un paciente que tiene o se sospecha que tiene cáncer de pulmón, de uno o más polipéptidos seleccionados del grupo constituido por un polipéptido que tiene actividad quinasa ROS1, un polipéptido que tiene actividad quinasa ALK, y un polipéptido EGFR mutante (en cualquier combinación); y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un producto terapéutico inhibidor de ALK/ROS1 y/o un producto terapéutico inhibidor de EGFR al paciente, tratando de este modo al sujeto por cáncer de pulmón.

Debería hacerse notar que, cuando un inhibidor de ROS1 o ALK y un inhibidor de EGFR son administrados a un paciente, la molécula inhibidora puede ser una molécula que inhiba tanto ROS1 o ALK como EGFR. Por ejemplo, NVP TAE-684 inhibe ROS1 (Gu et al., 2011, *PLoS ONE*, 6:e15640), ALK (Galkin et al., 2007, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104:270-275) y EGFR (Katayama et al., 2011, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108:7535-40), igual que AP26113 (Katayama et al., 2011, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108:7535-40). Se pueden identificar moléculas adicionales que inhiben tanto ROS1 y/o ALK como EGFR.

Tal como se utiliza en la presente memoria, por "proteína que tiene actividad quinasa ALK" se entiende cualquier polipéptido que retiene el dominio quinasa completo de ALK y, por lo tanto, tiene actividad quinasa ALK. Polipéptidos no limitantes con actividad quinasa ALK incluyen ALK de longitud completa (véase la patente estadounidense nº 5.770.421), NPM-ALK, ALO17-ALK, TFG-ALK, MSN-ALK, TPM3-ALK, TPM4-ALK, ATIC-ALK, MYH9-ALK, CLTC-ALK, SEC31L1-ALK, RANBP2-ALK, CARS-ALK, EML4-ALK, KIF5B-ALK y TFG-ALK (véanse, por ejemplo, Palmer et al., *Biochem. J.* 420:345-361, 2009 (y los artículos ahí citados), Rikova et al., *Cell* 131:1190-1203, 2007; Soda et al., *Nature* 448:561-566, 2007; Morris et al., *Science* 263:1281-84, 1994; Du et al., *J. Mol. Med* 84:863-875, 2007; Panagopoulos et al., *Int. J. Cancer* 118:1181-86, 2006; Cools et al., *Genes Chromosomes Cancer* 34:354-362, 2002; Debelenko et al., *Lab. Invest.* 83:1255-65, 2003; Ma et al., *Genes Chromosomes Cancer* 37:98-105, 2003; Lawrence et al., *Am. J. Pathol.* 157:377-384, 1995; Hernández et al., *Blood* 94:3265-68, 1999; Takeuchi K., *Clin Cancer Res.* 15:3143-49, 2009; Tort et al., *Lab. Invest.* 81:419-426, 2001; Trinei et al., *Cancer Res.* 60:793-798, 2000; y Touriol et al., *Blood* 95:3204-07, 2000. Véase también Pulford et al., *J. Cell. Physiol.*, 199:330-358, 2004.

En diversas realizaciones, el paciente es un ser humano. En diversas realizaciones, el cáncer de pulmón es un cáncer no microcítico de pulmón o es un cáncer microcítico de pulmón.

Un inhibidor de la quinasa de molécula pequeña útil es el compuesto de Pfizer, Inc. crizotinib (también denominado PF-02341066), que inhibe la actividad quinasa de ALK, ROS1 y MET, y sus propiedades están bien descritas. Véanse You et al., *Cancer Res* 67: 4408 (2007) y la publicación de patente estadounidense nº 2008/0300273. Inhibidores de quinasa de molécula pequeña adicionales que pueden dirigirse a ROS1 incluyen TAE-684 (de Novartis), CH5424802 (Chugai; véase Sakamoto, H. et al., *Cancer Cell* 19: 679-690, 2011), AP26113 (Ariad Pharmaceuticals, Inc.), y CEP-14083, CEP-14513, y CEP-11988 (Cephalon; véase Wan et al., *Blood* 107: 1617-23, 2006). También se ha demostrado que TAE-684, una 5-cloro-2,4-diaminofenilpirimidina, inhibe la quinasa ALK. Galkin, et al., *Proc. National Acad. Sci* 104:270-275, 2007.

Inhibidores adicionales de molécula pequeña y otros inhibidores (por ejemplo, inhibidores indirectos) de la actividad quinasa ROS1 pueden diseñarse racionalmente usando modelado cristalográfico de rayos X o por ordenador de la estructura tridimensional de ROS1, o pueden hallarse mediante cribado de alto rendimiento de bibliotecas de compuestos para la inhibición de enzimas reguladoras clave aguas arriba y/o moléculas de unión necesarias, lo que da lugar a la inhibición de la actividad quinasa ROS1 o ALK. Tales estrategias son muy conocidas en la técnica y han sido descritas. La inhibición de ROS1 o ALK por tales productos terapéuticos puede confirmarse, por ejemplo, examinando la capacidad del compuesto para inhibir la actividad quinasa ROS1 o ALK, pero no otra actividad quinasa, en un panel de quinasas, y/o examinando la inhibición de la actividad de ROS1 o ALK en una muestra biológica que incluye células cancerosas (por ejemplo, células de cáncer de pulmón). A continuación, se describen adicionalmente métodos para identificar compuestos que inhiben un cáncer caracterizado por la expresión/presencia de un polipéptido con actividad quinasa ROS1 o ALK.

Productos terapéuticos inhibidores de ROS1, productos terapéuticos inhibidores de ALK, y/o productos terapéuticos inhibidores de EGFR útiles en los métodos dados a conocer en la presente memoria también pueden ser anticuerpos dirigidos que se unen específicamente a sitios o dominios catalíticos o de unión críticos requeridos para la actividad de ROS1 o ALK e inhiben la quinasa bloqueando el acceso de ligandos, sustratos o moléculas secundarias a α y/o impidiendo que la enzima adopte una conformación necesaria para su actividad. La producción, la selección y el uso terapéutico de anticuerpos específicos de dianas humanizadas han sido bien descritos. Véase, Merluzzi et al., *Adv. Clin. Path.* 4 (2): 77-85 (2000). Hay disponibles sistemas y tecnologías comerciales, tales como la Human Combinatorial Antibody Library (HuCAL®), de Morphosys, Inc., para la generación y selección de alta capacidad de procesamiento de anticuerpos inhibidores específicos a dianas humanizadas.

Se ha descrito la producción de diversos anticuerpos dirigidos anti receptores de quinasa y su uso para inhibir la actividad del receptor diana. Véanse, por ejemplo, la publicación de patente estadounidense nº 20040202655, la publicación de patente estadounidense nº 20040086503, la publicación de patente estadounidense nº 20040033543. En la 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 nº EP1423428.

También pueden emplearse estrategias de expresión en fagos para generar inhibidores de anticuerpos específicos a ROS1, específicos a ALK, o específicos a EGFR, y se describen protocolos para la construcción de bancos de bacteriófagos y la selección de anticuerpos recombinantes en el conocidísimo texto de referencia CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Colligan et al. (ed.), John Wiley & Sons, Inc. (1992-2000), capítulo 17, sección 17.1. Véase también la patente estadounidense nº 6.319.690, la patente estadounidense nº 6.300.064, la patente estadounidense nº 5.840.479, y la publicación de patente estadounidense nº 20030219839.

Puede producirse un banco de fragmentos de anticuerpos mostrados sobre la superficie de bacteriófagos (véase, por ejemplo, la patente estadounidense 6.300.064) y se seleccionó para la unión a un polipéptido con actividad quinasa ROS1 o actividad quinasa ALK o a un polipéptido EGFR (por ejemplo, un polipéptido EGFR mutante). Véase la patente europea nº EP1423428.

- 5 Después, los anticuerpos identificados en la selección de bancos de anticuerpos, tal como se describió anteriormente, pueden ser seleccionados por su capacidad de bloquear la actividad de ROS1, ALK o EGFR (por ejemplo, un EGFR mutante), tanto en un ensayo de quinasas *in vitro* como en líneas celulares y/o tumores *in vivo*. La inhibición de ROS1, ALK o EGFR puede confirmarse, por ejemplo, examinando la capacidad de tal terapéutica de anticuerpos para inhibir la actividad quinasa ROS1, ALK o EGFR en un panel de quinasas, y/o examinando la
- 10 inhibición de la actividad ROS1, ALK o EGFR en una muestra biológica que incluye células cancerosas, como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, un compuesto inhibidor de ROS1 reduce la actividad quinasa ROS1, pero reduce la actividad quinasa de otras quinasas en menor medida (o nada en absoluto). Asimismo, en algunas realizaciones, un compuesto inhibidor de ALK reduce la actividad quinasa ALK, pero reduce la actividad quinasa de otras quinasas en menor medida (o nada en absoluto). De modo similar, en algunas realizaciones, un
- 15 compuesto inhibidor de EGFR reduce la actividad quinasa EGFR, pero reduce la actividad quinasa de otras quinasas en menor medida (o nada en absoluto). Los métodos para seleccionar dichos compuestos para la inhibición de la quinasa ROS1, ALK, y/o EGFR son descritos con más detalle en lo que antecede.

- Los compuestos inhibidores de ROS1, inhibidores de ALK o inhibidores de EGFR que son útiles en la práctica de los métodos divulgados también pueden ser compuestos que inhiben indirectamente la actividad de ROS1, ALK o
- 20 EGFR inhibiendo la actividad de proteínas o moléculas distintas de la propia quinasa ROS1, ALK o EGFR. Tales productos terapéuticos inhibidores pueden ser inhibidores dirigidos que modulan la actividad de quinasas reguladoras clave que fosforilan o desfosforilan (y, por ende, que activan o desactivan) al propio ROS1, ALK o EGFR, o que interfieren en la unión de los ligandos. Al igual que con otras tirosinas quinasa receptoras, ROS1, ALK y EGFR regulan la señalización corriente abajo a través de una red de proteínas adaptadoras y de quinasas
- 25 corriente abajo. Como resultado, la inducción del crecimiento celular y la supervivencia por la actividad de ROS1, ALK o EGFR puede inhibirse dirigiendo estas proteínas interactivas o de corriente abajo.

- La actividad quinasa ROS1, ALK o EGFR también puede ser inhibida indirectamente usando un compuesto que inhibe la unión de una molécula activadora necesaria para que estos polipéptidos de longitud máxima y de fusión (por ejemplo, un polipéptido de fusión CD74-ROS1 o uno EML4-ALK) adopten su conformación activa (es decir, de modo que el dominio quinasa pueda ser activado). Por ejemplo, se ha descrito la producción y el uso de anticuerpos
- 30 anti PDGF. Véase la publicación de patente estadounidense nº 20030219839, "Anti-PDGF Antibodies and Methods for Producing Engineered Antibodies," Bowdish *et al.* La inhibición del ligando (PDGF) que se une al receptor regula negativamente de manera directa la actividad del receptor.

- Los compuestos o productos terapéuticos inhibidores de ROS1, ALK, y/o EGFR pueden también incluir compuestos antisentido o inhibidores de la transcripción que inhiben la actividad quinasa ROS1, ALK o EGFR bloqueando la transcripción del gen que codifica polipéptidos con actividad quinasa ROS1, ALK o EGFR. Se ha descrito la inhibición de diversos receptores de quinasas, que incluyen VEGFR, EGFR, e IGFR y FGFR, mediante productos terapéuticos antisentido para el tratamiento del cáncer. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses nºs
- 35 6.734.017, 6.710.174, 6.617.162, 6.340.674, 5.783.683, 5.610.288.

- Pueden diseñarse y construirse y emplearse oligonucleótidos antisentido como agentes terapéuticos contra genes diana según técnicas convencionales. Véanse, por ejemplo, Cohen, J., *Trends in Pharmacol. Sci.* 10(11): 435-437 (1989); Marcus-Sekura, *Anal. Biochem.* 172: 289-295 (1988); Weintraub, H., *Sci. AM*, pp. 40-46 (1990); Van Der Krol et al., *BioTechniques* 6: 958-976 (1988); Skorski et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1994) 91: 4504-4508. Recientemente se ha descrito la inhibición del crecimiento de carcinomas humanos *in vivo* empleando un inhibidor
- 40 de ARN antisentido de EGFR. Véase la publicación de patente estadounidense nº 20040047847. De forma similar, se puede preparar según métodos estándar un producto terapéutico inhibidor de ROS1 o inhibidor de ALK que incluya al menos un oligonucleótido antisentido contra un gen ROS1 o ALK de mamífero o un polinucleótido codificante de la proteína de fusión ROS1 o ALK de mamífero. Pueden prepararse composiciones farmacéuticas que incluyan compuestos antisentido inhibidores de ROS1 y administrarse como se describe más a fondo a continuación.

- Las composiciones de moléculas de ARN interferente pequeño (ARNip), que inhiben la traducción y, por tanto, la actividad, de ROS1, ALK o EGFR a través del proceso de interferencia de ARN, también pueden ser empleadas de modo deseable en los métodos dados a conocer en la presente memoria. La interferencia de ARN y el silenciamiento selectivo de la expresión de proteínas diana mediante la introducción de moléculas de ARN bicatenarias pequeñas exógenas que tienen una secuencia complementaria del ARNm que codifica la proteína diana
- 45 ha sido bien descrita. Véase, por ejemplo, la publicación de patente estadounidense nº 20040038921, la publicación de patente estadounidense nº 20020086356, y la publicación de patente estadounidense nº 20040229266.

- Se ha demostrado que las moléculas de ADN bicatenario (ARNbc) bloquean la expresión de genes mediante un mecanismo regulador altamente conservado conocido como interferencia de ARN (iARN). Sucintamente, la ARNasa III Dicer procesa el ARNbc en ARN interferentes pequeños (ARNip) de aproximadamente 22 nucleótidos, que actúan
- 50 como secuencias guía para inducir la escisión del ARNm específico a la diana por un RISC complejo silenciador

inducido por ARN (véase Hammond et al., *Nature* (2000), 404: 293-296). El iARN implica una reacción de tipo catalítico por la cual se generan nuevos ARNip a través de la escisión sucesiva de ARNbc más largo. Así, a diferencia del antisentido, el iARN degrada el ARN diana de una manera no estequiométrica. Se ha demostrado que, cuando se lo administra a una célula o a un organismo, el ARNbc exógeno dirige la degradación del ARN mensajero endógeno (ARNm) específica a la secuencia mediante iARN.

Ahora hay disponible comercialmente una amplia diversidad de productos de ARNip específicos a dianas, que incluyen vectores y sistemas para su expresión y su uso en células de mamífero. Véanse, por ejemplo, Promega, Inc. (www.promega.com); Dharmacon, Inc. (www.dharmacon.com). Hay disponibles manuales técnicos detallados sobre el diseño, la construcción y el uso de ARNbc para iARN. Véanse, por ejemplo, "RNAi Technical Reference & Application Guide", de Dharmacon; "RNAi: A Guide to Gene Silencing", de Promega. También hay comercialmente disponibles productos de ARNip inhibidores de ROS1, y pueden emplearse de modo adecuado en los métodos dados a conocer en la presente memoria. Véase, por ejemplo, Dharmacon, Inc., Lafayette, Colorado (n^{os} de cat. M-003162-03, MU-003162-03, D-003162-07 a -10 (siGENOME™ SMARTselection y SMARTpool® siRNAs).

Recientemente se ha establecido que los ARNbc pequeños con una longitud menor de 49 nucleótidos, y preferiblemente de 19-25 nucleótidos, que incluyen al menos una secuencia que es sustancialmente idéntica a parte de una secuencia de ARNm diana, y dicho ARNbc tiene óptimamente al menos una proyección de 1-4 nucleótidos en un extremo, son los más eficaces en la mediación del iARN en mamíferos. Véanse las publicaciones de patente estadounidense n^{os} 20040038921 y 20040229266. La construcción de tal ARNbc y su uso en preparaciones farmacéuticas para silenciar la expresión de una proteína diana *in vivo* se describen en detalle en tales publicaciones.

Si se conoce la secuencia del gen diana en un mamífero, pueden producirse ARN de 21-23 nt, por ejemplo, y ensayarse en cuanto a su capacidad para la mediación del iARN en una célula de mamífero, tal como una célula humana o de otro primate. Las moléculas de ARN de 21-23 nt que se ha demostrado que medien en el iARN pueden someterse a ensayo, si se desea, en un modelo animal apropiado para evaluar también su eficacia *in vivo*. Los sitios diana que se conocen —por ejemplo, los sitios diana que se ha determinado que son sitios diana eficaces basándose en estudios con otras moléculas de ácidos nucleicos; por ejemplo, ribozimas o antisentido—, o las dianas que se sabe que están asociadas con una enfermedad o un trastorno, tales como los sitios que contienen mutaciones o deleciones, pueden emplearse para diseñar moléculas de ARNip que se dirijan también a esos sitios.

Como alternativa, pueden predecirse/diseñarse de forma racional las secuencias de los ARNbc eficaces mediante la selección del ARNm diana de interés para sitios diana; por ejemplo, empleando un algoritmo informático de plegamiento. La secuencia diana puede analizarse por ordenador para producir una lista de todos los fragmentos o subsecuencias de una longitud particular —por ejemplo, fragmentos de 23 nucleótidos—, usando una secuencia de ejecución Perl a medida o programas comerciales de análisis de secuencias, tales como Oligo, MacVector, o el paquete GCG Wisconsin.

Pueden emplearse diversos parámetros para determinar qué sitios diana son los más adecuados dentro de la secuencia de ARN diana. Estos parámetros incluyen, sin limitación, la estructura secundaria o terciaria de ARN, la composición de bases de nucleótidos de la secuencia diana, el grado de homología entre diversas regiones de la secuencia diana, o la posición relativa de la secuencia diana dentro del transcrito de ARN. En función de estas determinaciones, puede elegirse un número cualquiera de sitios diana dentro del transcrito de ARN para seleccionar moléculas de ARNip según su eficacia; por ejemplo, empleando ensayos de escisión de ARN *in vitro*, cultivos celulares o modelos animales. Véase, por ejemplo, la publicación de patente estadounidense n^o 20030170891. También se ha descrito recientemente un algoritmo para identificar y seleccionar sitios diana de iARN. Véase la publicación de patente estadounidense n^o 20040236517.

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

La transfección y los sistemas de vector/expresión para iARN en células de mamífero están disponibles comercialmente y han sido bien descritos. Véase, por ejemplo, Dharmacon, Inc. (Lafayette, Colorado), sistema DharmaFECT™; Promega, Inc., sistema de horquilla U6 siSTRIKE™; véanse 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.

Entonces, la interferencia de ARNip en un mamífero empleando moléculas de ARNbc preparadas puede realizarse administrando al mamífero una preparación farmacéutica que comprende el ARNbc. La composición farmacéutica se

administra en una dosificación suficiente para inhibir la expresión del gen diana. El ARNbc generalmente puede administrarse a una dosificación inferior a 5 mg diarios de ARNbc por kilogramo de peso corporal, 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 diarios por kilogramo de peso corporal del receptor, preferiblemente en el intervalo de 0,1 a 200 microgramos diarios por kilogramo de peso corporal, más preferiblemente en el intervalo de 0,1 a 100 microgramos diarios por kilogramo de peso corporal, aún más preferiblemente en el intervalo de 1,0 a 50 microgramos por kilogramo de peso corporal diarios, y lo más preferiblemente en el intervalo de 1,0 a 25 microgramos diarios por kilogramo de peso corporal. Una composición farmacéutica que comprende el ARNbc se administra una vez al día, o en múltiples subdosis; por ejemplo, empleando formulaciones de liberación sostenida muy conocidas en la técnica. La preparación y la administración de tales formulaciones farmacéuticas puede realizarse según técnicas convencionales, tal como se describe más a fondo a continuación.

Tal ARNbc puede utilizarse para inhibir la expresión y la actividad de ROS1 en un cáncer, preparando una preparación farmacéutica que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de tal ARNbc, como se ha descrito anteriormente, y administrando la preparación a un sujeto humano que tiene un cáncer de pulmón o presunto cáncer de pulmón (por ejemplo, un NSCLC o SCLC) que expresa un polipéptido con actividad quinasa ROS1 o ALK (tal como, por ejemplo, la expresión aberrante de la proteína ROS1 o ALK de longitud máxima o la expresión de una proteína de fusión ROS1 o ALK); por ejemplo, mediante inyección directa en el tumor. La inhibición similar de otras tirosinas quinasa receptoras, tales como VEGFR y EGFR, empleando inhibidores de ARNip ha sido descrita recientemente. Véanse la publicación de patente estadounidense nº 20040209832, la publicación de patente estadounidense nº 20030170891, y la publicación de patente estadounidense nº 20040175703.

Los productos terapéuticos inhibidores de ROS1 y/o inhibidores de EGFR útiles en la práctica de los métodos dados a conocer en la presente memoria pueden administrarse a un mamífero por cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo, sin limitación, vías oral o peritoneal, incluyendo la administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, transdérmica (aerosol), rectal, vaginal y tópica (incluyendo bucal y sublingual).

Para la administración oral, generalmente se proporciona un producto terapéutico inhibidor de ROS1 y/o inhibidor de EGFR en forma de comprimidos o cápsulas, como un polvo o gránulos, o como una solución o suspensión acuosa. Los comprimidos para uso oral pueden incluir ingredientes activos mezclados con vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como diluyentes inertes, agentes disgregantes, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y conservantes. Diluyentes inertes adecuados incluyen carbonato de sodio y de calcio, fosfato de sodio y de calcio, y lactosa, mientras que la fécula de maíz y el ácido alginico son agentes disgregantes adecuados. Los agentes ligantes pueden incluir fécula y gelatina, mientras que el agente lubricante, si está presente, generalmente será estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Si se desea, los comprimidos pueden revestirse con un material, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, para retrasar la absorción en el tracto gastrointestinal.

Las cápsulas para el uso oral incluyen cápsulas de gelatina dura, en las que el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido, y cápsulas de gelatina blanda, en las que los ingredientes activos se mezclan con agua o un aceite, tal como aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva. Para un uso intramuscular, intraperitoneal, subcutáneo e intravenoso, las composiciones farmacéuticas generalmente se proporcionan en soluciones o suspensiones acuosas estériles, tamponadas hasta un pH y una isotonicidad apropiados. Los vehículos acuosos adecuados incluyen la disolución de Ringer y el cloruro de sodio isotónico. El vehículo puede consistir exclusivamente en un tampón acuoso ("exclusivamente" significa que no hay presentes agentes auxiliares o sustancias encapsulantes que pudieran afectar o arbitrar la captación del fármaco inhibidor del producto terapéutico inhibidor de ROS1 y/o de EGFR). Tales sustancias incluyen, por ejemplo, estructuras micelares, tales como liposomas o cápsides, tal como se describe a continuación. Las suspensiones acuosas pueden incluir agentes suspensores, tales como los derivados de la celulosa, el alginato de sodio, la polivinilpirrolidona y la goma de tragacanto, y un agente humectante, tal como lecitina. Los conservantes adecuados para suspensiones acuosas incluyen p-hidroxibenzoato de etilo y de n-propilo.

Las composiciones terapéuticas inhibidoras de ROS1 y/o inhibidoras de EGFR también pueden incluir formulaciones encapsuladas para proteger al producto terapéutico (por ejemplo, un compuesto de ARNbc o un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de fusión ROS1 o a un polipéptido EGFR mutante) contra la eliminación rápida del cuerpo, 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 para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener comercialmente en Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También se pueden usar suspensiones liposómicas (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos virales) como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar según métodos conocidos por los expertos en la técnica; por ejemplo, tal como se describe en la patente estadounidense nº 4.522.811; en la publicación de PCT WO 91/06309; y en la publicación de patente europea EP-A-43075. Una formulación encapsulada puede incluir una proteína de la envuelta vírica. La proteína de la envuelta vírica puede derivarse de un virus —tal como un virus de polio— o estar asociada con él, o puede ser parcial o totalmente artificial. Por

ejemplo, la proteína de la envuelta puede ser una proteína de virus 1 y/o una proteína de virus 2 del virus del poliovirus, o un derivado de las mismas.

Los productos terapéuticos inhibidores de ROS1 y/o inhibidores de EGFR también pueden incluir un vehículo de administración, incluyendo liposomas, para administración a un sujeto, vehículos y diluyentes y sus sales, y/o pueden estar presentes en formulaciones farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, se describen métodos para la liberación de moléculas de ácido nucleico en Akhtar et al., 1992, *Trends Cell Bio.*, 2, 139; DELIVERY STRATEGIES FOR ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDE THERAPEUTICS, ed. Akhtar, 1995, Maurer et al., 1999, *Mol. Member. Biol.*, 16, 129-140; Hofland y Huang, 1999, *Handb. Exp. Pharmacol.*, 137, 165-192; y Lee et al., 2000, *ACS Symp. Ser.*, 752, 184-192. Además, la patente estadounidense nº 6.395.713 y la publicación de PCT nº WO 94/02595 describen los métodos generales para la administración de moléculas de ácido nucleico. Estos protocolos pueden utilizarse para el transporte de casi cualquier molécula de ácido nucleico.

Los productos terapéuticos inhibidores de ROS1 y/o inhibidores de EGFR (es decir, un compuesto inhibidor de ROS1 o de EGFR que se administra como producto terapéutico) se puede administrar a un tumor de mamífero por diversos métodos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, sin limitación, encapsulación en liposomas, mediante iontoforesis, o por incorporación en otros vehículos, tales como hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables y microesferas bioadhesivas, o mediante vectores proteináceos (véase la publicación de PCT nº WO 00/53722). Como alternativa, la combinación de producto terapéutico/vehículo se administra de modo local mediante una inyección directa o mediante el uso de una bomba de infusión. La inyección directa de la composición, ya sea subcutánea, intramuscular o intradérmica, puede tener lugar utilizando metodologías estándar de aguja y jeringa, o mediante tecnologías sin aguja como las descritas en Conry et al., 1999, *Clin. Cancer Res.*, 5, 2330-2337 y la publicación de PCT nº WO 99/3 1262.

Las formulaciones farmacéuticamente aceptables de productos terapéuticos inhibidores de ROS1 y/o inhibidores de EGFR incluyen sales de los compuestos descritos anteriormente —por ejemplo, sales de adición de ácidos; por ejemplo, sales de ácido clorhídrico, bromhídrico, acético y bencenosulfónico—. Una formulación o composición farmacológica se refiere a una formulación o composición en una forma adecuada para la administración; por ejemplo, la administración sistémica, en una célula o un paciente, incluyendo, por ejemplo, un ser humano. Las formas adecuadas, en parte, dependen del uso o la vía de entrada; por ejemplo, oral, transdérmica o mediante inyección. Tales formas no deberían impedir que la formulación o composición alcance una célula diana. Por ejemplo, las composiciones farmacológicas inyectadas en la corriente sanguínea deberían 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 (por ejemplo, la absorción sistémica o acumulación de fármacos en la corriente sanguínea, seguido de su distribución por todo el cuerpo) son deseables e incluyen, sin limitaciones: intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, por inhalación, oral, intrapulmonar e intramuscular. Cada una de estas vías de administración exponen el producto terapéutico inhibidor de ROS1 a un tejido enfermo o tumor accesible. Se ha demostrado que la velocidad de entrada de un fármaco hacia la circulación es una función de su peso molecular o su tamaño. El uso de un liposoma u otro vehículo farmacológico que contenga los compuestos de la presente invención puede localizar potencialmente el fármaco, por ejemplo, en ciertos tipos de tejidos, tales como los tejidos del sistema endotelial reticular (RES). También es útil una formulación de liposomas que puede facilitar la asociación del fármaco con la superficie de las células, tales como linfocitos y macrófagos. Esta estrategia puede proporcionar un transporte potenciado del fármaco a las células diana aprovechando la especificidad del reconocimiento inmunológico de las células anómalas, tales como células del cáncer, por parte de los macrófagos y de los linfocitos.

Una "formulación farmacéuticamente aceptable" significa una composición o formulación que permite la distribución eficaz de las moléculas de ácidos nucleicos en la localización física más adecuada para su actividad deseada. Ejemplos no limitantes de agentes adecuados para la formulación con las moléculas de ácidos nucleicos incluyen: inhibidores de p-glicoproteínas (tales como Pluronic P85), que pueden potenciar la entrada de fármacos en el SNC (Joliet-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) (Rosermes, Inc. Cambridge, Massachusetts); y nanopartículas cargadas, tales como las fabricadas con polibutílcianoacrilato, que puede transportar fármacos atravesando 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 liberación para los compuestos inhibidores de ROS1 útiles en los métodos dados a conocer en la presente memoria 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 USA*, 92, 5592-5596; Boado, 1995, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 15, 73-107; Aldrian-Herrada et al., 1998, *Nucleic Acids Res.*, 26, 4910-4916; y Tyler et al., 1999, *PNAS USA*, 96, 7053-7058.

Las composiciones terapéuticas que incluyen liposomas modificados en superficie que contienen lípidos de polietilenglicol (modificados con PEG, o liposomas de largo tiempo en circulación o liposomas sigilosos) también pueden emplearse de modo adecuado en los métodos dados a conocer en la presente memoria. Estas

formulaciones ofrecen un método para aumentar la acumulación de fármacos en tejidos diana. Esta clase de vehículos farmacológicos resiste la opsonización y la eliminación por el sistema fagocítico mononuclear (MPS o RES), permitiendo con ello tiempos en la circulación sanguínea más largos y una mayor exposición tisular para el fármaco encapsulado (Lasic et al. *Chem. Rev.*, 1995, 95, 2601-2627; Ishiwata et al., *Chem. Pharm. Bull.* 1995, 43, 1005-1011). Se ha demostrado que tales liposomas se acumulan 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 el 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, 270, 24864-24870; publicación de PCT n° WO 96/10391; publicación de PCT n° WO 96/10390; y publicación de PCT n° WO 96/10392). También es probable que los liposomas de largo tiempo en circulación protejan a los fármacos de la degradación por nucleasas en un grado mayor que los liposomas catiónicos, en función de su capacidad de 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 ed. 1985). Por ejemplo, pueden proporcionarse conservantes, estabilizantes, tinciones y agentes aromatizantes. Estos incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres del ácido p-hidroxibenzoico. Además, pueden utilizarse antioxidantes y agentes suspensores.

En algunas realizaciones, el producto terapéutico inhibidor de ROS1 y/o el producto terapéutico inhibidor de EGFR es administrado en una cantidad eficaz. Por "cantidad eficaz" o "dosis eficaz" se entiende la cantidad del producto terapéutico requerida para prevenir, inhibir la aparición o tratar (aliviar un síntoma en cierta medida, preferiblemente todos los síntomas) de un estado patológico (por ejemplo, cáncer de pulmón). La dosis eficaz depende del tipo de enfermedad, del uso terapéutico, de la vía de administración, del tipo de mamífero que se esté tratando, de las características físicas del mamífero específico considerado, de la medicación concurrente y de otros factores que los expertos en las técnicas médicas reconocerán. Generalmente, una cantidad eficaz es una cantidad entre 0,1 mg/kg y 100 mg/kg de peso corporal/día de ingredientes activos que se administra dependiendo de la potencia del polímero cargado negativamente.

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

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

Un producto terapéutico inhibidor de ROS1 y/o inhibidor de EGFR útil en la práctica de la divulgación puede comprender un solo compuesto según se ha descrito anteriormente, o una combinación de múltiples compuestos, ya sea en la misma clase de inhibidor (por ejemplo, inhibidor de anticuerpos), o en diferentes clases (por ejemplo, inhibidores de anticuerpos e inhibidores de molécula pequeña). Tal combinación de compuestos puede aumentar el efecto terapéutico global mediante la inhibición del avance de un cáncer que expresa la proteína de fusión. Por ejemplo, la composición terapéutica puede incluir un inhibidor de molécula pequeña, tal como Crizotinib (también denominado PF-02341066) producido por Pfizer, Inc. (véase la publicación de estadounidense n° 2008/0300273) solo o en combinación con otros análogos de Crizotinib dirigidos a la actividad ROS1 y/o inhibidores de molécula pequeña de ROS1, tales como NVP-TAE684, producido por Novartis, Inc., o el compuesto CH5424802, descrito in Sakamoto et al., *Cancer Cell* 19: 679-690, 2011. La composición terapéutica también puede comprender uno o más agentes quimioterapéuticos no específicos, además de uno o más inhibidores dirigidos. Recientemente se ha demostrado que estas combinaciones proporcionan un efecto sinérgico de destrucción del tumor en muchos cánceres. La eficacia de tales combinaciones para inhibir la actividad de ROS1 y/o EGFR y el desarrollo tumoral in vivo puede ser evaluada como se describe a continuación.

La divulgación también proporciona, en parte, métodos para determinar si un compuesto inhibe el avance de un cáncer (por ejemplo, un cáncer de pulmón) caracterizado por un polipéptido con actividad quinasa ROS1 o ALK, un polipéptido EGFR mutante o un polinucleótido que codifica los mismos, determinando si el compuesto inhibe la

expresión de la actividad quinasa ROS1, ALK o EGFR del polipéptido en el cáncer. En algunas realizaciones, la inhibición de la actividad de ROS1 o ALK o de un polipéptido EGFR mutante se determina examinando una muestra biológica que incluye células de médula ósea, sangre o un tumor. En otra realización, la inhibición de la actividad quinasa ROS1 o ALK o EGFR mutante se determina utilizando al menos un reactivo que se une específicamente a un polipéptido ROS1 o ALK (por ejemplo, un anticuerpo específico a ROS1 un anticuerpo específico a ALK) o a un polipéptido EGFR mutante, o un reactivo que se une específicamente a un polinucleótido que codifique un polipéptido ROS1 o ALK o un polipéptido EGFR mutante (por ejemplo, un ARNip o un antisentido).

El compuesto sometido a ensayo puede ser cualquier tipo de producto terapéutico o composición, según se ha descrito 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 ser sometida a ensayo para averiguar su capacidad de inhibir ROS1 o un polipéptido EGFR mutante *in vitro* usando una célula o un extracto celular en el que la quinasa ROS1 está activada o en el que se expresa un polipéptido EGFR mutante. Puede emplearse un panel de compuestos para ensayar la especificidad del compuesto para ROS1 o EGFR (en oposición a otras dianas, tales como PDGFR).

Otra técnica para la selección de fármacos que puede usarse proporciona una selección de alto rendimiento de compuestos que tienen afinidad de unión adecuada a una proteína de interés, como se describe en la publicación de PCT nº WO 84/03564. En este método, al igual que se aplica a los polipéptidos que tienen actividad ROS1 o ALK o a los polipéptidos EGFR mutantes, se sintetiza un gran número de compuestos de ensayo pequeños diferentes sobre un sustrato sólido, tal como varillas de plástico o alguna otra superficie. Se puede hacer que los compuestos de ensayo reaccionen con un polipéptido dado a conocer en la presente memoria, o con fragmentos del mismo, y se lavan. El polipéptido unido es detectado entonces mediante métodos muy conocidos en la técnica. Un polipéptido purificado también puede recubrir directamente placas para ser usado en las técnicas de selección de fármacos anteriormente mencionadas. Como alternativa, pueden emplearse anticuerpos no neutralizantes para capturar el péptido e inmovilizarlo sobre un soporte sólido.

Entonces, un compuesto que se haya descubierto que es un inhibidor eficaz de la actividad ROS1 o EGFR mutante *in vitro* puede ser estudiado para determinar su capacidad de inhibir el avance de un cáncer que expresa un polipéptido con actividad quinasa (tal como cáncer de pulmón u otro cáncer, tal como cáncer hepático, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de riñón o cáncer de páncreas), *in vivo*, utilizando, por ejemplo, xenoinjertos de mamíferos que albergan tumores humanos de pulmón, hígado, páncreas, riñón, pulmón o colon que expresan un polipéptido con actividad quinasa ROS1 o ALK o un polipéptido EGFR mutante. En este procedimiento, líneas celulares que se sabe que expresan una proteína que tiene actividad quinasa ROS1 o ALK (por ejemplo, ROS1 o ALK de longitud máxima o una de las proteínas de fusión ROS1 o ALK) o un polipéptido EGFR mutante pueden ser puestas subcutáneamente en un animal (por ejemplo, en un ratón desnudo o SCID u otro animal inmunocomprometido). Después, las células se desarrollan produciendo una masa tumoral que puede ser monitorizada de forma visual. A continuación, el animal puede ser tratado con el fármaco. El efecto del tratamiento con el fármaco sobre el tamaño del tumor puede observarse externamente. A continuación, el animal es sacrificado y se extirpa el tumor para su análisis mediante IHC y transferencia de tipo Western. De forma similar, pueden prepararse trasplantes de médula ósea de mamíferos, mediante métodos estándar, para examinar la respuesta a los fármacos en tumores hematológicos que expresan una proteína con actividad quinasa ROS1 o ALK o un polipéptido EGFR mutante. De esta forma, los efectos del fármaco pueden observarse en el contexto biológico que más se parece 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 a 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 a la apoptosis, tales como caspasa 3 escindida y PARP escindida.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de dichos compuestos pueden ser determinadas mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o en animales experimentales; por ejemplo, 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 ser expresado como la proporción DL50/DE50. En algunas realizaciones, los compuestos presentan altos índices terapéuticos.

En la práctica del método divulgado para determinar si un compuesto inhibe el avance de un tumor caracterizado por la presencia de un polipéptido con actividad quinasa ROS1 (o de un que codifica el mismo), también pueden usarse de forma ventajosa muestras biológicas que incluyen células de xenoinjertos (o trasplantes de médula ósea) de mamíferos. Los xenoinjertos (o receptores de trasplante) no limitantes son pequeños mamíferos, tales como ratones, que albergan tumores (o leucemias) humanos que expresan un polipéptido con actividad quinasa ROS1 o ALK (por ejemplo, un polipéptido de fusión ROS1 o ALK o un ROS1 o ALK de longitud máxima) o un polipéptido EGFR mutante. 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 están bien descritos (véanse, por ejemplo, Schwaller, et al., *EMBO J.* 17: 5321-333 (1998); Kelly et al., *Blood*, 99: 310-318 (2002)).

Los siguientes Ejemplos se proporcionan solo para ilustrar más a fondo la memoria descriptiva y no pretenden limitar su alcance, salvo en lo provisto en las reivindicaciones adjuntas a la misma. La presente divulgación abarca modificaciones y variaciones de los métodos indicados en la presente memoria que serían obvias para una persona con un dominio normal de la técnica. Los materiales, reactivos y similares a los que se hace referencia pueden obtenerse de fuentes comerciales, a no ser que se indique algo distinto.

Ejemplo 1

Detección de la proteína quinasa ROS1 por inmunohistoquímica (IHC)

Las proteínas de fusión ROS1 han sido descritas previamente en líneas celulares de NSCLC y en muestras tumorales humanas de NSCLC (así como en otros tejidos, tales como el cáncer de hígado y el de cerebro). Para determinar si las proteínas de fusión ROS1 descubiertas en NSCLC pudieran o no ser detectadas por inmunohistoquímica, se utilizó un anticuerpo monoclonal de conejo específico a ROS1. El anticuerpo específico a ROS1 (concretamente, el anticuerpo monoclonal de conejo ROS1 D4D6) que se utilizó en estos estudios ha sido descrito previamente (véase la publicación de PCT n° WO2010/093928), y se une específicamente a una región de la proteína quinasa ROS1 humana que está en C-terminal al dominio quinasa de la proteína ROS1. Aunque el anticuerpo D4D6 no está todavía comercialmente disponible, hay anticuerpos específicos a ROS1 similares disponibles comercialmente en diversos proveedores, incluyendo, sin limitación, el anticuerpo Ros (C-20), n° de catálogo sc-6347 de Santa Cruz Biotechnology, Inc., (Santa Cruz, California) y el anticuerpo ROS1 (69D6), n° de catálogo 3266 de Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, Massachusetts).

Para estos estudios, se preparó una cohorte de 556 muestras humanas de tumores de NSCLC como bloques de parafina. Todas las muestras tumorales fueron evaluadas por un patólogo, y se encontró que comprendían 246 casos de adenocarcinoma, 64 carcinomas broncoalveolares, 226 carcinomas escamosos y 20 megacíticos. Las identificaciones de las muestras seleccionadas, incluyendo las muestras positivas a ROS1 y a EGFR mutante, fueron confirmadas por un patólogo independiente.

Inmunohistoquímica: Se desparafinaron secciones tisulares de 4-6 µm y se rehidrataron a través de xileno y etanol graduado, respectivamente (por ejemplo, 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). Los portaobjetos se enjuagaron en diH₂O, después se sometieron a la recuperación de antígeno en una Decloaking Chamber (Biocare Medical, Concord, California) usando 1,0 mM EDTA, pH 8, y reglajes del fabricante: SP1 125°C durante 30 segundos y SP2 90°C durante 10 segundos. Los portaobjetos se inactivaron en H₂O₂ al 3% durante 10 minutos, luego se lavaron en diH₂O. Después de bloquear en solución salina tamponada con Tris al 0,5% Tween-20 (TBST) positivo/suero de cabra al 5% en una cámara humidificada, los portaobjetos fueron incubados durante la noche a 4°C con AcM XP™ de conejo ROS1 (D4D6) a 0,19 µg/ml diluido en diluyente de anticuerpos SignalStain® (n° 8112 Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts). Después de lavar con TBST, la detección se realizó con ENVISION+ (Dako, Carpintería, California) o SIGNALSTAIN® Boost IHC Detection Reagent (HRP, conejo) (n° de catálogo 8114, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts) con una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente en una cámara humidificada. Después de lavar los portaobjetos (por ejemplo, tres veces en TBST), los portaobjetos fueron expuestos a continuación a NovaRed (Vector Laboratories, Burlingame, California) preparado según las instrucciones del fabricante.

Los portaobjetos se revelaron durante 1 minuto y después se aclararon en diH₂O. Los portaobjetos se sometieron a contratinción incubando en hematoxilina (lista para usar, comercialmente disponible de Invitrogen (Carlsbad, California) n° de catálogo 00-8011) durante 1 minuto, se aclararon durante 30 segundos en diH₂O, se incubaron durante 20 segundos en reactivo azulado (Richard Allan Scientific, Kalamazoo, Michigan (empresa del grupo Thermo Scientific), n° de catálogo 7301), y finalmente se lavaron durante 30 segundos en diH₂O. Los portaobjetos se deshidrataron en 2 cambios de etanol al 95% durante 20 segundos cada uno y 2 cambios de etanol al 100% durante 2 minutos cada uno. Los portaobjetos se aclararon en 2 cambios de xileno durante 20 segundos cada uno, después se secaron al aire. Los cubreobjetos se montaron usando VectaMount (Vector Laboratories, Burlingame, California). Los portaobjetos se secaron al aire, luego se evaluaron bajo el microscopio. Las imágenes (20×) se adquirieron usando un microscopio Olympus CX41 equipado con una cámara Olympus DP70 y soporte lógico DP Controller.

De los 556 tumores NSCLC seleccionados por inmunohistoquímica con el Rmab ROS1 D4D6 específico a ROS1, se identificaron 9 tumores positivos a ROS1. El desglose fue el siguiente:

De los 246 adenocarcinomas, 8 (o el 3,3%) fueron positivos para la quinasa ROS1.

De los 20 carcinomas megacíticos, 1 (o el 5,0%) fueron positivos para la quinasa ROS1.

Se observaron diversos patrones de tinción ROS1 IHC que van desde el citoplasmático débil hasta los agregados perinucleares fuertes (véanse las Figuras 1A-F). En 5/9 (55%) casos ROS1 se localizó difusamente en el citoplasma (Fig. 1A). Se observó fuerte tinción citoplasmática en 1 carcinoma megacítico (Fig. 1C). Dos casos presentaban fenotipos diferenciados entre sí, siendo uno citoplasmático difuso con áreas de tinción punteada de la membrana plasmática (Fig. 1D) y la otra tinción vesicular total (Fig. 1F). También debe observarse que en casos excepcionales

las células no neoplásicas, tales como macrófagos y células epiteliales bronquiales, fueron teñidas con ROS1 D4D6. La expresión de ROS1 estaba ausente en el tejido estromal circundante.

Ejemplo 2

Detección de una fusión ROS1 en muestras de cáncer humano usando el ensayo FISH

- 5 Se detectó la presencia de la proteína de fusión de SLC34A2-ROS1 y/o de la proteína CD74-ROS1 (u otra proteína de fusión ROS1) en muestras tumorales de NSCLC humano empleando un ensayo de hibridación fluorescente *in situ* (FISH), según se ha descrito previamente. Véase, por ejemplo, Verma et al., HUMAN CHROMOSOMES: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUES, Pergamon Press, Nueva York, Nueva York (1988). Se estudiaron más de 200 muestras tumorales de NSCLC humano introducidas en parafina.
- 10 Para analizar las reordenaciones que tienen que ver con ROS1, se diseñó una sonda de escisión de dos colores. Se obtuvieron una sonda proximal (clon de BAC RP1-179P9) y dos sondas distales (clon BAC RP11-323017, RP1-94G16) (estando todas ellas comercialmente disponibles, por ejemplo, en Invitrogen Inc., Carlsbad, California, como n^{os} de catálogo RPC11.C y RPC111.C). Las localizaciones en las que estas sondas se unen al gen ROS1 se muestran esquemáticamente en la Fig. 2. Como se muestra en la Fig. 2A, la sonda proximal se marcó con Spectrum Orange dUTP, y las sondas distales se marcaron con Spectrum Green dUTP. El marcado de las sondas se realizó con el Nick Translation DNA Labeling Kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Enzo Life Sciences, Farmingdale, Nueva York). Se realizó FISH en secciones tisulares FFPE de 4 µm de espesor según métodos estándar. Por ejemplo, las secciones de tejido embebidas en parafina se rehidrataron y se sometieron a recuperación de antígeno con microondas en tampón citrato 0,01M (pH 6,0) durante 11 minutos. Las secciones se digirieron con proteasa (pepsina 4 mg/ml, 2000-3000 U/mg) durante 25 minutos a 37°C, se deshidrataron y se hibridaron con la sonda FISH ajustada a 37°C durante 18 horas. Después de lavar, se aplicó 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; mg/ml) en medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, California) para la contratinción nuclear.
- 15 Los casos positivos en FISH para ROS1 se definieron como señales de escisión >15% en las células tumorales. Se utilizó el microscopio Nikon C1 Confocal, objetivo de 60× X y trifiltro (dapi, TRITC, FITC) para puntuar cada case. Para la adquisición de imágenes se utilizó el microscopio de fluorescencia de campo ancho Olympus BX-51 con objetivo de 40 X y el soporte lógico Metamorph para generar imágenes tricolor.
- 20 Por lo tanto, la sonda de reordenación ROS1 contiene dos sondas marcadas de manera diferente en lados opuestos del punto de rotura del gen ROS1 en la secuencia de la forma natural (WT) (véase la Figura 15A). Cuando se hibrida, la región ROS1 nativa aparecerá como una señal de fusión anaranjada/verde, mientras que la reordenación en este *locus* (como ocurre en la proteína de fusión SLC34A2-ROS1) dará como resultado señales separadas anaranjada y verde.
- 25 Como se muestra en la Figura 2B, se encontró un gen ROS1 reordenado en HCC78 (Figura 2B, panel izquierdo) que, como se ha descrito anteriormente, contiene una reordenación de genes que da como resultado la fusión SLC34A2-ROS1. En una de las muestras de pulmón humano —concretamente, la del pulmón 306—, se encontró un reordenamiento del gen ROS1 similar, que puede ser SLC34A2-ROS1 o CD74-ROS1.
- 30 El análisis FISH reveló una baja incidencia de esta mutación de ROS1 en la población de muestras estudiada. De los 123 tumores iniciales examinados, dos de los 123 tumores o el 1,6 % de los tumores contenían las mutaciones de fusión ROS1. Sin embargo, dada la alta incidencia del NSCLC a lo largo del mundo (más de 151.00 casos nuevos al año solamente en EE. UU.), cabe esperar que haya un número significativo de pacientes que alberguen este ROS1 mutante, pacientes que pueden beneficiarse de un régimen terapéutico inhibidor de ROS1.

Ejemplo 3

Descubrimiento del tumor NSCLC positivo para FIG-ROS1

- 45 Del Ejemplo 1, una de las muestras tumorales, concretamente el tumor 749, mostró tinción con ROS1 que se localizó en los compartimentos vesiculares (véase la Fig. 1F). Este patrón de tinción es distinto de todos los demás tumores positivos a ROS1, lo que apunta a la posibilidad de un socio de fusión ROS1 diferente.
- 50 Para determinar cuál era el patrón FISH de este tumor 749, se obtuvo de Invitrogen una tercera sonda distal RP11-213A17 para investigar más a fondo si la mutación ROS1 en este tumor podría deberse a una fusión FIG-ROS1. las fusiones entre el gen FIG y el gen ROS1 han sido descritas en glioblastoma, colangiocarcinoma y cáncer hepático (véanse Charest et al., *Genes Chromosomes Cancer* 37: 58-71, 2003; Charest et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 916-921, 2003; y la publicación de PCT n° WO2010/093928), pero esta fusión nunca antes se ha descrito en el pulmón. Dado que la fusión entre el gen FIG y el gen ROS1 no da lugar a una translocación o inversión, sino que resulta más bien de una delección intracromosómica en el cromosoma 6 de 240 kilobases, se diseñó un nuevo conjunto de sondas FISH.

Las sondas FISH utilizadas en la prueba de confirmación IHC descrita anteriormente (véase el Ejemplo 2 anterior) identificaron aquellos tumores y células con translocaciones equilibradas de ROS1 que podrían ser debidas a la presencia de una de las proteínas de fusión SLC34A2-ROS1 o a la proteína de fusión CD74-ROS1. El patrón de FISH en el pulmón 749 sugirió que el reordenamiento no era una de estas dos fusiones, sino, potencialmente, la de FIG-ROS1. Para determinar si el pulmón ID 749 era de hecho positivo para FIG-ROS1, se diseñó otro conjunto de sondas FISH (Fig. 3). Como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2, el conjunto 1 de sondas que contiene los BAC 179P9 y 323017 flanquea ambos lados del punto de rotura ROS1 en las proteínas de fusión ROS1 descritas en la presente memoria (por ejemplo, después del exón 34, 35 o 36 de ROS1) (véanse las Fig. 3 y Fig. 2A). En las células HCC78 positivas para SLC34A-ROS1 (véanse la Fig. 2B, panel izquierdo y la Fig. 4A), el conjunto 1 de sondas da como resultado una translocación equilibrada. En la línea celular de glioblastoma humano U118MG positiva para FIG-ROS1, BAC 323017 no hibridó, ya que esta sección del cromosoma 6 se suprime, dando como resultado solo señales anaranjadas (Fig. 4C). El conjunto 2 de sondas contenía 179P9 situado en ROS1 y 213A7 situado en el gen FIG, por lo que U118MG muestra tanto señales anaranjadas como verdes con este conjunto de sondas (véase la Fig. 4D). Las células HCC78 mostraron 1 cromosoma con una translocación equilibrada (por ejemplo, a partir de una fusión SLC34A2-ROS1; véanse las dos flechas amarillas en la Fig. 4B) y la flecha blanca en la Fig. 4B apunta a un cromosoma normal con las señales verde y anaranjada juntas, ya que el gen FIG y el gen ROS1 están, de hecho, muy juntos en el mismo cromosoma (véase la Fig. 4B). El cromosoma de la forma natural presentó una señal separada, debido a la distancia entre las sondas. El pulmón de ID 749, cuando fue sondeado con el conjunto 1 de sondas (Fig. 4E) o el conjunto 2 de sondas (véase la Fig. 4F), imitó el de las células U118MG (Figuras 4C y D). Estos datos fueron los primeros en mostrar la fusión de FIG-ROS1 como una delección intracromosómica en el cromosoma 6 en NSCLC.

Ejemplo 4

Aislamiento y secuenciación del gen de fusión FIG-ROS1(S) del tumor pulmonar 749

Para aislar y secuenciar la fusión ROS1 del tumor 749 (que era un tumor fijado en formol, embebido en parafina), se utilizó el siguiente protocolo.

RT-PCR de muestras tumorales FFPE: Se extrajo ARN de secciones de $3 \times 10 \mu\text{m}$ siguiendo protocolos estándar (RNeasy FFPE Kit, Qiagen). Se sintetizó el ADNc de la primera cadena a partir de 500 ng de ARN total con el uso del sistema de síntesis de primera cadena SuperScript III (Invitrogen) con cebadores específicos a genes. A continuación, se amplificó el ADNc de la fusión FIG-ROS1 con el uso de pares de cebadores de PCR FIG-F3 y ROS1-GSP3.1 para la isoforma corta y FIG-F7 y ROS1-GSP3.2 para las isoformas largas. Los cebadores GAPDH se adquirieron de Qiagen (Valencia, California).

Cebadores

ROS1-GSP3.1: CAGCAAGAGACGCAGAGTCAGTTT (SEQ ID NO: 18)

ROS1-GSP3.2: GCAGCTCAGCCAACTCTTTGTCTT (SEQ ID NO: 10)

FIG-F3: GCTGTTCTCCAGGCTGAAGTATATGG (SEQ ID NO: 19)

FIG-F7: GTAACCCTGGTGCTAGTTGCAAAG (SEQ ID NO: 20)

Se seleccionaron los cebadores para FIG porque, basándose en los patrones FISH observados en el tumor 749 y en la información publicada sobre la fusión FIG-ROS1, cabía esperar que el tumor 749 fuera una fusión FIG-ROS1.

Como se predijo, la proteína de fusión ROS1 en el tumor 749 era, de hecho, una fusión FIG-ROS1, específicamente la fusión FIG-ROS1 (S) descrita anteriormente (véase la publicación PCT nº WO2010/0923828). La Figura 5 muestra una alineación de la secuencia del bloque FFPE del tumor 749 (en la línea "sujeto") con la secuencia de FIG-ROS1(S) descrita en la publicación de PCT nº WO2010/0923828 (en la línea "consulta"). Como se muestra en la Figura 5, la identidad era 100% con 0 huecos. Dado que FIG-ROS1(S) contiene todo el dominio quinasa de la quinasa ROS1, cabe esperar que esta FIG-ROS1(S) retenga la actividad quinasa y, por lo tanto, que sea una proteína con actividad quinasa ROS1 como se describe en la presente memoria.

La SEQ ID NO: 24 presenta la secuencia de aminoácidos de FIG-ROS1(S) y la SEQ ID NO: 23 presenta la secuencia de nucleótidos de FIG-ROS1(S).

Se ha descrito la FIG-ROS (L) en el cáncer hepático (véase la publicación de PCT nº WO2010/0923828). Las SEC ID Nos.: 22 y 21 presentan las secuencias de aminoácidos y nucleótidos, respectivamente, de FIG-ROS1(L). Además, a partir del análisis de la estructura génica de los genes FIG y ROS1, se ha propuesto una tercera variante de FIG-ROS1 (concretamente, FIG-ROS1(XL) (véase la publicación de PCT nº WO2010/0923828). Las SEC ID Nos.: 26 y 25 presentan las secuencias de aminoácidos y nucleótidos, respectivamente, de FIG-ROS1(XL). Dado este hallazgo de FIG-ROS1(S) en el NSCLC, también se pueden encontrar otras variantes de la proteína de fusión FIG-ROS1 en el NSCLC.

Ejemplo 5**Detección de la expresión de la quinasa ROS1 en una muestra de cáncer de pulmón humano usando un ensayo de PCR**

- La presencia de una proteína ROS1 de longitud máxima expresada aberrantemente o de una proteína de fusión ROS1 (por ejemplo, una de las proteínas de fusión SLC34A2-ROS1, de la proteína de fusión CD74-ROS1 o de una de las proteínas de fusión FIG-ROS1) en una muestra de cáncer de pulmón humano puede detectarse mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ya sea genómica o de la transcriptasa inversa (RT), previamente descrita. Véase, por ejemplo, Cools et al., *N. Engl. J. Med.*, 348: 1201-1214 (2003).
- Sucintamente y a título de ejemplo, empleando técnicas convencionales pueden obtenerse muestras de tumor o de un derrame pleural de un paciente que padece NSCLC. Se construyen sondas de PCR contra la quinasa ROS1 truncada, la proteína de fusión SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 o FIG-ROS1. Puede utilizarse el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) para extraer ARN de las muestras del tumor o del derrame pleural. Puede extraerse ADN con el uso del DNeasy Tissue Kit (Qiagen). Para RT-PCR, el ADNc de primera cadena se sintetiza a partir de, por ejemplo, 2.5 mg de ARN total con el uso de, por ejemplo, del sistema de síntesis de la primera cadena SuperScript™ III (Invitrogen) con oligo (dT)₂₀. A continuación, se amplifica el gen ROS1 o el gen de fusión ROS1 (por ejemplo, SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 o FIG-ROS1) con el uso de pares de cebadores, por ejemplo, SLC34A2-F1 y ROS1-P3 (véase el Ejemplo 5 anterior). Para la PCR genómica, la amplificación del gen de fusión puede realizarse con el uso del *kit* de alta fidelidad Taq Platinum de ADN polimerasa (Invitrogen) con pares de cebadores; por ejemplo, SLC34A2-F1 y ROS1-R1, o SLC34A2-F1 y ROS1-R2.
- Tal análisis identificará a un paciente que tiene un cáncer caracterizado por la expresión de la quinasa ROS1 truncada (y/o una proteína de fusión ROS1 tal como FIG-ROS1, SLC34A2-ROS1 o CD74-ROS1), paciente que es candidato para el tratamiento usando un producto terapéutico inhibidor de ROS1.

Ejemplo 6**Sensibilidad de las fusiones quinasa ROS1 a TAE-6 4 y crizotinib**

- La pequeña molécula TAE-6 4, una 5-cloro-2,4-diaminofenilpirimidina, inhibe la quinasa ALK. La estructura de TAE-684 se proporciona en Galkin, et al., *Proc. National Acad. Sci* 104(1) 270-275, 2007. Otra pequeña molécula, concretamente crizotinib, también inhibe la quinasa ALK, así como la quinasa MET. La estructura de crizotinib (también denominado PF-02341066) se proporciona en Zou HY et al., *Cancer Research* 67: 4408-4417, 2007 y en la publicación de patente estadounidense nº 20080300273.
- Se determinó si TAE-684 y/o crizotinib también inhiben la actividad quinasa de los polipéptidos de fusión ROS1.
- Se obtuvieron en DSMZZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Alemania) células BaF3 y Karpas 299. Las células BaF3, que necesitan interleucina-3 para sobrevivir, 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). Se cultivaron células Karpas 299 (una línea celular de linfoma) en RPMI-1640 con FBS al 10%.
- Las células BaF3 se transdujeron con retrovirus que codifican FIG-ROS1(S), FIG-ROS1(L) o FLT-3ITD (la mutación de duplicación en tándem interna en FLT3 causa leucemia LMA) y se seleccionaron para el crecimiento independiente de IL3. Se usaron células Karpas 299, que expresan NPM-ALK, como control positivo. Los retrovirus se generaron como se ha descrito anteriormente (véase la publicación de PCT nº WO 2010/093928).
- Se realizó un ensayo MTS utilizando el CellTiter 96 Aqueous One Solution Reagent (Promega, nº de catálogo G3582). Sucintamente, se cultivaron 1×10⁵ células/pocillo en placas de 24 pocillos en 1 mL de caldo de cultivo que incluía TAE-684 de 0 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM o 1000 nM. Después de 72 horas, se añadieron 20 µl del CellTiter 96 Aqueous One Solution Reagent a cada pocillo de una placa de ensayo de 96 pocillos (fondo plano) y, a continuación, se añadieron 100 µl de células cultivadas con o sin tratamiento. Se usaron como controles los pocillos que solo tenían caldo de cultivo. La placa de 96 pocillos se incubó durante 1-4 horas a 37°C, y luego se contaron las células viables leyendo la absorbancia a 490 nm usando un lector de placas de 96 pocillos.
- Como se muestra en la Fig. 6, las células BaF3 transducidas con retrovirus que expresan uno de los polipéptidos de FIG-ROS1 dejaron de crecer en presencia de TAE-684. La FIG-ROS1(S) era menos susceptible a TAE-684 que la FIG-ROS1(L). Las células Karpas 299 también respondieron (es decir, dejaron de crecer) en presencia de TAE-684. Las células BaF3 transducidas con FLT3/ITD no fueron susceptibles a TAE-684. Los valores de CI50 de dos experimentos son como sigue en la Tabla 4, con datos de una línea celular final, concretamente, células BaF3 que expresan neomicina marcada myc, disponible solo en el segundo experimento.

Tabla 4

TAE-684	CI50	CI50
FIG-ROS1 (L)	1,78 nM	2,84 nM
FIG-ROS1 (S)	10,16 nM	15,01 nM
FLT3/ITD	419,35 nM	316,44 nM
Neo-Myc	ND	1641,84 nM
Karpas-299	4,85 nM	4,36 nM

A continuación, se evaluó el mecanismo de muerte de las células BaF3 y Karpas 299 midiendo, mediante ensayo de citometría de flujo, el porcentaje de células positivas de caspasa 3 escindidas usando caspasa-3 escindida como marcador para la apoptosis. Estos resultados se obtuvieron usando el protocolo públicamente disponible en Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, Massachusetts). Como se muestra en la Fig. 7, la presencia de TAE-684 hizo que las células BaF3 que expresan FIG-ROS1(S) o FIG-ROS1(L) murieran por apoptosis. Las células Karpas 299, que dejaron de crecer en presencia de TAE-684, no murieron por apoptosis; simplemente sufrieron el paro del ciclo celular. Así, el mecanismo mediante el cual el TAE-684 inhibe los polipéptidos de fusión FIG-ROS1 es diferente del mecanismo mediante el cual el TAE-684 inhibe la quinasa ALK.

Para identificar adicionalmente el mecanismo de acción de TAE-684 sobre los polipéptidos de fusión FIG-ROS1, las cuatro líneas celulares (es decir, células Karpas 299 y células BaF3 transducidas con retrovirus que codifican FIG-ROS1(S), FIG-ROS1(L), y FLT-3ITD) se sometieron a análisis de transferencia de tipo Western después del tratamiento con TAE-684 de 0, 10, 50, o 100 nM durante tres horas. Todos los anticuerpos procedieron de Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, Massachusetts).

Como se muestra en la Fig. 8, TAE-684 inhibió la fosforilación tanto de FIG-ROS1(S) como de FIG-ROS1(L) en células BaF3 que expresan FIG-ROS1(S) y FIG-ROS1(L). Además, se inhibió la fosforilación de STAT3, AKT y ERK, y Shp2 en células BaF3 que expresan FIG-ROS1(S) y FIG-ROS1(L). 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 ROS1, ALK, LTK, InsR e IGF1R pertenecen a la misma familia de tirosina quinasas, puede que compartan una estructura similar en el dominio quinasa. Los inhibidores o anticuerpos de quinasas diseñados contra ALK, LTK, InsR e IGF1R pueden tener efectos terapéuticos contra la quinasa ROS1.

A continuación, se realizó un conjunto paralelo de experimentos en las mismas células usando los mismos protocolos con la adición de otro control negativo; concretamente, células BaF3 transducidas con el marcaje neo-myc, para comparar dos terapias ALK; concretamente, TAE-684 y crizotinib.

Como se muestra en la Fig. 9A (TAE-684) y la Fig. 9B (crizotinib), las células BaF3 que contenían la proteína de fusión FIG-ROS1 eran más sensibles a TAE-684 que a crizotinib a la misma concentración de cada producto terapéutico. Puede ser que el crizotinib no sea tan eficaz como una dosis similar de TAE-684, puesto que ni siquiera el control positivo —concretamente, las células Karpas 299 que expresan la proteína de fusión NPM-ALK—era sensible a crizotinib en comparación con TAE-684 a las mismas concentraciones. Ambos controles negativos (es decir, BaF3 transducidas con FLT3-ITD o BaF3 transducidas con neo-myc) eran menos sensibles a crizotinib y a TAE-684 que las células BaF3 que expresan la proteína FIG-ROS1 y las células Karpas 299 que expresan la proteína NPM-ALK.

Después de un tratamiento con 0, 0,1, 0,3 o 1,0 uM de crizotinib durante tres horas se realizó el análisis de transferencia de tipo Western utilizando anticuerpos disponibles en Cell Signaling Technology, Inc. Según se muestra en la Figura 10, el crizotinib inhibió la fosforilación tanto de FIG-ROS1(S) como de FIG-ROS1(L) en células BaF3 que expresan FIG-ROS1(S) y FIG-ROS1(L). Además, el crizotinib inhibió la fosforilación de STAT3 y ERK en células BaF3 que expresan FIG-ROS1(S) y FIG-ROS1(L). La fosforilación de STAT3 y ERK no se vio afectada en las células BaF3 transducidas con el retrovirus FLT-3ITD, tras el tratamiento con crizotinib. El crizotinib también inhibió la fosforilación de ALK, STAT3 y ERK en células Karpas 299. Dado que ROS1, ALK, LTK, InsR e IGF1R a la misma familia de tirosina quinasas, puede que compartan una estructura similar en el dominio quinasa. Los inhibidores o anticuerpos de quinasas diseñados contra ALK, LTK, InsR e IGF1R pueden tener efectos terapéuticos contra la quinasa ROS1.

Ejemplo 15

Estudio de NSCLC que expresa ALK y/o ROS1

Además de la quinasa ROS1, se han descrito también NSCLC que contienen proteínas que tienen actividad ALK (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses 7.700.339, 7.605.131, 7.728.120). Usando los métodos de IHC descritos anteriormente en el Ejemplo 1, se examinaron numerosas muestras FFPE de tumores de NSCLC humano para determinar la unión específica mediante anticuerpos anti ROS1 o anti ALK. Tales anticuerpos están comercialmente disponibles en numerosas fuentes.

Las mismas muestras se examinaron también con FISH para el gen ROS1 o para el gen ALK usando métodos estándar. Por ejemplo, en los Ejemplos anteriores se describe un protocolo FISH para el gen ROS1. En la patente estadounidense nº 7.700.339 se describe un protocolo FISH para ALK. Asimismo, en la publicación de patente estadounidense nº 20110110923 se describe otro ensayo FISH). Los resultados del examen se muestran a continuación en las Tablas 5 (muestras positivas a ROS1) y 6 (muestras positivas para ALK).

Tabla 5 Histopatología de muestras positivas a ROS1

Nº de paciente	ID del tumor	Diagnóstico	Patrón histológico (%)	Puntuación IHC	FISH ROS1
1	147	Adenocarcinoma	BAC (40), papilar (30), acinar (20), sólido (10)	3 +	+
2	306	Adenocarcinoma	acinar (70), papilar (20) y sólido (10)	3 +	+
3	570	Adenocarcinoma	acinar (90), BAC (5), micropapilar (5)	3 +	+
4	400037	Adenocarcinoma	acinar	2 +	+
5	668	Adenocarcinoma	sólido (80), acinar (10), BAC (10)	1 +	+
6	702	Adenocarcinoma	papilar (40), acinar (30), sólido (30)	1 +	+
7	749	Adenocarcinoma	sólido (80), acinar (20)	1 +	+, delección verde
8	760	Adenocarcinoma	células en forma de anillo de sellar	3 +	+
9	575	Macrocyto		2 +	No puntuable

Tabla 6: Histopatología de casos positivos para ALK

Nº de paciente	ID del tumor	Diagnóstico	Patrón histológico (%)	FISH ALK
1	187	Adenocarcinoma	sólido características de células focales en forma de anillo de sellar	+
2	307	Adenocarcinoma	BAC (30), acinar (10), papilar (10), sólido (50) células claras y características mucinosas	+
3	587	Adenocarcinoma	acinar (85), sólido (10), papilar (5)	No puntuable
4	618	Adenocarcinoma	sólido	+
5	645	Adenocarcinoma	sólido (70), BAC (30)	+
6	652	Adenocarcinoma	papilar (60), micropapilar (40)	+
7	663	Adenocarcinoma	papilar (50), BAC (50)	+

Nº de paciente	ID del tumor	Diagnóstico	Patrón histológico (%)	FISH ALK
8	664	Adenocarcinoma	acinar	+
9	666	Adenocarcinoma	sólido (90), papilar (10)	+
10	670	Adenocarcinoma	sólido (60), papilar (40)	+
11	680	Adenocarcinoma	sólido (70) y acinar (30) con características de células en forma de anillo de sellar	+
12	759	Adenocarcinoma	sólido células en forma de anillo de sellar	+
13	580	Adenocarcinoma (incierto)		+
14	70	Adenocarcinoma	sólido	+
15	383	Adenocarcinoma	BAC (40), papilar (30), acinar (30)	+
16	395	Adenocarcinoma	sólido	+
17	278	Escamoso; carcinoma megacítico (incierto)		+
18	330	Carcinoma neuroendocrino megacítico		+
19	503	Escamoso		+
20	615	Escamoso		+
21	644	Escamoso		+
22	691	Escamoso		+

En función de este examen de NSCLC humano tanto por IHC como por FISH, se halló que la expresión de ALK y ROS1 en estos tumores es mutuamente excluyente. En otras palabras, si un tumor de NSCLC es conducido por ALK, no expresará ROS1. Asimismo, si un tumor de NSCLC es dirigido por ROS1, no expresará ALK. De este modo, un fármaco terapéutico —tal como crizotinib o TAE-684— que inhiba tanto la actividad de ROS1 como la actividad de ALK será particularmente eficaz en el tratamiento del NSCLC.

Ejemplo 16

Análisis de mutaciones de EGFR en tumores de NSCLC positivos a ROS1 y ALK

Se examinó el estado mutacional de todos los tumores positivos a ROS1 y ALK en las cohortes de pacientes usando IHC con anticuerpos de EGFR específicos a la mutación (EGFR L858R y EGFR E746-A750del (Yu et al., 2009, *Clin. Cancer Res.*, 15:3023-28)). Los portaobjetos fueron teñidos con AcM de conejo receptor de EGF (específico al mutante L858R) (43B2) (1,2 µg/ml), AcM XP® de conejo receptor de EGF (específico a E746-A750del) (6B6) (8,5 µg/ml) o AcM XP® de conejo receptor de EGF (D38B1) (0,28 µg/ml), (nº 3197, nº 2085 y nº 4267, respectivamente, todos de Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts) todos diluidos en diluyente de anticuerpos SignalStain® (nº 8112 de Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts), incubados durante 1 hora a temperatura ambiente, lavados, luego incubados con el reactivo de detección por IHC SignalStain® Boost (HRP, conejo) (Cell Signaling Technology, nº 8114) durante 30 minutos. Todos los portaobjetos fueron expuestos a un sustrato NOVARED (Vector Laboratories, Burlingame, California), y, a continuación, se montaron cubreobjetos. Se tomaron imágenes (20×) usando un microscopio Olympus CX41 equipado con una cámara Olympus DP70 y soporte lógico DP Controller.

Según se esperaba, todos los tumores positivos a ROS1 y ALK expresaron el EGFR total. Inesperadamente, fueron identificados dos tumores positivos a EGFR L858R/ALK (pacientes 3 y 8), uno positivo a EGFR L858R/ROS1 (paciente 1) y uno positivo a EGFR E746-A750del/ROS1 (paciente 6) (véanse las Figuras 11A-H). La secuenciación confirmó la presencia de mutaciones de EGFR en los dos tumores positivos a ROS1.

Equivalentes

Ha de ser entendido que, aunque la divulgación ha sido descrita junto con descripción detallada de la misma, la anterior descripción está pensada para ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que está definida por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Cell Signaling Technology, Inc.

<120> Quinasa EGFR y ROS1 en cánceres

5 <130> CST-321

<150> 61/635,057

<151> 18-04-2012

10 <150> 61/787,033

<151> 15-03-2013

<160> 36

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 2347

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

25 <400> 1

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

ES 2 655 842 T3

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
 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

ES 2 655 842 T3

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
 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

ES 2 655 842 T3

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
			705				710						715		
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		
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		
Ser	Glu	Ile	Ser	Gln	Asn	Ala	Leu	Met	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Arg	Leu	Phe
			885				890						895		

ES 2 655 842 T3

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
 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

ES 2 655 842 T3

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			
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			

ES 2 655 842 T3

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
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

ES 2 655 842 T3

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 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		

ES 2 655 842 T3

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 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

ES 2 655 842 T3

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
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		

5 <210> 2
 <211> 7368
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polinucleótido Sintético

5

<400> 2

caagctttca agcattcaaa ggtctaaatg aaaaaggcta agtattattt caaaaggcaa	60
gtatatccta atatagcaaa acaaacaaag caaaatccat cagctactcc tccaattgaa	120
gtgatgaagc ccaaataatt catatagcaa aatggagaaa attagaccgg ccatctaaaa	180
atctgccatt ggtgaagtga tgaagaacat ttactgtctt attccgaagc ttgtcaattt	240
tgcaactctt ggctgcctat ggatttctgt ggtgcagtgt acagttttta atagctgcct	300
aaagtcgtgt gtaactaatc tgggccagca gcttgacctt ggcacaccac ataactctgag	360
tgaaccgtgt atccaaggat gtcacttttg gaactctgta gatcagaaaa actgtgcttt	420
aaagtgtcgg gagtcgtgtg aggttggctg tagcagcgcg gaaggtgcat atgaagagga	480
agtactggaa aatgcagacc taccaactgc tccctttgct tcttccattg gaagccacaa	540
tatgacatta cgatggaaat ctgcaaactt ctctggagta aaatacatca ttcagtggaa	600
atatgcacaa cttctgggaa gctggactta tactaagact gtgtccagac cgtcctatgt	660
ggtcaagccc ctgcaccctt tcaactgagta cattttccga gtggtttgga tcttcacagc	720
gcagctgcag ctctactccc ctccaagtcc cagttacagg actcatcctc atggagtcc	780
tgaaactgca cctttgatta ggaatattga gagctcaagt cccgacactg tggaagtcag	840
ctgggatcca cctcaattcc caggtggacc tattttgggt tataacttaa ggctgatcag	900
caaaaatcaa aaattagatg cagggacaca gagaaccagt ttccagtttt actccacttt	960
accaaatact atctacaggt tttctattgc agcagtaa at gaagttggtg agggccaga	1020
agcagaatct agtattacca cttcatcttc agcagttcaa caagaggaac agtggctctt	1080
tttatccaga aaaacttctc taagaaagag atctttaaaa catttagtag atgaagcaca	1140
ttgccttcgg ttggatgcta tataccataa tattacagga atatctgttg atgtccacca	1200
gcaaattggt tatttctctg aaggaactct catatgggcg aagaaggctg ccaacatgtc	1260
tgatgtatct gacctgagaa ttttttacag aggttcagga ttaatttctt ctatctccat	1320

ES 2 655 842 T3

agattggctt tatcaaagaa tgtatttcat catggatgaa ctggtatgtg tctgtgattt	1380
agagaactgc tcaaacatcg aggaaattac tccacctct attagtgcac ctcaaaaaat	1440
tgtggctgat tcatacaatg ggtatgtctt ttacctctg agagatggca tttatagagc	1500
agaccttctt gtaccatctg gccgggtgtc agaagctgtg cgtattgtgg agagttgcac	1560
gttaaaggac tttgcaatca agccacaagc caagcgaatc atttacttca atgacactgc	1620
ccaagtcttc atgtcaacat ttctggatgg ctctgcttcc catctcatcc tacctcgcat	1680
cccctttgct gatgtgaaaa gttttgcttg tgaaaacaat gactttcttg tcacagatgg	1740
caaggtcatt ttccaacagg atgctttgtc ttttaatgaa ttcactgtgg gatgtgacct	1800
gagtcacata gaagaatttg ggtttggtaa cttggctcat tttggctcat cctccagct	1860
gcacctctg ccaggccgcc cgcaggagct ttccgtgtg tttggctctc accaggctct	1920
tgttcaatgg aagcctctg cctttgccat aggagccaat gtcactctga tcagtgatat	1980
tattgaactc tttgaattag gcccttctgc ctggcagaac tggacctatg aggtgaaagt	2040
atccacccaa gacctctg aagtcactca tattttcttg aacataagtg gaacctgct	2100
gaatgtacct gagctgcaga gtgctatgaa atacaagggt tctgtgagag caagttctcc	2160
aaagaggcca ggcctctggt cagagccctc agtgggtact accctggtgc cagctagtga	2220
accaccattt atcatggctg tgaaagaaga tgggctttgg agtaaaccat taaatagctt	2280
tggcccagga gagttcttat cctctgatat aggaaatgtg tcagacatgg attggtataa	2340
caacagcctc tactacagtg acacgaaagg cgacgttttt gtgtggctgc tgaatgggac	2400
ggatatctca gagaattatc acctaccag cattgcagga gcaggggctt tagcttttga	2460
gtggctgggt cactttctct actgggtgg aaagacatat gtgatacaaa ggcagtctgt	2520
gttgacggga cacacagaca ttgttacctc cgtgaagcta ttggtgaatg acatgggtgt	2580
ggattcagtt ggtggatata tctactggac cacactctat tcagtggaaa gcaccagact	2640
aatggggaa agttcccttg tactacagac acagccttgg ttttctggga aaaaggtaat	2700
tgctctaact ttagacctca gtgatgggt cctgtattgg ttggttcaag acagtcaatg	2760
tattcacctg tacacagtg ttcttcgggg acagagcact ggggatacca ccatcacaga	2820
atttgcagcc tggagtactt ctgaaatttc ccagaatgca ctgatgtact atagtggctg	2880
gctgttctg atcaatggct ttaggattat cacaactcaa gaaataggtc agaaaaccag	2940
tgtctctgtt ttggaaccag ccagatttaa tcagttcaca attattcaga catcccttaa	3000
gccctgccca gggaactttt cctttacccc taaggttatt ccagattctg ttcaagagtc	3060
ttcatttagg attgaaggaa atgcttcaag ttttcaaatc ctgtggaatg gtccccctgc	3120
ggtagactgg ggtgtagttt tetacagtgt agaatttagt gctcattcta agttcttggc	3180
tagtgaacaa cactctttac ctgtatttac tgtggaagga ctggaacctt atgccttatt	3240

ES 2 655 842 T3

taatctttct gtcactcctt atacctactg gggaaagggc cccaaaacat ctctgtcact	3300
tcgagcacct gaaacagttc catcagcacc agagaacccc agaataattta tattaccaag	3360
tggaaaatgc tgcaacaaga atgaagttgt ggtggaattt aggtggaaca aacctaagca	3420
tgaaaatggg gtgttaacaa aatttgaaat tttctacaat atatccaatc aaagtattac	3480
aaacaaaaca tgtgaagact ggattgctgt caatgtcact ccctcagtga tgtcttttca	3540
acttgaaggc atgagtccca gatgctttat tgccttcacg gttagggcct ttacatctaa	3600
ggggccagga ccatatgctg acgttgtaaa gtctacaaca tcagaaatca acccatttcc	3660
tcacctcata actcttcttg gtaacaagat agttttttta gatatggatc aaaatcaagt	3720
tgtgtggacg ttttcagcag aaagagttat cagtgccgtt tgctacacag ctgataatga	3780
gatgggatat tatgctgaag gggactcact ctttcttctg cacttgcaac atcgctctag	3840
ctctgagctt ttccaagatt cactggtttt tgatatcaca gttattacaa ttgactggat	3900
ttcaaggcac ctctactttg cactgaaaga atcacaaaat ggaatgcaag tatttgatgt	3960
tgatcttgaa cacaagggtga aatatcccag agagggtgaag attcacaata ggaattcaac	4020
aataatttct ttttctgtat atcctctttt aagtcgcttg tattggacag aagtttccaa	4080
ttttggctac cagatgttct actacagtat tatcagtcac accttgccac gaattctgca	4140
accacagct acaaaccaac aaaaacaaaag gaatcaatgt tcttgtaatg tgactgaatt	4200
tgagttaagt ggagcaatgg ctattgatac ctctaaccta gagaaacat tgatatactt	4260
tgccaaagca caagagatct gggcaatgga tctggaaggc tgtcagtgtt ggagagttat	4320
cacagtacct gctatgctcg caggaaaaac ccttggttagc ttaactgtgg atggagatct	4380
tatatactgg atcatcacag caaaggacag cacacagatt tatcaggcaa agaaaggaaa	4440
tggggccatc gtttcccagg tgaaggccct aaggagtagg catatcttgg cttacagttc	4500
agttatgcag ccttttccag ataaagcggt tctgtctcta gcttcagaca ctgtggaacc	4560
aactatactt aatgccacta acactagcct cacaatcaga ttacctctgg ccaagacaaa	4620
cctcacatgg tatggcatca ccagccctac tccaacatac ctggtttatt atgcagaagt	4680
taatgacagg aaaaacagct ctgacttgaa atatagaatt ctggaatttc aggacagtat	4740
agctcttatt gaagatttac aaccattttc aacatacatg atacagatag ctgtaaaaaa	4800
ttattattca gatccttttg aacatttacc accaggaaaa gagatttggg gaaaaactaa	4860
aatggagta ccagaggcag tgcagctcat taatacaact gtgcggctcag acaccagcct	4920
cattatatct tggagagaat ctcaaacgcc aaatggacct aaagaatcag tccgttatca	4980
gttggaatc tcacacctgg ccctaattcc tgaaactcct ctaagacaaa gtgaatttcc	5040
aatggaagg ctcaactctcc ttgttactag actgtctggt ggaaatattt atgtgttaaa	5100

ES 2 655 842 T3

gggtcttgcc tgccactctg aggaaatgtg gtgtacagag agtcatcctg tcaactgtgga 5160
 aatgtttaac acaccagaga aaccttattc cttgggtcca gagaacacta gtttgcaatt 5220
 taattggaag gctccattga atgttaacct catcagatct tgggttgagc tacagaagtg 5280
 gaaatacaat gagttttacc atgttaaaac ttcattgcagc caaggtcctg cttatgtctg 5340
 taatatcaca aatctacaac cttatacttc atataatgtc agagtagtgg tggtttataa 5400
 gacgggagaa aatagcacct cacttccaga aagctttaag acaaaagctg gagtccaaa 5460
 taaaccaggc attcccaaat tactagaagg gagtaaaaat tcaatacagt gggagaaaagc 5520
 tgaagataat ggatgtagaa ttacatacta tatccttgag ataagaaaga gcacttcaaa 5580
 taatttcag aaccagaatt taaggtggaa gatgacattt aatggatcct gcagtagtgt 5640
 ttgcacatgg aagtccaaaa acctgaaagg aatatttcag ttcagagtag tagctgcaa 5700
 taatctaggg tttgtgtaat atagtggaat cagtgagaat attatattag ttggagatga 5760
 tttttggata ccagaaacaa gtttcatact tactattata gttggaatat ttctggttgt 5820
 tacaatccca ctgacctttg tctggcatag aagattaaag aatcaaaaaa gtgccaagga 5880
 aggggtgaca gtgcttataa acgaagacaa agagttggct gagctgcgag gtctggcagc 5940
 cggagtaggc ctggctaatt cctgctatgc aatacatact ctccaacccc aagaggagat 6000
 tgaaaatcct cctgccttcc ctccggaaaa actgactctg cgtctcttgc tgggaagtgg 6060
 agccttttga gaagtgtatg aaggaaacagc agtggacatc ttaggagttg gaagtggaga 6120
 aatcaaagta gcagtgaaga ctttgaagaa gggttccaca gaccaggaga agattgaatt 6180
 cctgaaggag gcacatctga tgagcaaatt taatcatccc aacattctga agcagcttgg 6240
 agtttgtctg ctgaatgaac cccaatacat tatcctggaa ctgatggagg gaggagacct 6300
 tcttacttat ttgcgtaaag cccggatggc aacgttttat ggtcctttac tcaccttgg 6360
 tgaccttgta gacctgtgtg tagatatctc aaaaggctgt gtctacttgg aacggatgca 6420
 tttcattcac agggatctgg cagctagaaa ttgccttgtt tccgtgaaag actataccag 6480
 tccacggata gtgaagattg gagactttgg actcgcagca gacatctata aaaatgatta 6540
 ctatagaaag agaggggaag gcctgctccc agttcgttgg atggctccag aaagtttgat 6600
 ggatggaatc ttcactactc aatctgatgt atggctcttt ggaattctga tttgggagat 6660
 ttttaactct ggtcatcagc cttatccagc tcattccaac cttgatgtgt taaactatgt 6720
 gcaaacagga gggagactgg agccaccaag aaattgtcct gatgatctgt ggaatttaat 6780
 gaccagtgct tgggctcaag aaccgacca aagacctact tttcatagaa ttcaggacca 6840
 acttcagtta ttcagaaatt ttttcttaa tagcatttat aagtcagag atgaagcaaa 6900
 caacagtga gtcataaatg aaagcttga aggtgaagat ggcgatgtga tttgtttgaa 6960
 ttcagatgac attatgccag ttgctttaat ggaaacgaag aaccgagaag ggttaacta 7020
 tatggactct gctacagaat gtggccaagg tgaagaaaag tctgagggtc ctctaggctc 7080
 ccaggaatct gaatcttgtg gtctgaggaa agaagagaag gaaccacatg cagacaaaga 7140
 tttctgcca gaaaaacaag tggcttactg cccttctggc aagcctgaag gcctgaacta 7200
 tgctgtctc actcacagtg gatattgaga tgggtctgat taatagcgtt gtttgggaaa 7260
 tagagagttg agataaacac tctcattcag tagttactga aagaaaactc tgctagaatg 7320
 ataaatgtca tgggtgtcta taactccaaa taaacaatgc aacgttcc 7368

ES 2 655 842 T3

<210> 3
 <211> 1210
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

 10 <400> 3
 Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
 1 5 10 15

 Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln
 20 25 30

 Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe
 35 40 45

 Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn
 50 55 60

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

 Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val
 85 90 95

 Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr
 100 105 110

 Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn
 115 120 125

 Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu
 130 135 140

 His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu
 145 150 155 160

ES 2 655 842 T3

Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met
165 170 175

Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro
180 185 190

Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln
195 200 205

Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg
210 215 220

Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys
225 230 235 240

Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp
245 250 255

Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro
260 265 270

Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly
275 280 285

Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His
290 295 300

Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu
305 310 315 320

Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val
325 330 335

Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn
340 345 350

Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp
355 360 365

Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr
370 375 380

Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu
385 390 395 400

Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp
405 410 415

ES 2 655 842 T3

Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln
 420 425 430
 His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu
 435 440 445
 Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser
 450 455 460
 Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu
 465 470 475 480
 Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu
 485 490 495
 Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro
 500 505 510
 Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn
 515 520 525
 Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly
 530 535 540
 Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro
 545 550 555 560
 Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro
 565 570 575
 Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val
 580 585 590
 Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp
 595 600 605
 Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys
 610 615 620
 Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly
 625 630 635 640
 Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu
 645 650 655
 Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His

ES 2 655 842 T3

660					665					670					
Ile	Val	Arg	Lys	Arg	Thr	Leu	Arg	Arg	Leu	Leu	Gln	Glu	Arg	Glu	Leu
		675					680					685			
Val	Glu	Pro	Leu	Thr	Pro	Ser	Gly	Glu	Ala	Pro	Asn	Gln	Ala	Leu	Leu
	690					695					700				
Arg	Ile	Leu	Lys	Glu	Thr	Glu	Phe	Lys	Lys	Ile	Lys	Val	Leu	Gly	Ser
705					710					715					720
Gly	Ala	Phe	Gly	Thr	Val	Tyr	Lys	Gly	Leu	Trp	Ile	Pro	Glu	Gly	Glu
				725					730					735	
Lys	Val	Lys	Ile	Pro	Val	Ala	Ile	Lys	Glu	Leu	Arg	Glu	Ala	Thr	Ser
			740					745					750		
Pro	Lys	Ala	Asn	Lys	Glu	Ile	Leu	Asp	Glu	Ala	Tyr	Val	Met	Ala	Ser
		755					760					765			
Val	Asp	Asn	Pro	His	Val	Cys	Arg	Leu	Leu	Gly	Ile	Cys	Leu	Thr	Ser
	770					775					780				
Thr	Val	Gln	Leu	Ile	Thr	Gln	Leu	Met	Pro	Phe	Gly	Cys	Leu	Leu	Asp
785					790					795					800
Tyr	Val	Arg	Glu	His	Lys	Asp	Asn	Ile	Gly	Ser	Gln	Tyr	Leu	Leu	Asn
				805					810					815	
Trp	Cys	Val	Gln	Ile	Ala	Lys	Gly	Met	Asn	Tyr	Leu	Glu	Asp	Arg	Arg
			820					825					830		
Leu	Val	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Val	Leu	Val	Lys	Thr	Pro
		835					840					845			
Gln	His	Val	Lys	Ile	Thr	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala	Lys	Leu	Leu	Gly	Ala
	850					855					860				
Glu	Glu	Lys	Glu	Tyr	His	Ala	Glu	Gly	Gly	Lys	Val	Pro	Ile	Lys	Trp
865					870					875					880
Met	Ala	Leu	Glu	Ser	Ile	Leu	His	Arg	Ile	Tyr	Thr	His	Gln	Ser	Asp
				885					890					895	
Val	Trp	Ser	Tyr	Gly	Val	Thr	Val	Trp	Glu	Leu	Met	Thr	Phe	Gly	Ser
			900					905					910		

ES 2 655 842 T3

Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu
 915 920 925
 Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr
 930 935 940
 Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys
 945 950 955 960
 Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln
 965 970 975
 Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro
 980 985 990
 Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp
 995 1000 1005
 Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro Gln Gln Gly Phe
 1010 1015 1020
 Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu Ser Ser Leu
 1025 1030 1035
 Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp Arg Asn
 1040 1045 1050
 Gly Leu Gln Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln Arg
 1055 1060 1065
 Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp
 1070 1075 1080
 Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro
 1085 1090 1095
 Lys Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln
 1100 1105 1110
 Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro
 1115 1120 1125
 His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln
 1130 1135 1140
 Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp Ser Pro Ala His Trp Ala
 1145 1150 1155

Gln Lys Gly Ser His Gln Ile Ser Leu Asp Asn Pro Asp Tyr Gln
1160 1165 1170

Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro Asn Gly Ile Phe Lys
1175 1180 1185

Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val Ala Pro Gln
1190 1195 1200

Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala
1205 1210

<210> 4

<211> 1186

<212> PRT

<213> **Secuencia Artificial**

<220>

<223> **Polipéptido Sintético**

<400>

Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln
1 5 10 15

Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn
20 25 30

Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg
35 40 45

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

Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu
65 70 75 80

Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala
85 90 95

Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro
100 105 110

Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn
115 120 125

Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val
130 135 140

ES 2 655 842 T3

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

ES 2 655 842 T3

Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val
 405 410 415
 Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile
 420 425 430
 Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala
 435 440 445
 Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr
 450 455 460
 Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln
 465 470 475 480
 Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro
 485 490 495
 Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val
 500 505 510
 Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn
 515 520 525
 Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn
 530 535 540
 Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His
 545 550 555 560
 Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met
 565 570 575
 Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val
 580 585 590
 Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly
 595 600 605
 Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr
 610 615 620
 Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile
 625 630 635 640
 Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg
 645 650 655

ES 2 655 842 T3

Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly
 660 665 670
 Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe
 675 680 685
 Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys
 690 695 700
 Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile
 705 710 715 720
 Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu
 725 730 735
 Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg
 740 745 750
 Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu
 755 760 765
 Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn
 770 775 780
 Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly
 785 790 795 800
 Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala
 805 810 815
 Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe
 820 825 830
 Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu
 835 840 845
 Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His
 850 855 860
 Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val
 865 870 875 880
 Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala
 885 890 895
 Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro

ES 2 655 842 T3

900	905	910
Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met 915 920 925		
Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe 930 935 940		
Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp 945 950 955 960		
Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala 965 970 975		
Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr 980 985 990		
Leu Ile Pro Gln Gln Gly Phe Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr 995 1000 1005		
Pro Leu Leu Ser Ser Leu Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val 1010 1015 1020		
Ala Cys Ile Asp Arg Asn Gly Leu Gln Ser Cys Pro Ile Lys Glu 1025 1030 1035		
Asp Ser Phe Leu Gln Arg Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu 1040 1045 1050		
Thr Glu Asp Ser Ile Asp Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu Tyr 1055 1060 1065		
Ile Asn Gln Ser Val Pro Lys Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn 1070 1075 1080		
Pro Val Tyr His Asn Gln Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp 1085 1090 1095		
Pro His Tyr Gln Asp Pro His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro Glu 1100 1105 1110		
Tyr Leu Asn Thr Val Gln Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp 1115 1120 1125		
Ser Pro Ala His Trp Ala Gln Lys Gly Ser His Gln Ile Ser Leu 1130 1135 1140		

Asp Asn Pro Asp Tyr Gln Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys
1145 1150 1155

Pro Asn Gly Ile Phe Lys Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr
1160 1165 1170

Leu Arg Val Ala Pro Gln Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala
1175 1180 1185

<210> 5

<211> 724

<212> PRT

<213> **Secuencia Artificial**

<220>

<223> **Polipéptido Sintético**

<400>

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

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

ES 2 655 842 T3

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

ES 2 655 842 T3

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
 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

ES 2 655 842 T3

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> 6

<211> 2175

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polinucleótido Sintético

<400> 6

atggctccct	ggcctgaatt	gggagatgcc	cagcccaacc	ccgataagta	cctcgaaggg	60
gccgcaggct	agcagcccac	tgcccctgat	aaaagcaaag	agaccaacaa	aacagataac	120
actgaggcac	ctgtaaccaa	gattgaactt	ctgccgtcct	actccacggc	tacactgata	180
gatgagccca	ctgaggtgga	tgaccctcct	aacctacca	ctcttcagga	ctcggggatc	240
aagtggtcag	agagagacac	caaagggaag	attctctgtt	tcttccaagg	gattgggaga	300
ttgattttac	ttctcggatt	tctctacttt	ttcgtgtgct	ccctggatat	tcttagtagc	360
gccttcacgc	tggttgagc	tgaggtccca	aataaaccag	gcattcccaa	attactagaa	420
gggagtaaaa	attcaataca	gtgggagaaa	gctgaagata	atggatgtag	aattacatac	480
tatatccttg	agataagaaa	gagcacttca	aataatttac	agaaccagaa	tttaaggtgg	540
aagatgacat	ttaatggatc	ctgcagtagt	gtttgcacat	ggaagtccaa	aaacctgaaa	600
ggaatatttc	agttcagagt	agtagctgca	aataatctag	ggtttggtga	atatagtgga	660
atcagtgaga	atattatatt	agttggagat	gatttttgga	taccagaaac	aagtttcata	720
cttactatta	tagttggaat	atttctggtt	gttacaatcc	cactgacctt	tgtctggcat	780
agaagattaa	agaatcaaaa	aagtgccaa	gaaggggtga	cagtgccttat	aaacgaagac	840
aaagagttgg	ctgagctgcg	aggtctggca	gccggagtag	gcctggctaa	tgctgctat	900
gcaatacata	ctcttccaac	ccaagaggag	attgaaaatc	ttcctgcctt	ccctcgggaa	960
aaactgactc	tgctgtctct	gctgggaagt	ggagcctttg	gagaagtgtg	tgaaggaaca	1020
gcagtggaca	tcttaggagt	tggaagtgga	gaaatcaaag	tagcagtgaa	gactttgaag	1080
aagggttcca	cagaccagga	gaagattgaa	ttcctgaagg	aggcacatct	gatgagcaaa	1140

ES 2 655 842 T3

```

ttaaatacatc ccaacattct gaagcagctt ggagtttgtc tgctgaatga accccaatac 1200
attatcctgg aactgatgga gggaggagac cttcttactt atttgcgtaa agcccggatg 1260
gcaacgtttt atggctcctt actcaccttg gttgaccttg tagacctgtg tgtagatatt 1320
tcaaaaggct gtgtctactt ggaacggatg catttcattc acagggatct ggcagctaga 1380
aattgccttg tttccgtgaa agactatacc agtccacgga tagtgaagat tggagacttt 1440
ggactcgcca gagacatcta taaaaatgat tactatagaa agagagggga aggcctgctc 1500
ccagttcggg ggatggctcc agaaagtgtg atggatggaa tcttcactac tcaatctgat 1560
gtatggctct ttggaattct gatttgggag attttaactc ttggtcacat gccttatcca 1620
gctcattcca accttgatgt gttaaaactat gtgcaaacag gaggggagact ggagccacca 1680
agaaattgtc ctgatgatct gtggaattta atgaccaggt gctgggctca agaaccgac 1740
caaagaccta cttttcatag aattcaggac caacttcagt tattcagaaa ttttttctta 1800
aatagcattt ataagtcag agatgaagca aacaacagtg gagtcataaa tgaaagcttt 1860
gaaggtgaag atggcgatgt gatttggttg aattcagatg acattatgcc agttgcttta 1920
atggaaacga agaaccgaga aggggttaaac tatatggtac ttgctacaga atgtggccaa 1980
gggtgaagaaa agtctgaggg tctcttaggc tcccaggaat ctgaatcttg tggctctgagg 2040
aaagaagaga aggaaccaca tgcagacaaa gatttctgcc aagaaaaaca agtggcttac 2100
tgcccttctg gcaagcctga aggcctgaac tatgcctgtc tcaactcacag tggatatgga 2160
gatgggtctg attaa 2175

```

<210> 7

<211> 621

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido Sintético

<400> 7

```

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

```

ES 2 655 842 T3

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
 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

ES 2 655 842 T3

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
 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

ES 2 655 842 T3

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> 8

<211> 1866

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polinucleótido Sintético

<400> 8

atggctccct	ggcctgaatt	gggagatgcc	cagcccaacc	cagataagta	cctcgaaggg	60
gccgcaggtc	agcagcccac	tgccctgat	aaaagcaaag	agaccaacaa	aacagataac	120
actgaggcac	ctgtaaccaa	gattgaactt	ctgccgtcct	actccacggc	tacactgata	180
gatgagccca	ctgaggtgga	tgacccctgg	aacctaccca	ctcttcagga	ctcggggatac	240
aagtggtcag	agagagacac	caaaggaag	attctctgtt	tcttccaagg	gattgggaga	300
ttgattttac	ttctcggatt	tctctacttt	ttcgtgtgct	ccctggatat	tcttagtagc	360
gccttccagc	tggttgagga	tgatttttgg	ataccagaaa	caagtttcat	acttactatt	420
atagttggaa	tattttctggt	tgttacaatc	ccactgacct	ttgtctggca	tagaagatta	480
aagaatcaaa	aaagtgccaa	ggaaggggtg	acagtgcctt	taaacgaaga	caaagagttg	540
gctgagctgc	gaggtctggc	agccggagta	ggcctggcta	atgcctgcta	tgcaatacat	600
actcttccaa	cccaagagga	gattgaaaat	cttctctgcct	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	cagtcacagg	atagtgaaga	ttggagactt	tggactcgcc	1140
agagacatct	ataaaaatga	ttactataga	aagagagggg	aaggcctgct	cccagttcgg	1200

ES 2 655 842 T3

tggatggctc	cagaaagttt	gatggatgga	atcttcaacta	ctcaatctga	tgtatggtct	1260
tttggaattc	tgatttgga	gattttaact	cttggtcatc	agccttatcc	agctcattcc	1320
aaccttgatg	tgttaaacta	tgtgcaaaca	ggaggagac	tggagccacc	aagaaattgt	1380
cctgatgatc	tgtggaattt	aatgaccag	tgctgggctc	aagaaccga	ccaaagacct	1440
acttttcata	gaattcagga	ccaacttcag	ttattcagaa	atTTTTtctt	aaatagcatt	1500
tataagtcca	gagatgaagc	aaacaacagt	ggagtcataa	atgaaagctt	tgaaggtgaa	1560
gatggcgatg	tgatttggtt	gaattcagat	gacattatgc	cagttgcttt	aatggaaacg	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	ctcactcaca	gtggatatgg	agatgggtct	1860
gattaa						1866

<210> 9

<211> 5616

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polinucleótido Sintético

<400> 9

ccccggcgca	gcgcggccgc	agcagcctcc	gcccccgca	cggtgtgagc	gcccgcgcgc	60
gccgaggcgg	ccggagtccc	gagctagccc	cggcggccgc	cgccgccag	accggacgac	120
agggcacctc	gtcggcgctc	gcccaggtcc	ccgcctcgcc	gccaacgcca	caaccaccgc	180
gcacggcccc	ctgactccgt	ccagtattga	tcgggagagc	cggagcgagc	tcttcgggga	240
gcagcgatgc	gacctccgg	gacggccggg	gcagcgctcc	tggcgctgct	ggctgcgctc	300
tgccccggca	gtcgggctct	ggaggaaaag	aaagtgtgcc	aaggcacgag	taacaagctc	360
acgcagttgg	gcacttttga	agatcatttt	ctcagcctcc	agaggatggt	caataactgt	420
gaggtggtcc	ttgggaattt	ggaaattacc	tatgtgcaga	ggaattatga	tctttccttc	480
ttaaagacca	tccaggaggt	ggctggttat	gtcctcattg	ccctcaacac	agtggagcga	540
attcctttgg	aaaacctgca	gatcatcaga	ggaaatatgt	actacgaaaa	ttcctatgcc	600
ttagcagtct	tatctaacta	tgatgcaa	aaaaccggac	tgaaggagct	gcccagaga	660
aatttacagg	aaatcctgca	tggcgccgtg	cggttcagca	acaaccctgc	cctgtgcaac	720
gtggagagca	tccagtggcg	ggacatagtc	agcagtgact	ttctcagcaa	catgtcgatg	780
gacttccaga	accacctggg	cagctgcca	aagtgtgatc	caagctgtcc	caatgggagc	840

ES 2 655 842 T3

tgctggggtg caggagagga gaactgccag aaactgacca aaatcatctg tgcccagcag	900
tgctccgggc gctgccgtgg caagtcccc agtgactgct gccacaacca gtgtgctgca	960
ggctgcacag gccccggga gagcgactgc ctgggtctgcc gcaaattccg agacgaagcc	1020
acgtgcaagg acacctgccc cccactcatg ctctacaacc ccaccacgta ccagatggat	1080
gtgaaccccc agggcaaata cagctttggg gccacctgog tgaagaagtg tccccgtaat	1140
tatgtggtga cagatcacgg ctctgctgctc cgagcctgtg gggccgacag ctatgagatg	1200
gagggaagacg gcgtccgcaa gtgtaagaag tgcgaagggc cttgccgcaa agtgtgtaac	1260
ggaataggta ttgggtgaatt taaagactca ctctccataa atgctacgaa tattaaacac	1320
ttcaaaaact gcacctccat cagtggcgat ctccacatcc tgccgggtggc atttaggggt	1380
gactccttca cacatactcc tcctctggat ccacaggaac tggatattct gaaaaccgta	1440
aaggaaatca cagggttttt gctgattcag gcttgccctg aaaacaggac ggacctccat	1500
gcctttgaga acctagaaat catacgcggc aggaccaagc aacatggtca gttttctctt	1560
gcagtcgtca gcctgaacat aacatccttg ggattacgct ccctcaagga gataagtgat	1620
ggagatgtga taatttcagg aaacaaaaat ttgtgctatg caaatacaat aaactggaaa	1680
aaactgtttg ggacctccg tcagaaaaacc aaaattataa gcaacagagg tgaaaacagc	1740
tgcaaggcca caggccaggt ctgccatgcc ttgtgctccc ccgagggtctg ctggggcccg	1800
gagccaggg actgcgtctc ttgccgaat gtcagccgag gcagggaatg cgtggacaag	1860
tgcaaccttc tggagggtga gccaaaggag tttgtggaga actctgagtg catacagtgc	1920
caccagaggt gcctgcctca ggccatgaac atcacctgca caggacgggg accagacaac	1980
tgtatccagt gtgcccacta cattgacggc cccactgog tcaagacctg cccggcagga	2040
gtcatgggag aaaacaacac cctggtctgg aagtacgcag acgccggcca tgtgtgccac	2100
ctgtgccatc caaactgcac ctacggatgc actgggcccag gtcttgaagg ctgtccaacg	2160
aatgggccta agatccgctc catcgccact gggatggtgg gggccctcct ctgtctgctg	2220
gtggtggccc tggggatcgg cctcttcatg cgaaggcgcc acatcgttcg gaagcgcacg	2280
ctgcggaggc tgctgcagga gaggagcctt gtggagcctc ttacaccagc tggagaagct	2340
cccaaccaag ctctcttgag gatcttgaag gaaactgaat tcaaaaagat caaagtgtctg	2400
ggctccgggtg cgttcggcac ggtgtataag ggactctgga tcccagaagg tgagaaagtt	2460
aaaattcccc tcgctatcaa ggaattaaga gaagcaacat ctccgaaagc caacaaggaa	2520
atcctogatg aagcctacgt gatggccagc gtggacaacc cccacgtgtg ccgcctgctg	2580
ggcatctgcc tcacctccac cgtgcagctc atcacgcagc tcatgccctt cggctgcctc	2640
ctggactatg tccgggaaca caaagacaat attggtccc agtacctgct caactggtgt	2700
gtgcagatcg caaagggcct gaactacttg gaggaccgtc gcttggtgca ccgcgacctg	2760

ES 2 655 842 T3

gcagccagga acgtactggt gaaaacaccg cagcatgtca agatcacaga ttttgggctg	2820
gccaaactgc tgggtgcgga agagaaagaa taccatgcag aaggaggcaa agtgcctatc	2880
aagtggatgg cattggaatc aattttacac agaattctata cccaccagag tgatgtctgg	2940
agctacgggg tgaccgtttg ggagttgatg acctttggat ccaagccata tgacggaatc	3000
cctgccagcg agatctcctc catcctggag aaaggagaac gcctccctca gccaccata	3060
tgtaccatcg atgtctacat gatcatggtc aagtgcctga tgatagacgc agatagtgc	3120
ccaaagtacc gtgagttgat catcgaattc tccaaaatgg cccgagacc ccagcgctac	3180
cttgtcattc agggggatga aagaatgcat ttgccaaagtc ctacagactc caacttctac	3240
cgtgccctga tggatgaaga agacatggac gacgtggtgg atgccgacga gtacctcatc	3300
ccacagcagg gcttcttcag cagccctcc acgtcacgga ctccctcct gagctctctg	3360
agtgcaacca gcaacaattc caccgtggct tgcattgata gaaatgggct gcaaagctgt	3420
cccatcaagg aagacagctt cttgcagcga tacagctcag accccacagg cgccttgact	3480
gaggacagca tagacgacac cttcctccca gtgcctgaat acataaacca gtccgttccc	3540
aaaaggcccc ctggctctgt gcagaatcct gtctatcaca atcagcctct gaaccccgcg	3600
cccagcagag acccacacta ccaggacccc cacagcactg cagtgggcaa ccccgagtat	3660
ctcaacactg tccagccac ctgtgtcaac agcacattcg acagccctgc cactgggccc	3720
cagaaaggca gccaccaaat tagcctggac aacctgact accagcagga cttctttccc	3780
aaggaagcca agccaaatgg catctttaag ggctccacag ctgaaaatgc agaataccta	3840
agggtcgcgc cacaaagcag tgaatttatt ggagcatgac cagggaggat agtatgagcc	3900
ctaaaaatcc agactctttc gatacccagg accaagccac agcaggctcct ccatcccaac	3960
agccatgccc gcattagctc ttagaccac agactggttt tgcaacgttt acaccgacta	4020
gccaggaagt acttcacct cgggcacatt ttgggaagtt gcattccttt gtcttcaaac	4080
tgtgaagcat ttacagaaac gcatccagca agaattttgt ccctttgagc agaaatttat	4140
ctttcaaaga ggtatatattg aaaaaaaaaa aaagtatatg tgaggatttt tattgattgg	4200
ggatcttggg gtttttcatt gtcgctattg atttttactt caatgggctc ttccaacaag	4260
gaagaagctt cctggttagca cttgctaccc tgagttcatc caggcccaac tgtgagcaag	4320
gagcacaagc cacaagtctt ccagaggatg cttgattcca gtggttctgc ttcaaggctt	4380
ccactgcaaa acactaaaga tccaagaagg ccttcatggc cccagcagc cggatcggtg	4440
ctgtatcaag tcatggcagg tacagtagga taagccactc tgtcccttcc tgggcaaaga	4500
agaaacggag gggatggaat tcttccttag acttactttt gtaaaaatgt cccacggta	4560
cttactcccc actgatggac cagtggtttc cagtcatgag cgttagactg acttgtttgt	4620

ES 2 655 842 T3

```

cttccattcc attgttttga aactcagtat gctgccctg tcttgctgtc atgaaatcag 4680
caagagagga tgacacatca aataataact cggattccag cccacattgg attcatcagc 4740
atttggaacca atagcccaca gctgagaatg tggaatacct aaggatagca ccgcttttgt 4800
tctcgcaaaa acgtatctcc taatttgagg ctcatatgaa atgcatcagg tcctttgggg 4860
catagatcag aagactacaa aaatgaagct gctctgaaat ctcccttagc catcacccca 4920
accccccaaa attagtttgt gttacttatg gaagatagtt ttctcctttt acttcacttc 4980
aaaagctttt tactcaaaga gtatatgttc cctccaggtc agctgcccc aaaccacctc 5040
cttacgcttt gtacacacaa aagtgtctct gccttgagtc atctattcaa gcacttacag 5100
ctctgcccac aacagggcat ttacagggtg cgaatgacag tagcattatg agtagtgtgg 5160
aattcaggta gtaaatatga aactagggtt tgaaattgat aatgctttca caacatttgc 5220
agatgtttta gaaggaaaa agttccttcc taaaataatt tctctacaat tggaagattg 5280
gaagattcag ctagttagga gccaccttt ttcctaatac tgtgtgtgcc ctgtaacctg 5340
actggttaac agcagtcctt tgtaaacagt gttttaaaact ctccatagtc atatccacc 5400
catccaattt atcaaggaag aaatggttca gaaaatattt tcagcctaca gttatgttca 5460
gtcacacaca catacaaaat gttccttttg cttttaaaagt aatttttgac tccagatca 5520
gtcagagccc ctacagcatt gttaagaaag tatttgattt ttgtctcaat gaaaataaaa 5580
ctatatcat ttccactcta aaaaaaaaaa aaaaaa 5616

```

<210> 10

<211> 24

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Polinucleótido Sintético

<400> 10

gcagtcagc caactcttg tctt 24

<210> 11

15 <211> 703

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Polipéptido Sintético

<400> 11

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 Asn Asn Glu Gln Leu Pro Met
20 25 30

ES 2 655 842 T3

Leu Gly Arg Arg Pro Gly Ala Pro Glu Ser Lys Cys Ser Arg Gly Ala
 35 40 45
 Leu Tyr Thr Gly Phe Ser Ile Leu Val Thr Leu Leu Leu Ala Gly Gln
 50 55 60
 Ala Thr Thr Ala Tyr Phe Leu Tyr Gln Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys
 65 70 75 80
 Leu Thr Val Thr Ser Gln Asn Leu Gln Leu Glu Asn Leu Arg Met Lys
 85 90 95
 Leu Pro Lys Pro Pro Lys Pro Val Ser Lys Met Arg Met Ala Thr Pro
 100 105 110
 Leu Leu Met Gln Ala Leu Pro Met Gly Ala Leu Pro Gln Gly Pro Met
 115 120 125
 Gln Asn Ala Thr Lys Tyr Gly Asn Met Thr Glu Asp His Val Met His
 130 135 140
 Leu Leu Gln Asn Ala Asp Pro Leu Lys Val Tyr Pro Pro Leu Lys Gly
 145 150 155 160
 Ser Phe Pro Glu Asn Leu Arg His Leu Lys Asn Thr Met Glu Thr Ile
 165 170 175
 Asp Trp Lys Val Phe Glu Ser Trp Met His His Trp Leu Leu Phe Glu
 180 185 190
 Met Ser Arg His Ser Leu Glu Gln Lys Pro Thr Asp Ala Pro Pro Lys
 195 200 205
 Asp Asp Phe Trp Ile Pro Glu Thr Ser Phe Ile Leu Thr Ile Ile Val
 210 215 220
 Gly Ile Phe Leu Val Val Thr Ile Pro Leu Thr Phe Val Trp His Arg
 225 230 235 240
 Arg Leu Lys Asn Gln Lys Ser Ala Lys Glu Gly Val Thr Val Leu Ile
 245 250 255
 Asn Glu Asp Lys Glu Leu Ala Glu Leu Arg Gly Leu Ala Ala Gly Val
 260 265 270
 Gly Leu Ala Asn Ala Cys Tyr Ala Ile His Thr Leu Pro Thr Gln Glu

ES 2 655 842 T3

275					280					285					
Glu	Ile	Glu	Asn	Leu	Pro	Ala	Phe	Pro	Arg	Glu	Lys	Leu	Thr	Leu	Arg
290						295					300				
Leu	Leu	Leu	Gly	Ser	Gly	Ala	Phe	Gly	Glu	Val	Tyr	Glu	Gly	Thr	Ala
305					310					315					320
Val	Asp	Ile	Leu	Gly	Val	Gly	Ser	Gly	Glu	Ile	Lys	Val	Ala	Val	Lys
				325					330					335	
Thr	Leu	Lys	Lys	Gly	Ser	Thr	Asp	Gln	Glu	Lys	Ile	Glu	Phe	Leu	Lys
			340					345					350		
Glu	Ala	His	Leu	Met	Ser	Lys	Phe	Asn	His	Pro	Asn	Ile	Leu	Lys	Gln
		355					360					365			
Leu	Gly	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Glu	Pro	Gln	Tyr	Ile	Ile	Leu	Glu	Leu
	370					375					380				
Met	Glu	Gly	Gly	Asp	Leu	Leu	Thr	Tyr	Leu	Arg	Lys	Ala	Arg	Met	Ala
385					390					395					400
Thr	Phe	Tyr	Gly	Pro	Leu	Leu	Thr	Leu	Val	Asp	Leu	Val	Asp	Leu	Cys
				405					410					415	
Val	Asp	Ile	Ser	Lys	Gly	Cys	Val	Tyr	Leu	Glu	Arg	Met	His	Phe	Ile
			420					425					430		
His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Cys	Leu	Val	Ser	Val	Lys	Asp	Tyr
		435					440					445			
Thr	Ser	Pro	Arg	Ile	Val	Lys	Ile	Gly	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala	Arg	Asp
		450				455					460				
Ile	Tyr	Lys	Asn	Asp	Tyr	Tyr	Arg	Lys	Arg	Gly	Glu	Gly	Leu	Leu	Pro
465				470						475					480
Val	Arg	Trp	Met	Ala	Pro	Glu	Ser	Leu	Met	Asp	Gly	Ile	Phe	Thr	Thr
			485						490					495	
Gln	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Phe	Gly	Ile	Leu	Ile	Trp	Glu	Ile	Leu	Thr
			500					505					510		
Leu	Gly	His	Gln	Pro	Tyr	Pro	Ala	His	Ser	Asn	Leu	Asp	Val	Leu	Asn
		515					520					525			

ES 2 655 842 T3

Tyr Val Gln Thr Gly Gly Arg Leu Glu Pro Pro Arg Asn Cys Pro Asp
530 535 540

Asp Leu Trp Asn Leu Met Thr Gln Cys Trp Ala Gln Glu Pro Asp Gln
545 550 555 560

Arg Pro Thr Phe His Arg Ile Gln Asp Gln Leu Gln Leu Phe Arg Asn
565 570 575

Phe Phe Leu Asn Ser Ile Tyr Lys Ser Arg Asp Glu Ala Asn Asn Ser
580 585 590

Gly Val Ile Asn Glu Ser Phe Glu Gly Glu Asp Gly Asp Val Ile Cys
595 600 605

Leu Asn Ser Asp Asp Ile Met Pro Val Ala Leu Met Glu Thr Lys Asn
610 615 620

Arg Glu Gly Leu Asn Tyr Met Val Leu Ala Thr Glu Cys Gly Gln Gly
625 630 635 640

Glu Glu Lys Ser Glu Gly Pro Leu Gly Ser Gln Glu Ser Glu Ser Cys
645 650 655

Gly Leu Arg Lys Glu Glu Lys Glu Pro His Ala Asp Lys Asp Phe Cys
660 665 670

Gln Glu Lys Gln Val Ala Tyr Cys Pro Ser Gly Lys Pro Glu Gly Leu
675 680 685

Asn Tyr Ala Cys Leu Thr His Ser Gly Tyr Gly Asp Gly Ser Asp
690 695 700

<210> 12

<211> 2112

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polinucleótido Sintético

10

<400> 12

atgcacagga ggagaagcag gagctgtcgg gaagatcaga agccagtcac ggatgaccag	60
cgcgacctta tctccaacaa tgagcaactg cccatgtctgg gccggcgccc tggggccccg	120
gagagcaagt gcagccgcgg agccctgtac acaggtttt ccatcctggt gactctgctc	180
ctcgtctggcc aggccaccac cgcctacttc ctgtaccagc agcagggccg gctggacaaa	240
ctgacagtca cctcccagaa cctgcagctg gagaacctgc gcatgaagct tcccaagcct	300

ES 2 655 842 T3

```

cccaagcctg tgagcaagat gcgcatggcc accccgctgc tgatgcaggc gctgcccattg 360
ggagccctgc cccagggggc catgcagaat gccaccaagt atggcaacat gacagaggac 420
catgtgatgc acctgctcca gaatgctgac cccctgaagg tgtaccggcc actgaagggg 480
agcttcccg agaacctgag acaccttaag aacaccatgg agaccataga ctggaaggtc 540
tttgagagct ggatgcacca ttggctcctg tttgaaatga gcaggcactc cttggagcaa 600
aagcccactg acgctccacc gaaagatgat ttttggtatc 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 gggagtgga 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 ccggtatggc 1200
acgttttatg gtcttttact caccttggtt gacctgtag acctgtgtgt agatatttca 1260
aaagctgtg tctacttga acggtatgat ttcattcaca gggatctggc agctagaaat 1320
tgcttgttt ccgtgaaaga ctataccagt ccacggatag tgaagattgg agactttgga 1380
ctcgccagag acatctataa aaatgattac tatagaaaga gagggaagg cctgctccca 1440
gttcggtgga tggctccaga aagtttgatg gatggaatct tcaactactca atctgatgta 1500
tggctctttg gaattctgat ttgggagatt ttaactcttg gtcacagcc ttatccagct 1560
cattccaacc ttgatgtgtt aaactatgtg caaacaggag ggagactgga gccaccaaga 1620
aattgtcctg atgatctgtg gaatttaatg acccagtgtt gggctcaaga acccgaccaa 1680
agacctactt ttcatagaat tcaggaccaa cttcagttat tcagaaattt tttcttaaat 1740
agcatttata agtccagaga tgaagcaaac aacagtggag tcataaatga aagctttgaa 1800
ggtgaagatg gcgatgtgat ttgtttgaat tcagatgaca ttatgccagt tgctttaatg 1860
gaaacgaaga accgagaagg gttaaaactat atggtacttg ctacagaatg tggccaaggc 1920
gaagaaaagt ctgagggtcc tctaggctcc caggaatctg aatcttgtgg tctgaggaaa 1980
gaagagaagg aaccacatgc agacaaagat ttctgccaag aaaaacaagt ggcttactgc 2040
ccttctggca agcctgaagg cctgaactat gcctgtctca ctcacagtgg atatggagat 2100
gggtctgatt aa 2112

```

<210> 13
 <211> 592
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Polipéptido Sintético

<400> 13

ES 2 655 842 T3

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
 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

ES 2 655 842 T3

210		215		220
Val Lys Thr Leu Lys Lys Gly Ser Thr Asp Gln Glu Lys Ile Glu Phe				
225		230		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		320
Phe Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Cys Leu Val Ser Val Lys Asp				
	325		330	335
Tyr Thr Ser Pro Arg Ile Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala Arg				
	340		345	350
Asp Ile Tyr Lys Asn Asp Tyr Tyr Arg Lys Arg Gly Glu Gly Leu Leu				
	355		360	365
Pro Val Arg Trp Met Ala Pro Glu Ser Leu Met Asp Gly Ile Phe Thr				
	370		375	380
Thr Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Ile Leu Ile Trp Glu Ile Leu				
385		390		400
Thr Leu Gly His Gln Pro Tyr Pro Ala His Ser Asn Leu Asp Val Leu				
	405		410	415
Asn Tyr Val Gln Thr Gly Gly Arg Leu Glu Pro Pro Arg Asn Cys Pro				
	420		425	430
Asp Asp Leu Trp Asn Leu Met Thr Gln Cys Trp Ala Gln Glu Pro Asp				
	435		440	445
Gln Arg Pro Thr Phe His Arg Ile Gln Asp Gln Leu Gln Leu Phe Arg				
450		455		460

ES 2 655 842 T3

Asn Phe Phe Leu Asn Ser Ile Tyr Lys Ser Arg Asp Glu Ala Asn Asn
465 470 475 480

Ser Gly Val Ile Asn Glu Ser Phe Glu Gly Glu Asp Gly Asp Val Ile
485 490 495

Cys Leu Asn Ser Asp Asp Ile Met Pro Val Ala Leu Met Glu Thr Lys
500 505 510

Asn Arg Glu Gly Leu Asn Tyr Met Val Leu Ala Thr Glu Cys Gly Gln
515 520 525

Gly Glu Glu Lys Ser Glu Gly Pro Leu Gly Ser Gln Glu Ser Glu Ser
530 535 540

Cys Gly Leu Arg Lys Glu Glu Lys Glu Pro His Ala Asp Lys Asp Phe
545 550 555 560

Cys Gln Glu Lys Gln Val Ala Tyr Cys Pro Ser Gly Lys Pro Glu Gly
565 570 575

Leu Asn Tyr Ala Cys Leu Thr His Ser Gly Tyr Gly Asp Gly Ser Asp
580 585 590

<210> 14

<211> 1782

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polinucleótido Sintético

<400> 14

atggctccct	ggcctgaatt	gggagatgcc	cagcccaacc	ccgataagta	cctcgaagg	60
gccgcagggtc	agcagccac	tgccctgat	aaaagcaaag	agaccaacaa	aacagataac	120
actgaggcac	ctgtaaccaa	gattgaactt	ctgccgtcct	actccacggc	tacactgata	180
gatgagccca	ctgaggtgga	tgaccctgg	aacctacca	ctcttcagga	ctcggggatc	240
aagtggtcag	agagagacac	caaagggaag	attctctggt	tcttccaagg	gattgggaga	300
ttgatatttac	ttctcggatt	tctctacttt	ttcgtgtgct	ccctggatat	tcttagtagc	360
gccttccagc	tggttgaggt	ctggcataga	agattaaaga	atcaaaaaag	tgccaaggaa	420
ggggtgacag	tgcttataaa	cgaagacaaa	gagttggctg	agctgcgagg	tctggcagcc	480
ggagtaggcc	tggctaatagc	ctgctatgca	atacatactc	ttccaaccca	agaggagatt	540
gaaaatcttc	ctgccttccc	tgggaaaaaa	ctgactctgc	gtctcttgct	gggaagtgga	600
gcctttggag	aagtgtatga	aggaacagca	gtggacatct	taggagttgg	aagtggagaa	660

```

atcaaagtag cagtgaagac tttgaagaag ggttccacag accaggagaa gattgaattc 720
ctgaaggagg cacatctgat gagcaaattt aatcatocca acattctgaa gcagcttgga 780
gtttgtctgc tgaatgaacc ccaatacatt atcctggaac tgatggaggg aggagacctt 840
cttacttatt tgcgtaaagc ccggatggca acgttttatg gtcctttact caccttggtt 900
gaccttgtag acctgtgtgt agatatttca aaaggctgtg tctacttgga acggatgcat 960
ttcattcaca gggatctggc agctagaaat tgccttgttt ccgtgaaaga ctataccagt 1020
ccacggatag tgaagattgg agactttgga ctgccagag acatctataa aaatgattac 1080
tatagaaaga gaggggaagg cctgctccca gttcggtgga tggctccaga aagtttgatg 1140
gatggaatct tcaactactca atctgatgta tggctttttg gaattctgat ttgggagatt 1200
ttaactcttg gtcactcagc ttatccagct cattccaacc ttgatgtgtt aaactatgtg 1260
caaacaggag ggagactgga gccaccaaga aattgtcctg atgatctgtg gaatttaatg 1320
accagtgtct gggctcaaga acccgaccaa agacctactt ttcatagaat tcaggaccaa 1380
cttcagttat tcagaaattt tttcttaaat agcatttata agtccagaga tgaagcaaac 1440
aacagtggag tcataaatga aagctttgaa ggtgaagatg gcgatgtgat ttgtttgaat 1500
tcagatgaca ttatgccagt tgctttaatg gaaacgaaga accgagaagg gttaaactat 1560
atggtacttg ctacagaatg tggccaaggt gaagaaaagt ctgaggggtcc tctaggctcc 1620
caggaatctg aatcttgttg tctgaggaaa gaagagaagg aaccacatgc agacaaagat 1680
ttctgccaaag aaaaacaagt ggcttactgc cttcttgcca agcctgaagg cctgaactat 1740
gcctgtctca ctcacagtgg atatggagat gggctctgatt aa 1782

```

<210> 15
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Polipéptido Sintético

<400> 15
 Phe Glu Met Ser Arg His Ser Leu Glu Gln Lys Pro Thr Asp Ala Pro
 1 5 10 15

Pro Lys Asp Asp Phe Trp Ile Pro Glu Thr Ser Phe Ile Leu Thr Ile
 20 25 30

Ile Val

<210> 16
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Polinucleótido Sintético

<400> 16
 aagcccggaug gcaacguut t 21

<210> 17
 <211> 21

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Polinucleótido Sintético

 <400> 17
 aagccugaag gccugaacut t 21

 10 <210> 18
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Polinucleótido Sintético

 <400> 18
 20 cagcaagaga cgcagagtca gttt 24

 <210> 19
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Polinucleótido Sintético

 <400> 19
 30 gctgttctcc aggctgaagt atatgg 26

 <210> 20
 <211> 24
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Polinucleótido Sintético

 <400> 20
 40 gtaaccctgg tgctagttgc aaag 24

 <210> 21
 <211> 2637
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Polinucleótido Sintético
 50
 <400> 21

ES 2 655 842 T3

atgtcggcgg ggggtccatg cccagcagca gccggagggg gccaggggg cgcctcctgc	60
tccgtggggg cccctggcgg ggtatccatg ttccggtggc tggaggtgct ggagaaggag	120
ttcgacaaag cttttgtgga tgtggatctg ctctctgggag agatcgatcc agaccaagcg	180
gacatcactt atgagggggc acagaagatg accagcctga gctcctgctt tgcacagctt	240
tgccacaaag cccagtctgt gtctcaaata aaccacaagc tggaggcaca gttggtggat	300
ctgaaatctg aactgacaga aacccaagca gagaaagtgt 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 agctgccaaag	600
tacttgata aggaactggc aggaagggtc caacagatac aattgctagg acgagatatg	660
aagggacctg ctcatgataa gctttggaac caattagaag ctgaaataca tttgcatcgt	720
cacaaaactg tgatccgagc ctgcagagga cgtaatgact tgaaacgacc aatgcaagca	780
ccaccaggcc atgatcaaga ttccctaaag aaaagccaag gtgttggtcc aattagaaaa	840
gttctcctcc ttaaggaaga tcatgaaggc cttggcattt caattacagg tgggaaagaa	900
catggtgttc caatcctcat ctctgagatc catccggggc aacctgctga tagatgcgga	960
gggctgcacg ttgggggatgc tattttggca gtcaacggag ttaacctaaag ggacacaaag	1020
cataaagaag ctgtaactat tctttctcag cagagaggag agattgaatt tgaagtagtt	1080
tatgtggctc ctgaagtgga ttctgatgat gaaaacgtag agtatgaaga tgagagtgga	1140
catcgttacc gtttgtacct tgatgagtta gaaggagggt gtaaccctgg tgctagtgtc	1200
aaagacacaa gtgggggaaat caaagtatta caagtctggc atagaagatt aaagaatcaa	1260
aaaagtgcc aaggaaggggt gacagtgctt ataaacgaag acaaagagtt ggctgagctg	1320
cgaggctctg cagccggagt aggcctggct aatgcctgct atgcaatata tactcttcca	1380
acccaagagg agattgaaaa tcttcctgcc ttccctcggg aaaaactgac tctgcgtctc	1440
ttgctgggaa gtggagcctt tggagaagtg tatgaaggaa cagcagtgga catcttagga	1500
gttggaagtg gagaaatcaa agtagcagtg aagactttga agaagggttc cacagaccag	1560
gagaagattg aattcctgaa ggaggcacat ctgatgagca aatttaata tcccaacatt	1620
ctgaagcagc ttggagtttg tctgctgaat gaacccaat acattatcct ggaactgatg	1680
gaggggaggag accttcttac ttatttgctg aaagcccgga tggcaacgtt ttatggtcct	1740
ttactcacct tgggtgacct tgtagacctg tgtgtagata tttcaaaagg ctgtgtctac	1800

```

ttggaacgga tgcatttcat tcacagggat ctggcagcta gaaattgcct tgtttccgtg      1860
aaagactata ccagtcacacg gatagtgaag attggagact ttggactcgc cagagacatc      1920
tataaaaatg attactatag aaagagaggg gaaggcctgc tcccagttcg gtggatggct      1980
ccagaaagtt tgatggatgg aatcttcact actcaatctg atgtatggtc ttttggaatt      2040
ctgatttggg agattttaac tcttggcat cagccttacc cagctcattc caaccttgat      2100
gtgttaaact atgtgcaaac aggagggaga ctggagccac caagaaattg tcctgatgat      2160
ctgtggaatt taatgaccca gtgctgggct caagaacccg accaaagacc tacttttcat      2220
agaattcagg accaacttca gttattcaga aattttttct taaatagcat ttataagtcc      2280
agagatgaag caaacaacag tggagtcata aatgaaagct ttgaaggatga agatggcgat      2340
gtgatttgtt tgaattcaga tgacattatg ccagttgctt taatggaaac gaagaaccga      2400
gaagggttaa actatatggt acttgctaca gaatgtggcc aaggtgaaga aaagtctgag      2460
ggtcctctag gctcccagga atctgaatct tgtggtctga ggaaagaaga gaaggaacca      2520
catgcagaca aagatttctg ccaagaaaaa caagtggctt actgcccttc tggcaagcct      2580
gaaggcctga actatgcctg tctcactcac agtggatatg gagatgggtc tgattaa      2637

```

<210> 22

<211> 878

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 22

```

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

```

ES 2 655 842 T3

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
 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

ES 2 655 842 T3

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
 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

ES 2 655 842 T3

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 755 760 765		
Val Ile Asn Glu Ser Phe Glu Gly Glu Asp Gly Asp Val Ile Cys Leu 770 775 780		
Asn Ser Asp Asp Ile Met Pro Val Ala Leu Met Glu Thr Lys Asn Arg 785 790 795 800		
Glu Gly Leu Asn Tyr Met Val Leu Ala Thr Glu Cys Gly Gln Gly Glu 805 810 815		
Glu Lys Ser Glu Gly Pro Leu Gly Ser Gln Glu Ser Glu Ser Cys Gly 820 825 830		
Leu Arg Lys Glu Glu Lys Glu Pro His Ala Asp Lys Asp Phe Cys Gln 835 840 845		
Glu Lys Gln Val Ala Tyr Cys Pro Ser Gly Lys Pro Glu Gly Leu Asn 850 855 860		
Tyr Ala Cys Leu Thr His Ser Gly Tyr Gly Asp Gly Ser Asp 865 870 875		

5 <210> 23
 <211> 1893
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polinucleótido Sintético

5

<400> 23

atgtcggcgg gcggtccatg cccagcagca gccggagggg gccaggggg cgcctcctgc	60
tccgtggggg cccttggcgg ggtatccatg ttccggtggc tggaggtgct ggagaaggag	120
ttcgacaaag cttttgtgga tgtggatctg ctcttgggag agatcgatcc agaccaagcg	180
gacatcactt atgaggggag acagaagatg accagcctga gctcctgctt tgcacagctt	240
tgccacaaag cccagtctgt gtctcaaac aaccacaagc tggaggcaca gttggtggat	300
ctgaaatctg aactgacaga aaccacagca gagaaagtgt 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 atatatgctgt tctccaggct gaagtatatg gggcgagact agctgccaag	600
tacttgata aggaactggc aggaagtact cttccaaccc aagaggagat tgaaaatctt	660
cctgccttcc ctccggaaaa actgactctg cgtctcttgc tgggaagtgg agcctttgga	720
gaagtgtatg aaggaacagc agtggacatc ttaggagttg gaagtggaga aatcaaagta	780
gcagtgaaga ctttgaagaa gggttccaca gaccaggaga agattgaatt cctgaaggag	840
gcacatctga tgagcaaatt taatcatccc aacattctga agcagcttgg agtttgtctg	900
ctgaatgaac cccaatacat tatcctggaa ctgatggagg gaggagacct tcttacttat	960
ttgcgtaaaag ccgggatggc aacgttttat ggtcctttac tcaccttggg tgaccttgta	1020
gacctgtgtg tagatatttc aaaaggctgt gtctacttgg aacggatgca tttcattcac	1080
agggatctgg cagctagaaa ttgccttggt tccgtgaaag actataccag tccacggata	1140
gtgaagattg gagacttttg actcgccaga gacatctata aaaatgatta ctatagaaag	1200
agaggggaag gcctgctccc agttcggtgg atggctccag aaagtttgat ggatggaatc	1260
ttcactactc aatctgatgt atggtctttt ggaattctga tttgggagat ttttaactctt	1320
ggtcatcagc cttatccagc tcattccaac cttgatgtgt taaactatgt gcaaacagga	1380
gggagactgg agccaccaag aaattgtcct gatgatctgt ggaatttaat gacccagtgc	1440
tgggctcaag aaccogacca aagacctact ttcatagaa ttcaggacca acttcagtta	1500
ttcagaaatt ttttcttaaa tagcatttat aagtcagag atgaagcaaa caacagtgga	1560
gtcataaatg aaagctttga aggtgaagat ggcgatgtga tttgtttgaa ttcagatgac	1620
attatgccag ttgctttaat ggaaacgaag aaccgagaag ggtaaaacta tatggtaactt	1680
gctacagaat gtggccaagg tgaagaaaag tctgagggtc ctctaggctc ccaggaatct	1740
gaatcttgtg gtctgaggaa agaagagaag gaaccacatg cagacaaaga tttctgccaa	1800
gaaaaacaag tggcttactg cccttctggc aagcctgaag gcctgaacta tgcctgtctc	1860
actcacagtg gatatggaga tgggtctgat taa	1893

<210> 24

10

<211> 630
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<400> 24
 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

10

ES 2 655 842 T3

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
 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

ES 2 655 842 T3

[illegible]

<210> 25
<211> 3030
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<223> Polinucleótido Sintético

<400> 25

ES 2 655 842 T3

atgtcggcgg ggggtccatg cccagcagca gccggagggg gccaggggg cgcctcctgc	60
tccgtggggg cccctggcgg ggtatccatg ttccggtggc tggaggtgct ggagaaggag	120
ttcgacaaag cttttgtgga tgtggatctg ctctctgggag agatcgatcc agaccaagcg	180
gacatcactt atgaggggcg acagaagatg accagcctga gctcctgctt tgcacagctt	240
tgccacaaag cccagtctgt gtctcaaatac aaccacaagc tggaggcaca gttggtggat	300
ctgaaatctg aactgacaga aacccaagca gagaaagtgt 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 atatatgtgt tctccaggct gaagtatatg gggcgagact agctgccaag	600
tacttgata aggaactggc aggaagggc caacagatac aattgctagg acgagatatg	660
aagggaacctg ctcatgataa gctttggaac caattagaag ctgaaataca tttgcatcgt	720
cacaaaactg tgatccgagc ctgcagagga cgtaatgact tgaaacgacc aatgcaagca	780
ccaccaggcc atgatcaaga ttccctaaag aaaagccaag gtgttggtcc 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
tatgtggctc ctgaagtgga ttctgatgat gaaaacgtag agtatgaaga tgagagtgga	1140
catcgttacc gtttgtacct tgatgagtta gaaggagggtg gtaaccctgg tgctagtgtc	1200
aaagacacaa gtgggggaaat caaagtatta caagctggag tcccaaataa accaggcatt	1260
cccaaattac tagaaggag taaaaattca atacagtggg agaaagctga agataatgga	1320
tgtagaatta catactatat ccttgagata agaaagagca cttcaaataa tttacagaac	1380
cagaatttaa ggtggaagat gacatttaat ggatcctgca gtagtgtttg cacatggaag	1440
tccaaaaacc tgaaaggaat atttcagttc agagtagtag ctgcaaataa tctagggttt	1500
ggtgaatata gtggaatcag tgagaatatt atattagttg gagatgattt ttggatacca	1560
gaaacaagtt tcatacttac tattatagtt ggaatatttc tggttgttac aatccactg	1620

ES 2 655 842 T3

```

acctttgtct ggcatagaag attaaagaat caaaaaagtg ccaaggaagg ggtgacagtg 1680
cttataaacg aagacaaaga gttggctgag ctgcgaggtc tggcagccgg agtaggcctg 1740
gctaatagcct gctatgcaat acatactctt ccaacccaag aggagattga aaatcttcct 1800
gccttccttc gggaaaaact gactctgcgt ctcttgctgg gaagtggagc ctttgagaa 1860
gtgtatgaag gaacagcagt ggacatctta ggagttggaa gtggagaaat caaagtagca 1920
gtgaagactt tgaagaaggg ttccacagac caggagaaga ttgaattcct gaaggaggca 1980
catctgatga gcaaatttaa tcatccaac attctgaagc agcttgaggt ttgtctgctg 2040
aatgaacccc aatacattat cctggaactg atggagggag gagaccttct tacttatttg 2100
cgtaaagccc ggatggcaac gttttatggt cctttactca ccttggttga ccttgtagac 2160
ctgtgtgtag atatttcaaa aggctgtgtc tacttggaac ggatgcattt cattcacagg 2220
gatctggcag ctagaaattg ccttgtttcc gtgaaagact ataccagtcc acggatagtg 2280
aagattggag actttggact cgccagagac atctataaaa atgattacta tagaaagaga 2340
ggggaaggcc tgctcccagt tcggtggatg gctccagaaa gtttgatgga tggaatcttc 2400
actactcaat ctgatgtatg gtcttttga attctgattt gggagatttt aactcttgg 2460
catcagcctt atccagctca ttccaacct gatgtgttaa actatgtgca aacaggagg 2520
agactggagc caccaagaaa ttgtcctgat gatctgtgga atttaatgac ccagtgtg 2580
gctcaagaac ccgaccaaag acctactttt catagaattc aggaccaact tcagttattc 2640
agaaattttt tcttaaatag catttataag tccagagatg aagcaaacia cagtggagtc 2700
ataaatgaaa gctttgaagg tgaagatggc gatgtgattt gtttgaattc agatgacatt 2760
atgccagttg ctttaatgga aacgaagaac cgagaagggt taaactatat ggtacttgct 2820
acagaatgtg gccaaagtga agaaaagtct gagggctctc taggctcca ggaatctgaa 2880
tcttggtgct tgaggaaaga agagaaggaa ccacatgcag acaaagattt ctgccaagaa 2940
aaacaagtgg cttactgcc ttctggcaag cctgaaggcc tgaactatgc ctgtctcact 3000
cacagtggat atggagatgg gtctgattaa 3030

```

<210> 26

<211> 1009

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido Sintético

<400> 26

Met Ser Ala Gly Gly Pro Cys Pro Ala Ala Ala Gly Gly Gly Pro Gly

1

5

10

15

ES 2 655 842 T3

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

ES 2 655 842 T3

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
 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

ES 2 655 842 T3

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
			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

ES 2 655 842 T3

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

<210> 27

<211> 278

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

10

<400> 27

ES 2 655 842 T3

Leu Thr Leu Arg Leu Leu Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Glu Val Tyr
 1 5 10 15
 Glu Gly Thr Ala Val Asp Ile Leu Gly Val Gly Ser Gly Glu Ile Lys
 20 25 30
 Val Ala Val Lys Thr Leu Lys Lys Gly Ser Thr Asp Gln Glu Lys Ile
 35 40 45
 Glu Phe Leu Lys Glu Ala His Leu Met Ser Lys Phe Asn His Pro Asn
 50 55 60
 Ile Leu Lys Gln Leu Gly Val Cys Leu Leu Asn Glu Pro Gln Tyr Ile
 65 70 75 80
 Ile Leu Glu Leu Met Glu Gly Gly Asp Leu Leu Thr Tyr Leu Arg Lys
 85 90 95
 Ala Arg Met Ala Thr Phe Tyr Gly Pro Leu Leu Thr Leu Val Asp Leu
 100 105 110
 Val Asp Leu Cys Val Asp Ile Ser Lys Gly Cys Val Tyr Leu Glu Arg
 115 120 125
 Met His Phe Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Leu Val Ser
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Thr Ser Pro Arg Ile Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly
 145 150 155 160
 Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asn Asp Tyr Tyr Arg Lys Arg Gly Glu
 165 170 175
 Gly Leu Leu Pro Val Arg Trp Met Ala Pro Glu Ser Leu Met Asp Gly
 180 185 190
 Ile Phe Thr Thr Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Ile Leu Ile Trp
 195 200 205
 Glu Ile Leu Thr Leu Gly His Gln Pro Tyr Pro Ala His Ser Asn Leu
 210 215 220
 Asp Val Leu Asn Tyr Val Gln Thr Gly Gly Arg Leu Glu Pro Pro Arg
 225 230 235 240
 Asn Cys Pro Asp Asp Leu Trp Asn Leu Met Thr Gln Cys Trp Ala Gln
 245 250 255
 Glu Pro Asp Gln Arg Pro Thr Phe His Arg Ile Gln Asp Gln Leu Gln
 260 265 270
 Leu Phe Arg Asn Phe Phe
 275

<210> 28
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 <400> 28
 Val Gly Val Trp His Arg
 1 5
 <210> 29
 <211> 6
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 20 <400> 29
 Leu Val Gly Asp Asp Phe
 1 5
 <210> 30
 <211> 6
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 30 <400> 30
 Leu Val Gly Ala Gly Val
 1 5
 <210> 31
 35 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Polipéptido Sintético
 <400> 31
 Pro Pro Lys Asp Asp Phe
 1 5
 45 <210> 32
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 <400> 32
 Ala Gly Ser Thr Leu Pro
 1 5
 55 <210> 33
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>

<223> Polipéptido Sintético
 <400> 33
 Leu Gln Val Trp His Arg
 1 5
 5
 <210> 34
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 <400> 34
 Val Leu Gln Ala Gly Val
 1 5
 15
 <210> 35
 <211> 1620
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 25 <400> 35

ES 2 655 842 T3

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

ES 2 655 842 T3

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

ES 2 655 842 T3

500	505	510
Asp His Gln Asp His Ala Leu Leu Leu Ser Thr Thr Asp Val Pro Ala 515 520 525		
Ser Glu Ser Ala Thr Val Thr Ser Ala Thr Phe Pro Ala Pro Ile Lys 530 535 540		
Ser Ser Pro Cys Glu Leu Arg Met Ser Trp Leu Ile Arg Gly Val Leu 545 550 555 560		
Arg Gly Asn Val Ser Leu Val Leu Val Glu Asn Lys Thr Gly Lys Glu 565 570 575		
Gln Gly Arg Met Val Trp His Val Ala Ala Tyr Glu Gly Leu Ser Leu 580 585 590		
Trp Gln Trp Met Val Leu Pro Leu Leu Asp Val Ser Asp Arg Phe Trp 595 600 605		
Leu Gln Met Val Ala Trp Trp Gly Gln Gly Ser Arg Ala Ile Val Ala 610 615 620		
Phe Asp Asn Ile Ser Ile Ser Leu Asp Cys Tyr Leu Thr Ile Ser Gly 625 630 635 640		
Glu Asp Lys Ile Leu Gln Asn Thr Ala Pro Lys Ser Arg Asn Leu Phe 645 650 655		
Glu Arg Asn Pro Asn Lys Glu Leu Lys Pro Gly Glu Asn Ser Pro Arg 660 665 670		
Gln Thr Pro Ile Phe Asp Pro Thr Val His Trp Leu Phe Thr Thr Cys 675 680 685		
Gly Ala Ser Gly Pro His Gly Pro Thr Gln Ala Gln Cys Asn Asn Ala 690 695 700		
Tyr Gln Asn Ser Asn Leu Ser Val Glu Val Gly Ser Glu Gly Pro Leu 705 710 715 720		
Lys Gly Ile Gln Ile Trp Lys Val Pro Ala Thr Asp Thr Tyr Ser Ile 725 730 735		
Ser Gly Tyr Gly Ala Ala Gly Gly Lys Gly Gly Lys Asn Thr Met Met 740 745 750		

ES 2 655 842 T3

Arg Ser His Gly Val Ser Val Leu Gly Ile Phe Asn Leu Glu Lys Asp
 755 760 765
 Asp Met Leu Tyr Ile Leu Val Gly Gln Gln Gly Glu Asp Ala Cys Pro
 770 775 780
 Ser Thr Asn Gln Leu Ile Gln Lys Val Cys Ile Gly Glu Asn Asn Val
 785 790 795 800
 Ile Glu Glu Glu Ile Arg Val Asn Arg Ser Val His Glu Trp Ala Gly
 805 810 815
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Thr Tyr Val Phe Lys Met Lys Asp
 820 825 830
 Gly Val Pro Val Pro Leu Ile Ile Ala Ala Gly Gly Gly Gly Arg Ala
 835 840 845
 Tyr Gly Ala Lys Thr Asp Thr Phe His Pro Glu Arg Leu Glu Asn Asn
 850 855 860
 Ser Ser Val Leu Gly Leu Asn Gly Asn Ser Gly Ala Ala Gly Gly Gly
 865 870 875 880
 Gly Gly Trp Asn Asp Asn Thr Ser Leu Leu Trp Ala Gly Lys Ser Leu
 885 890 895
 Gln Glu Gly Ala Thr Gly Gly His Ser Cys Pro Gln Ala Met Lys Lys
 900 905 910
 Trp Gly Trp Glu Thr Arg Gly Gly Phe Gly Gly Gly Gly Gly Cys
 915 920 925
 Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Tyr Ile Gly Gly Asn Ala Ala Ser
 930 935 940
 Asn Asn Asp Pro Glu Met Asp Gly Glu Asp Gly Val Ser Phe Ile Ser
 945 950 955 960
 Pro Leu Gly Ile Leu Tyr Thr Pro Ala Leu Lys Val Met Glu Gly His
 965 970 975
 Gly Glu Val Asn Ile Lys His Tyr Leu Asn Cys Ser His Cys Glu Val
 980 985 990
 Asp Glu Cys His Met Asp Pro Glu Ser His Lys Val Ile Cys Phe Cys
 995 1000 1005

ES 2 655 842 T3

Asp	His	Gly	Thr	Val	Leu	Ala	Glu	Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Ile	Val
1010						1015					1020			
Ser	Pro	Thr	Pro	Glu	Pro	His	Leu	Pro	Leu	Ser	Leu	Ile	Leu	Ser
1025						1030					1035			
Val	Val	Thr	Ser	Ala	Leu	Val	Ala	Ala	Leu	Val	Leu	Ala	Phe	Ser
1040						1045					1050			
Gly	Ile	Met	Ile	Val	Tyr	Arg	Arg	Lys	His	Gln	Glu	Leu	Gln	Ala
1055						1060					1065			
Met	Gln	Met	Glu	Leu	Gln	Ser	Pro	Glu	Tyr	Lys	Leu	Ser	Lys	Leu
1070						1075					1080			
Arg	Thr	Ser	Thr	Ile	Met	Thr	Asp	Tyr	Asn	Pro	Asn	Tyr	Cys	Phe
1085						1090					1095			
Ala	Gly	Lys	Thr	Ser	Ser	Ile	Ser	Asp	Leu	Lys	Glu	Val	Pro	Arg
1100						1105					1110			
Lys	Asn	Ile	Thr	Leu	Ile	Arg	Gly	Leu	Gly	His	Gly	Ala	Phe	Gly
1115						1120					1125			
Glu	Val	Tyr	Glu	Gly	Gln	Val	Ser	Gly	Met	Pro	Asn	Asp	Pro	Ser
1130						1135					1140			
Pro	Leu	Gln	Val	Ala	Val	Lys	Thr	Leu	Pro	Glu	Val	Cys	Ser	Glu
1145						1150					1155			
Gln	Asp	Glu	Leu	Asp	Phe	Leu	Met	Glu	Ala	Leu	Ile	Ile	Ser	Lys
1160						1165					1170			
Phe	Asn	His	Gln	Asn	Ile	Val	Arg	Cys	Ile	Gly	Val	Ser	Leu	Gln
1175						1180					1185			
Ser	Leu	Pro	Arg	Phe	Ile	Leu	Leu	Glu	Leu	Met	Ala	Gly	Gly	Asp
1190						1195					1200			
Leu	Lys	Ser	Phe	Leu	Arg	Glu	Thr	Arg	Pro	Arg	Pro	Ser	Gln	Pro
1205						1210					1215			
Ser	Ser	Leu	Ala	Met	Leu	Asp	Leu	Leu	His	Val	Ala	Arg	Asp	Ile
1220						1225					1230			
Ala	Cys	Gly	Cys	Gln	Tyr	Leu	Glu	Glu	Asn	His	Phe	Ile	His	Arg
1235						1240					1245			

ES 2 655 842 T3

Asp Ile	Ala Ala Arg Asn Cys	Leu Leu Thr Cys Pro	Gly Pro Gly
1250	1255	1260	
Arg Val	Ala Lys Ile Gly Asp	Phe Gly Met Ala Arg	Asp Ile Tyr
1265	1270	1275	
Arg Ala	Ser Tyr Tyr Arg Lys	Gly Gly Cys Ala Met	Leu Pro Val
1280	1285	1290	
Lys Trp	Met Pro Pro Glu Ala	Phe Met Glu Gly Ile	Phe Thr Ser
1295	1300	1305	
Lys Thr	Asp Thr Trp Ser Phe	Gly Val Leu Leu Trp	Glu Ile Phe
1310	1315	1320	
Ser Leu	Gly Tyr Met Pro Tyr	Pro Ser Lys Ser Asn	Gln Glu Val
1325	1330	1335	
Leu Glu	Phe Val Thr Ser Gly	Gly Arg Met Asp Pro	Pro Lys Asn
1340	1345	1350	
Cys Pro	Gly Pro Val Tyr Arg	Ile Met Thr Gln Cys	Trp Gln His
1355	1360	1365	
Gln Pro	Glu Asp Arg Pro Asn	Phe Ala Ile Ile Leu	Glu Arg Ile
1370	1375	1380	
Glu Tyr	Cys Thr Gln Asp Pro	Asp Val Ile Asn Thr	Ala Leu Pro
1385	1390	1395	
Ile Glu	Tyr Gly Pro Leu Val	Glu Glu Glu Glu Lys	Val Pro Val
1400	1405	1410	
Arg Pro	Lys Asp Pro Glu Gly	Val Pro Pro Leu Leu	Val Ser Gln
1415	1420	1425	
Gln Ala	Lys Arg Glu Glu Glu	Arg Ser Pro Ala Ala	Pro Pro Pro
1430	1435	1440	
Leu Pro	Thr Thr Ser Ser Gly	Lys Ala Ala Lys Lys	Pro Thr Ala
1445	1450	1455	
Ala Glu	Ile Ser Val Arg Val	Pro Arg Gly Pro Ala	Val Glu Gly
1460	1465	1470	
Gly His	Val Asn Met Ala Phe	Ser Gln Ser Asn Pro	Pro Ser Glu

ES 2 655 842 T3

1475

1480

1485

Leu His Lys Val His Gly Ser Arg Asn Lys Pro Thr Ser Leu Trp
1490 1495 1500

Asn Pro Thr Tyr Gly Ser Trp Phe Thr Glu Lys Pro Thr Lys Lys
1505 1510 1515

Asn Asn Pro Ile Ala Lys Lys Glu Pro His Asp Arg Gly Asn Leu
1520 1525 1530

Gly Leu Glu Gly Ser Cys Thr Val Pro Pro Asn Val Ala Thr Gly
1535 1540 1545

Arg Leu Pro Gly Ala Ser Leu Leu Leu Glu Pro Ser Ser Leu Thr
1550 1555 1560

Ala Asn Met Lys Glu Val Pro Leu Phe Arg Leu Arg His Phe Pro
1565 1570 1575

Cys Gly Asn Val Asn Tyr Gly Tyr Gln Gln Gln Gly Leu Pro Leu
1580 1585 1590

Glu Ala Ala Thr Ala Pro Gly Ala Gly His Tyr Glu Asp Thr Ile
1595 1600 1605

Leu Lys Ser Lys Asn Ser Met Asn Gln Pro Gly Pro
1610 1615 1620

<210> 36

<211> 6222

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polinucleótido Sintético

<400> 36

gggggaggca gcggtggtag cagctggtac ctcccgccgc ctctgttcgg agggtcgcgg	60
ggcaccgagg tgctttccgg ccgccctctg gtcggccacc caaagccgcg ggcgctgatg	120
atgggtgagg agggggcggc aagatttcgg gcgcccctgc cctgaacgcc ctgagctgct	180
gccgcccggg ccgctccagt gcctgcgaac tctgaggagc cgaggcgccg gtgagagcaa	240
ggacgctgca aacttgcgca gcgcgggggc tgggattcac gccagaagt tcagcaggca	300
gacagtccga agccttcccg cagcggagag atagcttgag ggtgcgcaag acggcagcct	360
ccgccctcgg ttcccgccca gaccgggcag aagagcttgg aggagccaaa aggaacgcaa	420
aaggcgggcca ggacagcgtg cagcagctgg gagccgccgt tctcagcctt aaaagttgca	480

ES 2 655 842 T3

gagattggag gctgccccga gaggggacag accccagctc cgactgcggg gggcaggaga	540
ggacggtacc caactgccac ctcccttcaa ccatagtagt tcctctgtac cgagcgcagc	600
gagctacaga cgggggcgcg gcactcggcg cggagagcgg gaggtcaag gtcccagcca	660
gtgagcccag tgtgcttgag tgtctctgga ctgcccctg agcttccagg tctgtttcat	720
ttagactcct gctcgcctcc gtgcagttgg gggaaagcaa gagacttgcg cgcacgcaca	780
gtcctctgga gatcaggtgg aaggagccgc tgggtaccaa ggactgttca ggcctcttc	840
ccatctcggg gagagcgaag ggtgaggctg ggcccggaga gcagtgtaaa cggcctcctc	900
cggcgggatg ggagccatcg ggctcctgtg gctcctgccg ctgctgcttt ccacggcagc	960
tgtgggctcc gggatgggga ccggccagcg cgggggctcc ccagctgcgg ggccggcgct	1020
gcagccccgg gagccactca gctactcgcg cctgcagagg aagagtctgg cagttgactt	1080
cgtggtgccc tcgctcttcc gtgtctacgc ccgggacctt ctgctgccac cctcctcctc	1140
ggagctgaag gctggcaggc ccgaggcccg cggctcgcta gctctggact gcgccccgct	1200
gctcaggttg ctggggcccg cggcgggggt ctccctggacc gccggttcac cagccccggc	1260
agaggccccg acgctgtcca gggctctgaa gggcggctcc gtgcgcaagc tccggcgtgc	1320
caagcagttg gtgctggagc tgggcgagga ggcgatcttg gagggttgcg tcgggcccc	1380
cggggaggcg gctgtggggc tgctccagtt caatctcagc gagctgttca gttggtggat	1440
tcgccaaggc gaagggcgac tgaggatccg cctgatgccc gagaagaagg cgtcggaggt	1500
gggcagagag ggaaggctgt ccgcggaat tcgcgcctcc cagccccgcc ttctcttcca	1560
gatcttcggg actggtcata gtccttgga atcaccaaca aacatgcctt ctctctctcc	1620
tgattatattt acatggaatc tcacctggat aatgaaagac tccttcctt tcctgtctca	1680
tcgcagccga tatggtctgg agtgacgctt tgacttcccc tgtgagctgg agtattcccc	1740
tccactgcat gacctcagga accagagctg gtcctggcgc cgcctccct ccgaggaggc	1800
ctcccagatg gacttgctgg atgggcctgg ggcagagcgt tctaaggaga tgcccagagg	1860
ctcctttctc cttctcaaca cctcagctga ctccaagcac accatcctga gtccgtggat	1920
gaggagcagc agtgagcact gcacactggc cgtctcggtg cacaggcacc tgcagccctc	1980
tggaaggtag attgccagc tgctgcccc caacgaggct gcaagagaga tcctcctgat	2040
gccactcca gggaagcatg gttggacagt gctccaggga agaactgggc gtccagacaa	2100
cccatctcga gtggccctgg aatacatctc cagtggaaac cgcagcttgt ctgcagtgga	2160
cttctttgcc ctgaagaact gcagtgaagg aacatcccca ggctccaaga tggccctgca	2220
gagctccttc acttgttgga atgggacagt cctccagctt gggcaggcct gtgacttcca	2280
ccaggactgt gccagggag aagatgagag ccagatgtgc cggaaactgc ctgtgggttt	2340

ES 2 655 842 T3

ttactgcaac	tttgaagatg	gcttctgtgg	ctggacccaa	ggcacactgt	cacccacac	2400
tcctcaatgg	caggtcagga	ccctaaagga	tgcccggttc	caggaccacc	aagaccatgc	2460
tctattgctc	agtaccactg	atgtccccgc	ttctgaaagt	gctacagtga	ccagtgcctac	2520
gtttcctgca	ccgatcaaga	gctctccatg	tgagctccga	atgtcctggc	tcattcgtgg	2580
agtcttgagg	ggaaacgtgt	ccttggtgct	agtggagaac	aaaaccggga	aggagcaagg	2640
caggatggtc	tggcatgtcg	ccgcctatga	aggcttgagc	ctgtggcagt	ggatgggtgt	2700
gcctctcctc	gatgtgtctg	acaggttctg	gctgcagatg	gtcgcagtgt	ggggacaagg	2760
atccagagcc	atcgtggctt	ttgacaatat	ctccatcagc	ctggactgct	acctcaccat	2820
tagcggagag	gacaagatcc	tgcagaatac	agcaccctaa	tcaagaaacc	tgtttgagag	2880
aaaccctaac	aaggagctga	aaccgggga	aaattcacca	agacagaccc	ccatctttga	2940
ccctacagtt	cattggtgtg	tcaccacatg	tggggccagc	gggccccatg	gccccacca	3000
ggcacagtgc	aacaacgcct	accagaactc	caacctgagc	gtggaggtgg	ggagcgaggg	3060
ccccctgaaa	ggcatccaga	tctggaaggt	gccagccacc	gacacctaca	gcattctcggg	3120
ctacggagct	gctggcggga	aaggcgggaa	gaacaccatg	atgcgggtccc	acggcgtgtc	3180
tgtgctgggc	atcttcaacc	tggagaagga	tgacatgctg	tacatcctgg	ttgggcagca	3240
gggagaggac	gcctgcccc	gtacaaacca	gttaatccag	aaagtctgca	ttggagagaa	3300
caatgtgata	gaagaagaaa	tccgtgtgaa	cagaagcgtg	catgagtggg	caggaggcgg	3360
aggaggaggg	ggtggagcca	cctacgtatt	taagatgaag	gatggagtgc	cgggtcccct	3420
gatcattgca	gcccggaggtg	gtggcagggc	ctacggggcc	aagacagaca	cgttccaccc	3480
agagagactg	gagaataaact	cctcgtttct	agggtctaac	ggcaattccg	gagccgcagg	3540
tgggtggaggt	ggctggaatg	ataacacttc	cttgctctgg	gccggaaaat	ctttgcagga	3600
gggtgccacc	ggagacatt	cctgccccca	ggccatgaag	aagtgggggt	gggagacaag	3660
aggggggttc	ggaggggggtg	gaggggggtg	ctcctcaggt	ggaggaggcg	gaggatatat	3720
aggcggcaat	gcagcctcaa	acaatgaccc	cgaaatggat	ggggaagatg	gggtttcctt	3780
catcagtcca	ctgggcatcc	tgtacacccc	agctttaaaa	tgatggaag	gccacgggga	3840
agtgaatatt	aagcattatc	taaactgcag	tactgtgag	gtagacgaat	gtcacatgga	3900
ccctgaaagc	cacaaggtca	tctgcttctg	tgaccacggg	acggtgctgg	ctgaggatgg	3960
cgtctcctgc	attgtgtcac	ccaccccgga	gccacacctg	ccactctcgc	tgatcctctc	4020
tgtgtgacc	tctgccctcg	tggccgcctt	ggtcctggct	ttctccggca	tcattgattgt	4080
gtaccgccgg	aagcaccagg	agctgcaagc	catgcagatg	gagctgcaga	gccctgagta	4140
caagetgagc	aagctccgca	cctcgacctat	catgaccgac	tacaacccca	actactgctt	4200
tgctggcaag	acctcctcca	tcagtgaacct	gaaggaggtg	ccgcggaaaa	acatcacctt	4260

ES 2 655 842 T3

cattcggggg	ctggggccatg	gcgccttttg	ggaggtgtat	gaaggccagg	tgtccggaat	4320
gccccacgac	ccaagccccc	tgcaagtggc	tgtgaagacg	ctgcctgaag	tgtgctctga	4380
acaggacgaa	ctggatttcc	tcatggaagc	cctgatcatc	agcaaatcca	accaccagaa	4440
cattgttcgc	tgcattgggg	tgagcctgca	atccctgccc	cggttcatcc	tgctggagct	4500
catggcgggg	ggagacctca	agtccttcct	ccgagagacc	cgcctcgc	cgagccagcc	4560
ctcctccctg	gccatgctgg	accttctgca	cgtggctcgg	gacattgcct	gtggctgtca	4620
gtatttggag	gaaaaccact	tcatccaccg	agacattgct	gccagaaact	gcctcttgac	4680
ctgtccaggc	cctggaagag	tggccaagat	tggagacttc	gggatggccc	gagacatcta	4740
cagggcgagc	tactatagaa	agggaggctg	tgccatgctg	ccagttaagt	ggatgcccc	4800
agaggccttc	atggaaggaa	tattcacttc	taaaacagac	acatggtcct	ttggagtgtc	4860
gctatgggaa	atcttttctc	ttggatatat	gccatacccc	agcaaaagca	accaggaagt	4920
tctggagttt	gtcaccagt	gaggccggat	ggacccccc	aagaactgcc	ctgggcctgt	4980
ataccggata	atgactcagt	gctggcaaca	tcagcctgaa	gacaggccca	actttgccat	5040
cattttggag	aggattgaat	actgcacca	ggacccggat	gtaatcaaca	ccgctttgcc	5100
gatagaatat	ggtccacttg	tggaagagga	agagaaagt	cctgtgaggc	ccaaggaccc	5160
tgagggggtt	cctcctctcc	tggtctctca	acaggcaaaa	cgggaggagg	agcgagccc	5220
agctgcccc	ccacctctgc	ctaccacctc	ctctggcaag	gctgcaaaga	aaccacagc	5280
tgagagatc	tctgttcgag	tccttagagg	gccggccgtg	gaagggggac	acgtgaatat	5340
ggcattctct	cagtccaacc	ctccttcgga	gttgcaacaag	gtccacggat	ccagaaacaa	5400
gcccaccagc	ttgtggaacc	caacgtacgg	ctcctggttt	acagagaaac	ccaccaaaaa	5460
gaataatcct	atagcaaaga	aggagccaca	cgacaggggt	aacctggggc	tgaggggaag	5520
ctgtactgtc	ccacctaacg	ttgcaactgg	gagacttccg	ggggcctcac	tgctcctaga	5580
gccctcttcg	ctgactgcc	atatgaagga	ggtacctctg	ttcaggctac	gtcacttccc	5640
ttgtgggaat	gtcaattacg	gctaccagca	acagggcttg	cccttagaag	ccgctactgc	5700
ccctggagct	ggtcattacg	aggataccat	tctgaaaagc	aagaatagca	tgaaccagcc	5760
tgggcctga	gctcggtcgc	acactcactt	ctcttccttg	ggatccctaa	gaccgtggag	5820
gagagagagg	caatggctcc	ttcacaaacc	agagaccaa	tgtcacgttt	tgttttgtgc	5880
caacctattt	tgaagtacca	ccaaaaaagc	tgtattttga	aaatgcttta	gaaaggtttt	5940
gagcatgggt	tcatcctatt	ctttcgaaag	aagaaaatat	cataaaaatg	agtgataaat	6000
acaaggccca	gatgtggttg	cataagggtt	ttatgcatgt	ttgttgata	cttccttatg	6060
cttctttcaa	attgtgtgtg	ctctgcttca	atgtagtcag	aattagctgc	ttctatgttt	6120
catagttggg	gtcatagatg	tttccttgcc	ttgttgatgt	ggacatgagc	catttgaggg	6180
gagagggaac	ggaaataaag	gagttatttg	taatgactaa	aa		6222

REIVINDICACIONES

1. Un método que comprende:

5 detectar, en una muestra biológica de un paciente humano que tiene o se sospecha que tiene cáncer, la presencia de un polipéptido de fusión ROS1 que tiene actividad quinasa ROS1 o de un polinucleótido que codifique al mismo; y

 detectar, en la muestra biológica, la presencia de un polipéptido EGFR mutante o de un polinucleótido que codifique al mismo.
2. El método de la reivindicación 1 en el que la muestra procede de un cáncer de pulmón, opcionalmente un
10 cáncer no microcítico de pulmón.
3. El método de cualquier reivindicación precedente en el que el polipéptido EGFR mutante comprende una mutación en el dominio quinasa.
4. El método de cualquier reivindicación precedente en el que la detección de la presencia de un polipéptido que tiene actividad quinasa ROS1 comprende el uso de un anticuerpo.
- 15 5. El método de cualquier reivindicación precedente en el que la detección de la presencia de un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad quinasa ROS1 comprende el uso de una hibridación *in situ* y/o una amplificación de ácidos nucleicos.
6. El método de cualquier reivindicación precedente en el que la detección de la presencia de un polipéptido EGFR mutante comprende el uso de un anticuerpo específico al mutante.
- 20 7. El método de cualquier reivindicación precedente en el que la detección de la presencia de un polinucleótido que codifica un polipéptido EGFR mutante comprende el uso de una secuenciación de ácidos nucleicos.
8. El método de cualquier reivindicación precedente en el que la detección de la presencia de un polinucleótido que codifica un polipéptido EGFR mutante comprende el uso de una amplificación de ácidos nucleicos.
- 25 9. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de ROS1 y de un inhibidor de EGFR para ser usada en el tratamiento del cáncer en un paciente humano en un método que comprende:

 determinar que una muestra biológica de un tumor del paciente comprende un polipéptido de fusión ROS1 que tiene actividad quinasa ROS1 o un polinucleótido que codifica al mismo y un polipéptido EGFR mutante o un polinucleótido que codifica al mismo.
- 30 10. El inhibidor de ROS1 y el inhibidor de EGFR de la reivindicación 9 en los que el tumor es un cáncer de pulmón, opcionalmente un cáncer no microcítico de pulmón.
11. El inhibidor de ROS1 y el inhibidor de EGFR para el uso de la reivindicación 9 o de la reivindicación 10 en los que el polipéptido EGFR mutante comprende una mutación en el dominio quinasa.
12. El inhibidor de ROS1 y el inhibidor de EGFR para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 9-11 en los que el inhibidor de ROS1 se selecciona del grupo constituido por crizotinib, ASP3026, NVP TAE-684, CH5424802 y AP26113.
35
13. El inhibidor de ROS1 y el inhibidor de EGFR para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 9-12 en los que el inhibidor de EGFR se selecciona del grupo constituido por gefitinib, erlotinib, cetuximab, afatinib, necitumumab, nimotuzumab, PF299804, RO5083945, ABT-806 y AP26113.

40

Figura 1 A-F

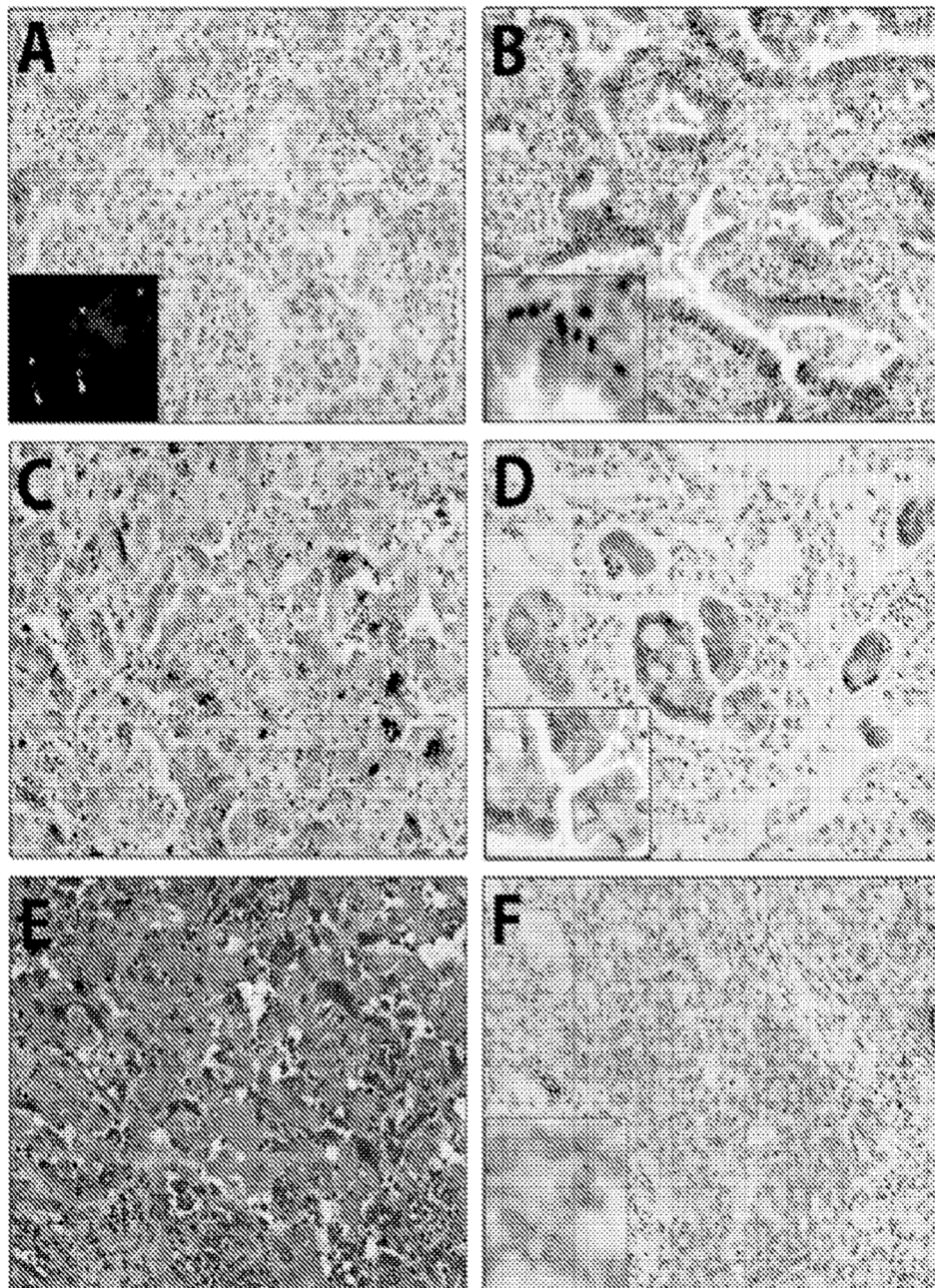


Figura 2

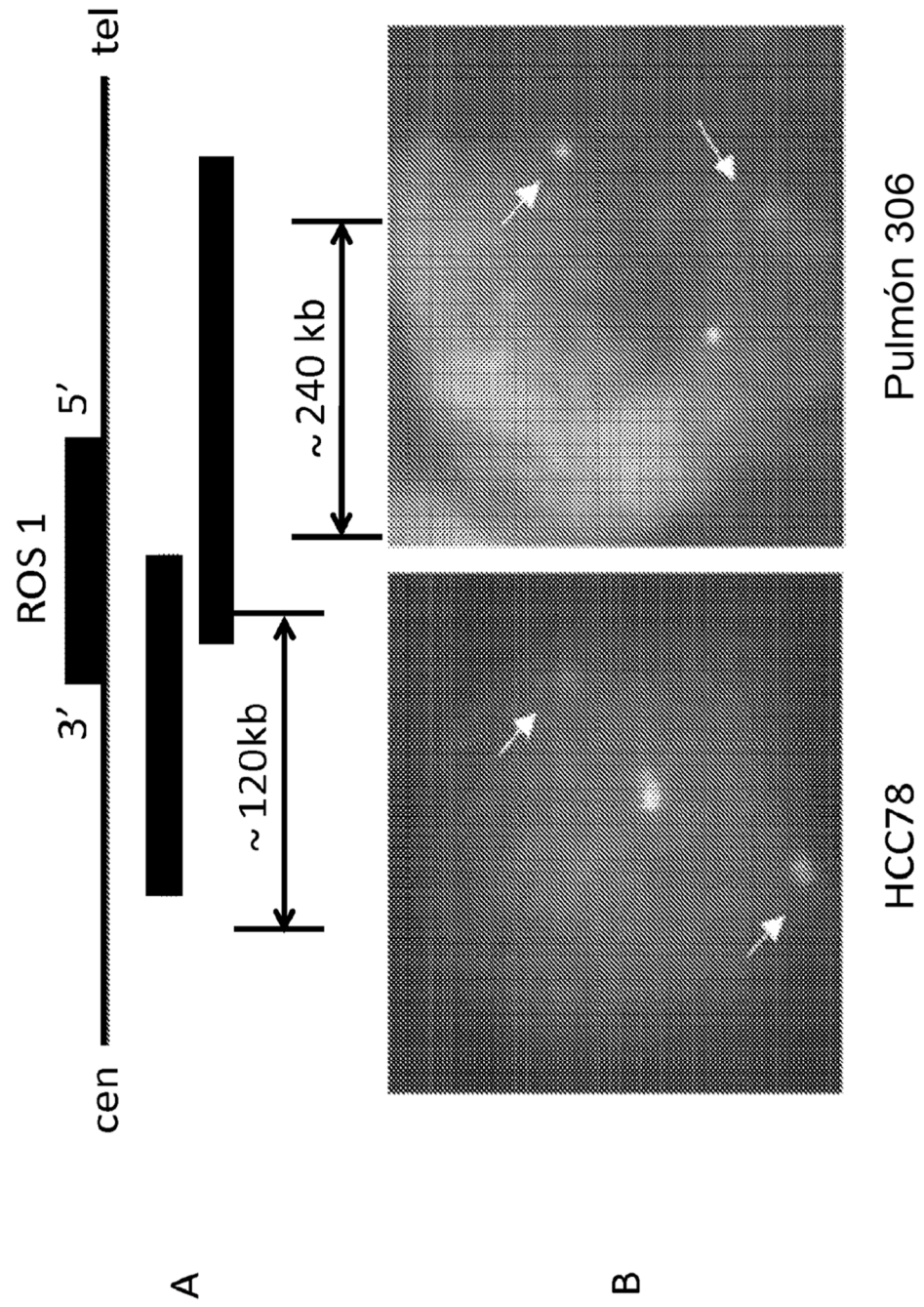
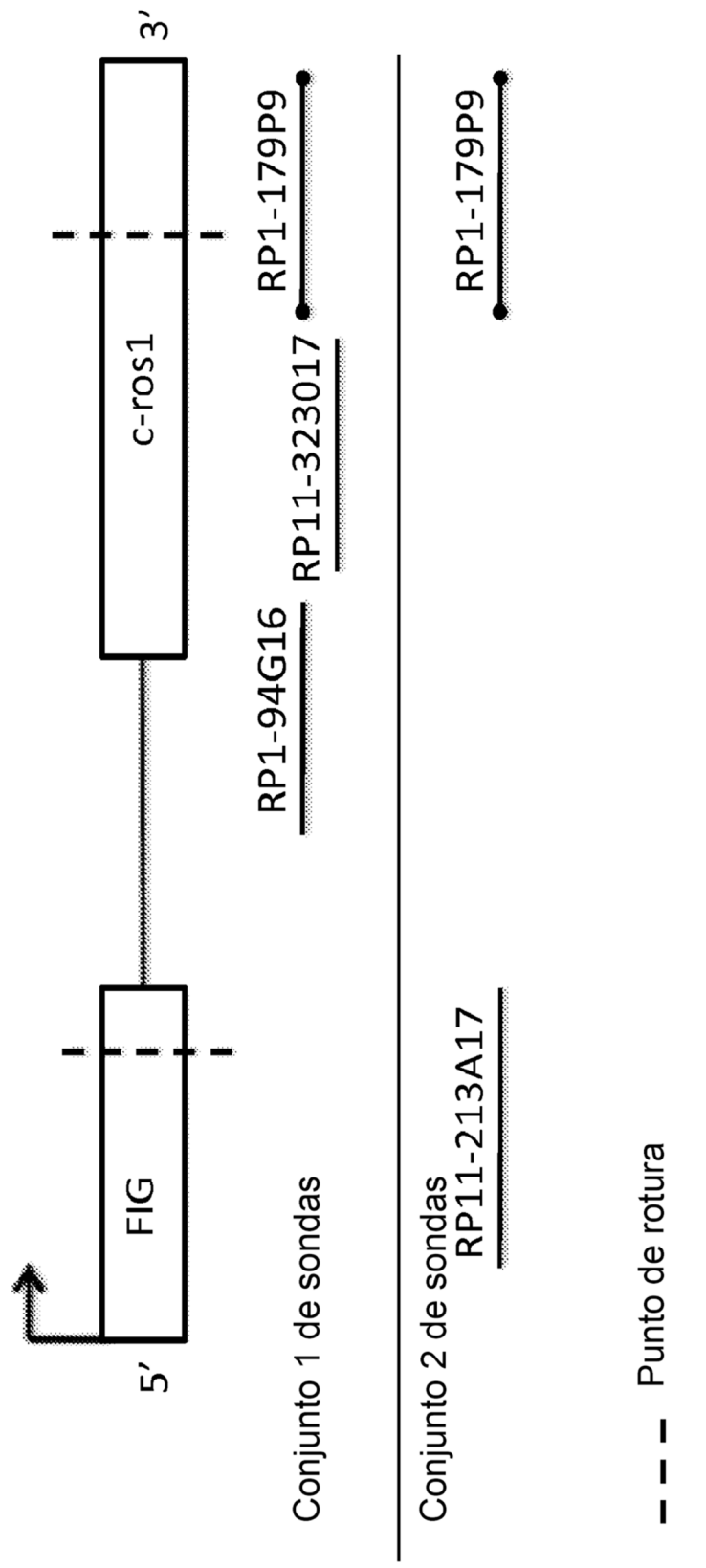


Figura 3



Figuras 4 A-F

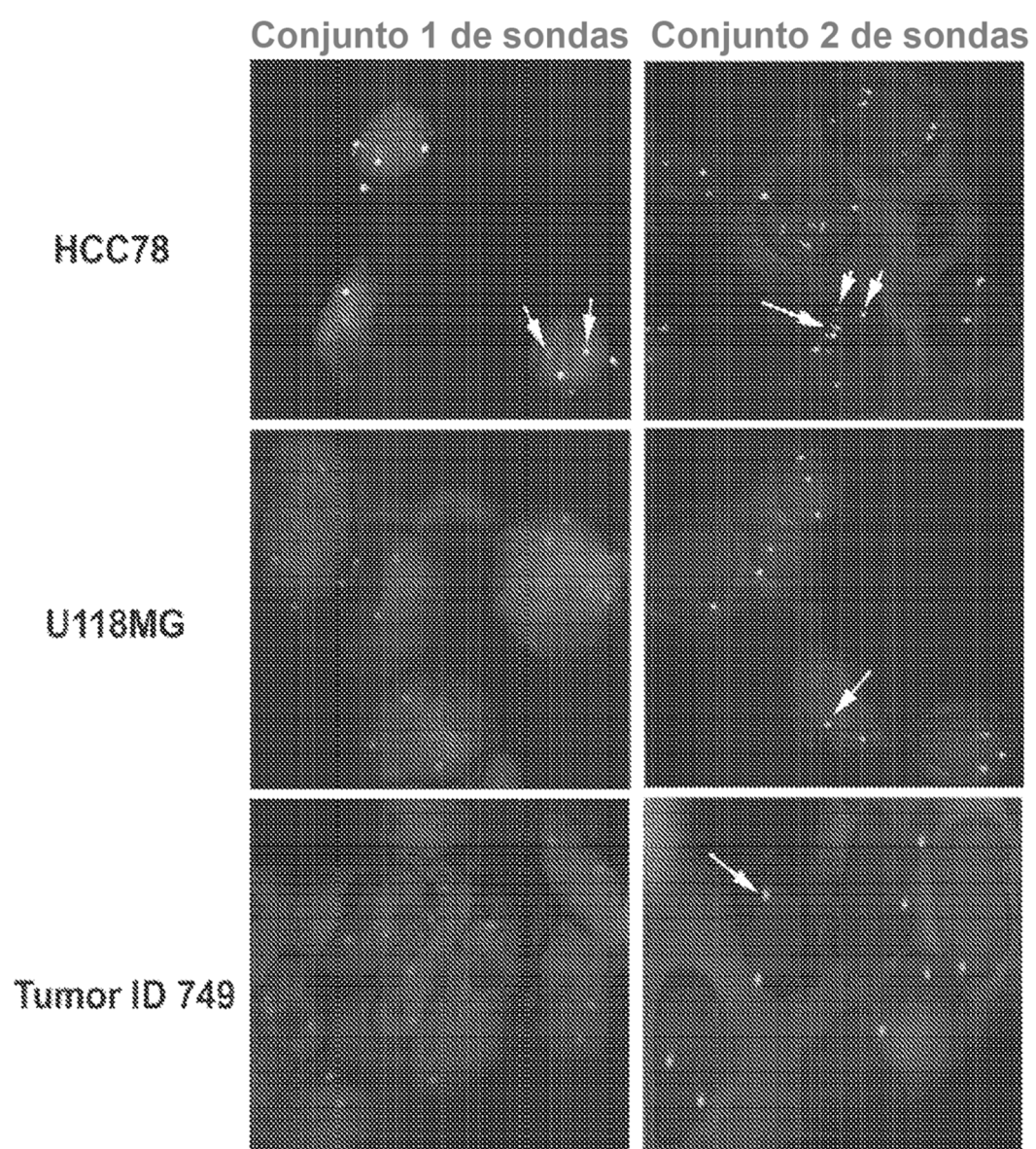


Figura 5

```
>1c1 | 9303
Longitud=167

Evaluación = 272 bits (147), Previsión = 3e-77
Identidades = 147/147 (100%), Huecos = 0/147 (0%)
Cadena=Positiva/Positiva

Consulta 556 GCTGTTCTCCAGGCTGAAGTATATGGGGCGAGACTAGCTGCCAAGTACTTGGATAAGGAA 615
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sujeto 3      GCTGTTCTCCAGGCTGAAGTATATGGGGCGAGACTAGCTGCCAAGTACTTGGATAAGGAA 62

Consulta 616 CTGGCAGGAAGTACTCTTCCAACCCCAAGAGGAGATTGAAAATCTTCCCTGCCCTTCCCCTCGG 675
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sujeto 63      CTGGCAGGAAGTACTCTTCCAACCCCAAGAGGAGATTGAAAATCTTCCCTGCCCTTCCCCTCGG 122

Consulta 676 GAAAAAAGTACTCTGCGTCTCTTGCTG 702
              |||||||||||||||||||||||||||
Sujeto 123      GAAAAAAGTACTCTGCGTCTCTTGCTG 149
```

Figura 6

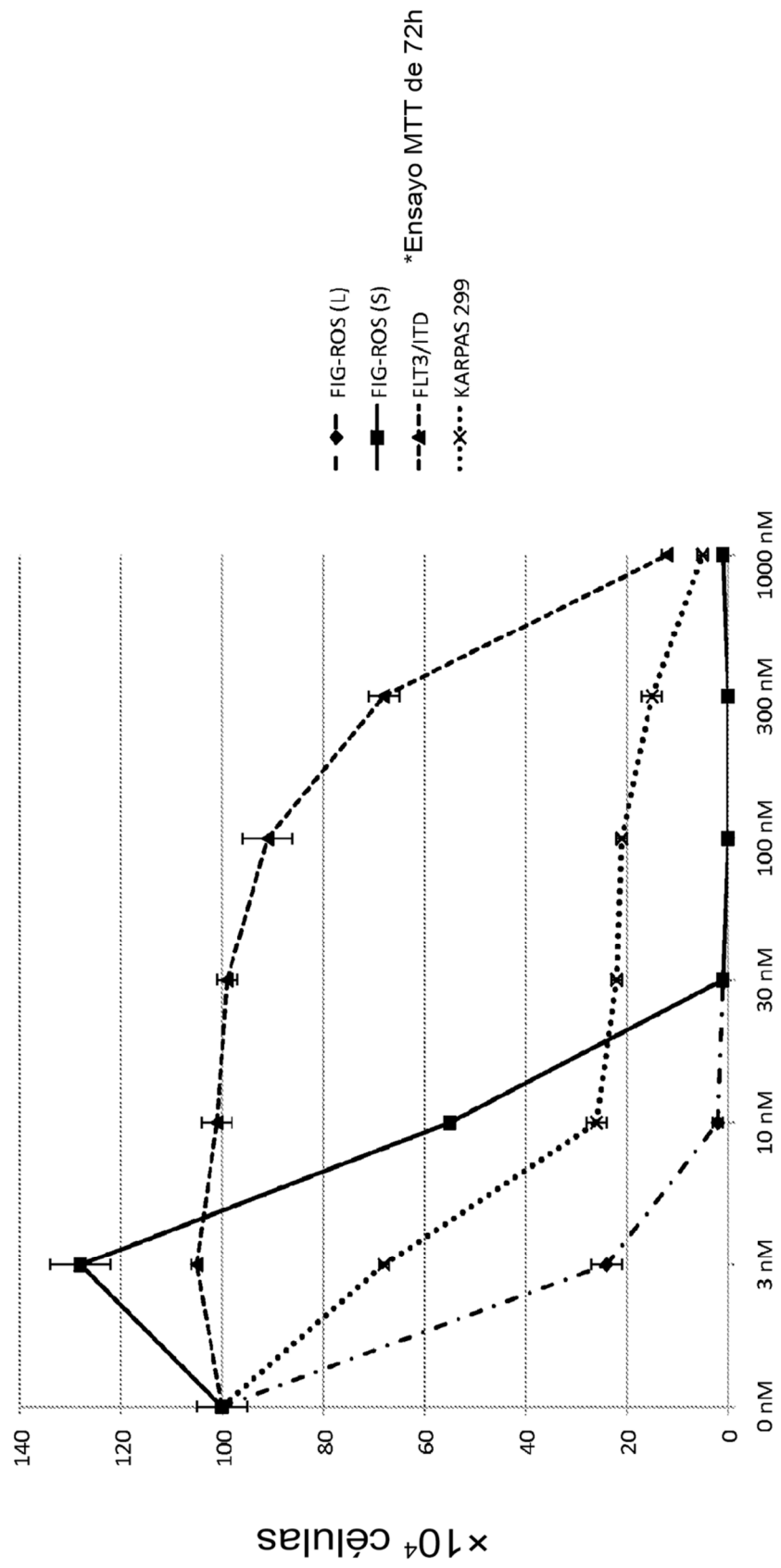


Figura 7: TAE-684 induce apoptosis en células BaF3 con expresión FIG-ROS

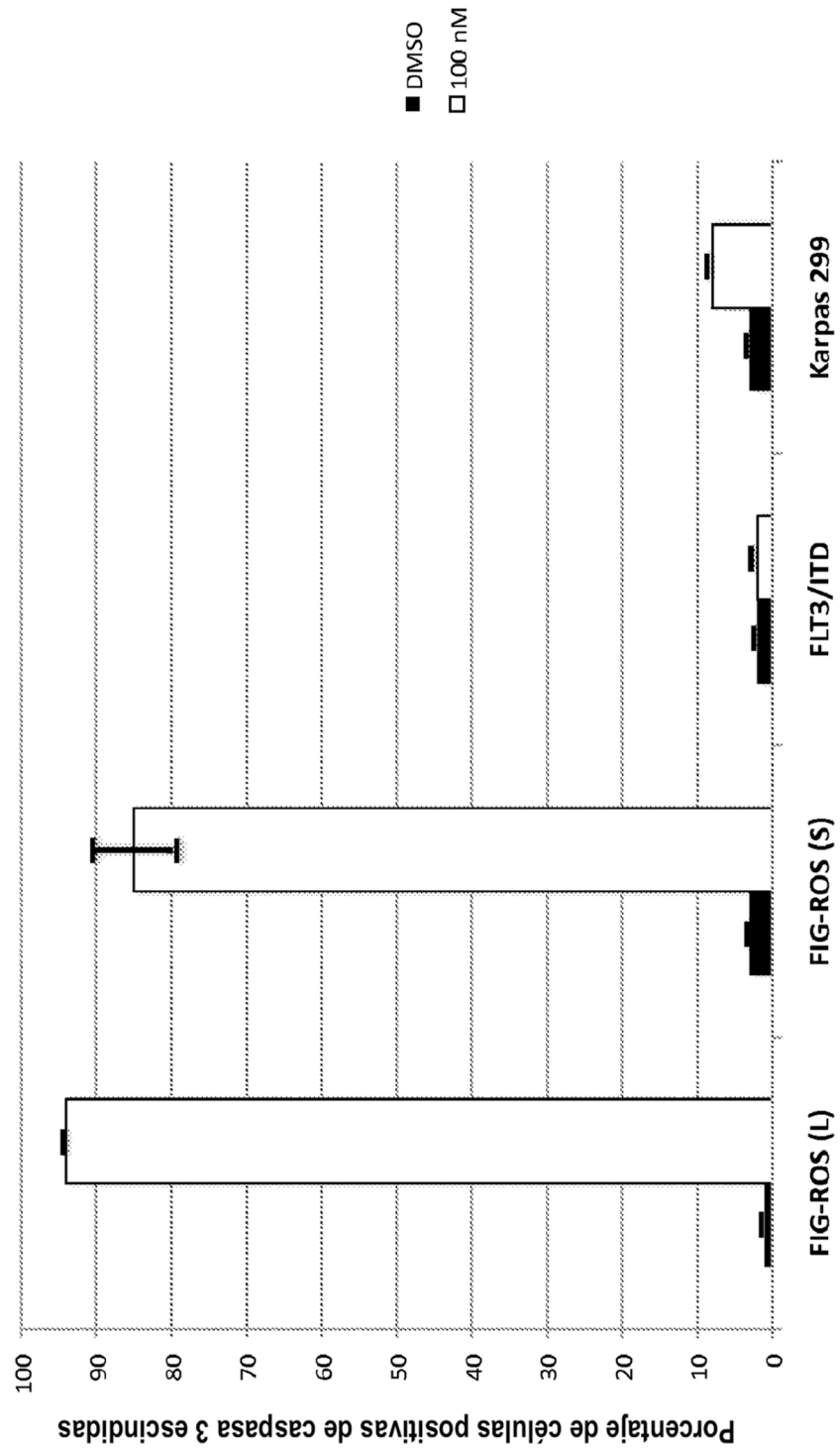


Figura 8: TAE-684 inhibe la fosforilación de FIG-ROS

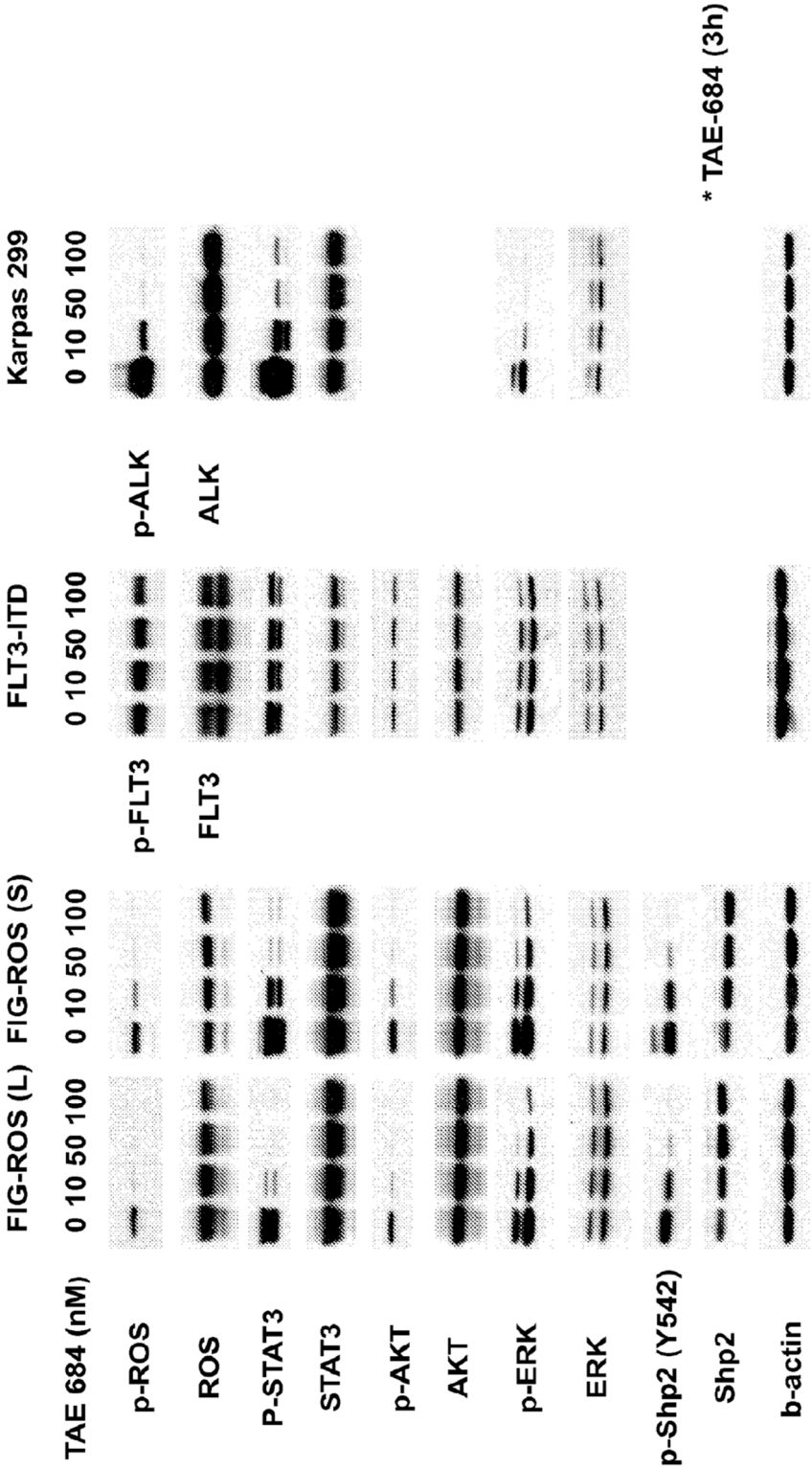


Figura 9A: TAE-684

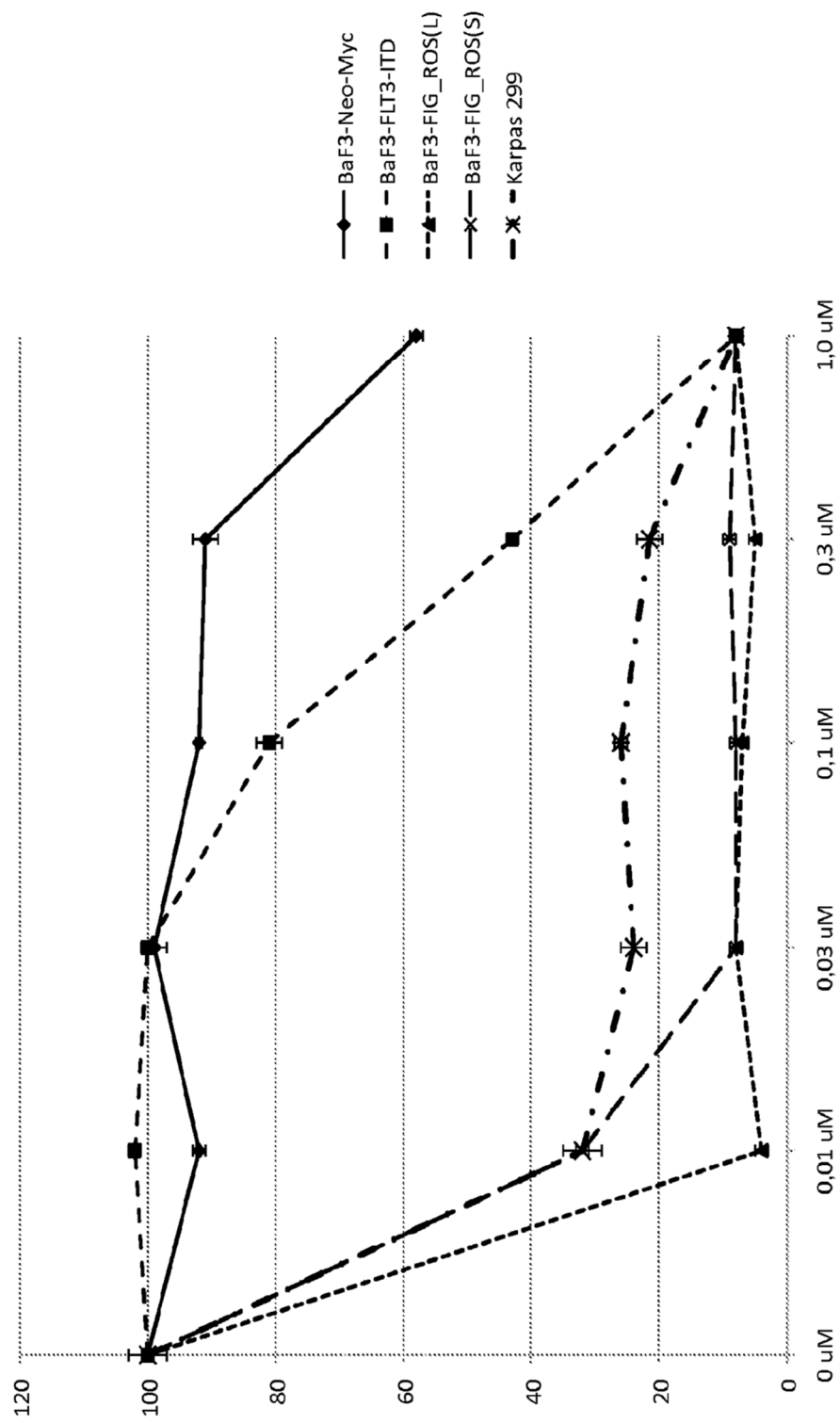


Figura 9B: Crizotinib

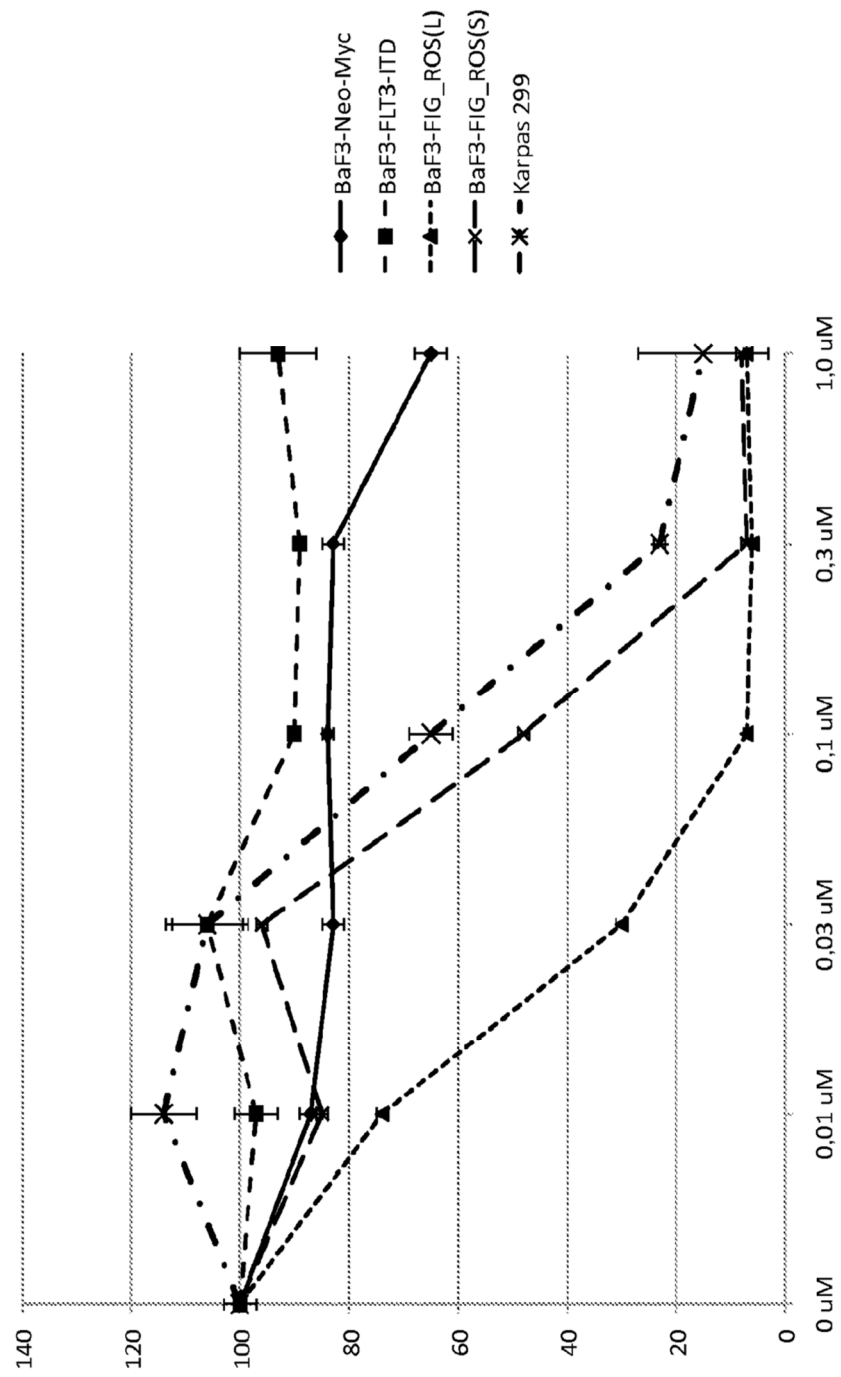


Figura 10

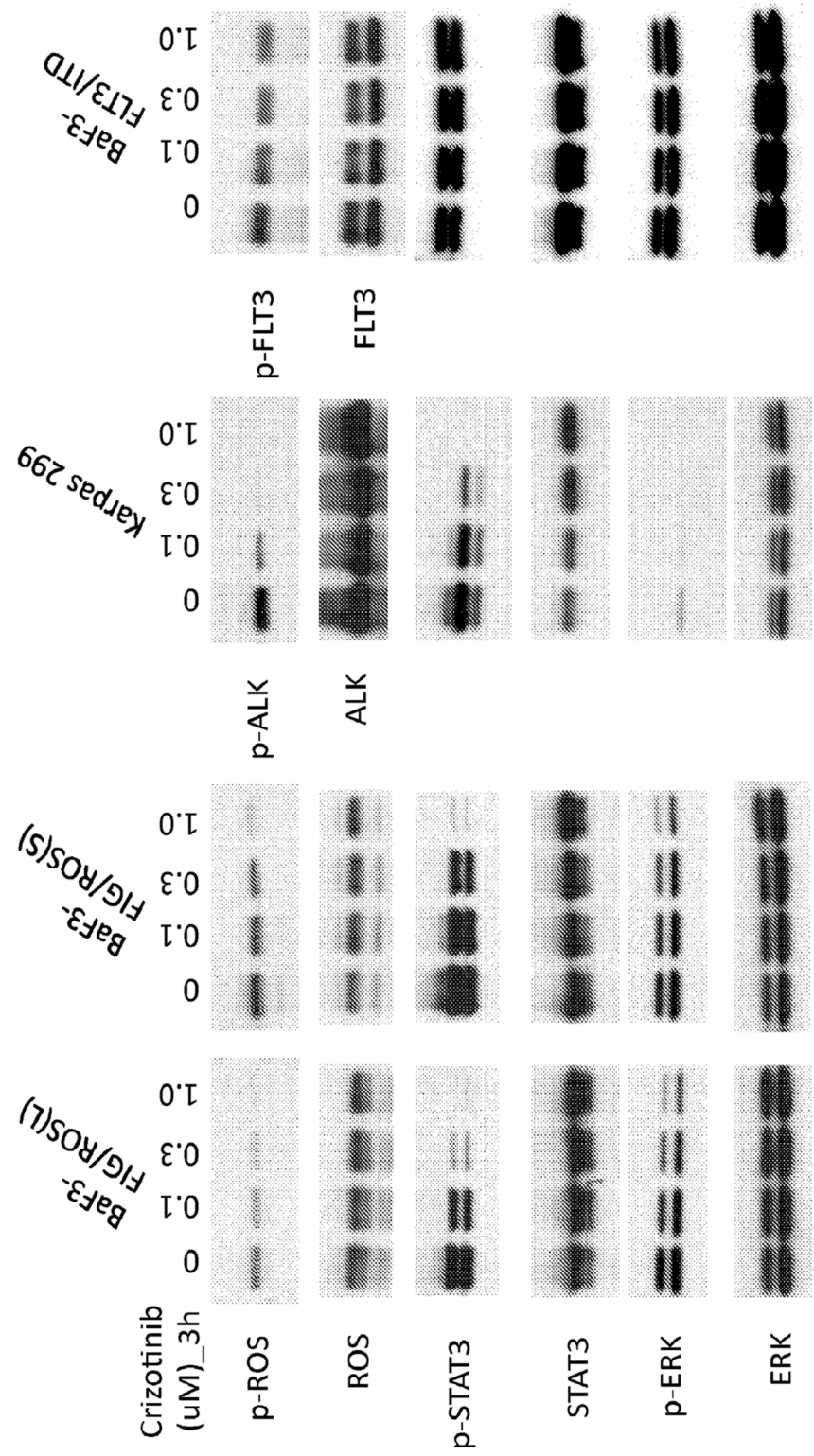


Figura 11

