

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 980**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2012** E 16196573 (6)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018** EP 3182128

54 Título: **ROS cinasa en cáncer de pulmón**

30 Prioridad:

23.05.2011 US 201113113676

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

18.06.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**RIMKUNAS, VICTORIA;
HAACK, HERBERT;
GU, TING-LEI;
GUO, AILAN;
POSSEMATO, ANTHONY;
CROSBY, KATHERINE;
TUCKER, MEGHAN y
REEVES, CYNTHIA**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 716 980 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

ROS cinasa en cáncer de pulmón

5 **Antecedentes de la invención**

La invención se refiere, en general, a proteínas y genes implicados en el cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón humano), y a la detección, el diagnóstico y al tratamiento del cáncer de pulmón.

10 Muchos cánceres se caracterizan por alteraciones en las vías de señalización celular que dan lugar a un control aberrante de los procesos celulares, incluyendo el crecimiento y la proliferación. Estas alteraciones a menudo están provocadas por cambios en la actividad de proteínas de señalización concretas, tales como cinasas.

15 La expresión aberrante de proteínas cinasas puede ser el agente causante (y el impulsor) del cáncer. La expresión aberrante puede estar causada por la fusión de la proteína (o a la porción cinasa de la misma) con una proteína secundaria (o porción), la expresión de una porción truncada de la proteína o por la regulación anormal de la expresión de la proteína de longitud completa.

20 Se sabe que las translocaciones de genes que producen proteínas de fusión de cinasas con una actividad de señalización aberrante pueden dar lugar directamente a ciertos cánceres (véase, por ejemplo, Mitelman et al., *Nature Reviews Cancer* 7: 233-245, 2007, Futreal et al., *Nat Rev Cancer* 4(3): 177-183 (2004), y Falini et al., *Blood* 99(2): 409-426 (2002). Por ejemplo, se ha demostrado que la oncoproteína BCR-ABL, una proteína de fusión de tirosina cinasa, es el agente causante y dirige la leucemia mieloide crónica humana (LMC). La oncoproteína BCR-ABL, que se encuentra en al menos 90-95% de los casos de CML, se genera por la translocación de secuencias
25 génicas de la proteína tirosina cinasa c-ABL en el cromosoma 9 a la secuencias BCR en el cromosoma 22, lo cual produce el denominado cromosoma Filadelfia. Véase, por ejemplo, Kurzock et al., *N. Engl. J. Med.*, 319: 990-998 (1988). También se observa la translocación en casos de leucemia linfocítica aguda (LLA) y leucemia mieloide aguda (LMA). Estos descubrimientos estimularon la aprobación por la FDA del mesilato de imatinib (comercializado bajo la marca Gleevec® por Novartis) y dasatinig (comercializado por Bristol-Myers Squibb bajo la marca comercial Sprycel®), inhibidores de molécula pequeña de la ABL cinasa, para el tratamiento de la LMC y la LLA. Estos fármacos son ejemplos de fármacos diseñados para interferir con las vías de señalización que dirigen el crecimiento de las células tumorales. El desarrollo de estos fármacos representa un avance significativo frente a las terapias convencionales para la LMC y la LLA, la quimioterapia y la radiación, que están plagadas de efectos secundarios muy conocidos y a menudo tienen un efecto limitado, puesto que no están dirigidas específicamente a las causas
35 subyacentes del cáncer.

Por consiguiente, sería útil la identificación de proteínas que dirigen los cánceres con el fin de detectar los cánceres en una etapa temprana, cuando son más propensos a responder al tratamiento. Además, la identificación de dichas proteínas permitirá, entre otras cosas, deseablemente posibilitar nuevos métodos para seleccionar pacientes para
40 las terapias dirigidas, así como la selección y el desarrollo de nuevos fármacos que inhiban dichas proteínas y, por tanto, para tratar el cáncer.

El papel oncogénico de los las tirosina cinasas receptoras (RTK) se ha vinculado con muchos tipos de tumores sólidos, incluyendo el cáncer de pulmón. El cáncer de pulmón, que tiene varios subtipos, entre los que se incluyen el
45 cáncer de pulmón no microcítico y el cáncer de pulmón microcítico, es la causa más frecuente de muerte por cáncer tanto en hombres como en mujeres de todo el mundo. Según el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos, aproximadamente uno de cada 14 hombres y mujeres en los Estados Unidos será diagnosticado de cáncer de pulmón en algún momento de su vida. Dos formas particularmente mortales de cáncer de pulmón son el carcinoma de pulmón microcítico (SCLC) y el carcinoma de pulmón no microcítico.

50 Desafortunadamente, a menudo el cáncer de pulmón no se diagnostica en una etapa temprana y a menudo no responde completamente a la cirugía, incluso cuando se combina con quimioterapia o radioterapia. Por ejemplo, el NSCLC es la principal causa de muerte por cáncer en los Estados Unidos, y supone aproximadamente el 87 % de todos los cánceres de pulmón. Se producen aproximadamente 151.000 nuevos casos de NSCLC en los Estados Unidos al año, y se calcula que más de 120.000 pacientes morirán al año por la enfermedad solo en los Estados Unidos. Véase "Cancer Facts and Figures 2005," American Cancer Society. El NSCLC, que comprende tres subtipos diferenciados, a menudo solo se detecta después de que haya metastatizado y por lo tanto la tasa de mortalidad es del 75 % a los dos años del diagnóstico.

60 Acquaviva, Wong y Charest, *Biochimica et Biophysica Acta* 1795(1):37-52 2009 revisaron los diversos papeles de la tirosina cinasa receptora del protooncogén ROS en el desarrollo y el cáncer y observaron que ROS y sus variantes oncogénicas constituyen dianas clínicamente relevantes para la intervención terapéutica del cáncer. Una de las muchas mutaciones ROS revisadas es un transcrito aberrante de c-ROS en el glioblastoma, resultante de una delección intracromosómica que fusiona c-ROS con FIG (fusionado en el glioblastoma). Se observa que la fusión FIG-ROS es un potente oncogén. La revisión también se refiere a un estudio a gran escala de la actividad tirosina cinasa en el cáncer de pulmón, que descubrió dos nuevas proteínas de fusión ROS asociadas con el NSCLC, en el que la
65

ROS se activó por reordenamientos genéticos que dan lugar a proteínas de fusión.

Por lo tanto, sería útil descubrir nuevas formas de identificar el cáncer de pulmón en una etapa temprana y nuevas formas (y nuevos reactivos) para tratar el cáncer de pulmón.

5

Sumario de la invención

La invención es tal como se reivindica en las reivindicaciones 1-14. La invención se basa en el descubrimiento de expresión y/o actividad aberrante de ROS en el cáncer, particularmente en el cáncer de pulmón. La expresión aberrante de ROS en el cáncer de pulmón de mamíferos puede deberse, por ejemplo, a la expresión de ROS cinasa de longitud completa en el cáncer de pulmón de mamíferos, ya que el tejido pulmonar sano y normal y las células no expresan la proteína ROS cinasa o la actividad ROS cinasa. La expresión aberrante de ROS en el cáncer de pulmón de mamíferos también puede deberse a la presencia de ROS truncada (por ejemplo, que comprende una parte de ROS cinasa que incluye el dominio cinasa) o una de las proteínas de fusión de ROS descritas en la presente memoria. Toda la expresión revelada de ROS en el cáncer de pulmón da como resultado la expresión del dominio ROS cinasa; por lo tanto, todos los polipéptidos de fusión de ROS divulgados tienen actividad ROS cinasa activa.

10

15

De acuerdo con esto, en un primer aspecto, la invención proporciona un método para detectar la presencia de un polipéptido con actividad ROS cinasa en una muestra biológica obtenida de un cáncer de pulmón de mamífero o un posible cáncer de pulmón de mamífero. El método incluye la utilización de al menos un reactivo que se une específicamente a dicho polipéptido con actividad de ROS cinasa para determinar si dicho polipéptido está presente en dicha muestra biológica, en donde la detección de la unión específica de dicho reactivo a dicha muestra biológica indica que dicho polipéptido está presente en dicho material biológico, y en donde el polipéptido es un polipéptido de fusión FIG-ROS.

20

25

En otra realización, el reactivo es un anticuerpo. En algunas realizaciones, el reactivo (por ejemplo, el anticuerpo) está marcado de forma detectable. El reactivo se une específicamente al polipéptido de fusión FIG-ROS (por ejemplo, se une específicamente a un polipéptido FIG-ROS (L), a un polipéptido FIG-ROS (S), o a un polipéptido FIG-ROS (VL)).

30

Un polipéptido de fusión FIG-ROS puede seleccionarse del grupo que consiste en un polipéptido FIG-ROS (L), un polipéptido FIGOS (S) y un polipéptido FIG-ROS (VL). El polipéptido puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 56 o SEQ ID NO: 60.

35

En algunas realizaciones, el método se pone en práctica en un formato seleccionado del grupo que consiste en un ensayo de citometría de flujo, un ensayo de cinasa in vitro, un ensayo de inmunohistoquímica (IHC), un ensayo de inmunofluorescencia (IF), un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), y un ensayo de análisis por transferencia de Western.

40

En una realización, se detecta la actividad cinasa de dicho polipéptido. En otra realización, el reactivo es un péptido marcado con isótopo pesado (AQUA). En otra realización, el péptido marcado con isótopo pesado (AQUA) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una unión de fusión de un polipéptido de fusión de ROS. En otra realización, el método se implementa usando análisis de espectrometría de masas.

45

En otro aspecto, la invención proporciona un método para detectar la presencia de polinucleótidos que codifican para un polipéptido con actividad ROS cinasa en una muestra biológica obtenida de un cáncer de pulmón de mamífero o un posible cáncer de pulmón de mamífero en donde el polinucleótido codifica un polipéptido de fusión FIG-ROS. El método incluye la utilización de un reactivo que se une específicamente a dicho polinucleótido que codifica dicho polipéptido con actividad de ROS cinasa 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 ROS cinasa está presente en dicha muestra biológica.

50

En algunas realizaciones, el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 55, 57 y 59.

55

En algunas realizaciones, el reactivo es una sonda de ácido nucleico. En algunas realizaciones, el reactivo está marcado de forma detectable. En otra realización, la sonda de ácido nucleico es una sonda de hibridación in situ de fluorescencia (FISH) y dicho método se implementa en un ensayo FISH. En otra realización, la sonda de ácido nucleico es una sonda de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y dicho método se implementa en un ensayo de PCR. Una realización adicional, el reactivo está marcado de forma detectable.

60

El polipéptido de fusión FIG-ROS puede seleccionarse del grupo que consiste en un polipéptido FIG-ROS (L), un polipéptido FIGOS (S) y un polipéptido FIG-ROS (VL). El polipéptido puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 56 o SEQ ID NO: 60.

65

En diversas realizaciones de los métodos de la invención, el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón humano (carcinoma de pulmón no microcítico). En una realización adicional, la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en una biopsia pulmonar, un lavado broncoalveolar, una resección tumoral, un aspirado con aguja fina, un efusión pleural y una célula tumoral circulante.

5 En diversas realizaciones de los métodos de la invención, el cáncer de pulmón de mamífero o el posible cáncer de pulmón de mamífero es un carcinoma de pulmón no microcítico. En diversas realizaciones, el cáncer de pulmón de mamífero o el posible cáncer de pulmón de mamífero es de un ser humano.

10 En diversas realizaciones de los métodos de la invención, la muestra biológica se diagnostica como de un cáncer de pulmón de mamífero o un posible cáncer de pulmón de mamífero dirigido por la actividad de ROS cinasa. En algunas realizaciones, el cáncer de pulmón de mamífero o el posible cáncer de pulmón de mamífero es probable que responda a un agente terapéutico inhibidor de ROS. En diversas realizaciones, se diagnostica que el paciente del que se obtiene dicha muestra biológica, en la que el reactivo se une específicamente a la muestra biológica, tiene un cáncer de pulmón de mamífero o un posible cáncer de pulmón de mamífero dirigido por la actividad de ROS cinasa. En algunas realizaciones, se diagnostica que es probable que el paciente responda a un agente terapéutico inhibidor de ROS. Un ejemplo no limitante de un agente terapéutico inhibidor de ROS es crizotinib (también conocido como PF-02341066). Los ejemplos adicionales no limitantes de terapéuticos inhibidores de ROS incluyen NVT TAE-684, AP26113, CEP-14083, CEP-14513, CH5424802, CEP11988, WHI-P131 y WHI-P154.

20 En diversas realizaciones, el cáncer de pulmón o posible cáncer de pulmón es de un ser humano. En algunas realizaciones, la expresión y/o la actividad del polipéptido o el polinucleótido se inhibe mediante un agente terapéutico inhibidor de ROS seleccionado del grupo que consiste en PF-02341066, NYT TAE-684, AP26113, CEP-14083, CEP-14513, CEP11988, CH5424802, WHI-P131 y WHI-P154.

25 También se describe un método para identificar a un paciente con cáncer de pulmón o con sospecha de tener cáncer de pulmón como un paciente susceptible de responder a un agente terapéutico inhibidor de ROS, que comprende: poner en contacto una muestra biológica de un pulmón de dicho paciente con un reactivo que se une específicamente a un polipéptido que tiene actividad ROS cinasa, detectar si el reactivo se une específicamente a la muestra biológica, en donde la detección de la unión del reactivo a la muestra biológica identifica al paciente como un paciente que probablemente responda a un agente terapéutico inhibidor de ROS.

30 En diversas realizaciones de todo el aspecto de la invención, el paciente es un paciente humano y el cáncer de pulmón (o posible cáncer de pulmón) es de un ser humano. El cáncer de pulmón es NSCLC. En algunas realizaciones, el agente terapéutico inhibidor de ROS o el agente terapéutico inhibidor de ALK es PF-02341066, NVT TAE-684 o AP26113. En algunas realizaciones, el agente terapéutico inhibidor de ROS o el agente terapéutico inhibidor de ALK es AP26113, CEP-14083, CEP-14513, CEP11988, CH5424802, WHI-P131 y WHI-P154.

40 En diversas realizaciones, la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en una biopsia pulmonar, un lavado broncoalveolar, una célula tumoral circulante, una resección tumoral, un aspirado con aguja fina y un efusión pleural.

45 También se describe un método para determinar si un compuesto inhibe la progresión de un cáncer de pulmón de mamífero o de un posible cáncer de pulmón caracterizado por la expresión de un polipéptido con actividad ROS, comprendiendo dicho método la etapa de determinar si dicho compuesto inhibe la expresión de dicho polipéptido en dicho cáncer. También se describe un método para inhibir la progresión de un cáncer de mamífero o posible cáncer de mamífero caracterizado por la expresión de un polipéptido con actividad ROS, comprendiendo dicho método la etapa de inhibir la expresión y/o actividad de dicho polipéptido en dicho cáncer de pulmón de mamífero o posible cáncer de pulmón de mamífero. En algunas realizaciones, el cáncer es de un ser humano.

50 Breve descripción de los dibujos

Fig. 1 - es un análisis de transferencia de Western de extractos de la línea celular de NSCLC humano (HCC78) que muestra la expresión de una forma de ROS que tiene un peso molecular mucho más bajo que la ROS de longitud completa /de tipo silvestre.

Fig. 2 - muestra la inhibición del ARNip de ROS cinasa mutante en líneas celulares de NSCLC humano: El panel A muestra una gráfica de la inhibición celular después de la transfección de ARNip, el panel B es una inmunotransferencia que muestra un inactivación específica de ROS y un incremento de la apoptosis (en la línea celular dirigida por ROS mutada) y el Panel C es una inmunotransferencia que muestra una actividad disminuida de las moléculas de señalización aguas abajo de ROS.

60 Figs. 3A-3B - muestra la localización del gen SLC34A2 y el gen ROS sobre los cromosomas 4p y 6q, respectivamente (Fig. 3A) y las localizaciones del dominio de las proteínas SLC34A2 y ROS de longitud completa (Fig. 3B).

Fig. 3C - es un diagrama esquemático que muestra la variante de SCL34A2-ROS larga, en la que los exones 1-4 de SCL34A2 se combinan con los exones 32-43 de ROS. La unión de fusión se produce en el resto 1750 cadena arriba del dominio transmembrana de ROS, y los restos de nucleótidos y de aminoácidos (SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13, respectivamente) que flanquean la unión de fusión se muestran en la parte inferior de la Fig. 3C (con los restos de nucleótidos y de aminoácidos de SCL34A2 en fuente regular y los restos de nucleótidos y de aminoácidos de ROS en texto en negrita).

Fig. 3D - es un diagrama esquemático que muestra la variante de SCL34A2-ROS corta en la que los exones 1-4 de SCL34A2 se combinan con los exones 32-43 de ROS. La unión de fusión se produce en el resto 1853 justo cadena arriba del dominio transmembrana de ROS, y los restos de nucleótidos y de aminoácidos (SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15, respectivamente) que flanquean la unión de fusión se muestran en la parte inferior de la Fig. 3D (con los restos de nucleótidos y de aminoácidos de SCL34A2 en fuente regular y los restos de nucleótidos y de aminoácidos de ROS en texto en negrita).

Fig. 3E - es un diagrama esquemático que muestra la variante de SCL34A2-ROS predicha muy corta en la que los exones 1-4 de SCL34A2 se combinan con los exones 35-43 de ROS. Se predice que la zona de unión de la fusión aparece en el resto 1882 de ROS, en el extremo N-terminal del dominio transmembrana de ROS, y los restos de nucleótidos y de aminoácidos (SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17, respectivamente) que flanquean la unión de fusión se muestran en la parte inferior de la Fig. 3E (con los restos de nucleótidos y de aminoácidos de SCL34A2 en fuente regular y los restos de nucleótidos y de aminoácidos de ROS en texto en negrita).

Fig. 4A - es la secuencia de aminoácidos (código de 1 letra) de la variante larga de la proteína de fusión de SCL34A2-ROS humana (SEQ ID NO: 5) (panel superior), indicándose también la secuencia de ADN (SEQ ID NO: 6) (panel inferior); los residuos del resto SCL34A2 se indican en cursiva, mientras que los residuos del dominio cinasa de ROS se indican en negrita.

Fig. 4B - es la secuencia de aminoácidos (código de 1 letra) de la variante corta de la proteína de fusión de SCL34A2-ROS humana (SEQ ID NO: 7) (panel superior), indicándose también la secuencia de ADN codificante (SEQ ID NO: 8) (panel inferior); los residuos del resto SCL34A2 se indican en cursiva, mientras que los residuos del dominio cinasa de ROS se indican en negrita.

Fig. 5 - es la secuencia de aminoácidos (código de una letra) de la proteína SCL34A2 humana (SEQ ID NO: 3) (n.º de registro de SwissProt 095436) (panel superior), indicándose también la secuencia de ADN codificante (SEQ ID NO: 4) (n.º de registro de GeneBank NM_006424) (panel inferior); los restos implicados en la translocación están subrayados.

Fig. 6A - es la secuencia de aminoácidos (código de 1 letra) de la ROS cinasa humana (SEQ ID NO: 1) (n.º de registro de SwissProt P08922); los restos implicados en la translocación de la variante (larga) de SCL34A2-ROS están subrayados, los restos en negrita subrayados son los implicados en las translocaciones de la variante (corta) y los restos rojos, en negrita y subrayados son los implicados en la translocación de la variante predicha (muy corta).

Fig. 6B - es la secuencia de ADN codificante de la ROS cinasa humana (SEQ ID NO: 2) (n.º de registro de GeneBank NM_002944); los restos implicados en la primera translocación de la variante (larga) de SCL34A2-ROS están subrayados, los restos en negrita subrayados son los implicados en la segunda translocación de la variante (corta) y los restos en mayúscula, en negrita y subrayados son los implicados en la translocación de la variante (muy corta).

Fig. 7 - es un gel que muestra la expresión de la proteína de fusión SCL34A2-ROS (primera variante (larga)) en células 293 (riñón embrionario humano) transfectadas, comparada con los controles (carriles 1 y 2).

Fig. 8 - muestra la localización del gen CD74 y del gen ROS en los cromosomas 5q y 6q, respectivamente (panel A), y las localizaciones del dominio de las proteínas de CD74 y ROS de longitud completa, así como las de la proteína de fusión CD74-ROS (paneles B y C (con la SEQ ID NO: 30 mostrada debajo del panel C)). La unión de fusión se produce en el resto 1853 cadena arriba del dominio transmembrana de ROS.

Fig. 9 - es la secuencia de aminoácidos (código de 1 letra) de la proteína de fusión de CD74-ROS humana (SEQ ID NO: 22) (panel superior), indicándose también la secuencia de ADN codificante (SEQ ID NO: 23) (panel inferior); los restos del resto CD74 se indican subrayados, mientras que los restos del dominio cinasa de ROS se indican en negrita.

Fig. 10 - es la secuencia de aminoácidos (código de 1 letra) de la proteína CD74 humana (SEQ ID NO: 24) (n.º de registro de SwissProt P04233) (panel superior), indicándose también la secuencia de ADN codificante (SEQ ID NO: 25) (n.º de registro de GeneBank NM_001025159) (panel inferior); los restos implicados en la translocación están subrayados.

Fig. 11A - es la secuencia de aminoácidos (código de 1 letra) de la ROS cinasa humana (SEQ ID NO: 1) (n.º de registro de SwissProt P08922); los restos implicados en la translocación CD74-ROS están subrayados.

Fig. 11B - es la secuencia de ADN codificante de la ROS cinasa humana (SEQ ID NO: 2) (n.º de registro de GeneBank NM_002944); los restos implicados en la translocación CD74-ROS están subrayados.

Fig. 12 - es el gel que muestra la detección del gen de fusión formado por la translocación de CD74 y ROS mediante RT-PCR; mostrándose las secuencias de los cebadores para CD74-F1 (arriba) y ROS-GSP3 (abajo) (SEQ ID NO: 26 y 27, respectivamente).

Figs. 13A-13F - son fotografías que muestran inmunohistoquímica y FISH de la proteína ROS y el ácido nucleico de ROS en tejidos tumorales FFPE de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC). La variación en la localización de la proteína ROS se muestra como sigue: (A) citoplásmica difusa con flechas amarillas en el recuadro (A) que ilustra la translocación equilibrada del locus *c-ros* mediante FISH. (B) Localización punteada fuerte de ROS en adenocarcinoma con amplificación (es decir, imagen ampliada) en el recuadro. (C) Localización citoplasmática de la tinción de ROS en el carcinoma de células grandes y la correspondiente tinción de hematoxilina y eosina en el panel E. (D) Adenocarcinoma con tinción de citoplasma único y localización en la membrana con amplificación en el recuadro que muestra la tinción de la membrana. (E) Tinción con hematoxilina y eosina correspondiente a la tinción de ROS en el panel C. (F) Tinción vesicular punteada con amplificación en el recuadro que muestra tinción de las vesículas.

Fig. 14A y B - Es una imagen que muestra la detección específica de la translocación/fusión de ROS (en una línea celular de NSCLC humana) mediante FISH empleando una sonda de de ruptura de dos colores. La Figura 14A muestra las localizaciones en el gen ROS en las que las sondas FISH hibridan, y la Fig. 14B muestra la reordenación del gen ROS en una línea celular de NSCLC humano (izquierda) y un tumor de NSCLC humano, dando como resultado señales separadas de color naranja y verde.

Fig. 15 es un diagrama esquemático que muestra donde hibridan las sondas de ADN de los dos conjuntos de sondas con el gen ROS y el gen FIG. La sonda proximal de ambos conjuntos de sondas, a saber, RP1-179P9, dará una señal naranja, mientras que las tres sondas distales darán una señal verde. El conjunto de sondas 1 derivó de *c-ros* y si se produce una translocación equilibrada, la naranja se separará de la verde; sin embargo si se produce una translocación FIG-ROS, la señal verde desaparecerá. El conjunto de sondas 2 derivó de *c-ros* (RP1-179P9 naranja) y fig (RP11-213A17 verde).

Las Figuras 16A-16F son fotografías que muestran los resultados del análisis FISH de células HCC78 (paneles A y B), células U118MG (paneles C y D) e ID 749 del tumor FFPE (paneles E y F). Las células HCC78 sondadas con el conjunto de sondas 1 (A) y el conjunto de sondas 2 (B) muestran los resultados esperados de la fusión SLC34A2-ROS presente en estas células. Las flechas amarillas apuntan a señales de división indicativas de translocación equilibrada en células HCC78 y las flechas blancas apuntan al cromosoma intacto. Las células U118MG sondadas con el conjunto de sondas 1 (C) y el conjunto de sondas 2 (D) muestran los resultados esperados de la fusión SLC34A2-ROS presente en estas células. El tumor FFPE 749 sondado con el conjunto de sondas 1 (E) y el conjunto de sondas 2 (F) es idéntico a las células U118MG. Tanto en U-118 MG como en el Tumor ID 749 sondado con el conjunto de sondas 1, solo hibrida la sonda *c-ros* (naranja) y la región delecionada (sonda verde) no está presente (paneles C y E, respectivamente). En U-118 MG y el Tumor ID 749 sondados con el conjunto de sondas 2 (paneles E y F, respectivamente), las sondas *c-ros* (naranja) y fig (verde) se juntan, indicando una fusión fig-ros.

La Figura 17 muestra los resultados de la secuenciación de ADNc de la proteína de fusión ROS del tumor 749 (en la línea "sujeto") y su alineación con la secuencia de nucleótidos de FIG-ROS (S) (como "consulta").

La Fig. 18 es un gráfico lineal que muestra la respuesta de crecimiento celular en presencia de TAF-684 de 0nM, 3nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM o 1000 nM de BaF3 que expresan FIG-ROS (S) (cuadrados rojos), BaF3 que expresan FIG-ROS (L) (rombos azules), BaF3 que expresan FLT3ITD (triángulos verdes) y células Karpas 299 (Xs púrpura).

La Fig. 19 es un gráfico de barras que muestra que BaF3 que expresa FIG-ROS (S) o FIG-ROS (L) mueren por apoptosis en presencia de TAE-684.

Fig. 20 Es una representación de un análisis de transferencia de Western que muestra que la fosforilación tanto de FIG-ROS (S) como de FIG-ROS (L), así como sus moléculas de señalización aguas abajo, son inhibidas por TAE-684.

Las Figs. 21A y 21B son gráficos lineales que muestran la respuesta de crecimiento celular en presencia de TAE-684 (Figura 21A) o crizotinib (Figura 21B) a 0 μ M, 0,01 μ M, 0,03 M, 0,10 μ M, 0,3 μ M, 1,0 μ M de células BaF3 transducidas con neo -myc (control negativo; rombos azules); BaF3 que expresa FIG-ROS(S) (X moradas), BaF3 que expresa FIG-ROS(L) (triángulos verdes), BaF3 que expresa FLT3ITD (cuadrados rojos), y células Karpas

299 (asteriscos azules).

La Fig. 22 es una representación de un análisis de transferencia de Western que muestra que la fosforilación tanto de FIG-ROS (S) como de FIG-ROS (L), así como de ALK y moléculas de señalización adicionales, se inhibe por crizotinib.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La invención se basa en el descubrimiento de la expresión aberrante de ROS en el cáncer de pulmón humano. Dado que la ROS cinasa no se expresa en tejido o células pulmonares normales, se espera que la actividad aberrante de ROS cinasa impulse la proliferación y supervivencia del cáncer de pulmón en el que se expresa. Dichos cánceres pueden identificarse (por ejemplo, diagnosticarse) y/o tratarse de acuerdo con las enseñanzas proporcionadas en la presente memoria.

Basándose en estos descubrimientos, un paciente cuyo cáncer de pulmón (o posible cáncer de pulmón) expresa una proteína con actividad ROS (por ejemplo, proteína ROS de longitud completa o una proteína de fusión de ROS), donde el tejido pulmonar de pacientes sanos no expresa dichas proteínas con actividad ROS puede responder favorablemente a la administración de un inhibidor de ROS (por ejemplo, el crecimiento del cáncer puede retardarse o detenerse en comparación con un paciente no tratado que padece el mismo cáncer).

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

Todos los términos y expresiones técnicas y científicas empleadas en la presente memoria tienen el mismo significado que el que entienden habitualmente los expertos en la técnica a la cual pertenece la presente invención, a menos que se indique lo contrario. En la presente memoria se hace referencia a diversas metodologías y materiales conocidos por los expertos en la técnica. Los trabajos de referencia estándar que exponen los principios generales de la tecnología de anticuerpos y 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, N.Y. (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., Eds., *Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology in Medicine*, CRC Press, Boca Raton (1995); McPherson, Ed., *Directed Mutagenesis: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford (1991). Los trabajos de referencia convencionales que ofrecen los principios generales de farmacología incluyen Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11ª ed., McGraw Hill Companies Inc., Nueva York (2006).

En un primer aspecto, la invención proporciona un método para detectar la presencia de un polipéptido con actividad ROS cinasa en una muestra biológica de un cáncer de pulmón de mamífero o un posible cáncer de pulmón de mamífero. El método incluye la utilización de al menos un reactivo que se une específicamente a dicho polipéptido con actividad de ROS cinasa para determinar si dicho polipéptido está presente en dicha muestra biológica, en donde la detección de la unión específica de dicho reactivo a dicha muestra biológica indica que dicho polipéptido está presente en dicho material biológico, y en donde el polipéptido es un polipéptido de fusión FIG-ROS.

La proteína ROS cinasa humana (codificada por el gen ROS1) es una tirosina cinasa receptora de 2347 aminoácidos de longitud que es propensa a la expresión aberrante que da lugar al cáncer. Se puede encontrar una descripción de la ROS cinasa humana de longitud completa (con la secuencia de aminoácidos de la proteína ROS humana) en el n.º de referencia de UniProt P08922. Como se muestra en la Tabla 1, los dominios de péptido de señal, extracelular, transmembrana y de cinasa de ROS se encuentran en los siguientes restos de aminoácidos en la SEQ ID NO: 1:

Tabla 1

Dominio	Restos de aminoácido en la SEQ ID NO: 1
Péptido de señal	1-27
Dominio extracelular	28-1859
Dominio transmembrana	1860-1882
Dominio de cinasa	1945-2222

Adicionalmente, existen múltiples variantes conocidas de origen natural de ROS (véase, por ejemplo, Greenman et al., Nature 446: 153-158, 2007). Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de ROS de longitud completa murina son conocidas (véase, por ejemplo, el n.º de referencia de UniProt Q78DX7). Usando una experimentación rutinaria, el biólogo experto en la materia sería fácilmente capaz de determinar las secuencias correspondientes en los homólogos de ROS de mamíferos no humanos.

Por ROS “de tipo silvestre” se entiende la expresión y/o activación de la ROS cinasa de longitud completa (es decir, para la ROS humana, el polipéptido de 2347 aminoácidos de longitud o el polipéptido de 2320 aminoácidos de longitud después de la eliminación de la secuencia del péptido de señal) en tejido sano (o normal) (por ejemplo, tejido no canceroso) de un individuo normal (por ejemplo, un individuo normal que no padece cáncer). La ROS cinasa (de longitud completa o troncada) no parece expresarse en tejido pulmonar normal en seres humanos (por ejemplo, véase más adelante en los Ejemplos). Sin embargo, usando los métodos descritos en los Ejemplos siguientes, los inventores han hecho el sorprendente descubrimiento de la expresión de ROS cinasa en el cáncer de pulmón. Dicha expresión en una célula atípica (en este caso una célula cancerosa) donde no se ve expresión en una célula típica (por ejemplo, una célula pulmonar no cancerosa) es aberrante.

En el glioblastoma se ha descrito una ROS cinasa expresada aberrantemente, en forma de fusión con otra proteína, a saber FIG, (véase Charest et al., 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 PCT n.º WO2010/093928).

Como se usa en la presente memoria, el término “fusión de ROS” se refiere a una porción del polipéptido de ROS que comprende el dominio cinasa de la proteína ROS (o polinucleótido que codifica la misma) fusionado a la totalidad o a una porción de otro polipéptido (o polinucleótido que codifica el mismo), donde el nombre de ese segundo polipéptido o polinucleótido se denomina en la fusión. (El término “fusión” significa simplemente la totalidad o una porción de un polipéptido o polinucleótido del primer gen fusionado a la totalidad o a una porción de un polipéptido o un polinucleótido de un segundo gen). Por ejemplo, una fusión SLC34A2-ROS es una fusión entre una porción del polipéptido SLC34A2 (o polinucleótido que codifica el mismo) y una porción del polipéptido ROS (o polinucleótido que codifica el mismo) que comprende el dominio cinasa de ROS. Una fusión de ROS a menudo es el resultado de una translocación o inversión cromosómica. Existen numerosas fusiones de ROS conocidas, todas las cuales son fusiones de ROS de la invención e incluyen, sin limitación, las proteínas de fusión FIG-ROS cuyos miembros incluyen FIG-ROS (S), FIG-ROS (L) y FIG-ROS (XL) (véase la publicación PCT n.º WO2010/093928).

Todas las proteínas de fusión ROS conocidas comprenden el dominio cinasa completo de ROS de longitud completa. Por lo tanto, tal como se utiliza en la presente memoria, por “polipéptido con actividad ROS cinasa” (o “polipéptido que tiene actividad ROS cinasa”) se entiende una proteína (o polipéptido) que incluye el dominio cinasa completo de la proteína ROS de longitud completa y, por tanto, retiene la actividad ROS cinasa. Los ejemplos no limitantes de proteínas con actividad ROS cinasa incluyen, sin limitación, la proteína ROS de longitud completa, las proteínas de fusión SLC34A2-ROS, cuyos miembros incluyen SLC34A2-ROS (VS), SLC34A2-ROS (S), SLC34A2-ROS (L) (véase la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20100143918), CD74-ROS (véase la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20100221737) y las proteínas de fusión FIG-ROS cuyos miembros incluyen FIG-ROS (S), FIG-ROS (L) y FIG-ROS (XL) (véase la publicación PCT n.º WO2010/093928), y cualquier forma troncada o mutada de ROS cinasa que retiene el dominio cinasa de la proteína ROS cinasa de longitud completa. Ya que el dominio cinasa de ROS se expone en la SEQ ID NO: 61, un “polipéptido con actividad de ROS cinasa” es aquel cuya secuencia de aminoácidos comprende la SEQ ID NO: 61.

Tal como se usa en la presente memoria, por “polipéptido” (o “secuencia de aminoácidos” o “proteína”) se hace referencia a un polímero formado a partir de la unión, en un orden definido, preferiblemente de α -aminoácidos, D, L-aminoácidos combinaciones de los mismos. El enlace entre un resto de aminoácido y el siguiente se refiere a un enlace amida o a un enlace peptídico. Los ejemplos no limitantes de polipéptidos incluyen una secuencia de oligopéptido, péptido, polipéptido o proteína, y fragmentos o porciones de los mismos, y a moléculas naturales o sintéticas. Los polipéptidos también incluyen moléculas derivatizadas, tales como glicoproteínas y lipoproteínas, así como polipéptidos de menor peso molecular. “Secuencia de aminoácidos” y términos similares, tales como “polipéptido” o “proteína”, no pretenden limitar la secuencia de aminoácidos indicada a la secuencia de aminoácidos

nativa completa, asociada con la molécula de proteína mencionada.

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

De este modo, un polipéptido con actividad ROS incluye además variantes de la proteína ROS de longitud completa o de los diversos polipéptidos de fusión de ROS descritos en la presente memoria que muestra una actividad sustancial de ROS cinasa. Algunas sustituciones conservadoras no limitantes incluyen el intercambio, uno por otro, entre los aminoácidos alifáticos Ala, Val, Leu y He; intercambio de los restos hidroxilo Ser y Thr; intercambio de los restos ácidos Asp y Glu; intercambio de los restos amida Asn y Gln; intercambio de los restos básicos Lys y Arg; y el intercambio de los restos aromáticos Phe y Tyr. Los ejemplos adicionales de sustituciones conservadoras de aminoácidos conocidas por los expertos en la técnica son: Aromáticos: fenilalanina triptófano tirosina (por ejemplo, un resto de triptófano se reemplaza por una fenilalanina); Hidrófobos: leucina isoleucina valina; Polares: glutamina asparaginas; Básicos: arginina lisina histidina; Ácidos: ácido aspártico ácido glutámico; Pequeños: alanina serina treonina metionina glicina. Tal como se indicó en detalle anteriormente, pueden encontrarse más indicaciones acerca de cuáles son los cambios en los aminoácidos que es probable que sean fenotípicamente silenciosos (es decir, no es probable que tengan un efecto perjudicial sobre una función) en Bowie et al., Science 247, *anteriormente citado*.

En algunas realizaciones, una variante puede tener cambios “no conservadores”, por ejemplo, sustitución de una glicina por un triptófano. Variantes similares pueden incluir también deleciones o inserciones de aminoácidos, o ambas. Pueden encontrarse indicaciones para determinar qué resto de aminoácido puede sustituirse, insertarse o eliminarse sin abolir la actividad biológica o inmunológica empleando programas informáticos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, el software DNASTAR.

Los polipéptidos que tienen actividad de ROS cinasa incluyen la proteína ROS humana de longitud completa (que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1) y los polipéptidos de fusión de ROS que tienen las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 5, 7, 22, 28, 56, 58 y 60 (incluyan o no una secuencia líder), una secuencia de aminoácidos que codifica un polipéptido que comprende al menos seis aminoácidos contiguos que abarcan la unión de fusión (es decir, las secuencias en la unión entre la proteína asociada no ROS y la proteína ROS; véase la Tabla 2, así como polipéptidos que tienen al menos un 90 % de similitud, más preferiblemente al menos 95 % de similitud y aún más preferiblemente al menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de similitud con los descritos anteriormente.

Los reactivos específicos de ROS de longitud completa y los reactivos específicos de polipéptido de fusión de ROS (tales como anticuerpos policlonales y monoclonales) que son útiles en ensayos para detectar la expresión de polipéptido ROS o la actividad de ROS cinasa como se describe a continuación o como agentes terapéuticos inhibidores de ROS capaces de inhibir la función / actividad de la proteína ROS. Además, estos polipéptidos pueden emplearse en el sistema de dos híbridos de levaduras para “capturar” una proteína ROS o proteínas de unión a la proteína de fusión de ROS, que también son candidatos a agentes terapéuticos inhibidores de ROS dados a conocer en el presente documento. El sistema de dos híbridos de levaduras se describe en Fields y Song, Nature, 340: 245-246 (1989).

En algunas realizaciones, el reactivo puede comprender además un marcador detectable (por ejemplo, un marcador fluorescente o un marcador infrarrojo). Un “marcador detectable”, con respecto a un polipéptido, un polinucleótido o un reactivo (por ejemplo, anticuerpo o sonda de FISH) divulgado en la presente memoria, significa una modificación química, biológica u otra modificación de o en el polipéptido, que incluye, sin limitaciones, modificaciones de fluorescencia (por ejemplo, FITC, ficoeritrina), infrarrojos, masa (por ejemplo, marcador isobárico), restos, colorantes (colorante cromofórico), radioisótopos (por ejemplo, ³²P), marcadores o marcajes (marcaje myc o marcaje GST), etc., mediante el cual puede detectarse la presencia de la molécula de interés. Por lo tanto, dicho polipéptido, polinucleótido o reactivo se denomina, “marcado de forma detectable”. El marcador detectable puede estar unido al polipéptido, polinucleótido o agente de unión mediante un enlace covalente (por ejemplo, enlace peptídico o fosfodiéster) o enlace químico no covalente (por ejemplo, un enlace iónico).

Los reactivos útiles en los métodos de la invención incluyen, entre otros, reactivos tales como anticuerpos o péptidos AQUA o fracciones de unión de los mismos, que se unen específicamente a la proteína ROS de longitud completa o a una de las muchas proteínas de fusión ROS expresadas en cáncer de pulmón. Por “unión específica” o “se une específicamente” se entiende que un reactivo o agente de unión de la invención (por ejemplo, una sonda de ácido nucleico, un anticuerpo o péptido AQUA) interacciona con su molécula diana (polipéptido o polinucleótido FIG-ROS) donde la interacción depende de la presencia de una estructura particular (por ejemplo, el determinante antigénico o epítipo sobre el polipéptido o la secuencia de nucleótidos del polinucleótido); en otras palabras, el reactivo reconoce

y se une a una estructura de péptido o polinucleótido específica, en lugar de a todos los polipéptidos o polinucleótidos en general. . Por "fragmento de unión de los mismos " se entiende un fragmento o porción de un reactivo que se une específicamente a la molécula diana (por ejemplo, un fragmento Fab de un anticuerpo).

5 Un reactivo que se une específicamente a la molécula diana puede denominarse un reactivo específico de diana o un reactivo anti-diana. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido FIG-ROS (L) puede denominarse anticuerpo específico de FIG-ROS (L) o un anticuerpo anti-FIG-ROS (L). De un modo similar, una sonda de ácido nucleico que se une específicamente a un polinucleótido de FIG-ROS (L) puede denominarse sonda de ácido nucleico específica de FIG-ROS (L) o sonda de ácido nucleico anti-FIG-ROS (L).

10 En algunas realizaciones, donde la molécula diana es un polipéptido, un reactivo que se une específicamente a una molécula diana tiene una afinidad de unión (K_D) para su molécula diana (polipéptido de fusión FIG-ROS) de 1×10^{-6} M o menor. En algunas realizaciones, un reactivo de la invención que se une específicamente a una molécula diana tiene por su molécula diana una K_D de 1×10^{-7} M o menor, o una K_D de 1×10^{-8} M o menor, o una K_D de 1×10^{-9} M o menor, o una K_D de 1×10^{-10} M o menor, o una K_D de 1×10^{-11} M o menor, o una K_D de 1×10^{-12} M o menor. En ciertas realizaciones, la K_D de un reactivo de la invención que se une específicamente a una molécula diana es de 1 pM a 500 pM, o entre 500 pM y 1 μ M, o entre 1 μ M y 100 nM, o entre 100 mM y 10 nM por su molécula diana. Los ejemplos no limitantes de una molécula diana a la que se une específicamente un reactivo de la invención incluyen el polipéptido de fusión FIG-ROS (L), el polipéptido de fusión FIG-ROS (S), el polipéptido de fusión FIG-ROS (XL) y fragmentos de los mismos, particularmente los fragmentos que incluyen la unión entre la porción ROS y la porción de la segunda proteína (FIG) del polipéptido de fusión de ROS.

20 En algunas realizaciones, donde la molécula diana es un polinucleótido, un reactivo de la invención que se une específicamente a su molécula diana es un reactivo que hibrida en condiciones rigurosas con su polinucleótido diana. La expresión "condiciones rigurosas", con respecto a las condiciones de hibridación de secuencias o sondas, es la "rigurosidad" que se produce dentro de un intervalo desde aproximadamente T_m menos 5°C (es decir, 5 °C por debajo de la temperatura de fusión (T_m) del reactivo o la sonda de ácido nucleico) hasta aproximadamente 20°C a 25°C por debajo de la T_m . Las condiciones rigurosas típicas son: una incubación durante la noche a 42°C en una disolución que comprende: formamida al 50 %, 5 x SSC (NaCl 750 mM, citrato de trisodio 75 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5 x disolución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10 % y 20 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cizallado y desnaturalizado, seguido del lavado de los filtros en 0,1 X SSC a aproximadamente 65°C. Tal como entienden los expertos en la técnica, la rigurosidad de la hibridación puede alterarse para identificar o detectar secuencias polinucleotídicas idénticas o relacionadas. Por un "reactivo" (por ejemplo, un polinucleótido o una sonda nucleotídica) que hibrida en condiciones rigurosas con un polinucleótido diana, se entiende que el reactivo (por ejemplo, el polinucleótido o sonda nucleotídica (por ejemplo, ADN, ARN o un híbrido de ADN-ARN) hibrida a lo largo de toda la longitud del polinucleótido de referencia o hibrida con una porción del polinucleótido de referencia que tiene al menos aproximadamente 15 nucleótidos (nt) o al menos aproximadamente 20 nt o al menos aproximadamente 30 nt o aproximadamente 30- 70 nt del polinucleótido de referencia. Estas sondas de nucleótidos de la invención son útiles como sondas (por ejemplo, para FISFI) y cebadores (por ejemplo, para PGR) de diagnóstico como se discute en la presente memoria.

40 Los ejemplos no limitantes de una molécula diana a la que se une específicamente un reactivo de la invención incluyen el polipéptido de fusión FIG-ROS (S), por ejemplo, que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 58 (o el polinucleótido FIG-ROS (S)), el polipéptido de fusión FIG-ROS (L), por ejemplo, que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 56 (o el polinucleótido FIG-ROS (L)), el polipéptido de fusión FIG-ROS (VL), por ejemplo, que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60 (o el polinucleótido FIG-ROS(VL)), y fragmentos de los mismos, particularmente los fragmentos que incluyen la unión entre la porción ROS y la porción de la segunda proteína FIG del polipéptido de fusión de ROS (véase, por ejemplo, la Tabla 2).

50 Los reactivos útiles en la práctica de los métodos divulgados incluyen, entre otros, anticuerpos específicos de polipéptido de fusión de ROS y péptidos AQUA (péptidos marcados con isótopos pesados) correspondientes y adecuados para la detección y cuantificación de la expresión del polipéptido indicado en una muestra biológica. Por tanto, un "reactivo específico de un polipéptido ROS" es cualquier reactivo, producto biológico o químico, que es capaz de unirse específicamente, detectar y/o cuantificar la presencia/nivel del polipéptido ROS expresado en una muestra biológica. Si el reactivo se une específicamente a una porción de la proteína ROS (por ejemplo, el dominio cinasa) que está presente en una proteína de fusión ROS, el reactivo específico del polipéptido ROS también sería capaz de unirse específicamente a, detectar y/o cuantificar la presencia/nivel del polipéptido de fusión de ROS expresado en una muestra biológica. Los términos incluyen, pero no se limitan a, los anticuerpos y los reactivos peptídicos AQUA que se tratan a continuación, y los agentes de unión equivalentes están dentro del alcance de la presente invención.

60 En algunas realizaciones, el reactivo que se une específicamente a un polipéptido con actividad ROS cinasa es un anticuerpo. En algunas realizaciones, el reactivo (por ejemplo, el anticuerpo) se une específicamente al polipéptido de fusión de ROS y no se une específicamente al polipéptido de longitud completa de ROS de longitud completa o a su compañero de fusión (FIG de longitud completa).

65

También útiles en la práctica de los métodos de la invención son otros reactivos, tales como anticuerpos específicos de epítomos que se unen específicamente a un epítomo en el dominio extracelular de una secuencia de la proteína de ROS de tipo silvestre (y, por tanto, son capaces de detectar la presencia (o la ausencia) de ROS de tipo silvestre en una muestra) o que se unen específicamente a un epítomo en el dominio cinasa de la secuencia de la proteína ROS de tipo silvestre (y, por lo tanto, son capaces de detectar la presencia (o ausencia) de cualquier proteína con actividad de ROS cinasa en una muestra)

Los anticuerpos que se une específicamente a la proteína ROS de longitud completa o a uno de los polipéptidos de fusión de ROS en cáncer de pulmón también pueden unirse a secuencias peptídicas epitópicas altamente homólogas y equivalentes en otras especies de mamíferos, por ejemplo, murinas o de conejo, o viceversa. Los anticuerpos útiles para la práctica de los métodos de la invención incluyen (a) anticuerpos monoclonales, (b) anticuerpos policlonales purificados que se unen específicamente al polipéptido diana (por ejemplo, la zona de unión de fusión del polipéptido de fusión), (c) los anticuerpos descritos en (a)-(b) anteriores que se unen a epítomos equivalentes y altamente homólogos o a sitios de fosforilación en otras especies no humanas (por ejemplo, ratón, rata), y (d) fragmentos de (a)-(c) anteriores que se unen al antígeno (o más preferiblemente, al epítomo) al cual se unen los ejemplos de anticuerpos divulgados en la presente memoria.

El término "anticuerpo" o "anticuerpos" se refiere a todos los tipos de inmunoglobulina, que incluyen IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, incluyendo los fragmentos de unión de los mismos (es decir, fragmentos de un anticuerpo que son capaces de unirse específicamente a la molécula diana del anticuerpo, tales como fragmentos F_{ab} y $F(ab')_2$), así como anticuerpos recombinantes, humanizados, policlonales y monoclonales y/o fragmentos de unión de los mismos. Los anticuerpos de la invención pueden proceder de cualquier especie de animal, tal como de un mamífero. Los ejemplos no limitantes de anticuerpos naturales incluyen anticuerpos procedentes de seres humanos, pollos, cabras y roedores (por ejemplo, ratas, ratones, hámsteres y conejos), incluyendo roedores transgénicos manipulados genéticamente para producir anticuerpos humanos (véase, por ejemplo, Lonberg et al, documento WO93/12227; patente de EEUU n.º 5.545.806; y Kucheralapati, et al., documento WO91/10741; patente de EEUU n.º 6.150.584). Los anticuerpos de la invención pueden ser también anticuerpos quiméricos. Véase, por ejemplo, M. Wroser et al., *Molec. Immunol.*, 26: 403-411 (1989); Morrision et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci.*, 81: 6851 (1984); Neuberger et al., *Nature*, 312: 604 (1984). Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales recombinantes producidos según los métodos descritos en la patente de EEUU n.º 4.474.893 (Reading) o la patente de EEUU n.º (Cabilly et al.) Los anticuerpos también pueden ser anticuerpos específicos construidos químicamente preparados según el método descrito en la patente de EE.UU. n.º 4.676.980 (Segel et al.).

Los anticuerpos naturales son anticuerpos producidos por un animal hospedador, aunque la invención también contempla anticuerpos genéticamente alterados en donde la secuencia de aminoácidos se ha cambiado con respecto a la del anticuerpo nativo. Debido a la importancia de las técnicas de ADN recombinante en esta solicitud, no es necesario limitarse a las secuencias de aminoácidos que se encuentran en los anticuerpos naturales; los anticuerpos pueden rediseñarse para obtener las características deseadas. Son muchas las posibles variaciones y pueden variar desde cambiar uno solo o unos pocos aminoácidos a rediseñar completamente la región variable o constante, por ejemplo. Los cambios en la región constante se realizarán, en general, para mejorar o alterar características, tales como la fijación del complemento, la interacción con membranas y otras funciones efectoras. Los cambios en la región variable se realizarán para mejorar las características de unión al antígeno. La expresión "anticuerpo humanizado", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a moléculas de anticuerpo en las que se han reemplazado aminoácidos en las regiones que no se unen al antígeno para que se parezcan más a un anticuerpo humano, aunque siguen manteniendo su capacidad de unión original. Otros anticuerpos que se contemplan específicamente son los anticuerpos oligoclonales. Como se usa en la presente memoria, la frase "anticuerpos oligoclonales" se refiere a una mezcla predeterminada de anticuerpos monoclonales distintos. Véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 95/20401; y las patentes de EE.UU n.º 5.789.208 y 6.335.163. En una realización, se generan anticuerpos oligoclonales que consisten en una mezcla predeterminada de anticuerpos contra uno o más epítomos en una única célula. En otras realizaciones, los anticuerpos oligoclonales comprenden una pluralidad de cadenas pesadas capaces de aparearse con una cadena ligera común para generar anticuerpos con múltiples especificidades (por ejemplo, publicación PCT WO 04/009618). Los anticuerpos oligoclonales son particularmente útiles cuando se desea dirigirse a múltiples epítomos sobre una única molécula diana. A la vista de los ensayos y epítomos descritos en la presente memoria, los expertos en la técnica pueden generar o seleccionar anticuerpos o mezclas de anticuerpos que sean aplicables para un objetivo previsto y una necesidad deseada.

Los anticuerpos recombinantes también se incluyen en la presente invención. Estos anticuerpos recombinantes tienen la misma secuencia de aminoácidos que los anticuerpos naturales o tienen secuencias de aminoácidos alteradas de los anticuerpos naturales. Pueden producirse en cualquier sistema de expresión que incluya tanto sistemas de expresión procarióticos como eucarióticos o utilizando métodos de presentación de fagos (véase, por ejemplo, Dower et al., WO91/17271 y McCafferty et al., documento WO92/01047; patente de EE.UU. n.º 5.969.108). Los anticuerpos pueden modificarse de numerosas formas. Pueden prepararse como anticuerpos monocatenarios (que incluyen productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños o SMIP™), fragmentos F_{ab} y $F(ab')_2$, etc. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos humanizados, quiméricos, desimmunizados o totalmente humanos. Numerosas publicaciones describen los muchos tipos de anticuerpos y los métodos para modificar dichos anticuerpos. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 6.355.245; 6.180.370; 5.693.762; 6.407.213; 6.548.640; 5.565.332;

5.225.539; 6.103.889; y 5.260.203. Los anticuerpos genéticamente alterados de la invención pueden ser funcionalmente equivalentes a los anticuerpos naturales mencionados anteriormente. En ciertas realizaciones, los anticuerpos modificados de la invención proporcionan una estabilidad y/o una eficacia terapéutica mejorada.

5 Los ejemplos no limitantes de anticuerpos modificados incluyen aquellos con sustituciones conservadoras de restos de aminoácidos y una o más deleciones o adiciones de aminoácidos que no alteran significativamente de forma perjudicial la utilidad de unión al antígeno. Las sustituciones pueden variar desde cambiar o modificar uno o más restos aminoácidos hasta el rediseño completo de una región, con la condición de que se mantenga la utilidad terapéutica. Los anticuerpos de la invención pueden modificarse después de la traducción (*por ejemplo*, acetilación y/o fosforilación) o pueden modificarse sintéticamente (*por ejemplo*, la unión de un grupo de marcaje). Los anticuerpos con regiones constantes o Fc variantes o modificadas pueden ser útiles para modular funciones efectoras, tales como, por ejemplo la citotoxicidad dependiente del antígeno (ADCC) y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Dichos anticuerpos con regiones Fc o constantes modificadas o variantes pueden ser útiles en los casos en los que una proteína de partida individual se expresa en tejido normal; en estos casos, los anticuerpos variantes sin función efectora pueden producir la respuesta terapéutica deseada sin dañar al tejido normal. Por consiguiente, ciertos aspectos y métodos de la presente divulgación se refieren a anticuerpos con funciones efectoras alteradas que comprenden una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos. La expresión "biológicamente activo" se refiere a una proteína que tiene funciones estructurales, reguladoras o bioquímicas de una molécula natural. Del mismo modo, "inmunológicamente activo" se refiere a la capacidad de la proteína ROS de longitud completa natural o recombinante, o sintética o del polipéptido de fusión de ROS (por ejemplo, uno de los polipéptidos de fusión FIG-ROS descritos en la presente memoria) o cualquier oligopéptido del mismo, para inducir una respuesta inmune específica en animales o células apropiados y para unirse con anticuerpos específicos.

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

35 Un sitio epitópico no limitante de un anticuerpo específico de polipéptido de fusión de la invención es un fragmento peptídico que consiste esencialmente en aproximadamente 11 a 17 aminoácidos de una secuencia polipeptídica de fusión, fragmento que abarca la unión de fusión entre la porción ROS de la molécula y la porción de la molécula de la pareja de fusión no ROS. Se apreciará que los anticuerpos que se unen específicamente a epitopos/péptidos más cortos o más largos que incluyen la zona de unión de la fusión de un polipéptido de fusión de ROS están dentro del alcance de la presente invención.

La invención no se limita al uso de anticuerpos, pero incluye moléculas equivalentes, tales como dominios de unión de proteínas o aptámeros de ácidos nucleicos, que se unen, de una manera específica de la proteína ROS o de la proteína de fusión ROS, fundamentalmente al mismo epitopo al cual se une un anticuerpo específico de un polipéptido específico de ROS de longitud completa o polipéptido de fusión de ROS útiles en los métodos de la invención. Véase, por ejemplo, Neuberger et al., *Nature*, 312: 604 (1984). Estos reactivos equivalentes que no son anticuerpos pueden emplearse de modo adecuado en los métodos de la invención que se describen más a fondo a continuación.

50 Los anticuerpos policlonales útiles en la práctica de los métodos de la invención pueden producirse según técnicas convencionales mediante la inmunización de un animal adecuado (por ejemplo, conejo, cabra, etc.) con un antígeno que incluya un epitopo específico de la proteína de fusión deseada (por ejemplo, la zona de unión entre la pareja de la proteína no ROS y la pareja de la proteína ROS en un polipéptido de fusión de ROS), la recolección del suero inmunológico del animal, y la separación de los anticuerpos policlonales del suero inmunológico, y la purificación de los anticuerpos policlonales que tienen la especificidad deseada, según procedimientos conocidos. El antígeno puede ser un antígeno peptídico sintético que comprenda la secuencia epitópica deseada, seleccionado y construido según técnicas muy conocidas. Véase, *por ejemplo*, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, capítulo 5, p. 75-76, Harlow & Lane Eds., Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Czernik, *Methods In Enzymology*, 201: 264-283 (1991); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85: 21-49 (1962)). Los anticuerpos policlonales producidos tal como se describe en la presente memoria pueden seleccionarse y aislarse tal como se describe más a fondo a continuación.

Los anticuerpos monoclonales también pueden emplearse de modo beneficioso en los métodos de la invención, y pueden producirse en líneas celulares de hibridoma según la técnica muy conocida de Kohler y Milstein, *Nature*, 265: 495-97 (1975); Kohler y Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6: 511 (1976); véase también, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ausubel et al. Eds. (Wiley y Sins, Nueva York, NY 1989 y actualizaciones anuales hasta 2010, incluido). Los anticuerpos monoclonales producidos de esta manera son muy específicos y mejoran la

selectividad y la especificidad de los métodos de ensayo proporcionados por la invención. Por ejemplo, una solución que contiene el antígeno adecuado (*por ejemplo*, un péptido sintético que comprende la zona de unión de la fusión de un polipéptido de fusión de ROS) puede inyectarse en un ratón y, después de un tiempo suficiente (según las técnicas convencionales), se sacrifica al ratón y se obtienen las células esplénicas. Las células del bazo después se immortalizan mediante su fusión con células de mieloma, generalmente en presencia de polietilenglicol, para producir células de hibridoma. Pueden producirse hibridomas de fusión de conejo, *por ejemplo*, según se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.675.063. Las células de hibridoma después se cultivan en un medio de selección adecuado, tal como hipoxantina-aminopterin-timidina (HAT), y el sobrenadante se explora respecto de anticuerpos monoclonales que tengan la especificidad deseada, tal como se describe a continuación. El anticuerpo secretado puede recuperarse del sobrenadante del cultivo de tejido por métodos convencionales, tales como precipitación, intercambio iónico o cromatografía de afinidad, o similares.

También pueden producirse fragmentos Fab monoclonales en *Escherichia coli* mediante técnicas recombinantes conocidas por los expertos en la técnica. Véase, *por ejemplo*, W. Huse, Science, 246: 1275-81 (1989); Mullinax et al., Proc. Nat'l Acad. Sci., 87: 8095 (1990). Si se desean anticuerpos monoclonales de un isotipo para una aplicación concreta, los isotipos concretos pueden prepararse directamente, mediante la selección a partir de la fusión inicial, o prepararse de modo secundario, a partir de un hibridoma parental que secreta un anticuerpo monoclonal de un isotipo diferente empleando la técnica de selección *sib* para aislar variantes de clase de conmutación (Steplewski, et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci., 82: 8653 (1985); Spira et al., J. Immunol. Methods, 74: 307 (1984). El sitio de combinación con el antígeno del anticuerpo monoclonal puede clonarse mediante PCR y producirse anticuerpos monocatenarios como anticuerpos recombinantes de presentación de fagos o anticuerpos solubles en *E. coli* (véase, *por ejemplo*, ANTIBODY ENGINEERING PROTOCOLS, 1995, Humana Press, Sudhir Paul editor)

Además, la patente de EEUU n.º 5.194.392, Geysen (1990), describe un método general para detectar o determinar la secuencia de monómeros (aminoácidos u otros compuestos) que es un equivalente topológico del epítipo (*es decir*, un "mimotopo") que es complementario con un paratopo (sitio de unión a antígeno) concreto de un anticuerpo de interés. Más en general, este método implica detectar o determinar una secuencia de monómeros que sea un equivalente topográfico de un ligando que es complementario con el sitio de unión al ligando de un receptor concreto de interés. De forma similar, la patente de Estados Unidos 5.480.971, Houghten et al. (1996) divulga oligopéptidos perrosilados lineales de rosilo C₁-C- y conjuntos y bibliotecas de dichos 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 análogos no peptídicos de los péptidos que portan el epítipo de la invención mediante estos métodos de modo convencional.

Los anticuerpos útiles en los métodos de la invención, 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 explorarse frente a una biblioteca de péptidos mediante ELISA para asegurar la especificidad para el antígeno deseado y, si se quiere, para la reactividad solo con la proteína ROS de longitud completa, un polipéptido de fusión de ROS concreto (*por ejemplo*, un polipéptido SLC34A2-ROS(S)) o fragmentos de los mismos de la invención. Los anticuerpos también pueden analizarse mediante un análisis de la transferencia de 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 de proteínas de fusión es conocido por los expertos en la técnica y se ha descrito. Véase, *por ejemplo*, la publicación de patente de los Estados Unidos n.º 20050214301.

Los anticuerpos (*por ejemplo*, específicos para la proteína ROS de longitud completa o específicos para el polipéptido de fusión de ROS) útiles en los métodos de la invención 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-péptidos a menudo tienen reactividad cruzada con epítipos que tienen una alta homología o identidad con el péptido inmunizante. Véase, *por ejemplo*, Czernik, anteriormente citado. La reactividad cruzada con otras proteínas de fusión puede caracterizarse con facilidad mediante un análisis de la transferencia de Western junto con marcadores de peso molecular conocido. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas con reacción cruzada pueden estudiarse para identificar los sitios altamente homólogos o idénticos a la secuencia de la proteína ROS de longitud completa o la secuencia del polipéptido de fusión de ROS (*por ejemplo*, un polipéptido FIG-ROS(S)) a la cual se une el anticuerpo. La reactividad cruzada no deseada puede eliminarse mediante selección negativa empleando purificación de anticuerpos sobre columnas de péptidos.

Los anticuerpos específicos de ROS y los anticuerpos específicos del polipéptido de fusión de ROS de la invención 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 especie humana, *per se*. La invención incluye la producción y el uso de anticuerpos que también se unen a epítipos 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 las secuencias de la proteína ROS humana (SEQ ID NO: 1), y

las secuencias del polipéptido de fusión de ROS humano divulgadas en la presente memoria (SEQ ID NO: 5, 7, 22, 28, 56, 58 y 60).

Los anticuerpos empleados en los métodos de la invención también pueden caracterizarse y validarse para su uso en un formato de ensayo concreto, por ejemplo, FC, IHC, y/o ICC. El uso de anticuerpos específicos para la proteína ROS de longitud completa y/o los anticuerpos específicos para los polipéptidos de fusión de ROS en estos métodos se describe más a fondo en la presente memoria. Los anticuerpos descritos en la presente memoria, usados solos o en los ensayos descritos a continuación, también pueden conjugarse de modo ventajoso con colorantes fluorescentes (por ejemplo, Alexa488, 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 de marcador celular (citoqueratina), según se describe más a fondo más adelante.

En la práctica de los métodos de la invención, la expresión y/o la actividad de un polipéptido de fusión de ROS de la invención y/o de ROS de longitud completa en una muestra biológica concreta también puede estudiarse de modo ventajoso empleando anticuerpos específicos para (es decir, que se unen específicamente a) la proteína ROS de longitud completa o anticuerpos específicos para polipéptidos de fusión de ROS. Por ejemplo, están disponibles en el mercado anticuerpos específicos de ROS (es decir, anticuerpos que se unen específicamente a ROS de longitud completa) (véase Santa Cruz Biotech., Inc. (Santa Cruz, CA) n.º de catálogo sc-6347; Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA), n.º de catálogo 3266); y Abcam (Cambridge, MA), n.º de catálogo ab5512 y ab108492, por ejemplo). En algunas realizaciones, los anticuerpos específicos de ROS utilizados en los métodos de la invención se unen específicamente al dominio de cinasa de ROS y, de este modo, detectarán ROS de longitud completa y todos los polipéptidos de fusión de ROS descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, los anticuerpos específicos de ROS utilizados en los métodos de la invención se unen específicamente a una región en la proteína ROS que está en el extremo C del dominio de cinasa de ROS y, de este modo, detectarán ROS de longitud completa y todos los polipéptidos de fusión de ROS descritos en la presente memoria. Dichos anticuerpos pueden producirse también según métodos convencionales.

La detección de la expresión y/o actividad de la expresión de ROS de longitud completa y/o del polipéptido de fusión de ROS en una muestra biológica (por ejemplo, una muestra de tumor), puede proporcionar información sobre si la proteína de fusión está dirigiendo por sí sola al tumor, o si también está presente y dirigiendo al tumor ROS de longitud completa expresada de manera aberrante. Dicha información es clínicamente útil para evaluar si dirigirse a la proteína de fusión o a la proteína (o proteínas) de longitud completa, o a ambas, o si es probable que sea más beneficioso para inhibir la progresión del tumor, y para seleccionar un agente terapéutico adecuado o una combinación de los mismos. Los anticuerpos específicos para el dominio extracelular de ROS cinasa, que no está presente en la ROS mutante divulgada en la presente memoria, pueden ser particularmente útiles para determinar la presencia/ausencia de la ROS cinasa mutante.

Se entenderá que puede emplearse más de un anticuerpo en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, uno o más anticuerpos específicos del polipéptido de fusión de ROS, junto con anticuerpos específicos para otra cinasa, receptor o sustrato de cinasa del cual se sospecha que está, o que potencialmente está, activado en un cáncer en el que el polipéptido de fusión de ROS se expresa, pueden emplearse simultáneamente para detectar la actividad de estas otras moléculas de señalización en una muestra biológica que comprenda células de dicho cáncer.

Los expertos en la materia apreciarán que pueden combinarse polipéptidos de fusión de la presente invención y los fragmentos portadores de epítopos de los mismos con partes de otras moléculas para crear polipéptidos quiméricos. Por ejemplo, un fragmento que contiene epítipo de ROS de longitud completa o un polipéptido de fusión de ROS puede combinarse con el dominio constante de las inmunoglobulinas (IgG) para facilitar la purificación del polipéptido quimérico y aumentar la semivida in vivo del polipéptido quimérico (véase, por ejemplo, los ejemplos de proteínas quiméricas CD4-Ig en el documento EPA 394.827; Trauneker et al., Nature, 331: 84-86 (1988)). Las proteínas de fusión que tienen una estructura dimérica unida por disulfuro (por ejemplo, de una porción de IgG) también pueden ser más eficaces para la unión y la neutralización de otras moléculas distintas al polipéptido monomérico por sí solo (véase Fountoulakis et al., J Biochem 270: 3958-3964 (1995)).

En algunas realizaciones, un reactivo que se une específicamente a ROS de longitud completa o a un polipéptido de fusión de ROS 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 fusión de un polipéptido de fusión de ROS. Dicho péptido AQUA puede ser adecuado para la cuantificación absoluta de un polipéptido de fusión FIG-ROS expresado 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 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., Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100: 6940-5 (2003). La expresión "detecta específicamente" con respecto a dicho péptido AQUA significa que el péptido solo detecta y cuantifica polipéptidos y proteínas que contienen la secuencia del péptido AQUA y sustancialmente no detecta polipéptidos y proteínas que no contienen la secuencia del péptido AQUA.

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

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

La segunda etapa de la estrategia AQUA es su aplicación para medir la cantidad de una proteína o una proteína modificada en mezclas complejas. Los lisados de células completas generalmente se fraccionan mediante una electroforesis en gel de SDS-PAGE, y las regiones del gel coherentes con la migración de las proteínas se cortan y se retiran. A este proceso le sigue una proteólisis en gel en presencia de los péptidos AQUA y un análisis LC-SRM. (Véase Gerber *et al.*, *anteriormente citado*.) Los péptidos AQUA se siembran en la mezcla de péptidos compleja obtenida mediante la digestión del lisado de células completas con una enzima proteolítica y se someten a una purificación por 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 extremadamente 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 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 resto. De esta forma, los dos patrones pueden emplearse para detectar y cuantificar las formas modificadas y no modificadas del sitio en una muestra biológica.

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

5 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
 10 cuantificar solo la forma modificada de la proteína diana. Los patrones de péptidos para las regiones modificadas y no modificadas pueden utilizarse juntos, para determinar el grado de modificación en una muestra concreta (es decir, para determinar cuál es la fracción de la cantidad total de proteína que está representada por la forma modificada). Por ejemplo, pueden utilizarse patrones de péptidos para la forma fosforilada y no fosforilada de una proteína que se sabe que está fosforilada en un sitio concreto, para cuantificar la cantidad de forma fosforilada en una muestra.

15 El péptido se marca empleando uno o más aminoácidos marcados (*es decir*, el marcador es una parte real del péptido) o, menos preferiblemente, los marcadores pueden unirse después de la síntesis según métodos convencionales. Preferiblemente, el marcador es un marcador que altera la masa basándose en las siguientes consideraciones: la masa debe ser exclusiva para las masas de los fragmentos de desplazamiento producidos mediante el análisis MS con regiones del espectro con bajo fondo; el componente de firma de masas iónicas es la porción del resto marcador que preferiblemente muestra una firma de masa iónica exclusiva en el análisis MS; la suma de las masas de los átomos constituyentes del marcador preferiblemente es exclusivamente diferente de los fragmentos de todos los posibles aminoácidos. Como resultado, los péptidos y aminoácidos marcados pueden
 20 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.

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

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

45 Los iones del fragmento en los espectros de MS/MS y MS^3 generalmente son muy específicos para el péptido de interés y, junto con los métodos de LC, permiten un medio muy selectivo para detectar y cuantificar un péptido/proteína diana en una mezcla de proteínas compleja, tal como un lisado de células, que contiene muchos miles o decenas de miles de proteínas. Puede ensayarse cualquier muestra biológica que contenga potencialmente una proteína/péptido diana de interés. Preferiblemente se emplean extractos de células 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.

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

60 Cada péptido aislado después se estudia controlando una reacción seleccionada en la MS. Esto implica emplear el conocimiento previo adquirido mediante la caracterización del patrón interno de péptido y después dejando que la MS controle continuamente un ion específico en el espectro de MS/MS o MS^n 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.*, y Gerber *et al.* anteriormente citado.

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

15 Por ejemplo, un péptido AQUA no limitante de la invención comprende la secuencia de aminoácidos **AGSTLP** (SEQ ID NO: 66), que corresponde a los tres aminoácidos inmediatamente flanqueantes a cada lado de la zona de unión de la fusión en la variante corta del polipéptido de fusión de FIG-ROS *es decir*, el polipéptido de fusión de FIG-ROS(S)), donde los aminoácidos codificados por el gen FIG están en cursiva y los aminoácidos codificados por el gen ROS en negrita. Se apreciará que también pueden construirse péptidos AQUA más grandes que comprendan la secuencia de la zona de unión de la fusión (y restos adicionales cadena abajo o arriba de esa). De modo similar, puede construirse, como alternativa, un péptido AQUA más pequeño que comprenda menos de todos los restos de dicha secuencia (pero que comprenda el punto de la zona de unión de la fusión en sí mismo). 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 (*véase Gygi et al.*, Gerber *et al.*, *supra.*).

20 Debe observarse que debido a que la secuencia del péptido AQUA que abarca la unión de fusión de una de las proteínas de fusión ROS descritas en la presente memoria también puede estar (o incluirse en) el epítipo al que un anticuerpo específico de fusión de ROS se une específicamente. Un "epítipo" se refiere a un epítipo inmunogénico (*es decir*, capaz de suscitar 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 antigénicos 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).

35 La Tabla 2 proporciona una lista de las secuencias de todas las uniones de fusión de los polipéptidos de fusión de ROS de la invención, donde los aminoácidos codificados por el gen no ROS están en cursiva y los aminoácidos codificados por el gen ROS en negrita.

Tabla 2

40

Fusión	Secuencia de unión	SEQ ID NO:
SLC34A2-ROS (muy corto)	VG <i>WHR</i>	62
SLC34A2-ROS (corto)	<i>LVG</i> DDF	63
SLC34A2-ROS (largo)	<i>LVG</i> AGV	64
CD74-ROS	<i>PPK</i> DDF	65
FIG-ROS (corto)	AGSTLP	66
FIG-ROS (largo)	<i>LQV</i> WHR	67
FIG-ROS (extralargo)	VLQAGV	68

En algunas realizaciones, el cáncer de pulmón de mamífero es de un ser humano (*es decir*, humano). En algunas realizaciones, el cáncer de pulmón de mamífero es NSCLC (carcinoma de pulmón no microcítico). En algunas realizaciones, el cáncer de pulmón de mamífero es SCLC (carcinoma de pulmón microcítico). En realizaciones adicionales de los métodos de la invención, el mamífero es un ser humano, y el ser humano puede ser un candidato para un agente terapéutico inhibidor de ROS, para el tratamiento de un cáncer de pulmón. El candidato humano puede ser un paciente que está siendo tratado en la actualidad, o que se considere para un tratamiento con un inhibidor de ROS cinasa. 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.

50 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 de ROS cinasa incluyendo, sin limitaciones, un polipéptido de fusión de ROS o una proteína ROS de longitud completa (con o sin la secuencia de péptido señal) o fragmentos que tienen actividad de ROS cinasa. 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, suspensión de células, o una suspensión de células y virus o extractos del mismo, y puede comprender una célula, los cromosomas aislados de una célula (*por ejemplo*, una extensión de cromosomas en metafase), ADN genómico (en solución o unido a un soporte sólido tal como para el análisis de Southern), ARN (en solución o unido a un soporte sólido tal como para el análisis Northern), ADNc (en solución o unido a un soporte sólido). En algunas realizaciones, la muestra biológica contiene células pulmonares sospechosas de ser cancerosas.

Cualquier muestra biológica que comprenda células (o extractos de células) procedentes de un cáncer de mamífero es adecuada para su uso en los métodos de la invención. En una realización, la muestra biológica comprende células obtenidas a partir de una biopsia de tumor o resección tumoral. La biopsia o resección puede obtenerse, según las técnicas clínicas convencionales, a partir de tumores primarios que aparezcan en el órgano de un mamífero, o de tumores secundarios que han metastatizado hacia otros tejidos. En otra realización, la muestra biológica comprende células obtenidas a partir de un aspirado con una aguja fina extraídas de un tumor y las técnicas para obtener estos aspirados son muy conocidas en la técnica (véase Cristallini et al., *Acta Cytol.* 36(3): 416-22 (1992)).

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

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

En algunas realizaciones, la muestra biológica comprende 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 corporación de Johnson and Johnson). Se describen otros métodos para aislar CTC (véase, por ejemplo, la publicación PCT n.º WO/2002/020825, Cristofanilli et al., *New Engl. J. of Med.* 351 (8):781-791 (2004), y Adams et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 130 (27): 8633-8641 (Julio de 2008)). En una realización particular, una célula tumoral circulante ("CTC") puede aislarse e identificarse como originada en el pulmón.

En 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 de ROS cinasa o una molécula de ácido nucleico que codifica el mismo (por ejemplo, polipéptido o polinucleótido de ROS de longitud completa o polipéptido o polinucleótido de fusión DE ROS) en la CTC.

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

Por tanto, las muestras biológicas útiles en la práctica de los métodos de la invención pueden obtenerse de cualquier mamífero en el que esté presente un cáncer o posible cáncer caracterizado por la presencia de un polipéptido que tiene actividad de ROS cinasa (por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido de ROS de longitud completa o un polinucleótido o polipéptido de fusión de ROS) está presente o podría estar presente o en desarrollo. Como se usa en la presente memoria, la frase "caracterizado por" con respecto a un cáncer (o posible cáncer) y la molécula indicada (*por ejemplo*, un polipéptido con actividad ROS cinasa) significa un cáncer (o posible cáncer) en el que una translocación o mutación génica (por ejemplo, que causa expresión aberrante de ROS de longitud completa) y/o un polipéptido expresado con actividad ROS cinasa (por ejemplo, un polipéptido de fusión de ROS) está presente, en comparación con otro cáncer o un tejido normal en el que tal translocación, expresión aberrante de ROS de longitud completa y/o polipéptido con actividad de ROS cinasa no están presentes. La presencia de dicha translocación,

expresión aberrante de ROS de longitud completa y/o polipéptido con actividad de ROS cinasa puede dar lugar (es decir, estimular o ser el agente causal de), en su totalidad o en parte, al crecimiento y supervivencia de dicho cáncer o posible cáncer.

5 Por consiguiente, cualquier muestra biológica (por ejemplo, CTC, efusión pleural, aspiración con aguja, biopsia de tumores, etc.) de un paciente que se identifica como que comprende un polipéptido con actividad de ROS cinasa o polinucleótido que codifica el mismo (por ejemplo, polipéptido o polinucleótido de ROS de longitud completa o un polipéptido o polinucleótido de fusión de ROS) puede indicar que el cáncer de origen del paciente (por ejemplo, un
10 cáncer de pulmón tal como NSCLC o SCLC) está siendo dirigido por el polipéptido con actividad de ROS cinasa y, por tanto, es probable que responda a una composición que comprende al menos un agente terapéutico inhibidor de la cinasa ROS.

Tal como se utiliza en la presente memoria, por “probable que responda” se quiere decir que un cáncer es más probable que muestre retraso o anulación del crecimiento en respuesta a (*por ejemplo* tras el contacto o tratamiento con) un agente terapéutico inhibidor de ROS. En algunas realizaciones, un cáncer que es probable que responda a un agente terapéutico inhibidor de ROS es uno que muere (*por ejemplo*, apoptosis de las células cancerosa) en respuesta al agente terapéutico inhibidor de ROS.

Para evaluar la presencia de un polipéptido con actividad ROS cinasa (o el polinucleótido que codifica el mismo) en una muestra biológica que comprende células procedentes de un tumor de cáncer de mamífero, puede emplearse de modo deseable una muestra de control que representa una célula en la que dicho polipéptido con actividad de ROS cinasa no se produce (por ejemplo, células pulmonares sanas) para fines comparativos. De modo ideal, 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 con actividad de ROS cinasa (o polinucleótido que codifica el mismo). Comparando el nivel en la muestra control frente a la muestra biológica de ensayo se puede saber si el polipéptido y/o polinucleótido mutante está o están presentes. Como alternativa, puesto que un polipéptido con actividad ROS cinasa (o polinucleótido que codifica el mismo) puede no estar presente en la mayoría de los cánceres, cualquier tejido que, de forma similar, no expresa el polipéptido con actividad ROS cinasa (o polinucleótido que codifica el mismo) puede emplearse como control.

Los métodos descritos a continuación tienen una utilidad diagnóstica valiosa para cánceres que se caracterizan por la presencia de un polipéptido con actividad ROS cinasa y para las decisiones de tratamiento que los conciernen. 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 activada ROS cinasa, ni que se halla sometido aún a un tratamiento para dicho cáncer, y el método se emplea para determinar diagnósticamente que un tumor en dicho sujeto pertenece a un subconjunto de tumores (*por ejemplo*, NSCLC o SCLC) en los que un polipéptido con actividad ROS cinasa (o polinucleótido que codifica el mismo) está presente/se expresa.

Como alternativa, una muestra biológica puede obtenerse de un sujeto que ha sido diagnosticado con un cáncer caracterizado por la presencia de un tipo de cinasa, tal como EGFR, y que ha estado recibiendo terapia, tal como terapia con inhibidor de EGFR (por ejemplo, Tarceva™, Iressa™), para el tratamiento de dicho cáncer, y el método de la invención se emplea para identificar si el tumor del sujeto también se caracteriza por la presencia de un polipéptido con actividad ROS cinasa (o polinucleótido que codifica el mismo, tal como proteína ROS de longitud completa o uno de los muchos polipéptidos de fusión de ROS (por ejemplo, SLC34A2-ROS(S)), y, por tanto, es probable que responda completamente a la terapia existente y/o si resulta deseable o puede garantizarse una terapia de inhibición de la ROS cinasa alternativa o adicional. Los métodos de la invención también pueden emplearse para controlar la progresión o la inhibición de un cáncer que expresa un polipéptido con actividad ROS cinasa después del tratamiento de un sujeto con una composición que comprende un agente terapéutico o una combinación de agentes terapéuticos inhibidores de ROS cinasa.

Este ensayo de diagnóstico puede realizarse después o antes de una evaluación preliminar o de procedimientos de vigilancia quirúrgica. El método de identificación de la invención puede emplearse de modo ventajoso como un diagnóstico para identificar pacientes que tienen un cáncer, tal como cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico), caracterizado por la presencia de un polipéptido con actividad ROS cinasa, tal como una proteína de fusión ROS (por ejemplo, FIG-ROS (S)), para saber cuáles son los pacientes es más probable que respondan a agentes terapéuticos dirigidos a la inhibición de la actividad de ROS cinasa. La capacidad para seleccionar dichos pacientes también será útil en la evaluación clínica de la eficacia de futuros productos terapéuticos inhibidores de ROS, así como en la prescripción futura de dichos fármacos a pacientes.

La capacidad para identificar selectivamente cánceres en los que un polipéptido con actividad ROS cinasa (o polinucleótido que codifica el mismo), tal como una proteína de fusión ROS o un polinucleótido de fusión ROS, o un polipéptido ROS de longitud completa o polinucleótido ROS de longitud completa, está/están presentes permite desarrollar nuevos métodos importantes para la identificación precisa de dichos tumores para fines de diagnóstico, así como obtener información útil para determinar si es probable que un tumor responda a una composición terapéutica inhibidora de ROS, o si es probable que no responda parcial o totalmente a un inhibidor que se dirija a una cinasa diferentes cuando se administra como agente único para el tratamiento del cáncer.

Como se usa en la presente memoria, por "cáncer" o "canceroso" se entiende una célula que muestra 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 mostrar 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 de pulmón no microcítico o cáncer de pulmón microcítico). Tal como se usa en la presente memoria, por "posible cáncer" (como en "posible cáncer de pulmón de mamífero") o "tejido sospechoso de ser canceroso" se entiende una célula o 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 tejido como el posible cáncer, pero donde la célula o el tejido aún no ha sido confirmado por un médico o patólogo como cancerosa.

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

En la estrategia del ensayo heterogéneo, los materiales son habitualmente 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 más a fondo a continuación. El anticuerpo en general se inmoviliza sobre un soporte, tal como una esfera, una placa o un portaobjetos, y se pone en contacto con la muestra sospechosa de contener el antígeno en una fase líquida. El soporte después se separa de la fase líquida, y la fase del soporte o la fase líquida se estudia para descubrir una señal detectable empleando un medio para producir dicha señal. La señal se relaciona con la presencia del analito en la muestra biológica. El medio para producir una señal detectable incluye el uso de marcadores radiactivos, marcadores fluorescentes, marcadores enzimáticos, puntos cuánticos, etc. Por ejemplo, si el antígeno que se va a detectar contiene un segundo sitio de unión, un anticuerpo que se une a ese sitio puede conjugarse con un grupo detectable y añadirse a la disolución de reacción en fase líquida antes de la etapa de separación. La presencia del grupo detectable sobre el soporte sólido indica la presencia del antígeno en la muestra de ensayo. Los ejemplos de inmunoensayos adecuados son el radioinmunoensayo, métodos de inmunofluorescencia, inmunoensayos ligados a enzimas y similares.

Los formatos de inmunoensayos y sus variaciones, que pueden ser útiles para realizar los métodos descritos en la presente, son muy conocidos en la técnica. Véase, *en general*, E. Maggio, Enzyme-Immunoassay (1980) (CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.); véase *también*, *por ejemplo*, la patente de EEUU n.º 4.727.022 (Skold et al., "Methods for Modulating Ligand-Receptor Interactions and their Application"); la patente de EEUU n.º 4.659.678 (Forrest et al., "Immunoassay of Antigens"); la patente de EE.UU. n.º 4.376.110 (David et al., "Immunometric Assays Using Monoclonal Antibodies"). Las condiciones adecuadas para la formación de complejos de reactivo-anticuerpo son muy conocidas por los expertos en la técnica. Véase *id.* Los anticuerpos específicos de ROS pueden emplearse en un ensayo de "dos sitios" o "sándwich", con una única línea celular de hibridoma como fuente para el anticuerpo monoclonal marcado y el anticuerpo monoclonal unido. Estos ensayos se describen en la patente de EEUU n.º 4.376.110. La concentración del reactivo detectable debe ser suficiente para que la unión de una proteína con actividad ROS cinasa (por ejemplo, una proteína ROS de longitud completa o un polipéptido de fusión de ROS) sea detectable, comparado con el fondo.

Los anticuerpos útiles en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria pueden conjugarse con un soporte sólido adecuado para un ensayo de diagnóstico (por ejemplo, esferas, placas, portaobjetos o pocillos formados por materiales tales como látex o poliestireno) según técnicas conocidas, tales como precipitación. Los anticuerpos u otros reactivos de unión al polipéptido 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 alcalina), y marcadores fluorescentes (*por ejemplo*, fluoresceína) según técnicas conocidas.

Los ensayos basados en células, tales como la citometría de flujo (FC), la inmunohistoquímica (IHC) o la inmunofluorescencia (IF) son particularmente deseables en la práctica de los métodos de la invención, 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 ROS cinasa (por ejemplo, un polipéptido ROS de longitud completa o un polipéptido de fusión de ROS) *in vivo*, y evitan el riesgo de cambios accidentales en la actividad que resulten de la manipulación de células obtenidas, por ejemplo, de una muestra de tumor para obtener extractos. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los métodos de la invención se ponen en práctica 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 ROS cinasa en un tumor de mamífero antes, durante y después del tratamiento con un fármaco dirigido a la inhibición de la actividad ROS cinasa. Por ejemplo, pueden analizarse células tumorales procedentes de un aspirado con una aguja fina mediante citometría de flujo para la expresión y/o activación de un polipéptido con actividad de ROS cinasa o polinucleótido que codifica el mismo (por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido de ROS de longitud completa o un polinucleótido o polipéptido de fusión de ROS), así como para marcadores que identifiquen los 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). Brevemente y como ejemplo, puede emplearse el siguiente protocolo para el análisis citométrico: fijación de las células con paraformaldehído al 2 % durante 10 minutos a 37 °C, seguido de permeabilización en metanol al 90% durante 30 minutos en hielo. Las células pueden teñirse después con el anticuerpo primario (por ejemplo, un anticuerpo específico de ROS de longitud completa o específico de un polipéptido de fusión de ROS), lavarse y marcarse con un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia. Las células después se analizan en un citómetro de flujo (por ejemplo, un Beckman Coulter FC500) según los protocolos específicos del instrumento empleado. Este análisis identificará el nivel del polipéptido ROS de longitud completa o del polipéptido de fusión de ROS en el tumor. Análisis similares después del tratamiento del tumor con un producto terapéutico que inhibe ROS revelarán el grado de respuesta de un tumor que expresa ROS o un polipéptido de fusión de ROS frente al inhibidor de ROS cinasa dirigido.

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

Los ensayos de inmunofluorescencia (IF) también pueden emplearse para determinar el estado de expresión y/o activación de un polipéptido con actividad ROS cinasa (por ejemplo, polipéptido ROS de longitud completa o un polipéptido de fusión de ROS) en un cáncer de mamífero antes, durante y después del tratamiento con un terapéutico dirigido a la inhibición de la actividad ROS cinasa. La IF puede realizarse según técnicas muy conocidas. Véase, *por ejemplo*, J.M. polak y S. Van Noorden (1997) INTRODUCTION TO IMMUNOCYTOCHEMISTRY, 2ª Ed.; ROYAL MICROSCOPY SOCIETY MICROSCOPY HANDBOOK, 37, BioScientific/Springer-Verlag. Brevemente, y como ejemplo, 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 ROS cinasa (por ejemplo, un polipéptido de fusión CD74-ROS), seguido de un anticuerpo secundario marcado con un colorante fluorescente, tal como Alexa 488, y analizarse con un microscopio de epifluorescencia.

Una diversidad de otros protocolos, que incluyen el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), análisis de transferencia de Western, ensayo de cinasa *in vitro* y clasificación de células activada por fluorescencia (FACS), para medir la expresión y/o actividad de un polipéptido con actividad ROS cinasa, son conocidos en la técnica y proporcionan una base para diagnosticar la presencia del polipéptido con actividad ROS cinasa (por ejemplo, un polipéptido ROS de longitud completa o un polipéptido de fusión de ROS tal como un polipéptido de fusión FIG-ROS (S)). Se establecen unos valores normales o estándar para la expresión del polipéptido ROS de longitud completa combinando los fluidos corporales o extractos celulares obtenidos de sujetos mamíferos normales, preferiblemente seres humanos, con un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido ROS de longitud completa 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 ROS de longitud completa expresadas en un sujeto, el control y las muestras de la enfermedad procedentes de los tejidos de biopsia se comparan con los valores estándar. La desviación entre los valores de los patrones y del sujeto establece los parámetros para diagnosticar la enfermedad. Como se describe en la presente memoria, ya que se descubrieron en el tejido pulmonar canceroso las proteínas con actividad ROS cinasa (por ejemplo, FIG-ROS (S)), no se espera que muestras biológicas de tejido pulmonar normal contengan estas proteínas con actividad ROS cinasa (o polinucleótidos que codifican las mismas).

En otro aspecto, la invención proporciona un método para detectar la presencia de un polinucleótido que codifica un polipéptido con actividad de ROS cinasa en una muestra biológica obtenida de un cáncer de pulmón de mamífero o posible cáncer de pulmón de mamífero, comprendiendo dicho método utilizar un reactivo que se une específicamente a dicho polinucleótido que codifica dicho polipéptido con actividad de ROS cinasa 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 ROS cinasa está presente en dicha muestra biológica y en donde el polinucleótido codifica un polipéptido de fusión FIG-ROS.

La presencia de un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad ROS cinasa se puede evaluar por cualquier método estándar. Además, estos métodos pueden combinarse con métodos para detectar el polipéptido que tiene actividad de ROS cinasa como se ha descrito anteriormente.

Ensayos de nucleótidos.

Los reactivos de unión específicos del polinucleótido de fusión FIG-ROS útiles en la práctica de los métodos de la invención también pueden ser sondas de ARNm, oligonucleótido o ADN que pueden hibridar directamente con, y detectar, transcritos de expresión de polipéptido truncado o de fusión en una muestra biológica. Dichas sondas se discuten con detalle en la presente memoria. Brevemente, y como ejemplo, muestras de un paciente fijadas en formalina 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.

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

En una realización, la hibridación con cebadores de PGR que son capaces de detectar secuencias de polinucleótidos, que incluyen secuencias genómicas, que codifican un polipéptido con actividad ROS cinasa (polipéptido de fusión FIG-ROS) puede utilizarse para identificar secuencias de ácidos nucleicos que codifican dichos polipéptidos con actividad ROS cinasa. 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 codificadora 3', y la rigurosidad de la hibridación o la amplificación (máxima, alta, intermedia o baja) determinará si la sonda identifica solo a las secuencias que aparecen en naturaleza que codifican los polipéptidos de ROS cinasa, alelos o secuencias relacionadas.

Las sondas también pueden emplearse para la detección de secuencias relacionadas, y preferiblemente deben contener al menos 50% de los nucleótidos de cualquiera de las secuencias que codifican el polipéptido de ROS mutante. Las sondas de hibridación (por ejemplo, sondas de FISH o sondas de transferencia Southern o Northern) de la presente invención pueden ser ADN o ARN y derivadas de las secuencias de nucleótidos de las proteínas de fusión FIG-ROS. En algunas realizaciones, en algunas realizaciones, en donde el polipéptido que tiene actividad cinasa de ROS es una proteína de fusión de ROS, 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 ROS natural y el gen de la pareja de unión (FIG).

Un polinucleótido de fusión de ROS (es decir, un polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión de ROS tal como FIG-ROS (S)) puede utilizarse en análisis de la transferencia Southern o Northern, transferencias por puntos, u otras tecnologías basadas en membranas; en tecnologías de PGR; 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 del polipéptido con actividad ROS cinasa. Estos métodos cualitativos o cuantitativos son muy conocidos en la técnica. En un aspecto concreto, las secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido con actividad ROS cinasa pueden ser útiles en ensayos que detectan la activación o la inducción de diversos cánceres, incluyendo carcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC) y carcinoma de pulmón microcítico. Los polinucleótidos que codifican un polipéptido con actividad ROS cinasa pueden marcarse por métodos convencionales y añadirse a una muestra de fluido o tejido procedente de un paciente en condiciones adecuadas para la formación de complejos de hibridación. Después de un periodo de incubación adecuado, la muestra se lava y la señal se cuantifica y se compara con un valor patrón. Si la cantidad de 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 unos niveles alterados de secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido con actividad ROS cinasa (polipéptido de fusión FIG-ROS) en la muestra indica la presencia de la enfermedad asociada. Estos ensayos también pueden utilizarse para evaluar la eficacia de un régimen de tratamiento terapéutico concreto en estudios animales, en ensayos clínicos, o para el control del tratamiento de un paciente individual.

En algunas realizaciones, los métodos de la invención se llevan a cabo usando un formato de ensayo de 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., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989). Los cebadores para PCR (también denominados oligómeros) pueden sintetizarse de modo químico, generarse de modo enzimático, o producirse a partir de una fuente recombinante. Los oligómeros consistirán preferiblemente en dos secuencias de nucleótidos, una con la orientación sentido (5' a 3') y otra con la orientación antisentido (3' a 5'), y se emplean bajo condiciones optimizadas para la identificación de un trastorno o gen específico. Los mismos dos oligómeros, conjuntos anidados de oligómeros, o incluso una agrupación degenerada de oligómeros pueden emplearse bajo condiciones menos rigurosas para la detección y/o cuantificación de secuencias de ADN o ARN muy relacionadas.

Los métodos que también pueden emplearse para cuantificar la expresión del polipéptido con actividad ROS cinasa (polipéptido de fusión de FIG-ROS) incluyen el radiomarcaje o la biotinylation de nucleótidos, la coamplificación de un ácido nucleico 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.

Los polinucleótidos que codifican un polipéptido con actividad ROS cinasa pueden emplearse para generar sondas de hibridación que son útiles para el cartografiado de la secuencia genómica natural. Las secuencias pueden cartografiarse en un cromosoma concreto o en una región específica del cromosoma empleando técnicas muy conocidas. Estas técnicas incluyen hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH), FACS, o construcciones de cromosomas artificiales, tales como cromosomas artificiales de levadura, cromosomas artificiales bacterianos, construcciones P1 bacterianas, o bibliotecas de ADNc de cromosomas individuales, tal como se revisa 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 *in situ* de fluorescencia (FISH) en los métodos de la invención (como se describe en Verma et al. HUMAN CHROMOSOMES: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUES, Pergamon Press, Nueva York, N.Y. (1988)). En algunas realizaciones, el ensayo FISH puede correlacionarse con otras técnicas de mapeo de cromosomas físicos y datos de mapa genético. La técnica FISH es bien conocida (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N.º 5.756.696; 5.447.841; 5.776.688; y 5.663.319). Pueden encontrarse ejemplos de datos de mapas genéticos en la 1994 Genome Issue of Science (265: 1981 f). La correlación entre la localización de la pareja de fusión de una proteína de fusión ROS (el gen FIG) sobre un mapa cromosómico físico y una enfermedad específica, o predisposición a una enfermedad específica, puede ayudar a delimitar la región del ADN asociada con esa enfermedad genética. Las secuencias de nucleótidos de la presente invención pueden utilizarse para detectar diferencias en las secuencias génicas entre individuos normales, portadores o afectados.

La hibridación *in situ* de preparaciones cromosómicas y las técnicas de cartografiado físico, tales como el análisis de conexiones empleando marcadores cromosómicos establecidos, pueden emplearse para extender los mapas genéticos. A menudo, la colocación de un gen sobre el cromosoma de otra especie de mamífero, tal como un ratón, puede revelar marcadores asociados, incluso si se desconoce el número o el brazo de un cromosoma humano concreto. Pueden asignarse nuevas secuencias a brazos cromosómicos, o a sus partes, mediante cartografiado físico. Esto proporciona información valiosa a los investigadores que están buscando genes de enfermedades empleado clonación posicional u otras técnicas de descubrimiento de genes. Tras haber localizado 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 cartografiado de secuencias del área puede representar genes asociados o reguladores para una posterior investigación. La secuencia de nucleótidos de la presente invención también puede utilizarse para detectar diferencias en la localización cromosómica debidas a translocación, inversión, etc., entre individuos normales, portadores o afectados.

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

En otro ejemplo, la tecnología CISH de Dako permite la hibridación *in situ* con inmuno-histoquímica en la misma

sección tisular. Véase Elliot et al., Br J Biomed Sci 2008; 65 (4): 167- 171, 2008 para una comparación de CISH y FISH.

Un método para diagnosticar a un paciente cáncer de pulmón o posible cáncer de pulmón dirigido por una ROS cinasa incluye el contacto de una muestra biológica de dicho cáncer de pulmón o posible cáncer de pulmón (en donde la muestra biológica comprende al menos una molécula de ácido nucleico) con una sonda que hibrida en condiciones rigurosas con una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad ROS cinasa que es un polinucleótido de fusión FIG-ROS (por ejemplo, un polinucleótido de fusión FIG-ROS (S), un polinucleótido de fusión FIG-ROS (L), un polinucleótido de fusión FIG-ROS (VL)), y en donde la hibridación de dicha sonda con al menos una molécula de ácido nucleico en dicha muestra biológica identifica a dicho paciente como que tiene cáncer de pulmón o posible cáncer de pulmón dirigido por una ROS cinasa.

Otro método para diagnosticar a un paciente cáncer de pulmón o posible cáncer de pulmón dirigido por una ROS cinasa incluye el contacto de una muestra biológica de dicho cáncer de pulmón o posible cáncer de pulmón (en donde dicha muestra biológica comprende al menos un polipéptido) con un reactivo que se une específicamente a un polipéptido de fusión FIG-ROS con actividad de ROS cinasa (por ejemplo, un polipéptido de fusión FIG-ROS (S), un polipéptido de fusión FIG-ROS (L), un polipéptido de fusión FIG-ROS (VL), en donde la unión específica de dicho reactivo a al menos un polipéptido en dicha muestra biológica identifica que dicho paciente tiene cáncer de pulmón o posible cáncer de pulmón dirigido por una ROS cinasa.

La identificación de un cáncer de pulmón o posible cáncer de pulmón como dirigido por una ROS cinasa identificará al paciente que tiene ese cáncer de pulmón o posible cáncer de pulmón como probable respondedor a un agente terapéutico inhibidor de ROS.

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 ROS cinasa (polipéptido de fusión FIG-ROS), se establece 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 polinucleotídica, o un fragmento de la misma, que codifica el polipéptido con actividad ROS cinasa (polipéptido de fusión FIG-ROS), 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.

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

Puede establecerse un perfil normal o estándar similar para la expresión o el nivel de actividad de un polipéptido que tiene actividad de ROS cinasa. 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, se une a la unión de fusión de un polipéptido de fusión FIG-ROS) y comparar 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 de ROS cinasa, se puede realizar un ensayo estándar de cinasa in vitro (véase, Ausubel et al., anteriormente citado; Sambrook et al., anteriormente citado) en muestras tomadas de pacientes normales en comparación con muestras tomadas de pacientes sintomáticos para cáncer de pulmón.

La inhibición de la expresión de ROS o la actividad cinasa puede determinarse usando un reactivo que se une específicamente a un polinucleótido de fusión ROS, un reactivo que se une específicamente al polipéptido de fusión de ROS, un reactivo que se une específicamente a un polinucleótido ROS de longitud completa o un reactivo que se une específicamente a un polipéptido ROS de longitud completa.

En diversas realizaciones, la expresión y/o actividad de dicho polipéptido se inhibe con una composición que comprende un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en crizotinib (también conocido como PF-02341066), NVT TAE-684, AP26113, CEP-14083, CEP-14513, CEP11988, WHI-P131 y WHI-P154.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un "inhibidor de ROS" o un "compuesto inhibidor de ROS" significa cualquier composición que comprende uno o más compuestos, químicos o biológicos, que inhiben, directa o indirectamente, la expresión y/o actividad de un polipéptido con actividad ROS cinasa. Dicha inhibición puede ser in vitro o in vivo. "Terapéutico inhibidor de ROS" o "terapéutico que inhibe ROS" significa un compuesto inhibidor de ROS utilizado como terapéutico para tratar a un paciente que tiene un cáncer de pulmón (por ejemplo, NSCLC o SCLC) caracterizado por la presencia de un polipéptido con actividad ROS cinasa, tal como una proteína ROS de

longitud completa expresada de forma aberrante o un polipéptido de fusión de ROS (por ejemplo, una de las proteínas de fusión FIG-ROS) descritas en la presente memoria.

5 El inhibidor de ROS es un reactivo que se une específicamente a un polipéptido de fusión de ROS (por ejemplo, F FIG-ROS(S), FIG-ROS(L), FIG-ROS(XL), SLC34A2-ROS(VS), SLC34A2-ROS(S), SLC34A2-ROS(L), o CD74-ROS), un reactivo que se une específicamente a un polipéptido ROS de longitud completa, un ARNip dirigido a un polinucleótido de fusión ROS (por ejemplo, un polinucleótido de fusión SLC34A2-ROS (L)) o un ARNip dirigido a un polinucleótido ROS de longitud completa.

10 El agente terapéutico inhibidor de ROS puede ser, por ejemplo, un inhibidor de cinasas, tal como un inhibidor de molécula pequeña o de anticuerpo. Puede ser un inhibidor de pancinasas con actividad contra varias cinasas diferentes, o un inhibidor específico de cinasa. Dado que ROS, ALK, LTK, InsR e IGF1R pertenecen a la misma familia de tirosina cinasas, pueden compartir una estructura similar en el dominio cinasa.

15 Por tanto, en algunas realizaciones, un inhibidor de ROS dados a conocer en el presente documento también inhibe la actividad de una ALK cinasa, una LTK cinasa, un receptor de insulina o un receptor de IGF1. Los compuestos inhibidores de ROS se discuten con más detalle a continuación. Las muestras biológicas de los pacientes pueden tomarse antes y después del tratamiento con el inhibidor y después analizarse, empleando los métodos descritos anteriormente, para el efecto biológico del inhibidor sobre la actividad ROS cinasa, que incluye la fosforilación de la proteína sustrato corriente abajo. Este ensayo farmacodinámico puede ser útil para determinar la dosis biológicamente activa del fármaco que puede ser preferible a una dosis máxima tolerable. Esta información también sería útil en propuestas para la aprobación de fármacos demostrando el mecanismo de acción del fármaco.

20 En otra realización, la expresión y/o actividad de dicho polipéptido se inhibe con una composición que comprende un agente terapéutico inhibidor de ROS seleccionado del grupo que consiste en PF-02341066), NVT TAE-684, AP26113, CEP-14083, CEP-14513, CEP11988, WHI-P131 y WHI-P154.

Según la presente invención, el polipéptido con actividad ROS cinasa puede aparecer en al menos un subgrupo de 30 cáncer de pulmón humano. De acuerdo con esto, la progresión de un cáncer de mamífero en el que se expresa un polipéptido con actividad de ROS cinasa puede inhibirse, *in vivo*, inhibiendo la actividad de la ROS cinasa en dicho cáncer. La actividad ROS en los cánceres caracterizados por la expresión de un polipéptido con actividad ROS cinasa (por ejemplo, un polipéptido de fusión de ROS o polipéptido ROS de longitud completa expresado aberrantemente) puede inhibirse poniendo en contacto el cáncer con una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco terapéutico inhibidor de ROS. Por consiguiente, un método para inhibir la progresión del polipéptido con 35 cáncer de pulmón que expresa actividad de ROS cinasa puede comprender inhibir la expresión y/o actividad de la ROS cinasa en el cáncer de pulmón poniendo en contacto el cáncer (por ejemplo, un tumor) con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico inhibidor de ROS.

40 Tal como se utiliza en la presente memoria, por "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad farmacéuticamente eficaz" se entiende una cantidad de un agente terapéutico inhibidor de ROS que es adecuado para inhibir el cáncer (o célula del mismo) o posible cáncer (o células del mismo), en comparación con un cáncer no tratado o posible cáncer, ya sea ralentizando el crecimiento del cáncer o posible cáncer, reduciendo la masa del cáncer o posible de cáncer, reduciendo el número de células del cáncer o posible cáncer, o matando el cáncer.

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

50 En algunas realizaciones, un agente terapéutico inhibidor de ROS útil en la práctica de los métodos dados a conocer en el presente documento es un inhibidor de molécula pequeña, dirigido. Los inhibidores dirigidos de molécula pequeña son una clase de moléculas que generalmente inhiben la actividad de su enzima diana uniéndose de forma específica, y a menudo irreversible, con el sitio catalítico de la enzima y/o uniéndose a una hendidura de unión a 55 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 ROS cinasa y la ALK cinasa, se prevé que cualquier inhibidor de ALK cinasa también inhiba la ROS cinasa. Adicionalmente, como se describe más adelante en los ejemplos, un cáncer de pulmón dirigido por ROS cinasa no estará dirigido por ALK cinasa. Del mismo modo, un cáncer de pulmón dirigido por ALK cinasa no estará dirigido por ROS cinasa.

60 Un método de tratamiento de un paciente para cáncer de pulmón, que comprende: detectar la presencia, en una muestra biológica de un pulmón de un paciente que tiene o se sospecha que tiene cáncer de pulmón, de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido que tiene actividad de ROS cinasa y un polipéptido que tiene actividad de ALK cinasa; y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente 65 terapéutico inhibidor de ROS/ALK al paciente, tratando de este modo al sujeto por cáncer de pulmón.

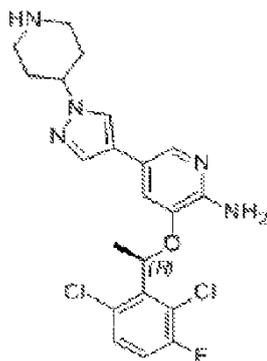
También se describe un método para identificar a un paciente con cáncer de pulmón o con sospecha de tener cáncer de pulmón como un paciente susceptible de responder a un agente terapéutico inhibidor de ROS, que comprende: poner en contacto una muestra biológica de un pulmón de dicho paciente con un primer reactivo que se une específicamente a un polipéptido que tiene actividad ROS cinasa y un segundo reactivo que se une específicamente a un polipéptido que tiene actividad de ALK cinasa y, detectar si el primer reactivo o el segundo reactivo se une específicamente a la muestra biológica, en donde la detección de la unión del primer reactivo o el segundo reactivo a la muestra biológica identifica al paciente como un paciente que probablemente responda a un agente terapéutico inhibidor de ROS. El primer reactivo puede unirse específicamente a la proteína ROS cinasa de longitud completa. El segundo reactivo puede unirse específicamente a la proteína ALK cinasa de longitud completa. El primer reactivo puede unirse específicamente al dominio cinasa de la proteína ROS cinasa. El segundo reactivo puede unirse específicamente al dominio cinasa de la proteína ALK cinasa.

Tal como se utiliza en la presente memoria, por "proteína que tiene actividad de ALK cinasa" se entiende cualquier polipéptido que retiene el dominio cinasa completo de ALK y, por lo tanto, tiene actividad de ALK cinasa. Los polipéptidos no limitantes con actividad de ALK cinasa incluyen ALK de longitud completa (véase la patente de Estados Unidos n.º 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 (véase, por ejemplo, Palmer et al., *Biochem. J.* 420(3): 345-361, 2009 (y los artículos citados en el mismo), Rikova et al., *Cell* 131: 1190-1203, 2007; Soda et al., *Nature* 448: 561-566, 2007; Morris et al., *Science* 263: 1281-1284, 1994; Du et al., *J. Mol. Med* 84: 863-875, 2007; Panagopoulos et al., *Int. J. Cancer* 118: 1181-1186, 2006; Cools et al., *Genes Chromosomes Cancer* 34: 354-362, 2002; Debelenko et al., *Lab. Invest.* 83: 1255-1265, 2003; Ma et al., *Genes Chromosomes Cancer* 37: 98-105, 2003; Lawrence et al., *Am. J. Pathol.* 157: 377-384, 1995; Hernandez et al., *Blood* 94: 3265-3268, 1999; Takeuchi K., *Clin Cancer Res.* 15(9):3143-3149, 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: 3204-3207, 2000. Véase también Pulford et al., *Journal of Cellular Physiology*, 199:330-358, 2004.

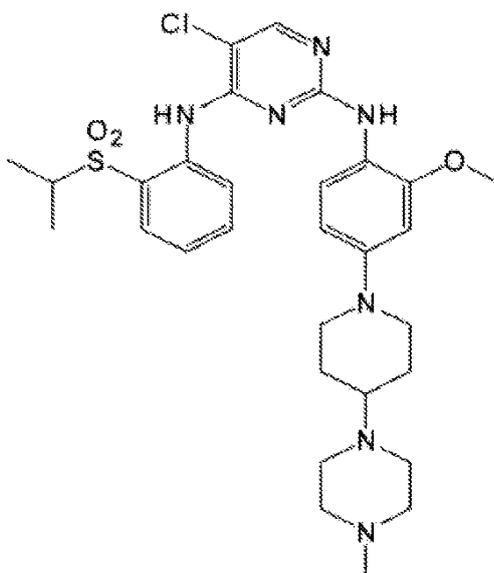
En diversas realizaciones, el paciente es un ser humano. En diversas realizaciones, el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón no microcítico o cáncer de pulmón microcítico.

Un inhibidor de la cinasa de molécula pequeña útil es el compuesto de Pfizer, Inc. crizotinib (también conocido como PF-02341066), que inhibe la actividad cinasa de ALK y MET, y sus propiedades están bien descritas. Véase You et al., *Cancer Res* 67: 4408 (2007) y la publicación de patente de Estados Unidos N.º 2008/0300273. Los inhibidores de cinasa de molécula pequeña adicionales que pueden dirigirse a ROS 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: 1617-1623, 2006).

PF-02341066 tiene la estructura:



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



y se ha demostrado que inhibe la cinasa ROSALK. Grosin, et al., Proc. National Acad. Sci 104(1) 270-275, 2007.

- 5 Inhibidores adicionales de molécula pequeña y otros inhibidores (*por ejemplo*, inhibidores indirectos) de la actividad de ROS cinasa pueden diseñarse racionalmente usando modelos cristalográficos de rayos X o por ordenador de la estructura tridimensional de la ROS, o pueden encontrarse mediante cribado de alto rendimiento de bibliotecas de compuestos para la inhibición de enzimas reguladoras aguas arriba clave y/o moléculas de unión necesarias, lo que da lugar a la inhibición de la actividad de ROS cinasa. Estas estrategias son muy conocidas en la técnica y han sido descritas. La inhibición de ROS por dichos agentes terapéuticos puede confirmarse, por ejemplo, examinando la capacidad del compuesto para inhibir la actividad ROS, pero no otra actividad cinasa, en un panel de cinasas, y/o examinando la inhibición de la actividad ROS en una muestra biológica que comprende células cancerosas (*por ejemplo*, células de cáncer de pulmón). Los métodos para identificar compuestos que inhiben un cáncer caracterizados por la expresión/presencia de polipéptido con actividad ROS cinasa, se describen adicionalmente a continuación.

Los productos terapéuticos inhibidores de ROS útiles en los métodos dados a conocer en el presente documento también pueden ser anticuerpos dirigidos que se unen específicamente a sitios o dominios críticos catalíticos o de unión requeridos para la actividad ROS e inhiben la cinasa 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, selección y uso terapéutico de anticuerpos específicos de dianas humanizadas ha sido bien descrito. Véase, Merluzzi et al., Adv. Clin. Path. 4 (2): 77-85 (2000). Están disponibles sistemas y tecnologías comerciales, tales como Morphosys, Inc.'s Human Combinatorial Antibody Library (HuCAL®), para la generación y selección de alta capacidad de procesamiento de anticuerpos inhibidores específicos de diana humanizados.

La producción de diversos anticuerpos dirigidos anti-receptores de cinasas y su uso para inhibir la actividad del receptor diana se ha descrito. Véase, *por ejemplo*, la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20040202655, la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20040086503, la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20040033543. En la técnica se conocen métodos estandarizados para producir y usar anticuerpos inhibidores de la actividad de la tirosina cinasa receptora. Véase, *por ejemplo*, la patente europea n.º EP1423428,

También pueden emplearse estrategias de presentación de fagos para generar inhibidores de anticuerpos específicos de ROS, y se describen protocolos para la construcción de bancos de bacteriófagos y la selección de anticuerpos recombinantes en el texto de referencia bien conocido CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Colligan et al. (eds.), John Wiley & Sons, Inc. (1992-2000), capítulo 17, sección 17.1. Véase también la patente de Estados Unidos n.º 6.319.690, la patente de Estados Unidos n.º 6.300.064, la patente de Estados Unidos n.º 5.840.479, y la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20030219839.

Puede producirse un banco de fragmentos de anticuerpos mostrados sobre la superficie de bacteriófagos (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 6.300.064) y se seleccionó según la unión a un polipéptido con actividad de ROS cinasa, tal como los polipéptidos de fusión de ROS descritos en la presente memoria. Un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de fusión de ROS (por ejemplo, un polipéptido de fusión SLC34A2-ROS (S)) o un polipéptido ROS de longitud completa se identifica como una molécula candidata para bloquear la activación constitutiva de ese polipéptido de fusión en una célula. Véase la patente europea n.º EP1423428.

Los anticuerpos dirigidos de unión a ROS identificados en la selección de bancos de anticuerpos, tal como se

describió anteriormente, después pueden seleccionarse para su capacidad para bloquear la actividad de ROS, en un ensayo de cinasas *in vitro* y en líneas celulares y/o tumores *in vivo*. La inhibición de ROS puede confirmarse, por ejemplo, examinando la capacidad de dicho compuesto terapéutico para inhibir la actividad ROS cinasa en un panel de cinasas, y/o examinando la inhibición de la actividad ROS en una muestra biológica que comprende células cancerosas, como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, un compuesto inhibidor de ROS dado a conocer en el presente documento reduce la actividad de ROS cinasa, pero reduce la actividad cinasa de otras cinasas en menor medida (o nada en absoluto). Los métodos para seleccionar dichos compuestos para la inhibición de ROS cinasa se describieron con más detalle anteriormente.

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

La actividad de ROS cinasa también puede inhibirse indirectamente usando un compuesto que inhibe la unión de una molécula activadora necesaria para ROS de longitud completa o un polipéptido de fusión de ROS (por ejemplo, un polipéptido de fusión CD74-ROS) para adoptar su conformación activa (es decir, tal que el dominio de ROS cinasa puede ser activado). Por ejemplo, se ha descrito la producción y el uso de anticuerpos anti-PDGF. Véase la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20030219839, "Anti-PDGF Antibodies and Methods for Producing Engineered Antibodies," Bowdish et al. La inhibición del ligando (PDGF) que se une al receptor regula negativamente de manera directa la actividad del receptor.

Los compuestos o agentes terapéuticos inhibidores de ROS pueden comprender también compuestos inhibidores de la transcripción o anti-sentido que inhiben la actividad de ROS cinasa bloqueando la transcripción del gen que codifica ROS de longitud completa o una proteína de fusión ROS. Se ha descrito la inhibición de diversos receptores de cinasas, que incluyen VEGFR, EGFR, e IGFR, y FGFR, por productos terapéuticos antisentido para el tratamiento del cáncer. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 6.734.017; 6. 710.174, 6.617.162; 6.340.674; 5.783.683; 5.610.288.

Pueden diseñarse y construirse oligonucleótidos antisentido y emplearse como agentes terapéuticos contra genes diana según técnicas convencionales. Véase, por ejemplo, Cohen, J., Trends in Pharmacol. Sci., 10(11): 435-437 (1989); Marcus-Sekura, Anal. Biochem., 172: 289-295 (1988); Weintraub, H., Sci. AM. Pp. 40-46 (1990); Van Der Krol et al., BioTechniques 6(10): 958-976 (1988); Skorski et al., Pro. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91: 4504-4508. La inhibición del crecimiento de carcinomas humanos *in vivo* empleando un inhibidor de ARN antisentido de EGFR se ha descrito en fechas recientes. Véase la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20040047847. De forma similar, un compuesto terapéutico inhibidor de ROS que comprende al menos un oligonucleótido antisentido contra un gen ROS de mamífero o un polinucleótido codificante de la proteína de fusión ROS de mamífero puede prepararse según métodos estándar. Pueden prepararse composiciones farmacéuticas que comprendan compuestos antisentido inhibidores de ROS 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 ROS a través del proceso de interferencia de ARN, también puede emplearse de modo deseable en los métodos de la invención. La interferencia de ARN y la silenciación selectiva de la expresión de la proteína diana mediante la introducción de moléculas de ARN bicatenarias pequeñas exógenas que comprenden una secuencia complementaria con el ARNm que codifica la proteína diana ha sido bien descrita. Véase, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20040038921, la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20020086356, y la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20040229266.

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

Una amplia diversidad de productos de ARNip específicos de diana, que incluyen vectores y sistemas para su expresión y uso en células de mamífero, están disponibles en el mercado. Véase, por ejemplo, Promega, Inc. (www.promega.com); Dharmacon, Inc. (www.dharmacon.com). Están disponibles manuales técnicos detallados sobre el diseño, la construcción y el uso de ARNbc para ARNi. Véase por ejemplo, Dharmacon's "RNAi Technical

Reference & Application Guide”; “RNAi: A Guide to Gene Silencing,” de Promega. También están disponibles en el mercado productos de ARNip inhibidores de ROS, y pueden emplearse de modo adecuado en el método de la invención. Véase, por ejemplo, Dharmacon, Inc., Lafayette, CO (n.º de cat. M-003162-03, MU-003162-03, D-003162-07 a -10 (siGENOME™ SMARTselection and SMARTpool® siRNAs).

5 Recientemente se ha establecido que los ARNbc pequeños con una longitud menor que 49 nucleótidos, y preferiblemente 19-25 nucleótidos, que comprenden al menos una secuencia que es sustancialmente idéntica a parte de una secuencia de ARNm diana, y dicho ARNbc tiene óptimamente al menos una proyección de 1-4 nucleótidos en un extremo, son los más eficaces en la mediación del ARNi en mamíferos. Véanse las publicaciones de patente de Estados Unidos n.º 20040038921 y 20040229266. La construcción de dichos ARNbc y su uso en preparaciones farmacéuticas para silenciar la expresión de una proteína diana *in vivo* se describe en detalle en dichas publicaciones.

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

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

30 Pueden emplearse diversos parámetros para determinar los sitios diana más adecuados dentro de la secuencia de ARN diana. Estos parámetros incluyen, pero no se limitan a la estructura secundaria o terciaria del ARN, la composición de bases nucleotídicas de la secuencia diana, el grado de homología entre diversas regiones de la secuencia diana, o la posición relativa de la secuencia diana dentro de la transcripción del ARN. Basándose en estas determinaciones, puede elegirse cualquier número de sitios diana dentro de la transcripción del ARN para seleccionar moléculas de ARNip según su eficacia, por ejemplo, empleando ensayos de ruptura de ARN *in vitro*, cultivos celulares o modelos animales. Véase, por ejemplo, la publicación de patente de los Estados Unidos n.º 20030170891. También se ha descrito recientemente un algoritmo para identificar y seleccionar sitios diana de ARNi. Véase la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20040236517.

40 Las técnicas de transferencia de genes que se emplean habitualmente incluyen los métodos de fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación y microinyección, y métodos víricos (Graham et al. (1973), *Virology*, 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 Tfx 50 (Promega Corp., Fitchburg, WI) o Lipofectamin 200 (Life Technologies, Carlsbad, CA). Como alternativa, pueden emplearse vectores víricos para transportar el ARNbc a una célula y mediar en el ARNi. Véase la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20040023390.

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

60 La interferencia de ARNip en un mamífero en un mamífero empleando moléculas de ARNbc preparadas después puede realizarse administrando una preparación farmacéutica que comprende el ARNbc al mamífero. La composición farmacéutica se administra en una dosificación suficiente para inhibir la expresión del gen diana. El ARNbc generalmente puede administrarse a una dosificación menor que 5 mg de ARNbc por kilogramo de peso corporal diarios, y es suficiente para inhibir o completamente suprimir la expresión del gen diana. En general, una dosis adecuada de ARNbc estará en el intervalo de 0,01 a 2,5 miligramos por kilogramo de peso corporal del receptor diarios, preferiblemente en el intervalo de 0,1 a 200 microgramos por kilogramo de peso corporal diarios, más preferiblemente en el intervalo de 0,1 a 100 microgramos por kilogramo de peso corporal diarios, aún más preferiblemente en el intervalo de 1,0 a 50 microgramos por kilogramo de peso corporal diarios, y lo más preferiblemente en el intervalo de 1,0 a 25 microgramos por kilogramo de peso corporal diarios. Una composición

farmacéutica que comprende el ARNbc se administra una vez diaria, o en múltiples subdosis, por ejemplo, empleando formulaciones de liberación sostenida muy conocidas en la técnica. La preparación y administración de dichas formulaciones farmacéuticas puede realizarse según técnicas convencionales, tal como se describe más a fondo a continuación.

5 Tal ARNbc puede utilizarse para inhibir la expresión y la actividad de ROS en un cáncer, preparando una preparación farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho ARNbc, como se ha descrito anteriormente, y administrando la preparación a un sujeto humano que tiene un cáncer de pulmón o posible
10 cáncer de pulmón (*por ejemplo*, un NSCLC o SCLC) que expresa un polipéptido con actividad ROS cinasa (tal como, por ejemplo, expresión aberrante de la proteína ROS de longitud completa o expresión de una proteína de fusión ROS), por ejemplo, mediante inyección directa al tumor. La inhibición similar de otros receptores de tirosina cinasa, tales como VEGFR y EGFR, empleando inhibidores de ARNip ha sido descrita recientemente. Véase la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20040209832, la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20030170891, y la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20040175703.

15 Los productos terapéuticos inhibidores de ROS útiles en la práctica de los métodos dados a conocer en el presente documento pueden administrarse a un mamífero por cualquier medio conocido en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, vías oral o peritoneal, incluyendo las vías intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, transdérmica (Aerosol), rectal, vaginal y tópica (incluyendo bucal y sublingual).

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

35 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 dadas a conocer en el presente documento en general se proporcionan en suspensiones o disoluciones acuosas estériles, tamponadas hasta un pH e isotonicidad apropiados. Los vehículos acuosos adecuados incluyen disolución de Ringer y cloruro de sodio isotónico. El vehículo puede consistir exclusivamente en un tampón acuoso (“exclusivamente” significa que no están presentes agentes auxiliares o sustancias encapsulantes que puedan afectar o mediar la captación del fármaco inhibidor de ROS).
40 Estas sustancias incluyen, por ejemplo, estructuras micelares, tales como liposomas o cápsulas, tal como se describe a continuación. Las suspensiones acuosas pueden incluir agente suspensores, tales como derivados de celulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona y 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.

45 Las composiciones terapéuticas inhibidoras de ROS pueden incluir también formulaciones encapsuladas para proteger el agente terapéutico (*por ejemplo*, un compuesto de ARNbc o un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de fusión de ROS) 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, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres, y poli(ácido láctico). Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener en el mercado en Alza Corporation y Nova
50 Pharmaceuticals, Inc. También se pueden usar suspensiones liposómicas (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos víricos) 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 de EEUU n.º 4.522.811; publicación PCT WO 91/06309; y publicación de patente europea EP-A-43075. Un formulación encapsulada puede comprender una proteína de la envuelta vírica. La proteína de la envuelta vírica puede derivarse o estar asociada con un virus, tal como un virus de polio, o puede ser parcial o totalmente artificial. Por ejemplo, la proteína de la envuelta puede ser una proteína de virus 1 y/o una proteína de virus 2 del virus del polio, o uno de sus derivados.

60 Los agentes terapéuticos inhibidores de ROS también pueden comprender 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, los métodos para la liberación de moléculas de ácido nucleico se describen en Akhtar et al., 1992, Trends Cell Bio., 2, 139; DELIVERY STRATEGIES FOR ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDE THERAPEUTICS, ed. Akhtar, 1995, Maurer et al., 1999, Mol. Membr. Biol.,
65 16, 129-140; Hofland y Huang, 1999, Handb. Exp. Pharmacol., 137, 165-192; y Lee et al., 2000, ACS Symp. Ser.,

752, 184-192. La patente de Estados Unidos n.º 6.395.713 y la publicación PCT n.º WO 94/02595 describen además los métodos generales para la administración de moléculas de ácido nucleico. Estos protocolos pueden utilizarse para el transporte de casi cualquier molécula de ácido nucleico.

5 Los agentes terapéuticos inhibidores de ROS (*es decir*, un compuesto inhibidor de ROS que se administra como un agente terapéutico) se puede administrar a un tumor de mamífero por diversos métodos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, encapsulación en liposomas, mediante iontoforesis, o por
10 incorporación en otros vehículos, tales como hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables y microesferas bioadhesivas, o mediante vectores proteínicos (véase la publicación PCT N.º WO 00/53722). Como alternativa, la combinación de producto terapéutico/vehículo se administra de modo local mediante una inyección directa o mediante el uso de una bomba de infusión. La inyección directa de la composición, 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 PCT n.º WO 99/3 1262.

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

25 Las vías de administración que conducen a una absorción sistémica (*por ejemplo*, absorción sistémica o acumulación de fármacos en la corriente sanguínea, seguido de su distribución a través de 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 ROS a un tumor o tejido enfermo accesible. Se ha demostrado que la velocidad de entrada de un fármaco hacia la circulación es una función del peso molecular o tamaño. El uso de un liposoma u otro vehículo de fármaco que comprende los compuestos dados a conocer en el presente documento puede localizar potencialmente el fármaco, en ciertos tipos de tejidos, tales como los tejidos del sistema endotelial reticular (RES). Una formulación de liposomas que puede facilitar la asociación del fármaco con la superficie de las células, tales como linfocitos y macrófagos, también es útil.
30 Esta estrategia puede proporcionar un transporte potenciado del fármaco a las células diana aprovechando la especificidad del reconocimiento inmunológico de los macrófagos y linfocitos de las células anómalas, tales como células del cáncer.

35 Una "formulación farmacéutica aceptable" significa una composición o formulación que permite la distribución eficaz de las moléculas de ácidos nucleicos dadas a conocer en el presente documento en la localización física más adecuada para su actividad deseada. Los ejemplos no limitantes de agentes adecuados para la formulación con las moléculas de ácidos nucleicos dadas a conocer en el presente documento incluyen: inhibidores de p-glicoproteínas (tales como Pluronic P85), que pueden potenciar la entrada de fármacos en el SNC (Jolliet-Riant y Tillement, 1999, Fundam. Clin. Pharmacol., 13, 16-26); polímeros biodegradables, tales como microesferas de poli(DL-lactida-coglicólido) para la administración de liberación sostenida después de la implantación intracerebral (Emerich et al, 1999, Cell Transplant, 8, 47-58) (Rosermes, Inc. Cambridge, Mass.); y nanopartículas cargadas, tales como las fabricadas con polibutiracrilato, que puede trasladar fármacos a través de la barrera hematoencefálica y pueden alterar los mecanismos de captación neuronal (Prog Neuro-psychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999). Otros ejemplos no limitantes de estrategias de liberación para los compuestos inhibidores de ROS útiles en el método dado a conocer en el presente documento 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.

40 Las composiciones terapéuticas que comprenden liposomas con superficie modificada que contienen lípidos de polietilenglicol (modificados con PEG, o liposomas de largo tiempo en circulación o liposomas sigilosos) también pueden emplearse de modo adecuado en los métodos dados a conocer en el presente documento. Estas formulaciones ofrecen un método para aumentar la acumulación de fármacos en tejidos diana. Esta clase de vehículos de fármacos resiste a la opsonización y la eliminación por el sistema fagocítico mononuclear (MPS o RES), y por tanto permiten conseguir unos tiempos en la circulación sanguínea más largos y una mayor exposición de los tejidos para el fármaco encapsulado (Lasic et al. Chem. Rev., 1995, 95, 2601-2627; Ishiwata et al., Chem. Pharm. Bull. 1995, 43, 1005-1011). Estos liposomas han demostrado acumularse selectivamente en tumores, probablemente debido a la extravasación y la captura en los tejidos diana neovascularizados (Lasic et al., Science 1995, 267, 1275-1276; Oku et al., 1995, Biochim. Biophys. Acta, 1238, 86-90). Los liposomas de tiempo de circulación largo potencian la farmacocinética y la farmacodinámica del ADN y ARN, en particular comparado con los liposomas catiónicos convencionales que se sabe que se acumulan en tejidos del MPS (Liu et al., J. Biol. Chem. 1995, 42,
65

24864-24870; Publicación PCT N.º WO 96/10391; Publicación PCT N.º WO 96/10390; y Publicación PCT N.º WO 96/10392). También es probable que los liposomas de largo tiempo en circulación protejan a los fármacos frente a la degradación por nucleasas en un grado mayor que los liposomas catiónicos, basándose en su capacidad para evitar la acumulación en tejidos de MPS metabólicamente agresivos, tales como el hígado y el bazo.

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

En algunas realizaciones, el agente terapéutico inhibidor de ROS y/o el agente terapéutico inhibidor de ALK/ROS se administra en una cantidad eficaz. Por "cantidad eficaz" o "dosis eficaz" se entiende la cantidad de la terapia requerida para prevenir, inhibir la aparición o tratar (aliviar un síntoma hasta cierto punto, 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 artes médicas reconocen. 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 por kilogramo de peso corporal diarios son útiles en el tratamiento de los trastornos indicados anteriormente (de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 7 g por paciente diarios). La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con los materiales vehículo para producir una forma de dosificación única varía dependiendo del hospedante tratado y del modo particular de administración. Las formas de dosificación unitaria en general contienen entre aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg de un ingrediente activo. Se entiende que el nivel de dosis específica para cualquier paciente concreto depende de una diversidad de factores, que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el momento de la administración, la vía de administración y la velocidad de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad concreta sometida a terapia.

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

Un fármaco terapéutico inhibidor de ROS dado a conocer en el presente documento puede comprender un solo compuesto como se ha descrito anteriormente, o una combinación de múltiples compuestos, ya sea en la misma clase de inhibidor (*por ejemplo*, anticuerpo inhibidor), o en diferentes clases (*por ejemplo*, Inhibidores de anticuerpos e inhibidores de molécula pequeña). Esta combinación de compuestos puede aumentar el efecto terapéutico global mediante la inhibición del avance de un cáncer que expresa la proteína de fusión. Por ejemplo, la composición terapéutica puede incluir un inhibidor de molécula pequeña, tal como crizotinib (también conocido como PF-02341066) producido por Pfizer, Inc. (véase la publicación de Estados Unidos n.º 2008/0300273) solo o en combinación con otros análogos de Crizotinib dirigidos a la actividad de ROS y/o inhibidores de molécula pequeña de ROS, 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. Estas combinaciones han demostrado recientemente que proporcionan un efecto sinérgico de destrucción del tumor en muchos cánceres. La eficacia de dichas combinaciones para inhibir la actividad de ROS y el crecimiento tumoral *in vivo* puede evaluarse como se describe a continuación.

También se describe un método para determinar si un compuesto inhibe la progresión de un cáncer (por ejemplo, cáncer de pulmón) caracterizado por la expresión de un polipéptido con actividad ROS cinasa, o oligonucleótido que codifica el mismo, determinando si el compuesto inhibe la expresión de actividad ROS cinasa del polipéptido en el cáncer. La inhibición de la actividad de ROS puede determinarse examinando una muestra biológica que comprende células de médula ósea, sangre o un tumor, o utilizando al menos reactivo que se une específicamente a un polipéptido ROS (por ejemplo, un anticuerpo específico de ROS) o un reactivo que se une específicamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido de ROS (por ejemplo, un ARNip o un antisentido ROS).

El compuesto ensayado puede ser cualquier tipo de producto terapéutico o composición, tal como se describió anteriormente. Los métodos para evaluar la eficacia de un compuesto, *in vitro* e *in vivo*, están bien establecidos y son conocidos en la técnica. Por ejemplo, una composición puede ensayarse para su capacidad para inhibir a ROS *in vitro* empleando una célula o un extracto celular en el que la ROS cinasa está activada. Puede emplearse un

panel de compuestos para ensayar la especificidad del compuesto para ROS (en oposición a otras dianas, tales como EGFR o PDGFR).

5 Otra técnica para el cribado de fármacos que puede usarse proporciona un cribado de alto rendimiento de compuestos que tienen afinidad de unión adecuada a una proteína de interés, como se describe en la publicación PCT WO 84/03564. En este método, al igual que se aplica a los polipéptidos de actividad ROS (por ejemplo, proteína ROS de longitud completa o una de las múltiples proteínas de fusión ROS), se sintetiza un gran número de compuestos de ensayo pequeños diferentes sobre un sustrato sólido, tal como varillas de plástico o alguna otra superficie. Los compuestos de ensayo se hacen reaccionar con un polipéptido dado a conocer en el presente documento, o fragmentos de los mismos, y se lavan. El polipéptido unido (por ejemplo, los polipéptidos de fusión SLC34A2-ROS(VS), SLC34A2-ROS(S), SLC34A2-ROS(L), CD74-ROS, FIG-ROS(S), FIG-ROS(L), or FIG-ROS(XL)) o el polipéptido de ROS de longitud completa) después se detecta mediante métodos muy conocidos en la técnica. Un polipéptido purificado también se puede recubrir directamente sobre placas para su uso en las técnicas de cribado de fármacos anteriormente mencionadas. Como alternativa, pueden emplearse anticuerpos no neutralizantes para capturar el péptido e inmovilizarlo sobre un soporte sólido.

20 Un compuesto que se ha descubierto que es un inhibidor eficaz de la actividad ROS *in vitro* después puede estudiarse para determinar su capacidad para inhibir la progresión de un cáncer que expresa el polipéptido con actividad cinasa (tales como cáncer de pulmón u otro tipo de cáncer, como cáncer de hígado, 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 de ROS cinasa. En este procedimiento, líneas celulares que se sabe que expresan una proteína que tiene actividad ROS cinasa (por ejemplo, ROS de longitud completa o una de las proteínas de fusión ROS) puede colocarse subcutáneamente en un animal (por ejemplo, en un ratón desnudo o SCID u otro animal inmunocomprometido). Las células después crecen para producir una masa tumoral que puede controlarse de modo visual. El animal puede a continuación tratarse con el fármaco. El efecto del tratamiento con el fármaco sobre el tamaño del tumor puede observarse externamente. A continuación se sacrifica al ratón y se extirpa el tumor para su análisis mediante IHC y transferencia de Western. De forma similar, los trasplantes de médula ósea de mamíferos pueden prepararse, mediante métodos estándar, para examinar la respuesta a los fármacos en tumores hematológicos que expresan una proteína con actividad ROS cinasa. De esta forma, los efectos del fármaco pueden observarse en un emplazamiento biológico que se parece mucho a un paciente. La capacidad del fármaco para alterar la señalización en las células tumorales o en las células estromales circundantes puede determinarse mediante un análisis con anticuerpos específicos de la fosforilación. La eficacia del fármaco para inducir la muerte celular o la inhibición de la proliferación celular también puede observarse mediante un análisis con marcadores específicos de la apoptosis, tales como caspasa 3 rota y PARP rota.

35 Puede determinarse la toxicidad y la eficacia terapéutica de dichos compuestos mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD50 (la dosis letal para 50% de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz en 50% de la población). La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, y puede expresarse como la proporción de DL50/DE50. En algunas realizaciones, los compuestos exhiben altos índices terapéuticos.

45 En la práctica del método divulgado para determinar si un compuesto inhibe la progresión de un tumor caracterizado por la presencia de un polipéptido con actividad ROS cinasa (o polinucleótido que codifica el mismo), también pueden usarse de forma ventajosa muestras biológicas que comprenden células de xenoinjertos de mamíferos (o trasplantes de médula ósea). Los xenoinjertos no limitantes (o receptores de trasplante) son pequeños mamíferos, tales como ratones, que albergan tumores humanos (o leucemias) que expresan un polipéptido con actividad ROS cinasa (por ejemplo, un polipéptido de fusión ROSCD74-ROS o FIG-ROS(S)) o ROS de longitud completa). Los xenoinjertos que portan tumores humanos son muy conocidos en la técnica (véase Kal, Cancer Treat Res., 72: 155-169 (1995)), y la producción de xenoinjertos de mamífero que portan tumores humanos ha sido bien descrita (véase, Winograd et al., In Vivo, 1 (1): 1-13 (1987)). De manera similar, la generación y el uso de modelos de trasplante de médula ósea está bien descrito (véase, por ejemplo, Schwaller, et al., EMBOJ. 17: 5321-333 (1998); Kelly et al., Blood, 99: 310-318 (2002)).

55 Los siguientes ejemplos se proporcionan solo para ilustrar más a fondo la invención y no pretenden limitar su alcance, excepto tal como se proporciona en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención incluye modificaciones y variaciones de los métodos indicados en la presente que son obvias para los expertos en la técnica. Los materiales, reactivos y similares a los que se hace referencia pueden obtenerse a partir de fuentes comerciales, a menos que se indique lo contrario.

60 Ejemplo 1 - Ejemplo de referencia

Identificación de la actividad de ROS cinasa en una línea celular de NSCLC mediante perfiles de fosfopéptidos globales

65 El perfil de fosforilación global de la activación de cinasa en varias líneas celulares de NSCLC humano, incluyendo

HCC78, se examinaron usando la técnica IAP para el aislamiento y la caracterización por espectrometría de masas de péptidos modificados de mezclas complejas (véanse las patentes de Estados Unidos n.º 7.300.753 y 7.198.896). La técnica IAP se realizó empleando un anticuerpo específico de fosfotirosina (disponible comercialmente a través de CELL SIGNALING TECHNOLOGY, INC., Danver, MA, n.º de catálogo 9411) para aislar y posteriormente

5

caracterizar los péptidos que contienen fosfotirosina a partir de extractos de las líneas celulares de NSCLC.

De forma específica, se empleó la estrategia IAP para facilitar la identificación de las tirosina cinasas activadas en las líneas celulares de NSCLC, para identificar nuevos directores de esta enfermedad.

10 Cultivo celular.

Las células HCC78 se obtuvieron en DSMZ (German National Resource Centre for Biological Material), se cultivaron en medio RPMI-1640 (Invitrogen) con suero bovino fetal al 10% (FBS) (Sigma).

15 Inmunoprecipitación de fosfopéptidos.

Un total de 2×10^8 células se lisaron en tampón de lisis de urea (HEPES 20 mM pH 8,0, urea 9M, vanadato sódico 1 mM, pirofosfato sódico 2,5 mM, beta-glicerofosfato 1mM) a 1.25×10^8 células/ml y se sonicaron. Los lisados sonicados se aclararon mediante centrifugación a 20.000 x g, y las proteínas se redujeron y alquilaron tal como se ha descrito previamente (véase, Rush et al., Nat. Biotechnol., 23(1): 94-101 (2005)). Las muestras se diluyeron con HEPES 20 mM, pH 8,0, hasta una concentración final de urea de 2 M. Se añadió tripsina (1 mg/ml en HCl 0.001 M) al lisado aclarado a 1:100 en v/v. Las muestras se digirieron durante la noche a temperatura ambiente.

20

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

25

30

El anticuerpo monoclonal de fosfotirosina P-Tyr-100 (Cell Signaling Technology) procedente de fluido de ascitis se acopló de modo no covalente a esferas de agarosa-proteína G (Roche) a 4 mg/ml de esferas durante la noche a 4°C. Después del acoplamiento, la resina-anticuerpo se lavó dos veces con PBS y tres veces con tampón MOPS. Se añadió el anticuerpo inmovilizado (40 µl, 160 µg) como una suspensión 1:1 en tampón MOPS IP a la fracción de péptidos solubilizada, y la mezcla se incubó durante la noche a 4°C. Las esferas de anticuerpos inmovilizados se lavaron tres veces con tampón MOPS y dos veces con ddH₂O. Los péptidos se eluyeron dos veces a partir de perlas por incubación con 40 µl de TFA al 0.15 % durante 20 minutos cada uno, y las fracciones se combinaron.

35

Análisis mediante espectrometría de masas LC-MS/MS.

40

Los péptidos en el eluato de IP (40 µl) se concentraron y se separaron del anticuerpo eluido empleando puntas de extracción Stop and Go (StageTips) (véase, Rappsilber et al., Anal. Chem., 75(3): 663-70 (2003)). Los péptidos se eluyeron de las microcolumnas con 1 µl de MeCN al 60 %, TFA al 0,1 % en 7.6 µl de ácido acético al 0.4 % / ácido heptafluorobutírico al 0.005 % (HFBA). La muestra se cargó en una columna capilar de 10 cm x 75 µm PicoFrit (New Objective) cargada con resina de fase inversa Magic C18 AQ (Michrom Bioresources) empleando un muestreador automático Famos con una válvula de inyección de muestras inerte (Dionex). La columna se reveló con un gradiente lineal de 45 min de acetoniitrilo en ácido acético al 0,4%, HFBA al 0,005%, administrado a 280 nl/min (Ultimate, Dionex).

45

50

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

Análisis de la base de datos y asignaciones.

55

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

60

65

los espectros recogidos de las digestiones con elastasa.

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

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

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

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

Los anteriores análisis de IAP identificaron 454 péptidos que contienen fosfotirosina no redundantes, 395 sitios de fosfotirosina, y 240 proteínas fosforiladas en tirosina, la mayoría de los cuales son nuevos, procedentes de células HCC78 (los datos no se muestran). Entre las cinasas con tirosina fosforilada se encontraban varias de las que no se detectan normalmente mediante un análisis de MS en otras líneas celulares de NSCLC (datos sin publicar), que incluyen la ROS cinasa.

Ejemplo 2 - Ejemplo de referencia

Detección de la expresión de la ROS-cinasa mutante en una muestra de cáncer humano usando perfil global de fosfopéptido

Con el fin de confirmar aún más la incidencia de la mutación de de la fusión de ROS en NSCLC humano, se examinaron varios tumores de NSCLC humanos usando la técnica IAP de perfilación global de fosfopéptidos descrita anteriormente (véase el Ejemplo 1) para identificar los fosfopéptidos de ROS en estos tumores. Se obtuvieron muestras de tumores (tumores disecados congelados y mantenidos en nitrógeno líquido) de un colaborador clínico en China (Second Xiangya Hospital, Central South University Changsha, Hunan, P.R. China).

Brevemente, entre aproximadamente 300 miligramos y 500 miligramos de tejido tumoral se homogeneizaron. Por ejemplo, el tejido se homogeneizó y lisó en tampón de lisis de urea (HEPES 20 mM pH 8,0, urea 9M, vanadato sódico 1 mM, pirofosfato sódico 2,5 mM, beta-glicerofosfato 1mM) a 1.25×10^8 células/ml y se sonicaron. Los lisados sonicados se aclararon mediante centrifugación a 20.000 x g, y las proteínas se redujeron y alquilaron tal como se ha descrito previamente (véase, Rush et al., Nat. Biotechnol., 23(1): 94-101 (2005)). Las muestras se diluyeron con HEPES 20 mM, pH 8,0, hasta una concentración final de urea de 2 M. Se añadió tripsina (1 mg/ml en HCl 0.001 M)

al lisado aclarado a 1:100 en v/v. Las muestras se digirieron durante la noche a temperatura ambiente.

5 El perfil global de fosfotirosina de estas muestras se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 1 anterior. Los resultados del perfil revelaron que una de las muestras tumorales contenía fosfopéptidos de ROS y fosfopéptidos de SLC34A2 (véase la siguiente Tabla 1 (otros fosfopéptidos detectados no mostrados) y moléculas aguas abajo, tales como fosfopéptidos IRS-1 e IRS-2. La firma de perfil de tirosina de este tumor es muy similar a la de la línea celular de NSCLC HCC78 (véase la Tabla 3, como se esperaba. El análisis FISH también mostró que el tumor tenía una translocación de ROS (véase el Ejemplo 10 más adelante). RT-PCR, el ensayo de secuenciación de ADN puede usarse para confirmar que la activación de ROS en este paciente (y otros pacientes que albergan la translocación ROS) se debe a la transcripción aberrante de SLC34A2 / ROS.

10

Tabla 3. Perfil de fosfopéptidos de tumores de NSCLC humano.

Nombre	Referencia	Sitio	Péptidos	SEQ ID NO.	HCC78 (línea celular)	cs042 (tumor)
			GLAAGVGLANACyAIHTLPTQEEIE			
ROS	P08922	1923	NLPAFPR	35	1	1
			DlyKNDYYR; DlyKNDYYR; DlyKNDYYR;	36; 37		
ROS	P08922	2110	DlyKNDyyRKRGEGLLPVR	36;	12	4
ROS	P08922	2114	DlyKNDyyRKRGEGLLPVR	37	11	3
			DIYKNDyYR;	36;		
ROS	P08922	2115	DlyKNDyyRKRGEGLLPVR			
			EGLNyMVLATECGQGEEK;	37		
			NREGLNyMVLATECGQGEEK;	38;		
			EGLNyMVLATECGQGEEKSEGPLG	39;	1	1
			SQESESCGLR;	40; 41		
			NREGLNyMVLATECGQGEEKSEGP			
ROS	P08922	2274	LGSQESESCGLR		20	
			QVAyCPSGKPEGLNYACLTHSGYG DGSD;	42		
ROS	P08922	2323	QVAyCPSGKPEGLNYACLTHSGyG		4	1
			DGSD;			
			QVAyCPSGKPEGLNyACLTHSGYG DGSD			
			QVAyCPSGKPEGLNYACLTHSGYG DGSD;	42		
			QVAyCPSGKPEGLNYACLTHSGYG DGSD;			
ROS	P08922	2334	DGSD		7	2
			QVAyCPSGKPEGLNYACLTHSGYG DGSD;	42		
			QVAyCPSGKPEGLNYACLTHSGyG			
ROS	P08922	2342	DGSD		3	
			GGHHRPDSSTLHTDDGyMPMSPGV	43		
IRS-1	P35568	612	APVPSGR			1
IRS-1	P35568	632	KGSGDyMPMSPK	44	2	1
			VDPNGyMMMSPSGGCSPDIGGGS	45		
IRS-1	P35568	662	SSSSSSNAVPSGTSYGK		3	
IRS-2	Q9Y4H ₂	598	QRPVPQPSSASLDEyTLMR	46		1
			SSSSNLGADDGyMPMTPGAALAGS	47		
IRS-2	Q9Y4H ₂	653	GSGSCR		4	5
IRS-2	Q9Y4H ₂	675	SDDyMPMSPASVSAPK	48	3	4

Nombre	Referencia	Sitio	Péptidos	SEQ ID NO.	HCC78 (línea celular)	cs042 (tumor)
IRS-2	Q9Y4H ₂	742	ASSPAESSPEDSGyMR	49	3	3
			APYTCGGDSDQyVLMSSPVGR;	50		
IRS-2	Q9Y4H ₂	823	SYKAPYTCGGDSDQyVLMSSPVGR		2	5
SLC34A			IELLPSySTATLIDEPTVDDPWNL	51		
2	095436	54	TLQDSGIK		1	1

Ejemplo 3 - Ejemplo de referencia

Análisis de transferencia de Western de la expresión de ROS cinasa en una línea celular de NSCLC

5 La observación de que la línea celular de NSCLC HCC78 (pero no las otras líneas celulares de NSCLC) expresa una ROS cinasa activada se confirmó mediante un análisis de la transferencia de Western de extractos celulares empleando anticuerpos específicos para ROS y otros receptores de tirosina cinasa (RTK) y cinasas corriente abajo.

10 Las células HCC78 se lisaron en 1 x tampón de lisis celular (Cell Signaling Technology) suplementado con Protease Arrest™ (G Biosciencias) y se separaron mediante electroforesis. Todos los anticuerpos y reactivos para la inmunotransferencia procedieron de Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA). La transferencia de Western se realizó como se describe en "Western Immunoblotting Protocol" (Cell Signaling Technology, Inc., 2005-2006 catalogue). El anticuerpo anti-ROS se obtuvo en Santa Cruz Biotechnology, Inc.

15 La Figura 1 muestra los resultados de de la transferencia de Western. Solo HCC78 expresa la proteína ROS entre muchas líneas celulares de NSCLC diferentes. La proteína de ROS en HCC78 tiene un peso molecular mucho menor que la proteína ROS de tipo silvestre, lo cual indica una proteína de fusión.

20 La transferencia de Western confirma que la proteína de fusión de ROS está fosforilada en la tirosina. El lisado de proteínas procedente de las células HCC78 se inmunoprecipitó con un anticuerpo de fosfotirosina, y se inmunotransfirió con el anticuerpo de ROS total. Se detectaron las mismas bandas de pY-iP que en el lisado total por el anticuerpo de ROS, teniendo las bandas IPed una migración un poco más lenta, lo cual también indica la fosforilación de la proteína.

25 Ejemplo 4 - Ejemplo de referencia

Inhibición del crecimiento de líneas celulares de NSCLC de mamífero que expresan ROS cinasa empleando ARNip

30 Para confirmar que la forma truncada de ROS está dirigiendo el crecimiento y la supervivencia de las células en la línea celular HCC78, se estudió la capacidad del ARNip silenciador para inhibir el crecimiento de estas células. La expresión de ROS se reguló por disminución mediante interferencia de ARN. Se encargó el siguiente ARNip de ROS a Proligo, Inc., indicándose las correspondientes secuencias de ROS entre paréntesis: 5'AAGCCCGGAUGGCAACGUUTT3' (ROS 1(6318-6340) (SEQ ID NO: 31); 5'AAGCCUGAAGGCCUGAACUTT3' (ROS 1(7181-7203) (SEQ ID NO: 32).

35 Se sembraron 2x10⁵ 105 células en placas de 12 pocillos el día anterior a la transfección. Se transfectaron 100 nM de ARNip de ROS1 empleando el reactivo de transfección Mirus TransIT-TKO. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se trasladaron a un medio de inanición manteniéndose en este durante 24 horas más. Las células se recolectaron mediante tripsinización y después se contaron, y el lisado celular se empleó en WB para comprobar el nivel de proteínas de ROS.

40 Un análisis de inmunotransferencia reveló que la expresión de ROS se redujo específica y significativamente a las 72 horas después de la transfección del ARNip a las células HCC78, y que la línea celular control H2066 no expresa la proteína de ROS (véase la figura 2, panel B). A esto le acompaña una disminución en la fosforilación de los sustratos aguas abajo, tales como p-Erk1/2 y p-Akt, tal como se esperaba (véase la figura 2, panel C). Además, tal como se esperaba, el tratamiento con ARNip de ROS produjo un aumento en la apoptosis de la línea celular HCC78 (pero no en la línea celular control H2066), según se determina mediante la detección de la PARP rota (véase la figura 2, panel B).). El 80 % de las células murieron 3 días después de la transfección con ARNip de ROS, según se muestra en la figura 2, panel A. Estos resultados indican que la ROS cinasa mutante/truncada en la línea celular HCC78 está dirigiendo la proliferación y el crecimiento de estas células NSCLC, y que este crecimiento y proliferación pueden ser inhibidos empleando ARNip para inhibir la expresión de ROS cinasa.

55 Ejemplo 5 - Ejemplo de referencia

Aislamiento y secuenciación del gen de fusión de SLC34A2-ROS

Dada la presencia de la forma truncada de la ROS cinasa detectada en una línea celular de NSCLC (HCC78), se realizó una amplificación rápida 5' de los extremos del ADNc en la secuencia que codifica el dominio cinasas de ROS, para determinar si está presente un transcrito de ROS quimérico.

Amplificación rápida de los extremos del ADN complementario

Se empleó el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) para extraer el ARN de la línea celular HCC78. El ADN se extrajo con el uso del kit DNeasy Tissue Kit (Qiagen). La amplificación rápida de los extremos del ADNc se realizó con el uso del sistema 5' RACE (Invitrogen) con los cebadores ROS-GSP1 para la síntesis del ADNc, y ROS-GSP2 y ROS-GSP3 para una reacción de PCR anidada.

Ensayo de PCR

Para la RT-PCR, se sintetizó ADNc de primera hebra a partir de 2,5 µg de ARN total empleando el sistema de síntesis de primera hebra SuperScript™ III (Invitrogen) con oligo (dT)₂₀ (comercialmente disponible en Invitrogen, Carlsbad, CA, n.º de catálogo 18080). Después, el gen de fusión de SLC34A2-ROS se amplificó mediante el uso de las parejas de cebadores SLCROS-F1 y SLCROS-R1, SLCROS-F2 y SLCROS-R2.

Construcciones

El marco de lectura abierto del gen de fusión de SLC34A2-ROS se amplificó mediante PCR a partir del ADNc de células HCC78 empleando la ADN polimerasa de alta fidelidad Platinum Taq (Invitrogen) y las parejas de cebadores SLC-Fb y ROS-Rb (con un sitio de restricción Bgl II). Este producto de la PCR se clonó en el vector retroviral MSCV-Neo. Los cebadores fueron:

ROS-GSP1: ACCCTTCTCGGTTCTTCGTTTCCA (SEQ ID NO: 9)

ROS-GSP2: GCAGCTCAGCCAACCTTTGTCTT (SEQ ID NO: 10)

ROS-GSP3: TGCCAGACAAAGGTCAGTGGGATT (SEQ ID NO: 11)

SLCROS-F1: TCCATCCCAGCACCTGCGGAG (SEQ ID NO: 18)

SLCROS-R1: CTCAACTCTCTATTTCCCAAACAACGC (SEQ ID NO: 20)

SLCROS-F2: CATGGCTCCCTGGCCTGAATTG (SEQ ID NO: 19)

SLCROS-R2: CAACGCTATTAATCAGACCCATCTCC (SEQ ID NO: 21)

SLC-Fb: GAAGATCTCTGACCATGGCTCCCTGGCCTGAA (SEQ ID NO: 33)

ROS-Rb: GAAGATCTACGCTATTAATCAGACCCATCTCC (SEQ ID NO: 34)

El producto de amplificación por PCR se detectó después de 2 rondas. El análisis de la secuencia de 5' a ROS mediante 5' RACE identificó que la cinasa estaba fusionada con el N-terminal de SLC34A2. El análisis de la secuencia del producto resultante reveló que el terminal C de ROS estaba fusionado con el extremo N del gen SLC34A2 (véanse las Fig. 3C y 3D). El gen de fusión de SLC34A2-ROS estaba dentro del marco y fusionado con los primeros 126 aminoácidos de SLC34A2 hasta los últimos 598 o 495 aminoácidos de ROS (véase la figura 3B, Con la flecha en 1750 mostrando la ruptura para los 598 aminoácidos en C-terminal y la flecha en 1853 mostrando la ruptura para los 495 aminoácidos en C-terminal), respectivamente, resultando en dos variantes de proteína de fusión (larga, corta). Un análisis de la estructura génica predijo otra variante, la variante muy corta, que se espera que comprenda los primeros 126 aminoácidos de SLC34A2 con los últimos 467 aminoácidos de ROS (véase la figura 3E). SLC34A2 se encontraba en el cromosoma 4p15, mientras que ROS fue en el cromosoma 6q22. Así, el gen de fusión fue creado por t (4; 6) (p15; q22). Véase la Fig. 3A.

Las secuencias de aminoácidos y ácido nucleico de la SLC34A2-ROS predicha (VS) (es decir, variante muy corta) se proporcionan en las SEQ ID NO: 28 y 29 respectivamente.

Las secuencias de las fusiones SLC34A2 se muestran en la Figura 4A (variante larga, secuencia de aminoácidos superior, secuencia de ácido nucleico inferior) y Figura 4B (variante corta, aminoácido superior, ácido nucleico inferior). La secuencia de aminoácidos y ácido nucleico de la proteína SLC34A2 humana se proporciona en la Figura 5, donde los residuos implicados en la translocación están subrayados.

De forma similar, la secuencia de aminoácidos y la secuencia de ácido nucleico de la proteína ROS humana se

muestran en las Figuras 6A y 6B, respectivamente. En las figuras 6A y 6B, los restos implicados en la translocación de la variante (larga) de SLC34A2-ROS están subrayados, los restos en negrita subrayados son los implicados en la translocación de la variante (corta) y los restos rojos, en negrita y subrayados son los implicados en la translocación de la variante predicha (muy corta).

5 La fusión de SLC34A2 y ROS para las versiones corta y larga se confirmaron mediante PCR con transcriptasa inversa en el ARN.

Ejemplo 6 - Ejemplo de referencia

10 La proteína de fusión de SLC34A2-ROS dirige el crecimiento y la supervivencia de células 293 transfectadas.

15 Para confirmar que la expresión de la proteína de fusión de SLC34A2-ROS puede transformar células normales en un fenotipo canceroso, células de riñón embrionario humanas (células 293) se transfectaron con la construcción de ADNc descrita anteriormente, que codifica la variante larga de la proteína de fusión de SLC34A2-ROS.

20 La construcción de ADNc de SLC34A2-ROS descrita anteriormente (que codifica la proteína de fusión de variante larga) se insertó en un vector de virus MSCV y se transfectó en células HEK293 usando reactivo de transfección SuperFect (comercialmente disponible de Qiaagen, Valencia, CA). Cuarenta y ocho horas después, las células HEK293 transfectadas se recolectaron y se comprobaron mediante transferencia de Western para confirmar la expresión de la proteína de fusión de SLC34A2-ROS recombinante (variante larga) con el peso molecular esperado (véase la figura 7).

Ejemplo 7 - Ejemplo de referencia

25 La proteína de fusión de SLC34A2-ROS dirige el crecimiento y la supervivencia de una línea de células de mamífero transformadas.

30 Para confirmar que la expresión de la proteína de fusión de SLC34A2-ROS puede transformar células normales en un fenotipo canceroso, pueden transformarse células 3T3 con una construcción de ADNc descrita anteriormente. Las células se mantienen en medio DMEM (Invitrogen) con suero de ternera fetal al 10 % (FCS) (Invitrogen, Carlsbad, CA).

35 La producción del sobrenadante retroviral y la transducción se realizan como se ha descrito previamente. Véase Schwaller et al., Embo J. 17(18): 5321-33 (1998). Las células 3T3 se transducen con el sobrenadante retroviral que contiene los vectores MSCV-Neo o MSCV-Neo/SLC34A2-ROS (largo) o MSCV-Neo/ROS (corto), respectivamente, y se seleccionaron para G418 (500 ug/ml). Las células transfectadas de forma estable se emplean en un ensayo de agar blando para confirmar que SLC34A2-ROS transformará a las células 3T3.

40 Este análisis confirmará que la expresión de la proteína de fusión de SLC34A2-ROS transforma a las células 3T3 de modo que el crecimiento celular sea independiente de la unión a un sustrato. Después se realiza un análisis de la transferencia de Western para comprobar el estado de fosforilación de ROS, SLC34A2, SFIP-1 y otras posibles dianas de ROS aguas abajo.

45 Ejemplo 8 - Ejemplo de referencia

Aislamiento y secuenciación del gen de fusión de CD74-ROS

50 Un segundo lote de varios tumores NSCLC humanos (incluyendo el tumor del paciente CD042) se tamizaron también usando la técnica IAP de perfiles globales de fosfopéptidos usando los métodos descritos en los Ejemplos 1 y 2. Se detectó ROS cinasa fosforilada en el paciente CD042. Para determinar si esta ROS cinasa presente en este paciente era una fusión entre la proteína SLC34A2 y la proteína ROS cinasa, se realizó una rápida amplificación 5' de los extremos del ADNc en la secuencia que codifica el dominio cinasa de ROS con el fin de determinar si un transcrito ROS quimérico estaba presente en esos pacientes. De manera interesante, como se describe más adelante, se encontró otro gen de fusión ROS usando este método, a saber, una fusión entre CD74 y ROS.

60 Como se describe en el Ejemplo 4, se usó el RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) para extraer ARN del tejido tumoral. El sistema 5' RACE (comercialmente disponible de Invitrogen (parte de Life Technologies, Inc.), Carlsbad, CA) se usó con los cebadores ROS-GSP1 para la síntesis de ADNc y ROS-GSP2 y ROS-GSP3 para una reacción de PCR anidada.

Ensayo de PCR

65 Para RT-PCR, el ADNc de primera hebra se sintetizó a partir de 2,5 µg de ARN total con el uso de SuperScript™ III (Invitrogen) con oligo (dT)₂₀ (Invitrogen n.º cat. 18080). Después, el gen de fusión de CD74-ROS se amplificó con el uso de parejas de cebadores CD74-F1 y ROS-GSP3:

ROS-GSP1: ACCCTTCTCGGTTCTTCGTTTCCA (SEQ ID NO: 9)

ROS-GSP2: GCAGCTCAGCCAACTCTTTGTCTT (SEQ ID NO: 10)

ROS-GSP3: TGCCAGACAAAGGTCAGTGGGATT (SEQ ID NO: 11)

CD74-F1: GCAGAATGCCACCAAGTATGGCAA (SEQ ID NO: 26)

El análisis de la secuencia del producto resultante reveló que el terminal C de ROS estaba fusionado con el extremo N del gen CD74 (véase la Fig. 8, paneles B y C). El gen de fusión de CD74-ROS estaba dentro de marco y condensa los primeros 208 aminoácidos de CD74 con los últimos 495 aminoácidos de ROS (véase la figura 8, panel B), lo cual resulta en una proteína de fusión. CD74 se encontraba en el cromosoma 5q32, mientras que ROS fue en el cromosoma 6q22 (véase la fig. 8, panel A). Así, se creó el gen de fusión mediante t(5;6)(q32;q22).

La secuencia de CD74-ROS se proporciona en la Figura 9 (superior, secuencia de aminoácidos; inferior, secuencia de nucleótidos). Como se muestra en la Figura 9, los restos de CD74 están subrayados, mientras que los restos del dominio de la ROS cinasa se muestran en negrita.

La Figura 10 muestra la secuencia (aminoácido superior y ácido nucleico inferior) de CD74 humano, donde los restos presentes en la fusión CD74-ROS están subrayados. De forma similar, las Figuras 11A y 11B muestran la secuencia de aminoácidos y de ácido nucleico de ROS humana, donde los restos presentes en la fusión CD74-ROS están subrayados.

La fusión de CD74 y ROS se confirmó mediante una PCR con transcriptasa inversa sobre el ARN. La Figura 12 es un gel de agarosa que muestra el producto de RT-PCR resultante de la PCR con los cebadores indicados.

Ejemplo 9 - Ejemplo de referencia

Detección de la proteína ROS cinasa por inmunohistoquímica (IHC)

Para determinar si las proteínas de fusión ROS descubiertas en NSCLC se podían detectar por inmunohistoquímica, se utilizó un anticuerpo monoclonal de conejo específico de ROS. El anticuerpo específico de ROS (es decir, el anticuerpo monoclonal de conejo ROS1 D4D6) que se utilizó en estos estudios se ha descrito previamente (véase la publicación PCT N.º WO2010/093928), y se une específicamente a una región de la proteína ROS cinasa humana que está en C-terminal al dominio cinasa de la proteína ROS. Mientras que el anticuerpo D4D6 no está todavía comercialmente disponible, los anticuerpos específicos ROS específicos están disponibles comercialmente de una variedad de proveedores incluyendo, sin limitación, el anticuerpo Ros (C-20), N.º de catálogo sc-6347 de Santa Cruz Biotechnology, Inc., (Santa Cruz, CA) y el anticuerpo ROS (69D6), N.º de catálogo 3266 de Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA).

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 dos patólogos independientes, y se encontró que comprendían 246 casos de adenocarcinoma, 64 carcinomas broncoalveolares, 226 carcinomas de células escamosas y 20 de células grandes.

Inmunohistoquímica: Se desparafinaron secciones de tejido 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 diH_2O , después se sometieron a la recuperación de antígeno en una cámara de declouing (Biocare Medical, Concord, CA) usando EDTA 1.0 mM, pH 8.0 y configuraciones del fabricante: SP1 125°C durante 30 segundos y SP2 90°C durante 10 segundos. Los portaobjetos se inactivaron en 3 % de H_2O_2 durante 10 minutos, luego se lavaron en diH_2O . Después de bloquear en solución salina tamponada con Tris al 0,5 % Tween-20 (TBST) / 5 % de suero de cabra en una cámara humidificada, se incubaron los portaobjetos durante la noche a 4 °C con mAb de conejo ROS1 (D4D6) XP™ a 0,19 μg / ml diluido en diluyente de anticuerpos SignalStain® Antibody (n.º 8112 Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Después de lavar con TBST, la detección se realizó con Envisionpositive (Dako, Carpinteria, CA) o SignalStain® Boost IHC Detection Reagent (HRP, conejo) (n.º de catálogo 8114 Cell Signaling Technology, Danvers, MA) con una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente en una cámara humidificada. Para los portaobjetos con SignalStain® Boost IHC, después de lavar los portaobjetos (por ejemplo, tres veces en TBST), los portaobjetos fueron expuestos a continuación a NovaRed (Vector Laboratories, Burlingame, CA) preparado según las instrucciones del fabricante.

Los portaobjetos se desarrollaron durante 1 minuto y después se aclararon en diH_2O . Los portaobjetos se sometieron a contratinción incubando en hematoxilina (lista para usar comercialmente disponible de Invitrogen (Carlsbad, CA) n.º de catálogo 00-8011) durante 1 minuto, se aclararon durante 30 segundos en diH_2O , se incubaron durante 20 segundos en reactivo azulado (Richard Allan Scientific, Kalamazoo, MI (a Thermo Scientific company),

n.º 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 cambios de xileno durante 20 segundos cada uno, después se secaron al aire. Los cubreobjetos se montaron usando VectaMount (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Los portaobjetos se secaron al aire, luego se evaluaron bajo el microscopio. Las imágenes (20x) se adquirieron usando un microscopio Olympus CX41 equipado con una cámara Olympus DP70 y software controlador DP.

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

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

De los 20 carcinomas de células grandes, 1 (o 5,0%) fue positivo para ROS1 cinasa.

Se observó una variedad de patrones de tinción ROS IHC que van desde el citoplasma débil hasta los agregados perinucleares fuertes (véanse las Figuras 13A-F). En 5/9 (55 %) casos ROS se localizó difusamente en el citoplasma (Fig. 13 A). Se observó fuerte tinción citoplasmática en 1 carcinoma de células grandes (Fig. 13C). Dos casos presentaban fenotipos únicos entre sí, siendo uno difuso citoplásmico con áreas de tinción punteada de la membrana plasmática (Fig. 13D) y la otra tinción vesicular total (Fig. 13F).). También debe observarse que en casos excepcionales las células no neoplásicas, tales como macrófagos y células epiteliales bronquiales, se tiñeron con ROS D4D6. La expresión de ROS estaba ausente en el tejido estromal circundante.

Ejemplo 10 - Ejemplo de referencia

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

La presencia de la proteína de fusión de SLC34A2-ROS y/o la proteína CD74-ROS (u otra proteína de fusión ROS) en muestras de tumor NSCLC humano se detectó empleando un ensayo de hibridación de fluorescencia 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, N.Y. (1988). Se estudiaron más de 200 muestras de tumor NSCLC humano introducidas en parafina.

Para analizar las reordenaciones que implican a ROS, 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) (todas las cuales están comercialmente disponibles, por ejemplo, en Invitrogen Inc., Carlsbad, CA, como números de catálogo RPC11.C y RPC11.C). Las localizaciones en las que estas sondas se unen al gen ROS se muestran esquemáticamente en la Fig. 14. Como se muestra en la Fig. 19A, la sonda proximal se marcó con Spectrum Orange dUTP, y las sondas distales se marcaron con Spectrum Green dUTP. El marcaje de las sondas se realizó con el Kit de marcaje Nick Translation DNA Labeling Kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY). Se realizó FISH en secciones de tejido 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 0.01 M (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, CA) para la contratinción nuclear.

Los casos positivos en FISH para ROS se definieron como > 15% de división de señales en las células tumorales. Se utilizó el microscopio confocal Nikon C1, 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 software Metamorph para generar imágenes tricolor.

Por lo tanto, la sonda de reordenación ROS contiene dos sondas marcadas de manera diferente en lados opuestos del punto de ruptura del gen ROS en la secuencia de tipo silvestre (WT) (véase la Figura 14A). Cuando se hibrida, la región ROS nativa aparecerá como una señal de fusión naranja / verde, mientras que la reordenación en este locus (como ocurre en la proteína de fusión SLC34A2-ROS) dará como resultado señales separadas naranja y verde.

Como se muestra en la Figura 14B, se encontró un gen ROS reordenado en HCC78 (Figura 14B, panel izquierdo) que, como se ha descrito anteriormente, contiene una reordenación génica que da como resultado la fusión SLC34A2-ROS. En una de las muestras de pulmón humano, a saber, pulmón 306, se encontró un reordenamiento del gen de ROS similar que puede ser SLC34A2-ROS o CD74-ROS.

El análisis FISH revela una baja incidencia de esta mutación de ROS en la población de muestras estudiada. De los 123 tumores iniciales examinados, dos de los 123 tumores o 1,6 % de los tumores contenían las mutaciones de fusión ROS. Sin embargo, dada la alta incidencia de NSCLC a lo largo del mundo (más de 151.000 casos nuevos en EEUU anuales, solamente), se espera que existirá un número significativo de pacientes que porten esta ROS

mutante, y estos pacientes pueden beneficiarse de un régimen terapéutico inhibidor de ROS.

Ejemplo 11

5 Descubrimiento del tumor NSCLC positivo para FIG-ROS

Del Ejemplo 9, una de las muestras tumorales, a saber el tumor 749, mostró tinción con ROS1 que se localizó en los compartimentos vesiculares (véase la Fig. 13F). Este patrón de tinción es distinto de todos los demás ROS1 tumores positivos, lo que apunta a la posibilidad de una parte ROS1 fusión diferente.

10 Para determinar cuál era el patrón FISH de este tumor 749, se obtuvo una tercera sonda distal RP11-213A17 de Invitrogen para investigar más a fondo si la mutación ROS en este tumor podría deberse a una fusión FIG-ROS. las fusiones entre el gen FIG y el gen ROS se han descrito en glioblastoma, colangiocarcinoma y cáncer de hígado (véase 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 PCT n.º WO2010/093928), Pero esta fusión nunca se ha descrito en el pulmón antes. Dado que la fusión entre el gen FIG y el gen ROS 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.

20 Las sondas FISH utilizadas en la prueba de confirmación IHC descrita anteriormente (véase el Ejemplo 11 anterior) identificaron aquellos tumores y células con translocaciones equilibradas de ROS que podrían ser debidas a la presencia de una de las proteínas de fusión SLC34A2-ROS o CD74-ROS. El patrón de FISH en el pulmón 749 sugirió que el reordenamiento no era una de estas dos fusiones pero potencialmente la de la FIG-ROS. Para determinar si el pulmón ID 749 era de hecho positivo para FIG-ROS, se diseñó otro conjunto de sondas FISH (figura 25 15). Como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 11, el conjunto de sondas 1 que contiene 179P9 y 323017 BAC flanquea ambos lados del punto de ruptura ROS en las proteínas de fusión ROS descritas en la presente memoria (por ejemplo, después del exón 34, 35 o 36 de ROS) (véanse las Fig. 15 y Fig. 14A). En las células HCC78 positivas para SLC34A-ROS (véase la figura 14B, panel izquierdo y figura 16A), el conjunto de sondas 1 da como resultado una translocación equilibrada. En la línea celular de glioblastoma humano U118MG positiva para FIG-ROS, BAC 323017 no hibridó, ya que esta sección del cromosoma 6 se suprime, dando como resultado solo señales anaranjadas (figura 16C). El conjunto de sondas 2 contenía 179P9 situado en ROS y 213A7 situado en el gen FIG, por lo que U118MG muestra ambas señales naranja y verde con este conjunto de sondas (véase la figura 16D). Las células HCC78 mostraron 1 cromosoma con una translocación equilibrada (por ejemplo, a partir de una fusión SLC34A2-ROS; véanse las dos flechas amarillas en la Fig. 16B) y la flecha blanca en la Fig. 16B apunta a un cromosoma normal con las señales verde y naranja juntas ya que el gen FIG y el gen ROS están, de hecho, muy juntos en el mismo cromosoma (véase la figura 16B). El cromosoma de tipo silvestre mostró una señal separada debido a la distancia entre las sondas. El ID de pulmón 749, cuando se probó con el conjunto de sondas 1 (figura 16E) o el conjunto de sondas 2 (véase la figura 16F), imitó el de las células U118MG (figuras 16C y D). Estos datos fueron los primeros en mostrar la fusión de FIG-ROS como una delección intracromosómica en el cromosoma 6 en NSCLC.

Ejemplo 12

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

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

50 RT-PCR de muestras tumorales FFPE: El ARN de secciones de 3 x 10 µm se extrajo siguiendo protocolos estándar (RNeasy FFPE Kit, Qiagen). El ADNc de la primera hebra se sintetizó a partir de 500 ng de ARN total con el uso del sistema de síntesis de primera cadena SuperScript III (Invitrogen) con cebadores específicos de genes. A continuación, se amplificó el ADNc de fusión de FIG-ROS con el uso de pares de cebadores de PCR FIG-F3 y ROS-GSP3.1 para la isoforma corta y FIG-F7 y ROS-GSP3.2 para las isoformas largas. Los cebadores GAPDH se adquirieron de Qiagen (Valencia, CA).

55 Cebadores

ROS-GSP3.1: ACCCTTCTCGGTTCTTCGTTTCCA (SEQ ID NO: 52)

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

FIG-F3: GCTGTTCTCCAGGCTGAAGTATATGG (SEQ ID NO: 53)

FIG-F7: GTAACCCTGGTGCTAGTTGCAAAG (SEQ ID NO: 54)

65 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-ROS, se esperaba que el tumor 749 fuera una fusión FIG-ROS.

Como se predijo, la proteína de fusión ROS en el tumor 749 era de hecho una fusión FIG-ROS, específicamente la fusión FIG-ROS (S) descrita anteriormente (véase la publicación PCT N.º WO2010/0923828). La Figura 17 muestra una alineación de la secuencia del bloque FFPE del tumor 749 (en la línea "sujeto") con la secuencia de la FIG-ROS (S) descrita en la publicación PCT N.º WO2010/0923828 (en la línea "consulta"). Como se muestra en la Figura 17, la identidad era 100 % con 0 huecos. Dado que FIG-ROS (S) contiene el dominio cinasa entero de la ROS cinasa, se espera que esta FIG-ROS (S) retenga la actividad cinasa y, por lo tanto, es una proteína con actividad ROS cinasa como se describe aquí.

La secuencia de aminoácidos de FIG-ROS (S) se expone en la SEQ ID NO: 58 y la secuencia de nucleótidos de FIG-ROS (S) se expone en la SEQ ID NO: 57.

FIG-ROS (L) en el cáncer de hígado también se ha descrito (véase la publicación PCT N.º WO2010/0923828). Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de FIG-ROS(L) se muestra en las SEC ID N.º: 56 y 55, respectivamente. Además, a partir del análisis de la estructura génica de los genes FIG y ROS, se ha propuesto una tercera variante de FIG-ROS (es decir, FIG-ROS (XL) publicación PCT N.º WO2010/0923828). Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de FIG-ROS(L) se muestra en las SEC ID N.º: 60 y 59, respectivamente. Dado este hallazgo de FIG-ROS (S) en NSCLC, también se pueden encontrar otras variantes de la proteína de fusión FIG-ROS en NSCLC.

Ejemplo 13

Detección de expresión de ROS cinasa en una muestra de cáncer de pulmón humano usando un ensayo de PCR

La presencia de una proteína ROS de longitud completa expresada aberrantemente o una proteína de fusión ROS (por ejemplo, una de las proteínas de fusión SLC34A2-ROS, proteína de fusión CD74-ROS o una de las proteínas de fusión FIG-ROS) en una muestra de cáncer de pulmón humano puede detectarse mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) genómica o de la transcriptasa inversa (RT), previamente descrita. Véase, por ejemplo, Cools et al., N. Engl. J. Med., 348: 1201-1214 (2003).

Brevemente y como ejemplo, pueden obtenerse muestras de efusión pleural o de tumor de un paciente que padece NSCLC empleando técnicas convencionales. Se construyen sondas de PCR contra ROS cinasa truncada, proteína de fusión SLC34A2-ROS, CD74-ROS o FIG-ROS. Puede utilizarse el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) para extraer el ARN de las muestras de efusión pleural o de tumor. El ADN puede extraerse con el uso del kit DNeasy Tissue Kit (Qiagen). Para RT-PCR, el ADNc de primera hebra se sintetiza a partir de, por ejemplo, 2.5 mg de ARN total con el uso de, por ejemplo, síntesis de primera hebra SuperScript™ III (Invitrogen) con oligo (dT)₂₀. A continuación, se amplifica el gen ROS o el gen de fusión ROS (por ejemplo, SLC34A2-ROS, CD74-ROS o FIG-ROS) con el uso de pares de cebadores, por ejemplo, SLC34A2-F1 y ROS-P3 (véase el Ejemplo 5 anterior). Para la PCR genómica, la amplificación del gen de fusión puede realizarse con el uso de alta fidelidad de DNA polimerasa Taq Platinum (Invitrogen) con pares de cebadores, p. SLC34A2-F1 y ROS-R1, o SLC34A2-F1 y ROS-R2.

Tal análisis identificará a un paciente que tiene un cáncer caracterizado por la expresión de la ROS cinasa truncada (y/o proteína de fusión ROS tal como FIG-ROS, SLC34A2-ROS o CD74-ROS), paciente que es candidato para el tratamiento usando un agente terapéutico inhibidor de ROS.

Ejemplo 14

Sensibilidad de las fusiones de ROS cinasa a TAE-684 y crizotinib

La molécula pequeña TAE-684, una 5-cloro-2,4-diaminofenilpirimidina, inhibe la ALK cinasa. La estructura de TAE-684 se proporciona en Galkin, et al., Proc. National Acad. Sci 104(1) 270-275, 2007. Otra molécula pequeña, a saber crizotinib, también inhibe la ALK cinasa, así como la cinasa MET. La estructura de crizotinib (también denominada PF-02341066) se proporciona en Zou HY et al., Cancer Research 67: 4408-4417, 2007 y la publicación de patente N.º.20080300273.

Se determinó si TAE-684 y/o crizotinib también inhibe ROS polipéptidos de fusión.

BaF3 y Karpas 299 se obtuvieron de DSMZZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Alemania). Las células BaF3, que necesitan interleucina-3 para sobrevivir, se mantuvieron a 37 ° C en medio RPMI-1640 (Invitrogen) con suero bovino fetal 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-ROS (S), FIG-ROS (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 un control positivo. Los retrovirus se generaron como se ha descrito anteriormente (véase la publicación PCT n.º. WO 2010/093928).

- Un ensayo MTS se realizó utilizando el CellTiter 96 Aqueous One Solution Reagent (Promega, Catalog No G3582). Brevemente, se cultivaron 1×10^5 se cultivaron células / pocillo en placas de 24 pocillos en 1 ml de medio 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 μ l del Reactivo 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 μ l de células cultivadas con o sin tratamiento. Se usaron los pocillos que solo tenían medio como controles. 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. 18, las células BaF3 transducidas con retrovirus que expresan uno de los polipéptidos de la FIG-ROS dejaron de crecer en presencia de TAE-684. La FIG-ROS (S) era menos susceptible a TAE-684 que FIG-ROS (L). Las células Karpas 299 también respondieron (es decir, dejaron de crecer) en presencia de TAE-684. Las células BaF3 transducidas con FLT3 / ITD no eran susceptibles a TAE-684. Los valores de CI50 de dos experimentos son los siguientes en la Tabla 4, con datos de una línea celular final, a saber, células BaF3 que expresan neomicina marcada con myc, disponible solo en el segundo experimento.

Tabla 4

TAE-684	CI50	CI50
FIG-ROS (L)	1,78 nM	2,84 nM
FIG-ROS (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

- El mecanismo de muerte de las células BaF3 y Karpas 299 se evaluó después midiendo el porcentaje de células positivas de caspasa 3 escindidas mediante ensayo de citometría de flujo usando caspasa-3 escindida como marcador para la apoptosis. Estos resultados se obtuvieron usando el protocolo públicamente disponible de Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA). Como se muestra en la Fig. 19, la presencia de TAE-684 hizo que las células BaF3 que expresan FIG-ROS (S) o FIG-ROS (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. De este modo, el mecanismo mediante el cual el TAE-684 inhibe los polipéptidos de fusión de la FIG-ROS es diferente del mecanismo mediante el cual el TAE-684 inhibe la ALK cinasa.

- Para identificar adicionalmente el mecanismo de acción de TAE-684 sobre los polipéptidos de fusión FIG-ROS, las cuatro líneas celulares (es decir, células Karpas 299 y células BaF3 transducidas con retrovirus que codifican FIG-ROS (S), FIG-ROS (L) y FLT - 3ITD) se sometieron a análisis de transferencia de 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, MA).

- Como se muestra en la Fig. 20, la fosforilación de FIG-ROS (S) y FIG-ROS (L) en células BaF3 que expresan FIG-ROS (S) y FIG-ROS (L) fue inhibida por TAE-684. Además, la fosforilación de STAT3, AKT, y ERK, y Shp2 se inhibieron en células BaF3 que expresan FIG-ROS (S) y FIG-ROS (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 de Karpas 299. Dado que ROS, ALK, LTK, InsR e IGF1R pertenecen a la misma familia de tirosina cinasas, pueden compartir una estructura similar en el dominio cinasa. Los inhibidores de cinasa o anticuerpos diseñados contra ALK, LTK, InsR e IGF1R pueden tener efectos terapéuticos contra ROS cinasa.

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

- Como se muestra en la Fig. 21A (TAE-684) y la Fig. 21B (crizotinib), las células BaF3 que contenían la proteína de fusión FIG-ROS eran más sensibles a TAE-684 que a crizotinib a la misma concentración de cada terapéutico. Puede ser que el crizotinib no sea tan eficaz como una dosis similar de TAE-684, puesto que incluso el control positivo, a saber, las células Karpas 299 que expresan la proteína de fusión NPM-ALK, no eran sensibles a crizotinib en comparación con TAE-684 a las mismas concentraciones. Ambos de los 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-ROS y las células arpas 299 que expresan la proteína NPM-ALK.

- Después de un tratamiento con 0, 0,1, 0,3 o 1,0 μ M de crizotinib durante tres horas se realizó el análisis de transferencia de Western utilizando anticuerpos disponibles de Cell Signaling Technology, Inc. Como se muestra en

- la Figura 22, la fosforilación tanto de FIG-ROS (S) y FIG-ROS (L) como las células BaF3 que expresan FIG-ROS (L) que expresan FIG-ROS (S) y FIG-ROS (L) fue inhibido por crizotinib. Además, la fosforilación de STAT3, y ERK se inhibió en crizotinib en células BaF3 que expresan FIG-ROS (S) y FIG-ROS (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.
- 5 Crizotinib también inhibió la fosforilación de ALK, STAT3 y ERK en células Karpas 299. Dado que ROS, ALK, LTK, InsR e IGF1R pertenecen a la misma familia de tirosina cinasas, pueden compartir una estructura similar en el dominio cinasa. Los inhibidores de cinasa o anticuerpos diseñados contra ALK, LTK, InsR e IGF1R pueden tener efectos terapéuticos contra ROS cinasa.
- 10 Ejemplo 15
- Estudio de NSCLC que expresa ALK y/o ROS.
- 15 Además de la cinasa ROS, se han descrito también NSCLC que contienen proteínas que tienen actividad ALK (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 7.700.339; 7.605.131; 7.728.120). Usando los métodos de IHC descritos anteriormente en el Ejemplo 9, numerosas muestras de FFPE de tumores de NSCLC humano se rastrearon para determinar la unión específica mediante anticuerpos anti-ROS o anti-ALK. Dichos anticuerpos están comercialmente disponibles en numerosas fuentes.
- 20 Las mismas muestras se tamizaron también con FISH para el gen ROS o para el gen ALK usando métodos estándar. Por ejemplo, un protocolo FISH para el gen ROS se describe en los Ejemplos anteriores. Un protocolo FISH para la ALK se describe en la patente de Estados Unidos N° 7.700.339.
- 25 Del mismo modo, otro ensayo FISH se describe en la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20110110923). Los resultados del cribado se muestran a continuación en las Tablas 5 (muestras positivas para ROS) y 6 (muestras positivas para ALK).

Tabla 5 Histopatología de muestras positivas para ROS1

N.º de paciente	ID del tumor	Diagnóstico	Patrón histológico (%)	ROS1 FISH
1	147	Adenocarcinoma	BAC (40), papilar (30), acinar (20), sólido (10)	+
2	306	Adenocarcinoma	acinar (70), papilar (20) y sólido (10)	+
3	570	Adenocarcinoma	Acinar (90), BAC (5), micropapilar (5)	+
4	400037	Adenocarcinoma	Acinar	+
5	668	Adenocarcinoma	sólido (80), acinar (10), BAC (10)	+
6	702	Adenocarcinoma	papilar (40), acinar (30), sólido (30)	+
7	749	Adenocarcinoma	sólido (80), acinar (20)	+, delección verde
8	760	Adenocarcinoma	Células de Signet	+
9	575	Células grandes		No puntuable

30

Tabla 6: Histopatología de casos positivos de ALK.

N.º de paciente	ID del tumor	Diagnóstico	Patrón histológico (%)	ALK FISH
1	187	Adenocarcinoma	sólido	+
			Características del anillo de célula de signet focal	
2	307	Adenocarcinoma	BAC (30), Acinar (10), papilar (10), sólido (50) células claras y 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	Papila (60), micropapilar (40)	+
7	663	Adenocarcinoma	Papilar (50), BAC (50)	+
8	664	Adenocarcinoma	Acinar	+

ES 2 716 980 T3

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 célula de anillo de signet	+
12	759	Adenocarcinoma	Sólido con células de anillo de Signet	+
13	580	Adenocarcinoma (incierto)		+
14	70	Adenocarcinoma	sólido	+
15	383	Adenocarcinoma	BAC (40), papilar (30), acinar (20)	+
16	395	Adenocarcinoma	sólido	+
17	278	Escamoso; carcinoma de células grandes (incierto)		+
18	330	Carcinoma neuroendocrino de células grandes		+
19	503	Escamoso		+
20	615	Escamoso		+
21	644	Escamoso		+
22	691	Escamoso		+

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

5

REIVINDICACIONES

1. Un método, que comprende

5 detectar la presencia de un polipéptido de fusión FIG-ROS en una muestra biológica obtenida de un cáncer de pulmón de mamífero o un posible cáncer de pulmón, en donde el cáncer de pulmón es carcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC).
2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido de fusión FIG-ROS tiene una identidad del 95

10 % con el polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido FIG-ROS (S) (SEQ ID NO: 58), un polipéptido FIG-ROS (L) (SEQ ID NO: 56 y un polipéptido FIG-ROS(VL) (SEQ ID NO: 60).
3. El método de la reivindicación 1, en donde dicha detección comprende realizar un ensayo usando un

15 anticuerpo.
4. El método de la reivindicación 3, en donde dicha detección comprende realizar un ensayo seleccionado del

20 grupo que consiste en un ensayo de citometría de flujo, un ensayo de inmunohistoquímica (IHC), un ensayo de inmunofluorescencia (IF), un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) y un ensayo de análisis transferencia de Western.
5. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en una

25 biopsia pulmonar, un lavado broncoalveolar, una resección tumoral, un aspirado con aguja fina, un efusión pleural y una célula tumoral circulante.
6. Un método, que comprende:

30 detectar la presencia de un polinucleótido de fusión de FIG-ROS en una muestra biológica de un cáncer de pulmón de mamífero o un posible cáncer de pulmón, en donde el cáncer de pulmón es carcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC).
7. El método de la reivindicación 6, en donde dicho polinucleótido de fusión de FIG-ROS codifica para un

35 polipéptido de fusión de FIG-ROS que tiene una identidad del 95 % con un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido FIG-ROS (S) (SEQ ID NO: 58), un polipéptido FIG-ROS (L) (SEQ ID NO: 56 y un polipéptido FIG-ROS(VL) (SEQ ID NO: 60).
8. El método de la reivindicación 6, en donde dicho polinucleótido de fusión de FIG-ROS comprende una

40 secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 59.
9. El método de la reivindicación 6, en donde dicha detección comprende realizar un ensayo de hibridación *in situ*

45 de fluorescencia (FISH), un ensayo de PCR o un ensayo de hibridación de ácido nucleico.
10. El método de la reivindicación 6, en donde dicha detección comprende un ensayo de PCR.
11. El método de la reivindicación 10, en donde dicho ensayo de PCR es RT-PCR.
12. El método de la reivindicación 6, en donde dicha detección comprende realizar un ensayo de FISH.
13. El método de la reivindicación 12, en donde dicho ensayo de FISH utiliza una sonda de ácido nucleico que

50 se hibrida con la porción de FIG de dicho polinucleótido de fusión de FIG-ROS, y una sonda de ácido nucleico que se hibrida con la porción de ROS de dicho polinucleótido de fusión de FIG-ROS.
14. El método de la reivindicación 6, en el que la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en una

55 biopsia pulmonar, un lavado broncoalveolar, una resección tumoral, un aspirado con aguja fina, un efusión pleural y una célula tumoral circulante.

Figura 1

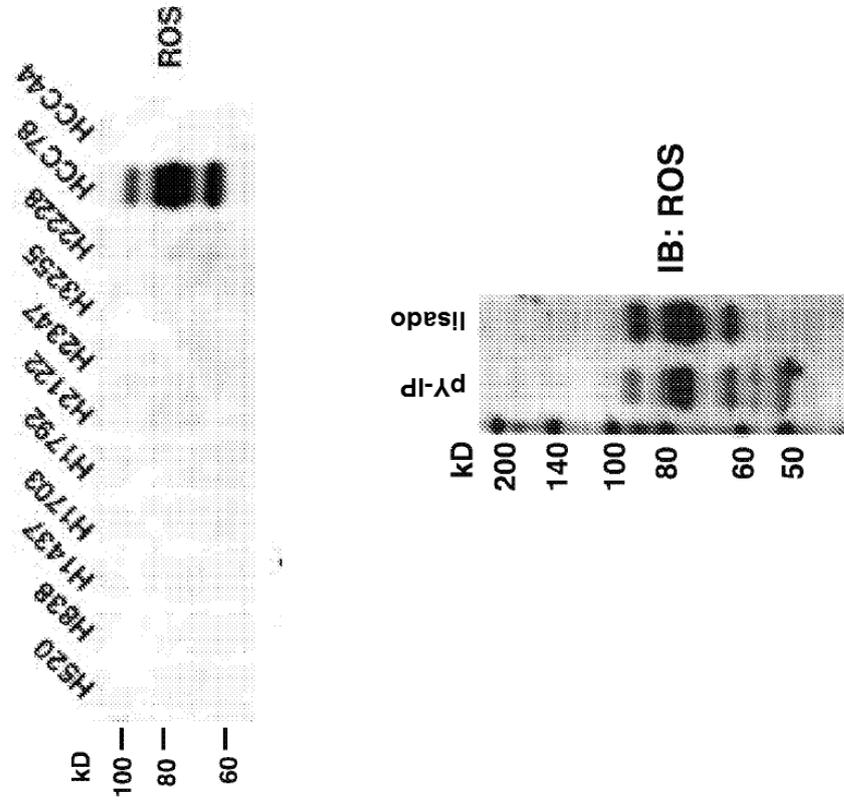


Figura 2

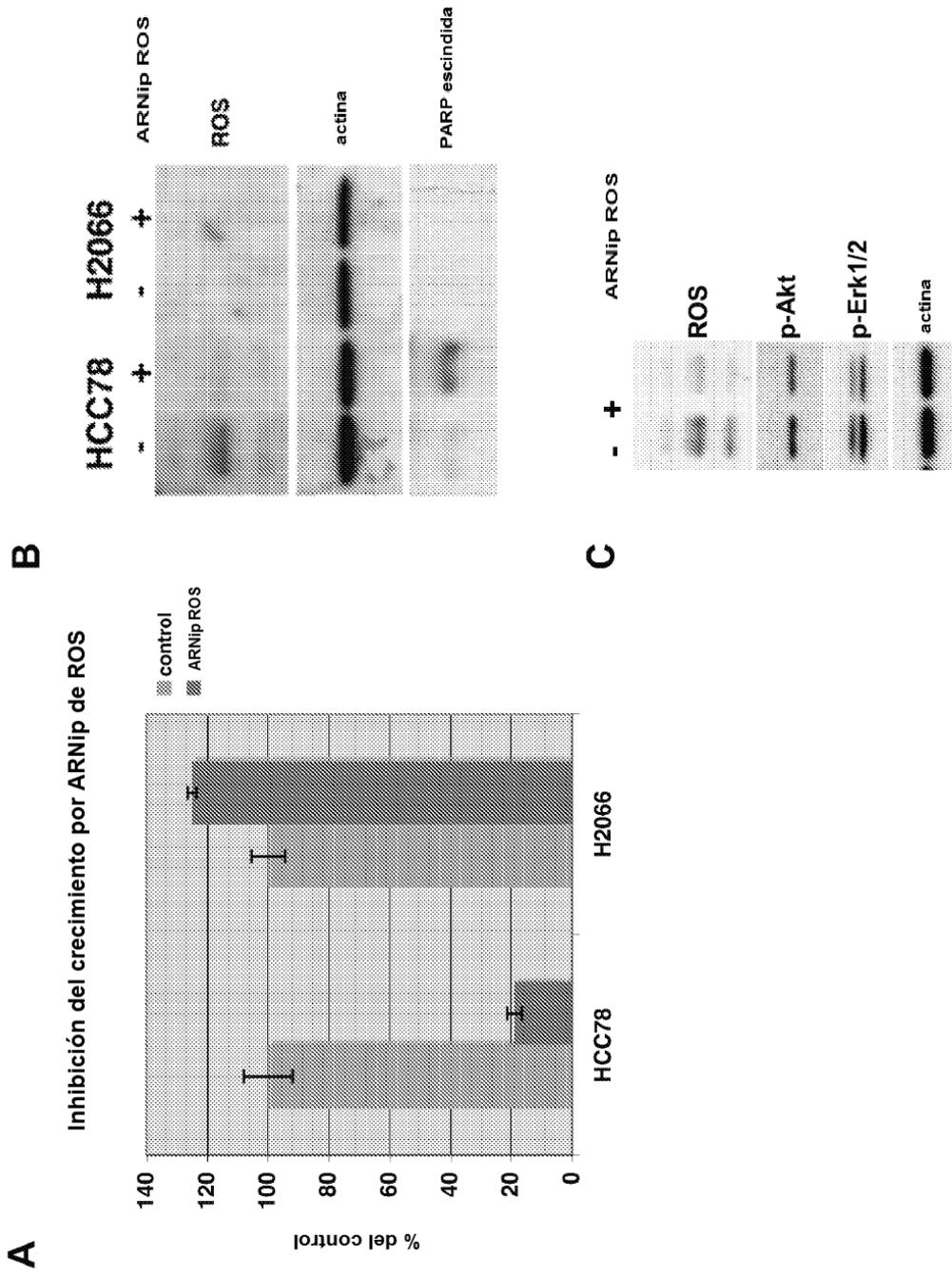
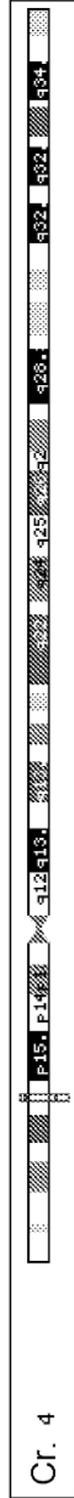


Figura 3A

SLC34A2 (4p15) →



ROS1 (6q22) ←

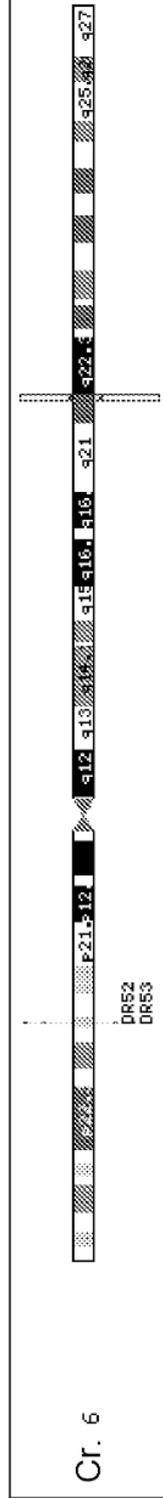


Figura 3B

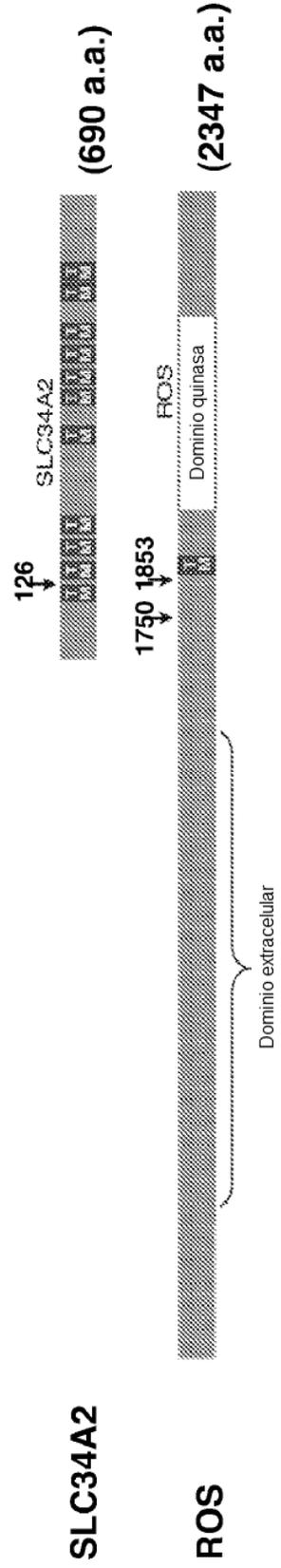
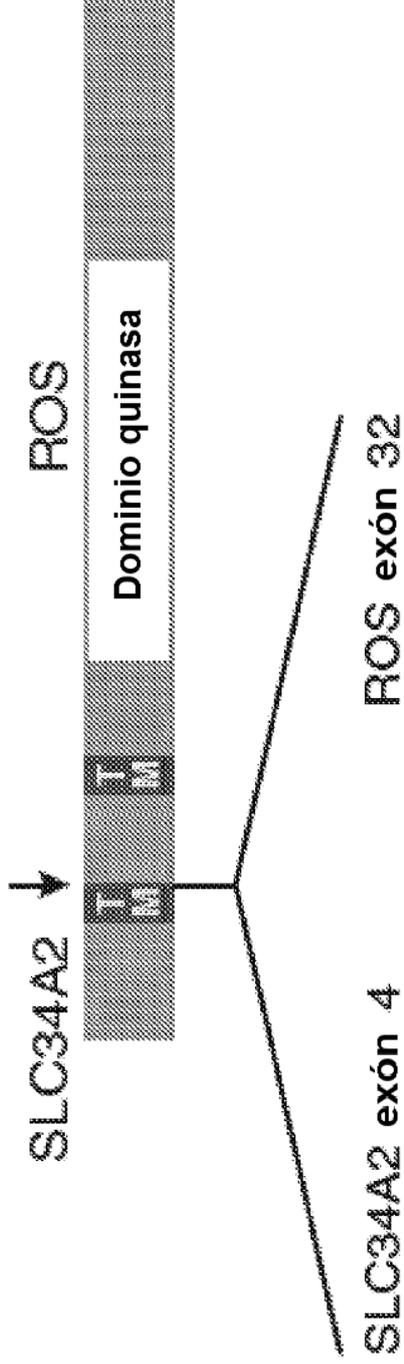


Figura 3C

SLC34A2/ROS (larga)

(724 a.a.)



Atttcttagcgcccttccagctgggttgga**gctggagtc**cccaataaaccaggcattccc
 I L S A F Q L V G A G V P N K P G I P

Figura 3D

SLC34A2/ROS (corta)

(621 a.a.)

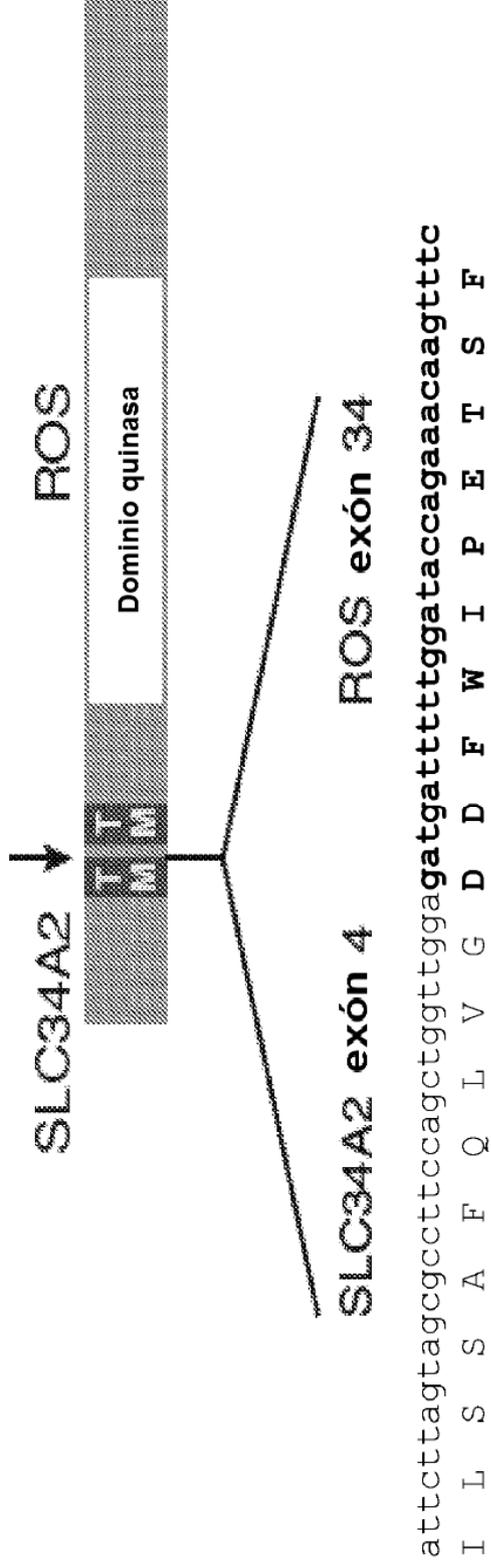


Figura 3E

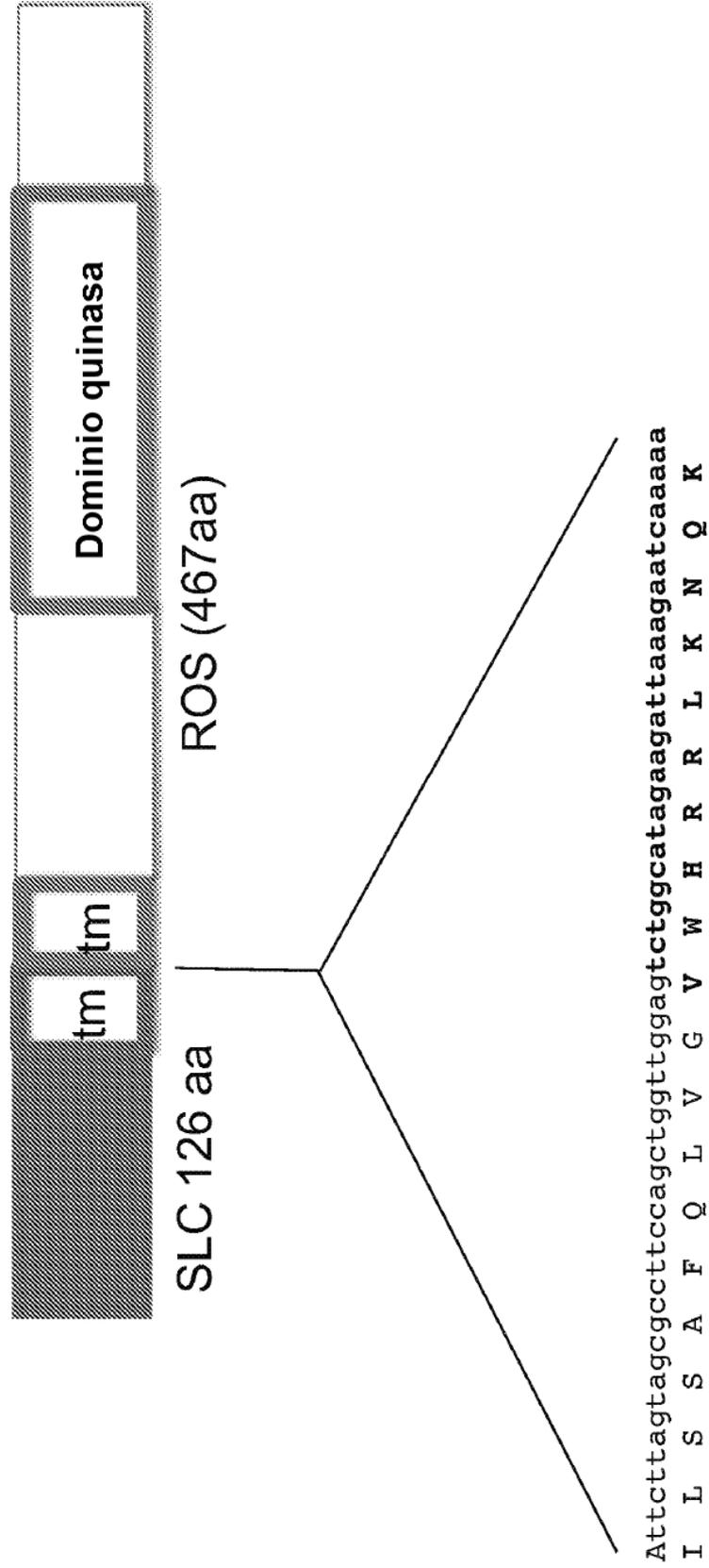


Figura 4A

MAPWPELGDAQPNPDKYLEGAAGQQPTAPDKSKETNKTDNTEAPVTKIELLPSYSTATLIDEFTEVDDPWNLPQLQDSGI
 KWSERDTKGIKLCFFQIGRLILLLGLYFFVCSLDLSSAFQLVAGVVPNKPGIPKLEGSKNSIQWEKAEDNGCRITY
 YILEIRKSTSNLQNLRWKMTFNGSCSSVCTWKSKNLKGIFQFRVVAANNLGFGEYSGISENIILVGDDEFWIPETSFI
 LTIIVGIFLVVTIPLTFVWHRLKNQKSAKEGVTVLINEDKELAE LRGLAAGVGLANACYAIHTLPTQEEIENLPAFPRE
KLTLRLLLGSGAFGEVYEGTAVDILGVSGEIKVAVKTLKKGSTDQEKIEFLKEAHLMSKFNHPNILKQLGVCLLNEPQY
IILELMEGGDLLTYLRKARMATFYGPLLTLVDLVDLCVDISKGCVYLERMHFIHRDLAARNCLVSVKDYTSPRIVKIGDF
GLARDIYKNDYRKRGEGLLPVRWMAPESLMDGIFTTQSDVWSFGILLWEILLTGHQPPAHSNLDVNLVYVQTGGRLEPP
RNCDDLWNLMTQCWAQEPDQRPTFHRIQDQLQFRNFFLNSIYKSRDEANNSGVINESFEGEDGDVICLNSDDIMPVAL
 METKNREGLNMYVLATECGQGEKSEGPLGSQESSECLRKEEKEPHADKDFCQEKQVAYCPSGKPEGLNYACLTHSGYG
 DGSD

atggctccctggcctgaattgggagatgccagcccaaccccgataagtacctcgaagggccgcaggtcagcagccac
 tgcctcctgataaaagcaaaagagaccaaaaaacagataaacctgaggcacctgtaaccaagattgaaactctgcccctcct
 actcccagcctacactgatagatgagcccactgagggtgagatgaccctggaacctaccactcttcaggactcggggatc
 aagtggctcagagagagacaccaaagggagattctctgttcttccaagggattgggagattgatttactctcggatt
 tctctacttttctgtgtgctccctggatattcttagtagcgcctccagctgggtggagctggagctccaaataaaccag
 gcattcccaaat tactagaagggagtaaaaaatccaatcacagtgggagaaagctgaagataatggatgtagaattacatac
 tatatccttgagataaagaagagcacttcaataatctacagaaccagaat ttaaggtggaagatgacatttaatggatc
 ctgcaagt agtgt.ttgccacatggaagt.ccaaaaaacct.gaaaggaat.at.ttcagt.tcagagtagtagctgcaaaataat.ct.ag
 ggtttggatgaat atagtggaatcagtgagaatattatattagttggagatgattttggataccagaacaagtttcata
 ct tactat tagttggaatattctgtgtgttacaatcccactgacctttgtctggcatagaagattaaagaatcaaaa
 aagtgccaaggaaggggtgacagtgcttataaacgaagacaagagttggctgagctgagaggtctggcagccggagtag
 gctggctaatgcctgctatgcaatacactcttccaaccaagaggagattgaaaatcttctgcttccctcgggaa
 aaaactgactctgctctcttctgctgggaagtggagcctttggagaagtgtatgaaggaaacagcagtggaacacttaggagt
 tggagtgaggaaaatacaagttagcagtgagactttgaagaaggggtccacagaccaggagaagattgaaattcctgaagg
 aggcacactctgtagagcaaat ttaatcatcccaacattctgaagcagcttgagatttctctgctgaaatgaacccaatac
 attatcctggaactgtagggaggagaccttcttacttatttgctgtaaagccggatggcaacttttatggctcctt
 actcaccttggtgacctgttagacctgtgtgtagatatttcaaaaggctgtgtctacttggaacggatgcatctcattc
 acagggatctggcagctagaaaattgcctgtttccctgaaagactataccagctccacggatagtgaaagattggagacttt
 ggactcgcagagacatctataaaaaatgattactatagaaagagaggggaagggcctgctcccagttcgggtgagtggtcc
 agaaaagttgtagggatggaatcttactactcaactgtagtataggcttttggaaattctgatttgggagattttaaactc
 ttggctcatcagccttatccagctcattccaaccttgatgtgttaaactatgtgcaaacaggaggggagactggagccacca
 agaaaattgtctctgtagatctgtggaatttaatagaccagtgctgggctcaagaacccgaccaaaagactacttttcatag
 aattcaggaccaactcagttattcagaaatttttcttaaatagcatttataagtcagagatgaaagcaaaacaacagtg
 gactcataaaatgaaagctttgaaagtgaaagatggcgatgtgatttgtttgaaatcagatgacattatgccagttgcttta
 atggaaaacgaagaaccgagaaggggttaactataggtacttctacagaaatgtggccaaggtgaaagaaaagctctgaggg
 tctctaggtcccaggaatctgaaatctgtgtgtctgaggaagaagagaaggaaccacatgcagacaaaagatttctgcc
 aaaaaaacaaatgqcttactgaccttctgcaaacctgaaagcctgaaactatgctctcactcacaatgqatataqqa

Figura 4B

MAPWPELGDAQPNPDKYLEGAAGQQPTAPDKSKETNKTDNTEAPVTKIELLPSYSTATLIDEPTFVDDPWNLPQLQDSGI
 KWSERDTKGGKILCFQIGRLILLGFLYFFVCSLDLSSAFQLVGDDEFWIPETSFILTIIVGIFLVVTIPLTFVWHRRL
 KNQKSAKEGVTVLINEDKELAE LRGLAAGVLANACYAIHTLPTQEEIENLPAFPREK**LTLRLLLSGAFGEVYEGTAVD**
ILGVSGSEIKVAVKTLKKGSTQEKIEFLKEAHLMSKFNHPNLIKQLGVCLLNEPQYIILELMEGGDLLTYLRKARMATF
YGPLLTLDLVDLCVDISKGCVYLERMHFIHRDLAARNCLVSVKDYTSPRIVKIGDFGLARDYKNDYYRKRGEGLLPVR
WMAPESLMDGIFTTQSDVWSFGILWEILTLGHQYPYPAHSNLDVLNVVQTGGRLPPRNCPPDDLWNLMTCWAQEPDQRP
TFHRIQDQLQLEFRNFFLNSIYKSRDEANNSGVINESFEGEDGDVICLNSDDIMPVALMETKNREGLNYMVLATECGQEE
 KSEGPLGSQESESCGLRKEEKEPHADKDFCQEKQVAYCPSGKPEGLNYACLTHSGYGDGSD

atggctccctggcctgaattgggagatgccagcccaaccccgataagtacctcgaaggggcccaggtcagcagccac
 tgcctcctgataaaagcaagagaccaacaaaacagataaacactgaggcacctgtaaccaagattgaacttctgccgtcct
 actccacggctacactgatagatgagccactgaggtggatgacccctggaacctaccactcttcaggactcggggatc
 aagtggtcagagagagacaccaagggagattctctgttcttccaagggatgggagattgatcttctcggatt
 tctctacttttctgtgtcctcctggatattcttagtagcgccttccagctggttgagatgatttttgataccagaaa
 caagtttcatacttactattatagttggaatattctgtgtgttacaatcccactgacctttgtctggcatagaagatta
 aagaatcaaaaaagtgccaaggaaggggtgacagtgccttataaacgaagacaaagattggctgagctgcgaggtctggc
 agccggagtaggcctggctaatagcctgctatgcaatacatactcttccaaccaagaggagattgaaaatcttctcgtcct
 tccctcgggaaaaactgactctcgtctcttctgctgggaagtggagcctttggagaagtgtatgaaggaaacagcagtggac
 atcttaggagttggaagtggagaaatcaagtagcagtgaaagactttgaagaaggggtccacagaccaggagaagattga
 attcctgaaggaggcacatctgatgagcaaatataatcaatcccaacattctgaagcagcttgagtttctctgctgaatg
 aaccccaatatacttctcctggaactgatggagggaggagaccttcttacttatttgctaaagcccggatggcaacgttt
 tatggctcttactcaccttgggtgacctgtgtagacctgtgtgtagatattcaaaaggctgtgtctacttggaaacggat
 gcattcattcacagggatctggcagctagaaaatgccttgtttccgtgaaagactataccagtcacggatagtgaaaga
 ttggagactttggactcgcagagacatctataaaaatgattactatagaaagagaggggaagccctgctcccagttcgg
 tggatggctccagaaagtttgatggatggaatcttccactactcaatctgatgtagtggtcttttggaaattctgatttggga
 gattttaactcttggatcagccttatccagctcattccaaccttgatgtgtttaaactatgtgcaaacaggaggggagac
 tggagccaccaagaaaatgtcctgatgactgtggaatataatgacccagctgctgggctcaagaacccgaccaaagacct
 acttttcatagaattcaggaccaacttcagttattcagaaaatcttctttaaataagcatttataagtcacagagatgaagc
 aaacaacagtgaggatcataaataaagctttgaaggtgaagatggcgatgtgatattgtttgaattcagatgacattatgc
 cagttgctttaaaggaaacgaagaaccgagaaggggttaaactatattggtacttgtacagaaatgtggccaaggtgaagaa
 aagctcagggtcctcaggctcccaggaatctgaatcttctgtggtctgaggaagaagagaaggaaccacatgcagacaa
 agattctgccaagaaaaaacaagtggcttactgccttctggcaagcctgaagcctgaacctatgctgtctcactcaca
 gttgatattggagatgggtctgattaa

Figura 5

MAPWPELGDAQPNPDKYLEGAAGQQPTAPDKSKETNKTDNTEAPVTKIELLPSYSTATLI
 DEPTEVDDPWNLPTLQDSGIKWSERDTKGKILCFQIGRLILLGLFLYFFVCSLDILSS
 AFQLVGGKMGAGQFFSNSSIMSNPLLGLVIGVLVTVLVQSSSTSTSIVVSMVSSSLTLVRA
 AIPITIMGANIGT SITNTIVALMQVDRSEFRRAFAGATVHDFFNWLSVLVLLPVEVATHY
 LEIITQLIVESFHFKNGEDAPDLLKVIKPFKTLIVQLDKKVISQIAMNDEKAKNKSLVK
 IWCKTFTNKTQINVTVPSTANCTSPSLCWT DGIQNWTKMKNVTKENIAKQHI FVNFLHP
 DLAVGTILLI LSLVLCGLIMIVKILGVLKGVATVIKKTINTDFPFPFALWTLGYLAI
 LVGAGMTFIVQSSSVFTSALTPILIGIVITIERAYPLTLGNSNIGTTTTAILAALASPNA
 LRSSLQIALCHFFFNISGILLWYPIPFTRLPIRMAKGLGNISAKYRWFVYLIIFFLI
 PLTVFGLSLAGWRVLVGVGVVVFIIILVLCRLQLSRCPRVLPKKLQNWFLPLWMRSL
 KPWDVAVSKFTGCFQMRCCYCCRVCCRACLLCGCPKCCRC SKCCEDLEEAQEGQDVPVK
 APETFDNITISREAQGEVPASDSKTECTAL

1 cgggccaggt ttccaggtc ggccgccc tccatccc cactgcgga gggagcgtg
 61 accatggctc cctggcctga attgggagat gccagcccc accccgataa gtacctgaa
 121 ggggccgcag gtcagcagcc cactgccc gataaaagca aagagacca caaacagat
 181 aacctgagg cacctgtaac caagattgaa cttctgccgt cctactccac ggctacactg
 241 atagatgagc ccactgaggt gtagacccc tggaaacctac ccactcttca ggcctgggg
 301 atcaagtggc cagagagaga caccaaaagg aagattctct gtttcttcca agggattggg
 361 agattgattt tacttctcgg atttctctac ttttctctgt gtcacctgga tattcttagt
 421 agcgccttcc agctggttgg aggaaaaatg gcaggacagt tttcagcaa cagctctatt
 481 atglccaacc ctttgttggg gctggtgatc ggggtgctg tgaccgtctt ggtgcagagc
 541 tccagcacct caacgtccat cgttgtcagc atggtgtcct ctctattgct cactgttcgg
 601 gctgccatcc ccattatcat gggggccaac attggaacgt caatcaccaa cactattgtt
 661 gcgctcatgc aggtgggaga tcggagtgag ttcagaagag ctttgcagg agccactgtc
 721 catgacttct tcaactggct gtcctgttgg gtgctcttgc ccgtggagggt ggcacccat
 781 tacctcgaga tcataacca gcttatagtg gagagcttcc acttcaagaa tggagaagat
 841 gccccagatc ttctgaaagt catcactaag cccttcaaaa agctcattgt ccagctggat
 901 aaaaaagtta tcagccaaat tgcaatgaac gatgaaaaag cgaaaaaaca gactcttgc
 961 aagatttggg gcaaaaacttt taccaacaag acccagatta acgtcactgt tccctcgact
 1021 gctaactgca cctccccttc cctctgttgg acggatggca tccaaaactg gaccatgaag
 1081 aatgtgacct acaaggagaa catcgccaaa tgcagcata ttttgtgaa tttccactc
 1141 ccggatcttg ctgtgggcaac catcttctc atactctccc tctgtgtcct ctgtggttgc
 1201 ctgatcatga ttgtcaagat cctgggctct gtgctcaagg gccaggtcgc cactgtcatc
 1261 aagaagacca tcaaacactga tttccccttt ccctttgcat ggttgactgg ctacctggcc
 1321 atcctcgtcg gggcaggcat gaccttcate gtacagagca gctctgtgtt cacgtcggcc
 1381 ttgaccccc tgattggaat cggcgtgata accattgaga gggcttatcc actcacgctg
 1441 ggctccaaca tcggcaccac caccaccgcc atcctggccg ccttagccag ccctggcaat
 1501 gcattgagga gttcactcca gatcgccctg tgcactttt tcttcaaat ctccggcatc
 1561 ttgctgtggg acccgatccc gttcactcgc ctgcccctcc gcattggcaa ggggctgggc
 1621 aacatctctg ccaagtatcg ctggttcgcc gtcttctacc tgatcatctt cttcttctg
 1681 atcccgtgta cgggtgttgg cctctcctg gccggctggc ggggtgctgt tgggtgcggg
 1741 gttcccgtcg tcttcatcat catcctggta ctgtgcctcc gactcctgca gctcgcctg
 1801 ccacgcgtcc tgccgaagaa actccagaac tggaaactcc tgccgctgtg gatgcgctc
 1861 ctgaagccct gggatgccgt cgtctccaag ttcaccggct gcttccagat gcgctgctg
 1921 tactgctgcc gcgtgtgctg ccgcgcgtgc tgcttctgt gtggtgccc caagtgtcgc
 1981 cgctgcagca agtgtcgcga ggacttggag gaggcgcagg aggggcagga gttccctgtc
 2041 aaggctcctg agaccttga taacataacc attagcagag aggctcaggg tgaggtccct
 2101 gcctcggact caaagaccga atgcaccgcc ttgtagggga cgcctcagat ggtcagggat
 2161 gggggatgg tctttagatt ttgcatgctc tctcccctcc cacttctgca ccttccacc
 2221 acctcgagga gatttctc ccattagcga atgaaattga tgcagtccta aaaaaaaaa

Figura 6A

MKNYCLIPKLVNFATLGCLWISVVQCTVLNSCLKSCVTNLGQQDLGTPHNLSEPCIQG
 CHFWNSVDQKNCALKCRESCVGCSSAEGAEEEEVENADLPTAPFASSIGSHNMTLRWK
 SANFSGVKYIIQWKYAQLLGSWYTKTVSRPSYVVKPLHPFTEYIFRVVWIFTAQLQLYS
 PPSPSYRTHPHGVPETAPLIRNIESSSPDTVEVSWDPPQFPGGPILGYNLRLISKNQKLD
 AGTQRTSFQFYSTLPNTIYRFSIAAVNEVGEGPEAESSITTSSSAVQQEEQWLFLSRKT
 LRKRSLKHLVDEAHCLRLDAIYHNITGISVDVHQIYVFSEGTLIWAKKAANMSDVS
 DLRIFYRGSGLISSISIDWLYQRMVFIMDELVCVCDLENCNIEEITPPSISAPQKIVADSYN
 GYVFFYLLRDGIYRADLPVPSGRCAEAVRIVESCTLKDFAIKPOAKRIYFNDAQVFMST
 FLDGSASHLILPRIPFADVKSFACENDELVTGKVFQDALSFNIEFVGCDSLHIEEF
 GFGNLVIFGSSQLHPLPGRPQELSVLFGSHQALVQWKPPALAIGANVILISDIIELFEL
 GPSAWQNWYEVKVVSTQDPPEVTHIFLNISGTMLNVPQLQSAMKYKVSVRASSPKRPGPW
 SEPSVGTTLVPASEPPFIMAVKEDGLWSKPLNSFGPGEFLSSDIGNVSDMDWYNNLSLYS
 DTGKDVVWLLNGTDISENYHLPISAGALAFEWLGHFLYWAGKTYVIQRQSVLTGHTD
 IVTHVKLLVNDMVVDSVGGYLYWTTLYSVESTRLNGESSVLQTQPWFSGKKVIALTLDL
 SDGLLYWLVDQSQCIHLYTAVLRGQSTGDTTITFEAAWSTSEISQNALMYSGRFLFWING
 FRIITTEIQEKTSVSVLEPARFNQFTIITSLKPLPGNFSFTPKVIPDSVQESSFRIEG
 NASSFQILWNGPPAVDWGVVYFVSVEFSAHSKFLASEQHSLPVFTVEGLEPYALFNLSVTP
 YTYWKGPKTSLSLRAPETVPSAPENPRIFILPSGKCCNKNEVVVEFRWNKPKHENGVL
 TKEFIFYNISQNSITNKTCEWIAVNVTPSVMSFQLEGMSPRCFIAFQVRAFTSKGPGPYA
 DVVKSTTSEINPFPHLITLLGNKIVFLDMDQNQVWTFSAERVISAVCYTADNEMGYAE
 GDSLFLHLHNRSSSELFQDSLVDITVIDWISRHLFALKESQNGMQVFDVLEHKV
 KYPREVKIHNRNSTIISFSVYPLLSRLYWTEVSNFGYQMFYYSIISHTLHRILQPTATNQ
 QNKRNCSCNVTEFELSGAMAIDTSNLEKPLIYFAKAQEIWAMDLEGCQCWRVITVPAML
 AGKTLVSLVDGDLIYWIITAKDSTQIYQAKKGNGAIVSQVKALRSRHILAYSSVMQPPF
 DKAFLSLASDTVEPTILNATNTSLTIRLPLAKTNLTWYGITSPTPTYLVVYAEVNRKNS
 SDLKYRILEFQDSIALIEDLQPFSTYMIQIAVKNYSDPLEHLPPGKEIWGKTKNGVPEA
 VQLINTTVRSDTSLIISWRESHKPNGPKESVRYQLAISHLALIPETPLRQSEFPNGRLTL
 LVTRLGGNIYVLKVLACHSEEMWCTESHVPTVEMFNTPEKPYSLVPENTSLOFNWKAPL
 NVNLIRFWVELQKWYNEFYHVKTSCSQGPAYVCNITNLQPYTSYNVRVVVYKTGENST
 SLPEFKTAKAGVPNKPGIPKLLLEGSKNSIQWEKAEDNGCRITYYILEIRKSTSNLQONQ
LRWKMTFNGSCSSVCTWKSKNLKGIFQFRVVAANNLGFGEYSGISENIILVGDDEFWIPET
SFILTIIVGIFLVVTIPLTFVWHRRLKNQSAKEGVTVLINEBKELAE LRGLAAGVGLAN
ACYAIHTLPTOEIENLPAFPREKLTURLLLGSGAFGEVYEGTAVDILGVCSGEIKVAVK
TLKKGSTDOEKIEFLKEAHLMSKFNHPNLIKOLGVCLINEPOYIIELEMEGGDILTYLRK
ARMATFYGPLLTLVDLVDLCVDBSKGCYILERMHFIHRDLAARNCLVSVKDYTSPRIVKI
GDEGLARDIYKNDYRKRGEGLLPVRWMAPESLMDGIFTTOSDYWSFGILWEILTLGHQ
PYPAHSNLDVLNYYVOTGGRIEPPRNCBDDLWNLMTCWAQEPDQRPTFHRIQNQLFRN
FELNSIQCRDEANNSGVINESFEGEDGDVICLNSDDIMPVYLMETKNREGLNYMYLATE
CGOGEEKSEGPLGSOESESCLRKEEKEPHADKDFCQEKQVAYCPSGKPEGLNYACLTHS
GYGBGSD

(el texto subrayado, en negrita y en rojo distingue tres proteínas de fusión diferentes)

Figura 6B

```

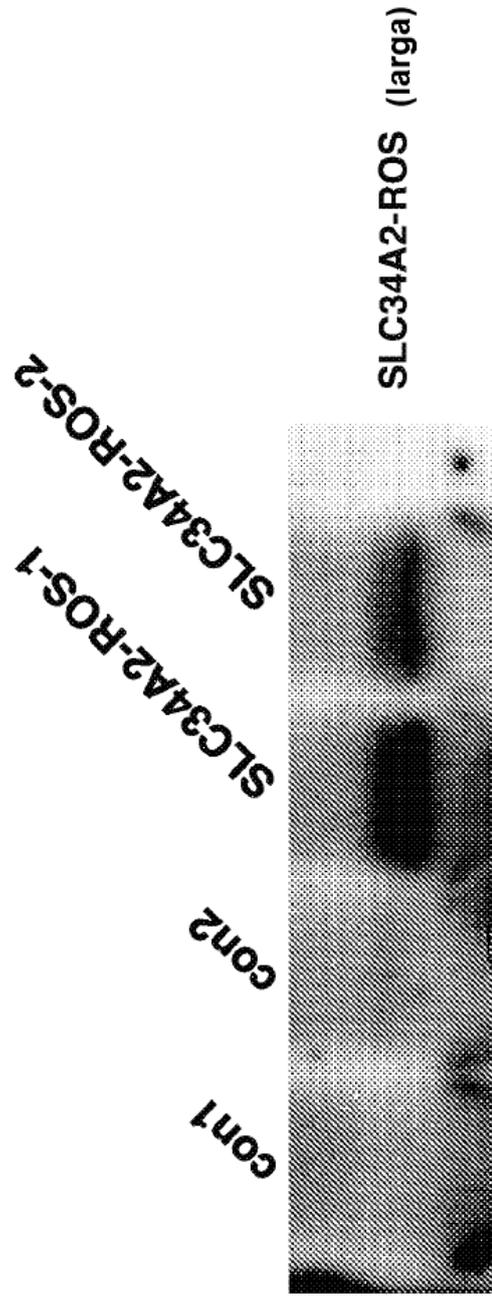
1 caagctttca agcattcaaa ggtctaaatg aaaaaggcta agtattattt caaaaggcaa
61 gtatatccta atatagcaaa acaaacaaag caaaatccat cagctactcc tccaattgaa
121 gtgatgaagc ccaaataatt catatagcaa aatggagaaa attagaccgg ccatctaaaa
181 atctgccatt ggtgaagtga tgaagaacat ttactgtctt attccgaagc ttgtcaattt
241 tgcaactctt ggotgcctat ggattttctgt ggtgcagtgt acagttttaa atagctgcct
301 aaagtcgtgt gtaactaatc tgggccagca gcttgacctt ggcacaccac ataactcgag
361 tgaaccgtgt atccaaggat gtcacttttg gaactctgta gatcagaaaa actgtgcttt
421 aaagtgtcgg gagtctgtg aggttggctg tagcagcgcg gaaggtgcat atgaagagga
481 agtaattgaa aatgcagacc taccaactgc tccctttgct tcttccattg gaagccacaa
541 tatgacatta cgatgaaat ctgcaactt ctctggagta aaatacatca ttcagtggaa
601 atatgcacaa cttctgggaa gctggactta tactaagact gtgtccagac cgtcctatgt
661 ggtcaagccc ctgcaccctc tcaactgagta cttttccga gtggtttggg tcttccagc
721 gcagctgcag ctctactccc ctccaagtcc cagttacagc actcatccc atggagttcc
781 tgaactgca cctttgatta ggaatattga gagctcaagt cccgacactg tggagtcag
841 ctgggatcca cctcaattcc caggtggacc tattttgggt tataacttaa ggctgacag
901 caaaaatgaa aaattagatg cagggacaca gagaaccagt tccagttt actccactt
961 accaaatact atctacaggt tttctattgc agcagtaaat gaagttggtg agggctcaga
1021 agcagaatct agtattacca ctctactctc agcagttcaa caagaggaa actgtgctctt
1081 tttatccaga aaaacttctc taagaaagag atctttaaaa catttagtag atgaagcaca
1141 ttgccttcgg ttggatgcta tataccataa tattacagga atatctgttg atgtccacca
1201 gcaaattggt tatttctctg aaggaactct catatggggc aagaaggctg ccaactgtc
1261 tgatgtatct gacctgagaa tttttacag aggttcagga ttaatttctt ctatctccat
1321 agattggcct tatcaagaa tgtatttcat catggatgaa ctggtatgtg tctgtgattt
1381 agagaactgc tcaaacatcg aggaaattac tccacctctc attagtgcac ctcaaaaaat
1441 tgtggctgat tcatacaatg ggtatgtctt ttacctctg agagatggca tttatagagc
1501 agaccttct gtaccatctg gccggtgtgc agaagctgtg cgtattgtgg agagttgcac
1561 gttaaaggac tttgcaatca agccacaagc caagcgaatc atttacttca atgacactgc
1621 ccaactctc atgtcaacat ttctggatgg ctctgcttcc catctcgcac tactctgcac
1681 cccctttgct gatgtgaaaa gttttgcttg tgaaaacaat gactttcttg tcacagatgg
1741 caaggtcatt ttccaacagg atgctttgtc ttttaatgaa ttcactgttg gatgtgacct
1801 gagtcacata gaagaatttg ggtttggtaa ctgggtcctc tttggctcat cctcccagct
1861 gcaacctctg ccaggccgcc cgcaggagct ttccggtgctg tttggctctc accaggctct
1921 tgttcaatgg aagcctctg ccttgccat agggaccaat gtcactctga tcagtgatat
1981 tattgaactc tttgaattag gccctctgc ctggcagaac tggacctatg aggtgaaagt
2041 atccacccaa gacctcctg aagctactca tattttcttg aacataatg gaacctgct
2101 gaatgtacct gagctgcaga gtgctatgaa atacaaggtt tctgtgagag caagttctcc
2161 aaagaggcca ggccccgtg cagagccctc agtgggtact accctgggtc cagctagtga
2221 accaccattt atcatggctg tgaaagaaga tgggctttg agtaaaccat taaatagctt
2281 tggcccagga gagttcttat cctctgatat aggaaatgtg tcagacatgg attggtataa
2341 caacagctc tactacagtg acacgaaagg cgacgttttt gtgtggcttc tgaattgggac
2401 ggatattcca gagaattatc acctaccag cattgcagga gcagggctt gatctttga
2461 gtggctgggt cactttctct actgggctg aaagacatat gtgatacaaa ggcagtctgt
2521 gttgacggga cacacagaca ttgttaccga cgtgaagcta ttggtgatg acatgggtgt
2581 ggattcagtt ggtggatctc tctactggac cacactctat tcagtggaaa gcaccagact
2641 aaatggggaa agttcccttg tactacagac acagccttg tttctggga aaaaggtaat
2701 tgctctaact ttagacctca gtgatgggt cctgtattgg ttggttcaag acagtcaatg
2761 tattcacctg tacacagctg ttcttcgggg acagagcact ggggatacca ccatcacaga
2821 atttgcagcc tggagtact ctgaaatttc ccagaatgca ctgatgtact atagtgtctg
2881 gctgttctg atcaatggct ttaggattat cacaactcaa gaaataggtc agaaaaccag
2941 tgtctctggt ttggaaccag ccagatttaa tcagttcaca attattcaga catcccttaa
3001 gccctgcca gggaactttt cctttacccc taaggttatt ccagattctg tccaagagtc
3061 ttcatttagg attgaaggaa atgcttcaag ttttcaaatc ctgtggaatg gtccccctgc
3121 ggtagactgg ggtgtagttt ctacagctgt agaatttagt gctcattcta agttcttggc
3181 tagtgaacaa cactctttac ctgtatttac tgtggaagga ctggaacctt atgccttatt
3241 taatctttct gtcactcctt atacctactg gggaaagggc cccaaaacat ctctgtcact
3301 tcgagcact gaaacagttc catcagcacc agagaacccc agaataattha tattaccaag
3361 tggaaaatgc tgaacaaga atgaagttgt ggtggaattt aggtggaaca aacctaaagca
3421 tgaaaaatgg gtgttaacaa aatttgaaat tttctacaat atatccaatc aaagtattac
3481 aaacaaaaca tgtgaagact ggattgctgt caatgtcact cctcagttg tctcttttca
3541 acttgaaggc atgagtcoca gatgctttat tgccttccag gttagggctt ttacatctaa
3601 ggggcccagga ccatatgctg acgttgtaaa gtctacaaca tcagaaatca acccatttcc
3661 tcaactcata actcttcttg gtaacaagat agttttttta gatatggatc aaaatcaagt
3721 tgtgtggagc ttttcagcag aaagagttat cagtgcctgt tgctacacag ctgataatga

```

Figura 6B (cont.)

3781 gatgggatat tatgctgaag gggactcact ctttctctg cacttgcaca atcgctctag
3841 ctctgagctt ttccaagatt cactgggttt tgatatcaca gttattacaa ttgactggat
3901 ttcaaggcac ctctactttg cactgaaaga atcacaaaat ggaatgcaag tattttgatgt
3961 tgatcttgaa cacaaggtga aatatcccag agaggtgaag atccacaata ggaattcaac
4021 aataatttct ttttctgtat atcctctttt aagtcgcttg tattggacag aagtttccaa
4081 ttttggctac cagatgttct actacagtat tatcagtcac accttgcacc gaattctgca
4141 acccacagct acaaaccaac aaaacaaaag gaatcaatgt tcttghtaat tgactgaatt
4201 tgagttaagt ggagcaatgg ctattgatac ctctaaccta gagaaccat tgatatactt
4261 tgccaaagca caagagatct gggcaatgga tctggaaggc tgcagtggtt ggagagttat
4321 cacagtacct gctatgctcg caggaaaaac ccttggttagc ttaactgttg atggagatct
4381 tatatactgg atcatccacag caaaggacag cacacagatt tatcaggcaa agaaaggaaa
4441 tggggccatc gtttcccagg tgaaggccct aaggagttag catatcttgg ctacagttc
4501 agttatgcag ccttttccag ataaagcgtt tctgtctcta gottcagaca ctgtggaacc
4561 aactatactt aatgccacta acactagcct cacaaatcaga ttacctcttg ccaagacaaa
4621 oactcacatgg cccagctca cagccctac tccaacatag ctgggtttatt tgcagaagt
4681 taatgacagg aaaaacagct ctgacttgaa atatagaatt ctggaatttc aggacagtat
4741 agctcttatt gaagattttac aaccttttc aacatacatg atacagatag ctgtaaaaaa
4801 ttattattca gatccttttg aacatttacc accaggaaaa gagatttggg gaaaaactaa
4861 aaatggagta ccagagccag tgcagctcat taatacaact gtgcggtcag acaccagcct
4921 cattatattc tggagagaat ctcaaacgac aaatggacct aaagaatcag tccgttatca
4981 gttggcaatc tcacaacctg cctaatttcc tgaactcct ctgaacaaa gtgaatttcc
5041 aaatggaagg ctcaactctcc ttgttactag actgtctggt ggaatattt atgtgttaaa
5101 ggttcttgcc tgcactctg aggaatgtg gtgtacagag agtcatctg tcactgtgga
5161 aatgtttaac acaccagaga aaccttattc cttggttcca gagaacta gtttgcaatt
5221 taattggaag gctccattga atgttaacct catcagattt tgggttagc tacagaagtg
5281 gaaatacaat gagttttacc atgttaaac ttcagtcagc caaggtctg ctatgtctg
5341 taatacaca aatctacaac ctataacttc atataatgtc agagtgttg tggttataa
5401 gacgggagaa aatagcacct cacttccaga aagctttaag acaaaagctg gagttccaaa
5461 taaaccaggc attcccaaat tactagaagg gagtaaaaa tcaatacagt gggagaaagc
5521 tgaagataat ggatgtagaa ttacatacta tctccttgag ataagaaa gcaacttcaa
5581 tcaattacag aaccagaatt taaggtgaa gatgacatt aatggatcct gcagtatgt
5641 ttgcaatgg aagtccaaa acctgaaaag aatatttcaag ttcagagtag taqctgcaaa
5701 taatctaggg tttgtgaa atagtggaat cagtgagaat attatattag ttggagatga
5761 ttttggata ccagaacaa gtttcatact tactattata gttggaat tctctgtgt
5821 tacaatcca ctgacctttg TCTGGCATAG AAGATTAAG AATCAAAA GTGCCAAGGA
5881 AGGGGTGACA GTGCTTATA ACGAAGACAA AGAGTTGGCT GAGCTGCGAG GTCTGGCAGC
5941 CGGAGTAGGC CTGGCTAATG CCTGCTATGC AATACATACT CTTCACCC AAGAGGAGAT
6001 TGAAATCTT CTGCTTCC CTCGGGAAA ACTGACTCTG CGTCTCTTG TGGGAAGTGG
6061 AGCCTTGGGA GAAGTGTATG AAGGAACAGC AGTGGACATC TTAGGAGTTG AAGTGGAGA
6121 AATCAAAGTA GCAGTGAAGA CTTTGAAGAA GGTTCCACA GACCAGGAGA AGATTGAATT
6181 CCTGAAGGAG GCACATCTGA TGAGCAAAT TAATCATCCC AACATTCTGA AGCAGCTTGG
6241 AGTTTGTCTG CTGAATGAAC CCCAATACAT TATCCTGGAA CTGATGGAGG GAGGAGACCT
6301 TCTTACTTAT TTGCGTAAAG CCCGGATGGC AACGTTTTAT GGTCTTTTAC TCACCTTGGT
6361 TGACCTTGTG GACCTGTGTG TAGATATTTT AAAAGGCTGT GTCTACTTGG AACGGATGCA
6421 TTTCATTCAC AGGGATCTGG CAGCTAGAAA TTGCCTTGT TCCGTGAAAG ACTATACCAG
6481 TCCACGGATA GTGAAGATTG GAGACTTTGG ACTCGCCAGA GACATCTATA AAAATGATTA
6541 CTATAGAAAG AGAGGGGAAG GCCTGCTCCC AGTTCGGTGG ATGGCTCCAG AAGTTTGTG
6601 GGATGGAATC TTCACTACTC AATCTGATGT ATGGTCTTTT GGAATTCTGA TTTGGGAGAT
6661 TTTAACTCTT GGTTCATCAGC CTTATCCAGC TCATTCCAAC CTTGATGTGT TAAACTATGT
6721 GCAAACAGGA GGGAGACTGG AGCCACCAAG AAATGTCTCT GATGATCTGT GGAATTTAAT
6781 GACCCAGTGC TGGGCTCAAG AACCCGACCA AAGACCTACT TTTCATAGAA TTCAGGACCA
6841 ACTTCAGTTA TTCAGAAAT TTTTCTTAAA TAGCATTAT AAGTCCAGAG ATGAAGCAAA
6901 CAACAGTGGG GTCATAAATG AAAGCTTTGA AGGTGAAGAT GCGGATGTGA TTTGTTTGA
6961 TTTCTGCTT GCTACAGAA GTGGCCAAGG TGAAGAAAAG TCTGAGGGTC CTCTAGGCTC
7021 CCAGGAATCT GAATCTTGTG GTCGAGGAA AGAAGAGAAG GAACCCATG CAGACAAGA
7081 TTTCTGCTT GCTACAGAA GTGGCCAAGG TGAAGAAAAG TCTGAGGGTC CTCTAGGCTC
7141 TTTCTGCTT GCTACAGAA GTGGCCAAGG TGAAGAAAAG TCTGAGGGTC CTCTAGGCTC
7201 TGCTGTCTC ACTCACAGTG GATATGGAGA TGGTCTGAT TAATAGCCTT GTTTGGGAAA
7261 TAGAGAGTTG AGATAAACAC TCTCATTGAG TAGTTACTGA AAGAAAATC TGCTAGAATG
7321 ATAAATGTCA TGGTGGTCTA TAACTCCAAA TAAACAATGC AACGTTCC

Figura 7



293 transfectantes

Figura 8

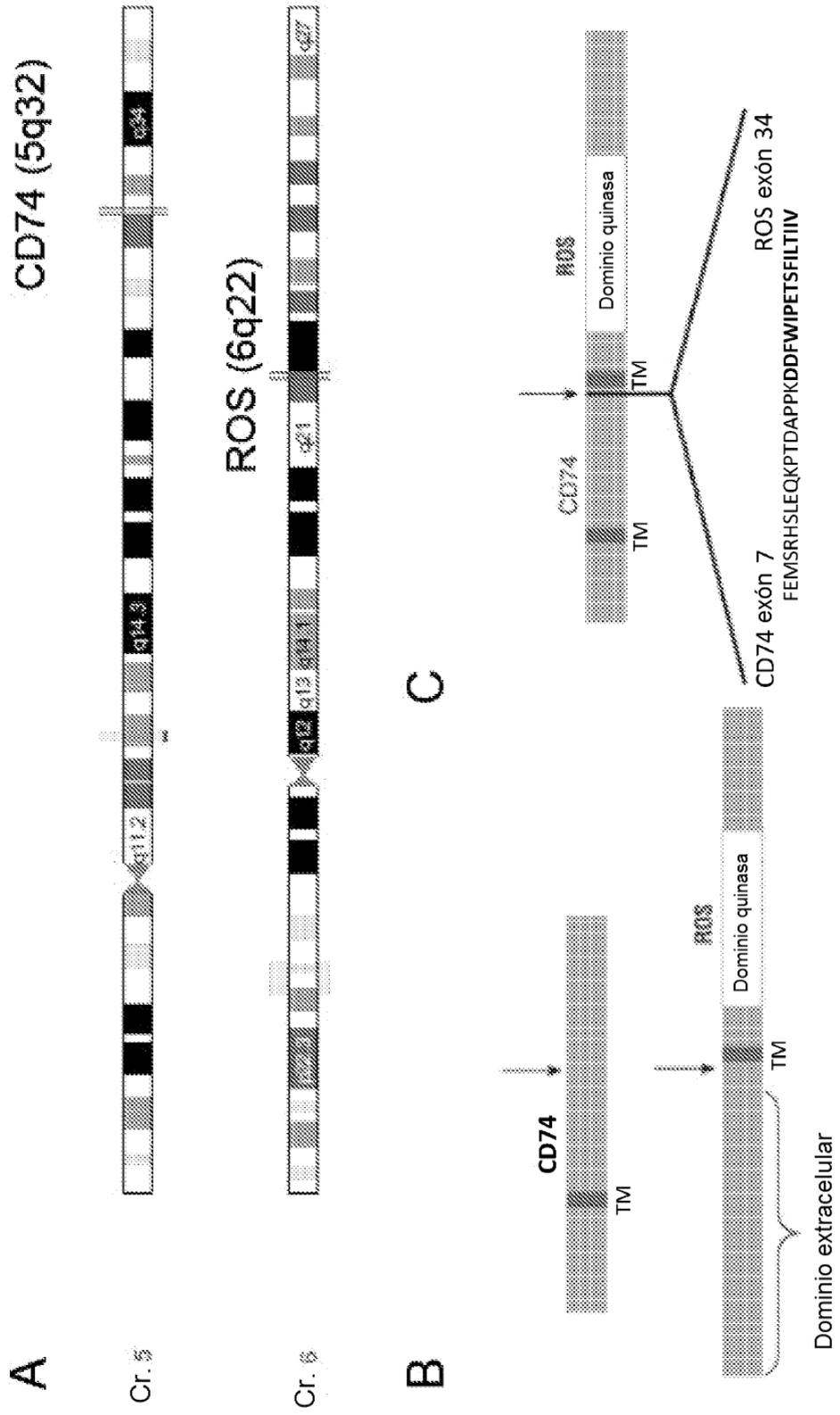


Figura 9

MHRRRSRSCREDQKPVMDQDRDLISNNEQLPMLGRRPGAPESKCSR GALYT
GFSILVTL LLAGQATTAYFLYQQQGR LDKLTVTSQNLQLENLRMKLPKPPKPV S
KMRMATPLL MQALPMGALPQGPMQNATKYGNMTE DHVMHLLQNADPLKVYP
PLKGSFPENLRHLKNTMETIDWKVFESWMHHLWFEMSRHSLEQKPTDAPPK
DDFWIPETSFILTIIVGIFLVVTIPLTFVWHRRLKNQKSAKEGVTVLIN EDKELAE L
RGLAAGVGLANACYAIHTLPTQEEIENLPAFPREKLTLRLLL GSGAFGEVYEGT
AVDILGVGSGEIKVAVKTLKKGSTDEKIEFLKEAHLMSKFNHPN ILKQLGVCL
LNEPQYIILELMEGDLLTYLRKARMAFYGPLLTLVDLVDLCVDISKGC VYLE
RMHFHRDLAARNCLVSVKDYTSPIVKIGDFGLARDIYKNDYRKRGE GLLPV
RWMAPESLMDGIFTTQSDVWSFGILIWEILTLGHQPYP AHSNLDVNLVYVQTGG
RLEPPRNCDDLWNLMTQCWAQEPDQRPTFHRIQDQLQLFRNFFL NSIYKSR
DEANNSGVINESFEGEDGDVICLNSSDIMPVALMETKNREGLNYMVLATE CGQ
GEEKSEGPLGSESESCGLRKEEKEPHADKDFCQEKQVAYCPSGKPEGL NYA
CLTHSGYGDGSD

ATGCACAGGAGGAGAAGCAGGAGCTGTCGGGAAGATCAGAAGCCAGTCAT
GGATGACCAGCGCGACCTTATCTCCAACAATGAGCAACTGCCCATGCTGGG
CCGGCGCCCTGGGGCCCCGGAGAGCAAGTGCAGCCGCGGAGCCCTGTAC
ACAGGCTTTTCCATCCTGGTGACTCTGCTCCTCGCTGGCCAGGCCACCACC
GCCTACTTCCTGTACCAGCAGCAGGGCCGGCTGGACAACTGACAGTCAC
CTCCCAGAACCTGCAGCTGGAGAACCTGCGCATGAAGCTTCCCAAGCCTCC
CAAGCCTGTGAGCAAGATGCGCATGGCCACCCCGCTGCTGATGCAGGCGC
TGCCCATGGGAGCCCTGCCCCAGGGGCCCATGCAGAATGCCACCAAGTAT
GGCAACATGACAGAGGACCATGTGATGCACCTGCTCCAGAATGCTGACCCC
CTGAAGGTGTACCCGCCACTGAAGGGGAGCTTCCCGGAGAACCTGAGACA
CCTTAAGAACACCATGGAGACCATAGACTGGAAGGTCTTTGAGAGCTGGAT
GCACCATTGGCTCCTGTTTGAATGAGCAGGCACTCCTTGGAGCAAAAGCC
CACTGACGCTCCACCGAAAGATGATTTTTGGATACCAGAAACAAGTTTCATA
CTTACTATTATAGTTGGAATATTTCTGGTTGTTACAATCCCACTGACCTTTGT
CTGGCATAGAAGATTAAGAATCAAAAAAGTGCCAAGGAAGGGGTGACAGT
GCTTATAAACGAAGACAAAGAGTTGGCTGAGCTGCGAGGTCTGGCAGCCG
GAGTAGGCCTGGCTAATGCCTGCTATGCAATACATACTTTCCAACCCAAGA
GGAGATTGAAAATCTTCCTGCCTTCCCTCGGGAAAAACTGACTCTGCGTCT
CTTGCTGGGAAGTGGAGCCTTTGGAGAAGTGTATGAAGGAACAGCAGTG
GACATCTTAGGAGTTGGAAGTGGAGAAATCAAAGTAGCAGTGAAGACTTT
GAAGAAGGGTTCCACAGACCAGGAGAAGATTGAATTCCTGAAGGAGGCA
CATCTGATGAGCAAATTTAATCATCCCAACATTCTGAAGCAGCTTGGAGTT
TGTCTGCTGAATGAACCCCAATACATTATCCTGGAAGTGAAGGAGGAGG
AGACCTTCTACTTATTTGCGTAAAGCCGGATGGCAACGTTTTATGGTCC
TTTACTCACCTTGGTTGACCTGTAGACCTGTGTGTAGATATTTCAAAGG

Figura 9 (cont.)

CTGTGTCTACTTGGAACGGATGCATTTTCATTCACAGGGATCTGGCAGCTAG
AAATTGCCTTGTTTCCGTGAAAGACTATACCAGTCCACGGATAGTGAAGAT
TGGAGACTTTGGACTCGCCAGAGACATCTATAAAAATGATTACTATAGAAA
GAGAGGGGAAGGCCTGCTCCAGTTCGGTGGATGGCTCCAGAAAGTTTG
ATGGATGGAATCTTCACTACTCAATCTGATGTATGGTCTTTTGAATTCTGA
TTTGGGAGATTTTAACTCTTGGTCATCAGCCTTATCCAGCTCATTCCAACCT
TGATGTGTTAAACTATGTGCAAACAGGAGGGAGACTGGAGCCACCAAGAA
ATTGTCCTGATGATCTGTGGAATTTAATGACCCAGTGCTGGGCTCAAGAAC
CCGACCAAAGACCTACTTTTCATAGAATTCAGGACCAACTTCAGTTATTCA
GAAATTTTTTCTTAAATAGCATTATAAGTCCAGAGATGAAGCAAACAACAGT
GGAGTCATAAATGAAAGCTTTGAAGGTGAAGATGGCGATGTGATTTGTTTGA
ATTCAGATGACATTATGCCAGTTGCTTTAATGGAAACGAAGAACCGAGAAGG
GTTAAACTATATGGTACTTGCTACAGAATGTGGCCAAGGTGAAGAAAAGTCT
GAGGGTCCTCTAGGCTCCCAGGAATCTGAATCTTGTGGTCTGAGGAAAGAA
GAGAAGGAACCACATGCAGACAAAGATTTCTGCCAAGAAAAACAAGTGGCT
TACTGCCCTTCTGGCAAGCCTGAAGGCCTGAACTATGCCTGTCTCACTCAC
AGTGGATATGGAGATGGGTCTGATTAA

Figura 10

MHRRRSRSCREDQKPVMDORDLISNNEQLPMLGRRPGAPESKCSRGALY
TGFSILVTLLLAGQATTAYFLYQQOGRDKLTVTSONLQLENLRMKLPKP
PKPVSKMRMATPLLMQALPMGALPOGPMQONATKYGNMTEDHVMHLLQAD
PLKVYPPLKGSFPENLRHLKNTMETIDWKVFESWMHHWLLFEMSRHSLEQ
KPTDAPPKVLTKCQEEVSHIPAVHPGSFRPKDENGNYLPLQCYGSIGYC
WCVPNGTEVPNTRSRGHHNCSESLELEDPSGLGVTKQDLGPAPL

CAGGGTCCCAGATGCACAGGAGGAGAAGCAGGAGCTGTCGGGAAGATCAG
AAGCCAGTCATGGATGACCAGCGCGACCTTATCTCCAACAATGAGCAACT
GCCCATGCTGGGCGGCGCCCTGGGGCCCCGGAGAGCAAGTGCAGCCGCG
GAGCCCTGTACACAGGCTTTTCCATCCTGGTGACTCTGCTCCTCGCTGGC
CAGGCCACCACCGCTACTTCTGTACCAGCAGCAGGGCCGGCTGGACAA
ACTGACAGTCACCTCCCAGAACCTGCAGCTGGAGAACCTGCGCATGAAGC
TTCCCAAGCCTCCAAGCCTGTGAGCAAGATGCGCATGGCCACCCCGCTG
CTGATGCAGGCGCTGCCATGGGAGCCCTGCCCCAGGGGCCCATGCAGAA
TGCCACCAAGTATGGCAACATGACAGAGGACCATGTGATGCACCTGCTCC
AGAATGCTGACCCCTGAAGGTGTACCCGCCACTGAAGGGGAGCTTCCCG
GAGAACCTGAGACACCTTAAGAACACCATGGAGACCATAGACTGGAAGGT
CTTTGAGAGCTGGATGCACCATTTGGCTCCTGTTTGAATGAGCAGGCACT
CCTTGGAGCAAAAGCCCCTGACGCTCCACCGAAAGTACTGACCAAGTGC
CAGGAAGAGGTCAGCCACATCCCTGCTGTCCACCCGGGTTTATTAGGCC
CAAGTGCAGACGAGAACGGCAACTATCTGCCACTCCAGTGCTATGGGAGCA
TCGGCTACTGCTGGTGTGTCTTCCCAACGGCACGGAGGTCCCAACACC
AGAAGCCGCGGGCACCATAACTGCAGTGAGTCACTGGAAGTGGAGGACCC
GTCTTCTGGGCTGGGTGTGACCAAGCAGGATCTGGGCCAGCTCCTTTG

Figura 11A

MKNIYCLIPKLVNFATLGCLWISVVQCTVNLNSCLKSCVTNLGQQQLDLGTPHNLSEPCIQG
 CHFWNSVDQKNCALKCRESCCEVGCSSAEGAYEEVLENADLPTAPFASSIGSHNMTLRWK
 SANFSGVKYIIQWKYAQLLGSWYTKTVSRPSYVVKPLHPFTEYIFRVVWIFTAQLQLYS
 PPSPSYRTHPHGVPETAPLIRNIESSSPDTVEVSWDPPQFPGGPILGYNLRLISKQKLD
 AGTQRTSFQFYSTLPNTIYRFSIAAVNEVGEGPEAESSITSSSAVQQEEQWLFLSRKTS
 LRKRSLKHLVDEAHCLRLDAIYHNITGISVDVHQQIVYFSEGTLIWAKKAANMSDVSDLR
 IFYRGSGLISSISIDWLYQRMFYIMDELVCVCDLENCNIEEITPPSISAPQKIVADSYN
 GYVFYLLRDGIYRADLPVPSGRCAEAVRIVESCTLKDFAIKPQAKRIYFNDTAQVFMST
 FLDGSASHLILPRIPFADVKSFACENNDFLVTDGKVIQQDALSNEFIVGCDLSHIEEF
 GFGNLVIFGSSSQLHPLPGRPQELSFLVFGSHQALVQWKPPALAIGANVILISDIIELFEL
 GPSAWQNWYEVKVSTQDPPEVTHIFLNIISGTMNLVPELQSAMKYKVSVRASSPKRPGPW
 SEPSVGTTLVPASEPPFIMAVKEDGLWSKPLNSFGPGEFLSSDIGNVSDMDWYNNLSLYS
 DTKGDVVFVWLLNGTDISENYHLPSIAGAGALAFEWLGHFLYWAGKTYVIQRQSVLTGHTD
 IVTHVKLLVNDMVVDSVGGYLYWTTLYSVESTRLNGESSLVLTQTPWFSGKKVIALTLDL
 SDGLLYWLQDSQCIHLYTAVLRGQSTGDTTITEFAAWSTSEISQNALMYSSGRLFWING
 FRIITTQEICQKTSVSVLEPARENQFTIIQTSCLKPLPGNFSFTPKVIPDSVQESSFRIEG
 NASSFQILWNGPPAVDWGVVYFYSVEFSAHSKFLASEQHSLPVFTVEGLEPYALFNLSVTP
 YTYWGKGPKTSLSLRAPETVPSAPENPRIFILPSGKCCNKNEVVVEFRWNKPKHENGVL
 KFEIFYNISNQSITNKTCEWDIAVNVTPSVMFQLEGMSPRCFIAFQVRAFTSKGPGPYA
 DVVKSTTSEINPFPHLITLLGNKIVFLDMDQNQVWTFSAERVISAVCYTADNEMGYAE
 GDSLFLLLHLHNRSSSELFQDSLVDITVITIDWISRHLIFALKESQNGMQVFDVBLEHKV
 KYPREVKIHNRNSTIISFSVYPLLSRLYWTEVSNFCYQMFYYSIISHTLHRILOPTATNQ
 QNKRNCSCCNVTEFELSGAMAIDTNSLEKPLIYFAKAQEIWAMDLEGCCQWRVITVPAML
 AGKTLVSLTVDGDLIYWIITAKDSTQIYQAKKNGAIVSQVKALRSRHILAYSVMQPPF
 DKAFSLASDTVEPTILNATNTSLTIRLPLAKTNLTWYGITSPTPTYLVYYAEVNRKNS
 SDLKYRILEFQDSIALIEDLQPFSTYMIQIAVKNYSDPLEHLPPGKEIWKTKNGVPEA
 VQLINTTVRSDTSLIISWRESHKPNGPKESVRYQLAISHLALIPETPLRQSEFPNGRLTL
 LVTRLSSGNIYVLKVLACHSEEMWCTESHPTVEMFNTPEKPYSLVPENTSLQFNWKAPL
 NVNLIRFWVELQKWKYNEFYHVKTSCSQGPAYVCNITNLQPYTSYNVRVVVVYKTGENST
 SLPESFKTKAGVPNKPGIPKLEGSKNISQWEKAEDNGCRITYYLEIRKSTSNLQONQ
 LRWKMTFNGSCSSVCTWKSKNLKGIFQFRVVAANLGFGEYSGISENIIIVGDDFWIPET
SFILTIIVGIFLVVTIPLTFVWHRRLKNQKSAKEGVTVLINEDKELAE LRGLAAGVGLAN
ACYAIHTLPTQEEIENLPAFPREKTLRLLLGSGAFGEVYEGTAVDILGVGSGEIKVAVK
TLKKGSTDQEKIEFLKEAHLMSKFNHPNIIKQLGVCLLNEPQYIILELMEGDILLTYLRK
ARMATFYGPLLTLVDLVDLCVDISKGCVYLERMHFIHRDLAARNCLVSVKDYTSPRIVKI
GDFGLARDIYKNDYRKRGEGLLPVRWMAPESLMDGIFTTQSDVWSFGILIWEILTLGHQ
PYPAHSNLDVNLNVQTTGGRLEPPRNCPPDLLWNLMTQCWAQEPDQRPTFHRIQNQLQLFRN
FFLNSIYQCRDEANNSSGVINESFEGEDGDVICLNSDDIMPVVLMETKNREGLNYMVLATE
CGQGEEKSEGPLGSQSESESCGLRKEEKEPHADKDFCQEKQVAYCPSGKPEGLNYACLTHS
GYGDGSD

Figura 11B

```

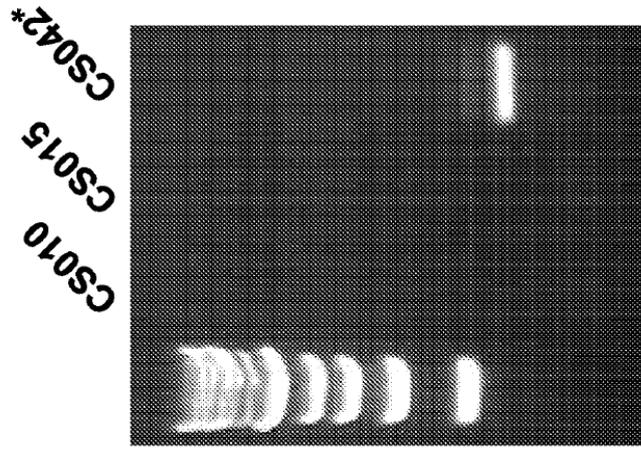
1 caagctttca agcattcaaa ggtctaaatg aaaaaggcta agtattatttt caaaaggcaa
61 gtatatccta atatatgcaa acaaacaaag caaaatccat cagctactcc toccaattgaa
121 gtgatgaagc ccaaataatt catatagcaa aatggagaaa attagaccgg ccatctaaaa
181 atctgccatt ggtgaagtga tgaagaacat ttactgtctt attccgaagc ttgtcaatft
241 tgcaactcct ggctgcctat ggatttctgt ggtgcagtggt acagttttaa atagctgcct
301 aaagtctgtg gtaactaatc tgggccagca gottgacctt ggcacaccac ataactctgag
361 tgaaccgtgt tatccaaggat gtcacttttg gaactctgta gatcagaaaa actgtgctft
421 aaagtgtcgg gagtctgtgt aggttggctg tagcagcggg gaaggtgcat atgaagagga
481 agtactggaa aatgcagacc taccactgc tccctttgct tottccattg gaagccacaa
541 tatgacatta cgatggaaat ctgcaaactt ctctggagta aaatacatca ttcagtgtaa
601 atatgcacaa cttctgggaa gctggactta tactaagact gtgtccagac cgtcctatgt
661 ggtcaagccc ctgcccctt tcactgagta ctttttccga gtggtttgga tottccacagc
721 gcagctgcag ctctactccc ctccaagtcc cagttacagg actcatcctc atggagtcc
781 tgaactgca cctttgatta ggaatattga gagctcaagt cccgacactg tggagtcag
841 ctgggatcca cctcaattcc caggtggacc tattttgggt tataacttaa ggctgatcag
901 caaaaatcaa aaattagatg cagggacaca gagaaccagt ttccagtttt actccactft
961 accaaatact atctacaggt tttctattgc agcagtaaat gaagtgggtg agggccaga
1021 agcaaatct agtattacca cttcatcttc agcagttcaa caagaggaac agtggctctt
1081 tttatccaga aaaacttctc taagaaagag atctttaaaa catttagtag atgaagcaca
1141 ttgcttctgg ttggatgcta tataccataa tattacagga atatctgttg atgtccacca
1201 gcaaatgttt tatttctctg aaggaactct catatggggc aagaaggctg ccaacatgtc
1261 tgatgtatct gacctgagaa tttttacag aggttcagga ttaatttctt ctatctccat
1321 agattggctt tatcaagaa tgtatttcat catggatgaa ctggtatgtg tctgtgattt
1381 agagaactgc tcaaacatcg aggaaattac tccacctct attagtgcac ctcaaaaaat
1441 tgtggctgat tcatacaatg ggtatgtctt ttacctctg agagatggca tttatagagc
1501 agacctctct gtacctctg gccgggtgtc agaagctgtg cgtattgtgg agagttgcac
1561 gttaaaggac tttgcaatca agccacaagc caagogaatc atttacttca atgacactgc
1621 ccaagtcttc atgtcaacat tctggatgg ctctgctcc catctcatcc tacctcogat
1681 ccctttgct ttccaacagg atgctttgtc ttttaatgaa ttcatcgtg gatgtgacct
1741 caaggtcatt ttccaacagg atgctttgtc ttttaatgaa ttcatcgtg gatgtgacct
1801 gagtcacata gaagaatttg ggtttgtaa cttggtcatc tttggtcat cctcccagct
1861 gcacctctg ccaggccgccc cgcaggagct ttgggtgctg tttggtctc accaggctct
1921 tgttcaatgg aagcctctg ccttgccc atggagccaa gtcatcctga tcaagtbat
1981 tattgaactc tttgaattag gccctctgc ctggcagaac tggacctag tggagaaatg
2041 atccacccaa gacctctctg aagtcactca tattttcttg aacataagtg gaacctgct
2101 gaatgtacct gagctgcaga gtgctatgaa atacaagggt tctgtgagag caagttctcc
2161 aaagaggcca ggccccggt cagagccctc agtgggtact acctgggtg cagctagtga
2221 accaccattt atcatggctg tgaagaaga tgggctttgg agtaaaccat taaatagctt
2281 tggcccagga gatttcttat cctctgat atggaaatgtg tcagacatgg attggtataa
2341 caacagcctc tactacagtg acacgaaagg cgacgtttt gtgtggctg tgaatgggac
2401 ggatatctca gagaattatc acctaccag cattgcagga gcaggggct tagcttttga
2461 gtggctgggt cacttctct actgggctgg aaagacatat gtgatacaaa ggcagctctg
2521 gttgacggga cacacagaca ttgttacc caaggaagct tgggtgaatg acatgggtgt
2581 ggattcagtt ggtggatct tctactggac cacactctat tcaaggaaa gcaccagact
2641 aaatggggaa agttcccttg tactacagac acagccttg tttctgga aaaaggtaat
2701 tgccttaact ttagacctca gtgatgggt cctgtattgg ttggttcaag acagtcaatg
2761 tttcacctg tacacagctg ttctcgggg acagagcact ggggatacca ccatcacaga
2821 atttgcagcc tggagtact ctgaaatftc ccagaatgca ctgatgtact atagtggctg
2881 gctgttctgg atcaatggct ttaggattat cacaactcaa gaaatagg agaaaaccag
2941 tgtctctggt ttggaaccag ccagatttaa tcagttcaca attattcaga catcccttaa
3001 gccctgcca gggactttt cctttacccc taaggttatt ccagattctg ttcaagagtc
3061 ttcatfttag attgaaggaa atgcttcaag ttttcaatc ctgtggaatg gtccccctgc
3121 ggtagactgg ggtgtagttt tctacagtg agaatfttag gctcattcta agttcttggc
3181 tagtgaacaa cactctttac ctgtatttac tgtggaagga ctggaacctt atgccttatt
3241 taactttct gtcactcctt atacctact gggaaaaggc ccaaaaacct ctctgtcact
3301 tgcagcact gaaacagttc catcagcacc agagaacccc agaatattta tattaccaag
3361 tggaaaatgc tgcaacaaga atgaagttgt ggtggaattt aggtggaaca aacctaaagca
3421 tgaaaaatgg gtgttaacaa aatftgaaat tttctacaat atatccaatc aaagtattac
3481 aacaaaaaca tgtgaagact ggattgtct caatgtcact cctcagtgta tgtcttttca
3541 acttgaaggg atgagctcca gatgctttat tgccttccag gttagggctt ttacatctaa
3601 ggggcccagga ccatatgctg acgttftaaa gtctacaaca tcagaaatca acctattcc

```

Figura 11B (cont.)

3661 tcacctcata actcttcttg gtaacaagat agttttttta gatatggatc aaaatcaagt
3721 tgtgtggacg ttttcagcag aaagagttat cagtgcogtt tgotacacag ctgataatga
3781 gatgggatat tatgctgaag gggactcact ctttctctcg cacttgcaca atcgcctctag
3841 ctctgagcct ttccaagatt cactggtttt tgatatacaca gttattacaa ttgactggat
3901 ttcaaggcac ctctactttg cactgaaaga atcacaaaat ggaatgcaag tatttgatgt
3961 tgatcttgaa cacaaaggta aatatccag agagggtgaag attcacaata ggaattcaac
4021 aataatctct ttttctgtat atoctctttt aagtcgcttg tattggacag aagtttccaa
4081 ttttggctac cagatgttct actacagtat tctcagtcac accttgcacc gaattctgca
4141 acccacagct acaaaccaac aaaacaaaag gaatcaatgt tcttngaattg tgactgaatt
4201 agttatgacg cttttccag ataaaagcgtt tctgtctcta gagaaccaa tgatatactt
4261 tgccaaagca caagagatct gggcaatgga tctggaaggc tgcagtggtt ggagagttat
4321 cacagtacct gctatgctcg caggaaaaac ccttggtagc ttaactgtgg atggagatct
4381 tatatactgg atcatcacag caaaggacag cacacagatt taccaggcaa agaaggaaa
4441 tggggccatc gtttcccagg tgaaggccct aaggagtagg cataccttgg cttacagttc
4501 agttatgacg cttttccag ataaaagcgtt tctgtctcta gcttcagaca ctgtggaacc
4561 aactatactt aatgccacta acactagcct cacaaatcaga ttacctctgg ccaagacaaa
4621 cctcacatgg tatggcatca ccagccctac tccaacatac ctggtttatt atgcagaagt
4681 taatgacagg aaaaacagct ctgacttgaa atatagaatt ctggaatttc aggacagtat
4741 agctcttatt gaagatttac aaccattttc aacatacatg atacagatag ctgtaaaaaa
4801 ttattattca gatccttttg aacattttacc accaggaaaa gagatttggg gaaaaactaa
4861 aatggagta ccagaggcag tgcagctcat taatacaact gtgcggctag acaccagcct
4921 cattatctct tggagagaat ctacacaagc aatggacct aaagaatcag tccgttatca
4981 gttggcaatc tcacacctgg ccctaatttc tgaactcct ctaagacaaa gtgaatttcc
5041 aatgggaagg ctcaactctc ttgttactag actgtctggt ggaatattt atgtgttaaa
5101 ggttcttgcc tgccactctg aggaaatgtg gtgtacagag agtcatctg tcaactgtgga
5161 aatgtttaac acaccagaga aaccttattc cttggttcca gagaacacta gtttgcaatt
5221 taattggaag gctccattga atgttaacct catcagattt tgggttgagc tacagaagtg
5281 gaaatacaat gagttttacc atgttaaac ttcatgcagc caaggctctg cttatgtctg
5341 taatacacaca aatctacaac cttatacttc atataatgtc agagtgtggt tggttataaa
5401 gacgggagaa aatagcaact cacttccaga aagctttaag acaaaagctg gagtccaaa
5461 taaaccaggc attcccaaat tactagaagg gatgaaaaat tcaatacagt gggagaaaagc
5521 tgaagataat ggatgtagaa ttacatacta tctccttgag ataagaaaga gcaactcaaa
5581 taatttacag aaccagaatt taagggtgaa gatgacattt aatggatcct gcagtatgt
5641 ttgcacatgg aagtccaaa acctgaaagg aatatttcag ttcagagtag tagctgcaaa
5701 taatctaggg tttgtgtaat atagtggat cagtgagaat attatattag ttggagatga
5761 tttttggata ccagaaacaa gtttcatact tactattata gttggaata tctctggttg
5821 tacaatccca ctgacctttg tctggcatag aagattaaag aatcaaaaaa gtgccaagg
5881 aggggtgaca gtgcttataa acgaagacaa agagttggct gagctgcgag gctctggcagc
5941 gggagtaggc ctggctaatt cctgctatgc aatacatact cttccaacc aagaggagat
6001 tgaaaatctt cctgccttcc ctgggaaaa actgactctg cgtctcttgc tgggaagtgg
6061 agcctttgga gaagtgtatg aaggaacagc agtggacatc ttaggagtg gaagtggaga
6121 aatcaaaagta gcagtgaaga ctttgaagaa gggttccaca gaccaggaga agattgaatt
6181 cctgaaggag gcacatctga tgagcaaat taatcatccc aacattctga agcagcttgg
6241 agtttgtctg ctgaatgaac cccaatacat tctcctggaa ctgatggagg gaggagacct
6301 tcttacttat ttgcgtaaa cccggatggc aacgttttat ggtcctttac tcaccttgg
6361 tgaccttgta gacctgtgtg tagatattc aaaaggctgt gtotacttgg aacggatgca
6421 tttcattcac agggatctgg cagctagaaa ttgccttgtt tccgtgaaa actataccag
6481 tccaaggata gtgaagattg gagactttg actcgccaga gacatctata aaaatgatta
6541 ctatagaaag agagggaag gcctgctccc agttcgggtg atggctccag aaagtttgat
6601 ggatggaatc ttcactactc aatctgatgt atggctttt ggaattctga tttgggagat
6661 tttaactctt ggtcatcagc cttatccagc tcattccaac cttgatgtgt taaactatgt
6721 gcaaacagga ggggactgg agccaccaag aatgttctct gatgatctgt ggaatttaat
6781 gaccagtgctc tgggctcaag aaccgacca aagacctact tttcatagaa ttcaggacca
6841 acttcagtta ttcagaaatt ttttcttaaa tagcatttat aagtcagag atgaagcaaa
6901 caacagtgga gtcataaatg aaagctttga aggtgaagat ggcgatgtga tttgtttgaa
6961 ttcagatgac attatgccag ttgctttaat ggaacgaaag aaccgagaag ggttaacta
7021 tatggtactt gctacagaat gtggccaagg tgaagaaaag tctgagggtc ctctaggctc
7081 ccaggaatct gaatcttgtg gtctgaggaa agaagagaag gaaccacatg cagacaaa
7141 tttctgcca gaaaaacaag tggcttactg ccttcttggc aagcctgaag gctgaacta
7201 tgctctgtct actcacagt gatattgaga tgggtctgat taatagcgtt tttgtggaaa
7261 tagagagttg agataaacac tctattcag tagttactga aagaaaactc gctagaatg
7321 ataaatgtca tgggtgtcta taactccaaa taacaatgc aacgttcc

Figura 12



CD74-ROS

CD74-F1: GCAGAATGCCACCAAGTATGGCAA
ROS-GSP3: TGCCAGACAAAGGTCAGTGGGATT

Figura 13 A-F

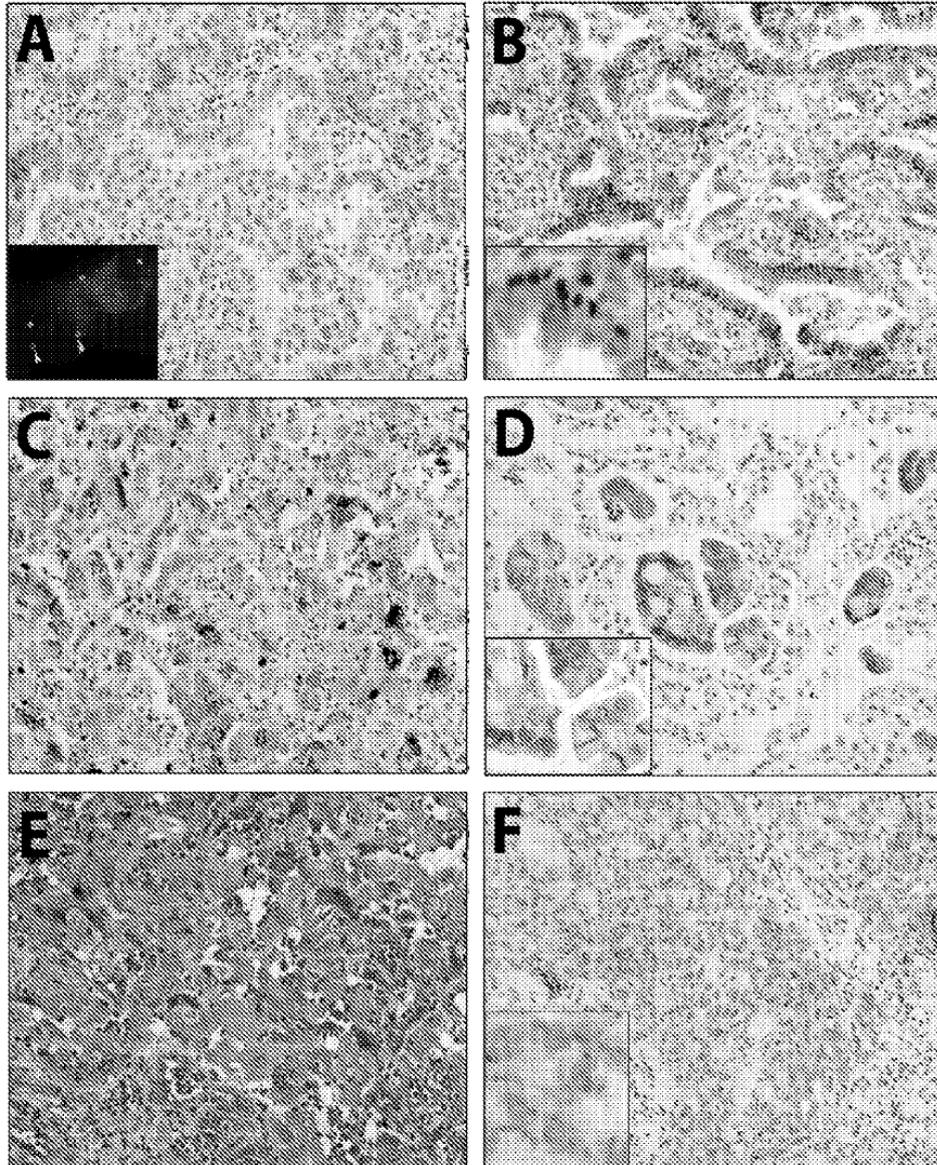


Figura 14

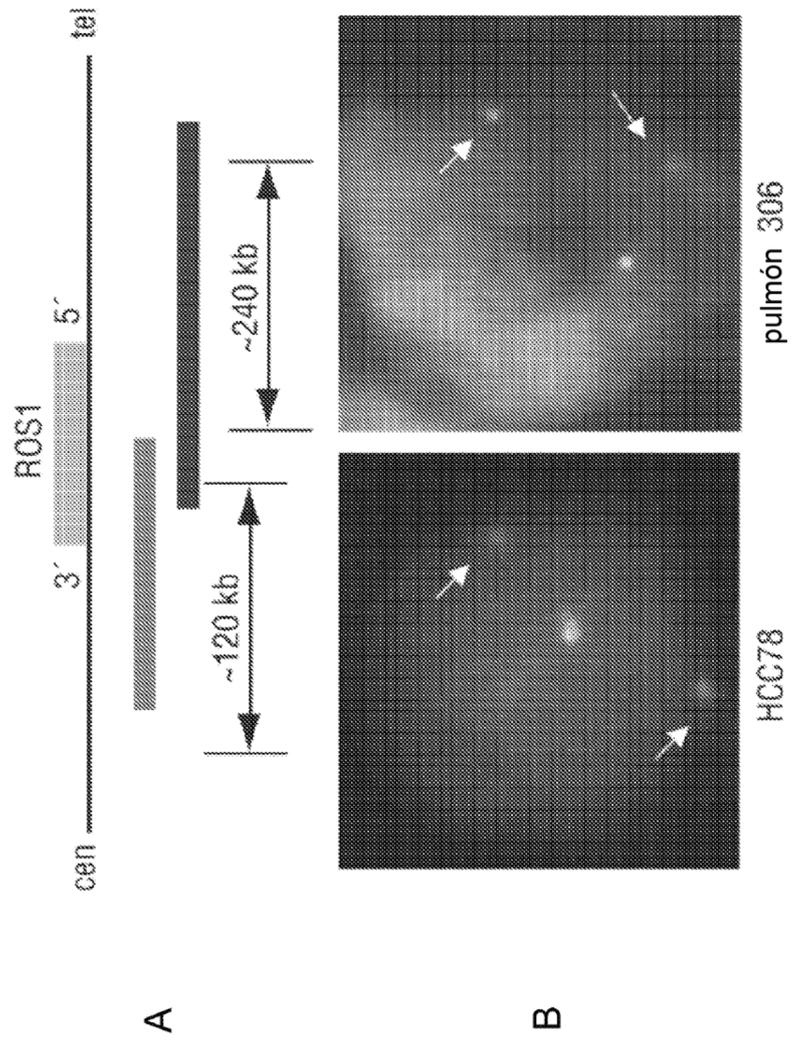


Figura 15

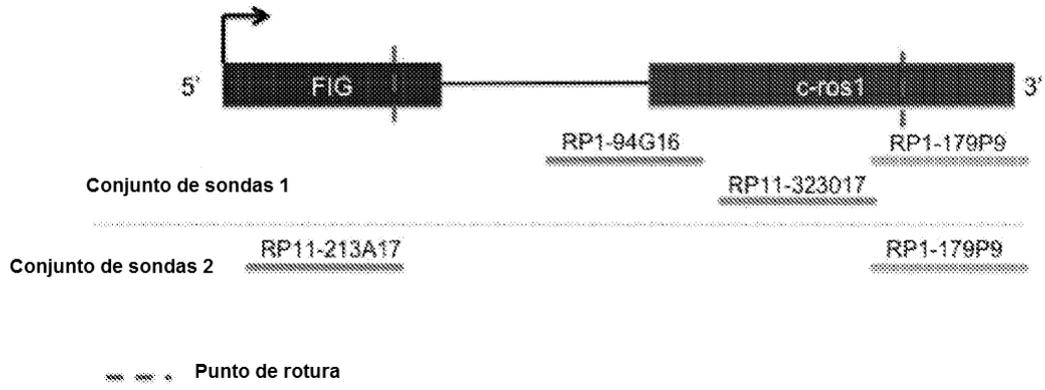


Figura 16 A-F

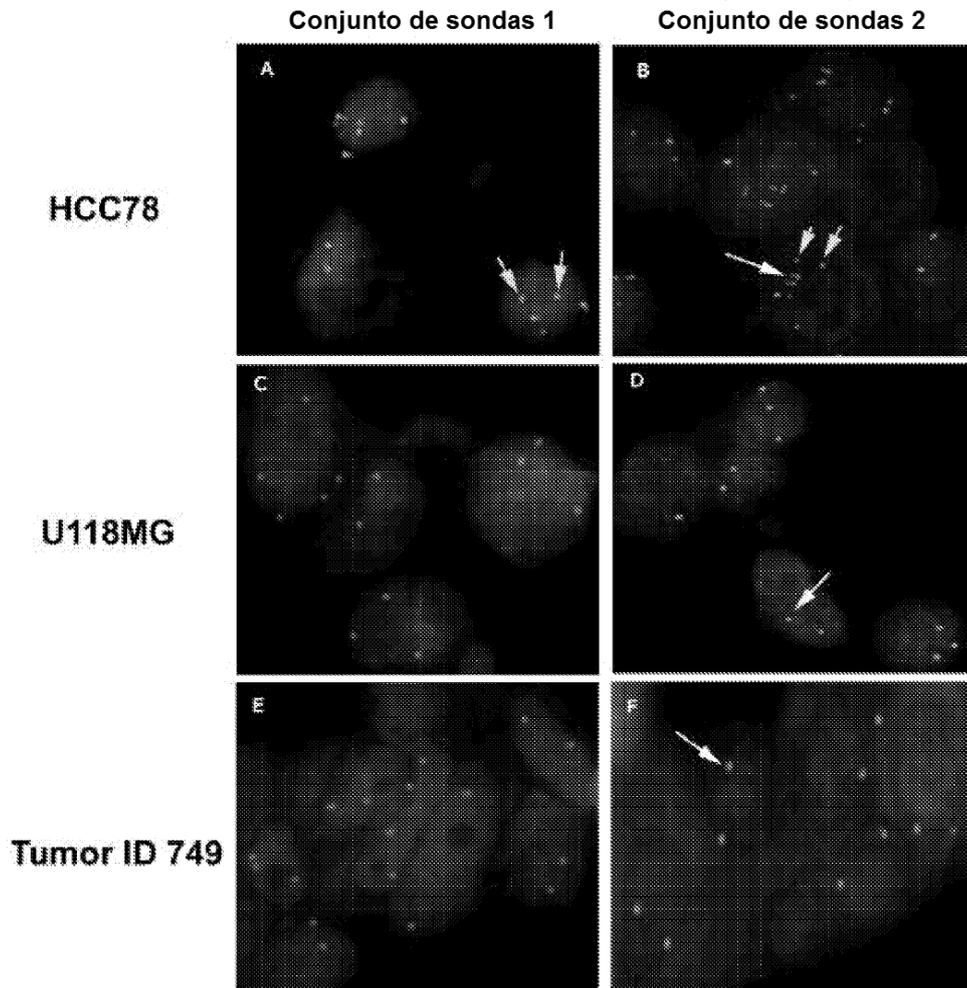


Figura 17

```

>1c1|9303
! longitud =167

Puntuación = 272 bits (147), Prev. = 3e-77
Identidades = 147/147 (100%), Huecos = 0/147 (0%)
Hebra=más/más

Consulta 556 GCTGTTCTCCAGGCTGAAGTATATGCGGGCCGAGACTAGCTGCCAAGTACTTGCATTAAGGAA 615
|||||
GCTGTTCTCCAGGCTGAAGTATATGCGGGCCGAGACTAGCTGCCAAGTACTTGCATTAAGGAA 62

Consulta 616 CTGGCAAGGAAGTACTCTTCCAACCCAGAGGAGATTGAAAATCTTCCCTGCCCTCCCTCGG 675
|||||
CTGGCAAGGAAGTACTCTTCCAACCCAGAGGAGATTGAAAATCTTCCCTGCCCTCCCTCGG 122

Consulta 676 GAAAACTGACTCTGGCTCTCTTGGCTG 702
|||||
GAAAACTGACTCTGGCTCTCTTGGCTG 149

```

Figura 18

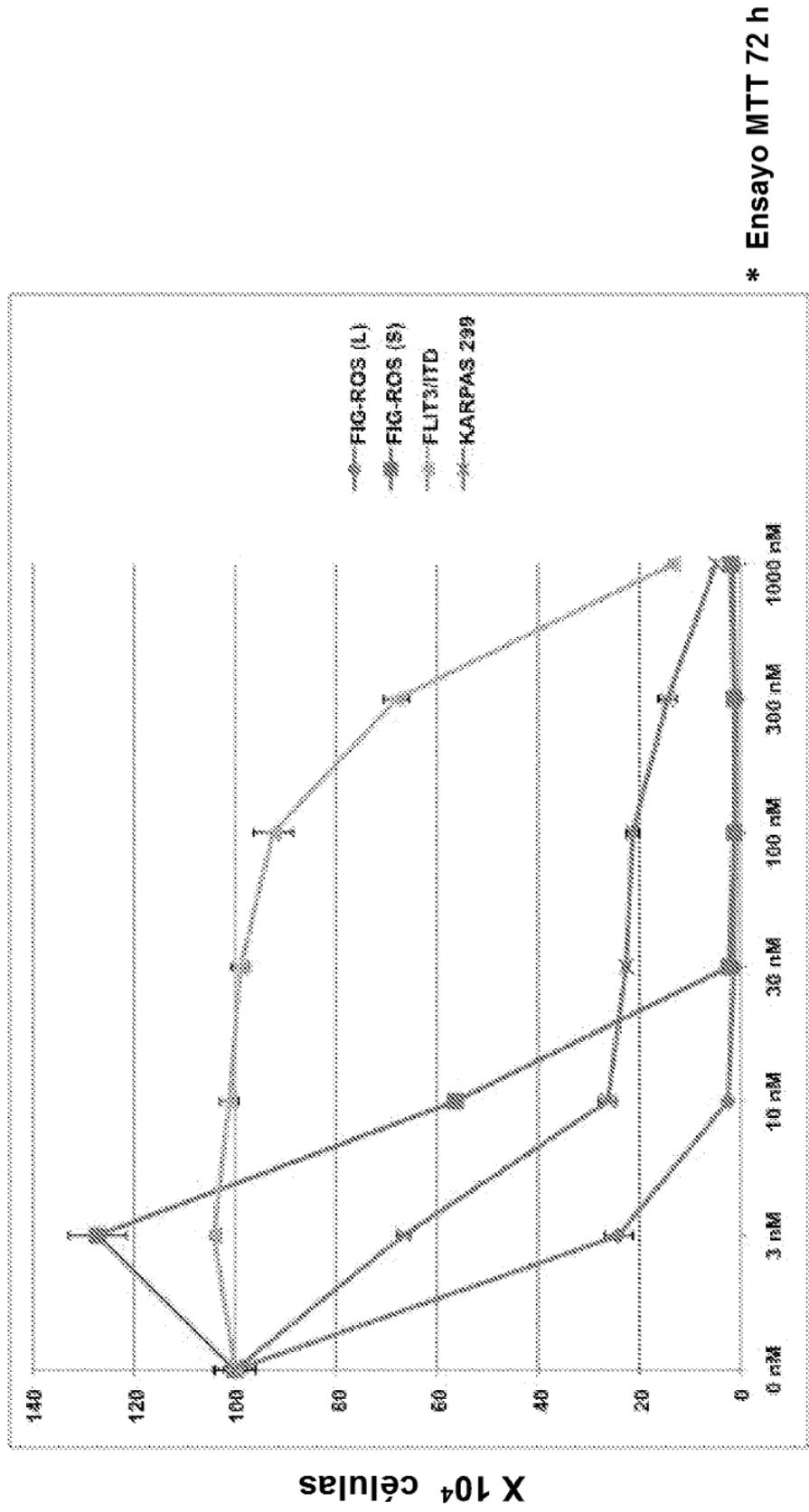


Figura 19: TAE-684 induce apoptosis en células BAF3 que expresan FIG-ROS

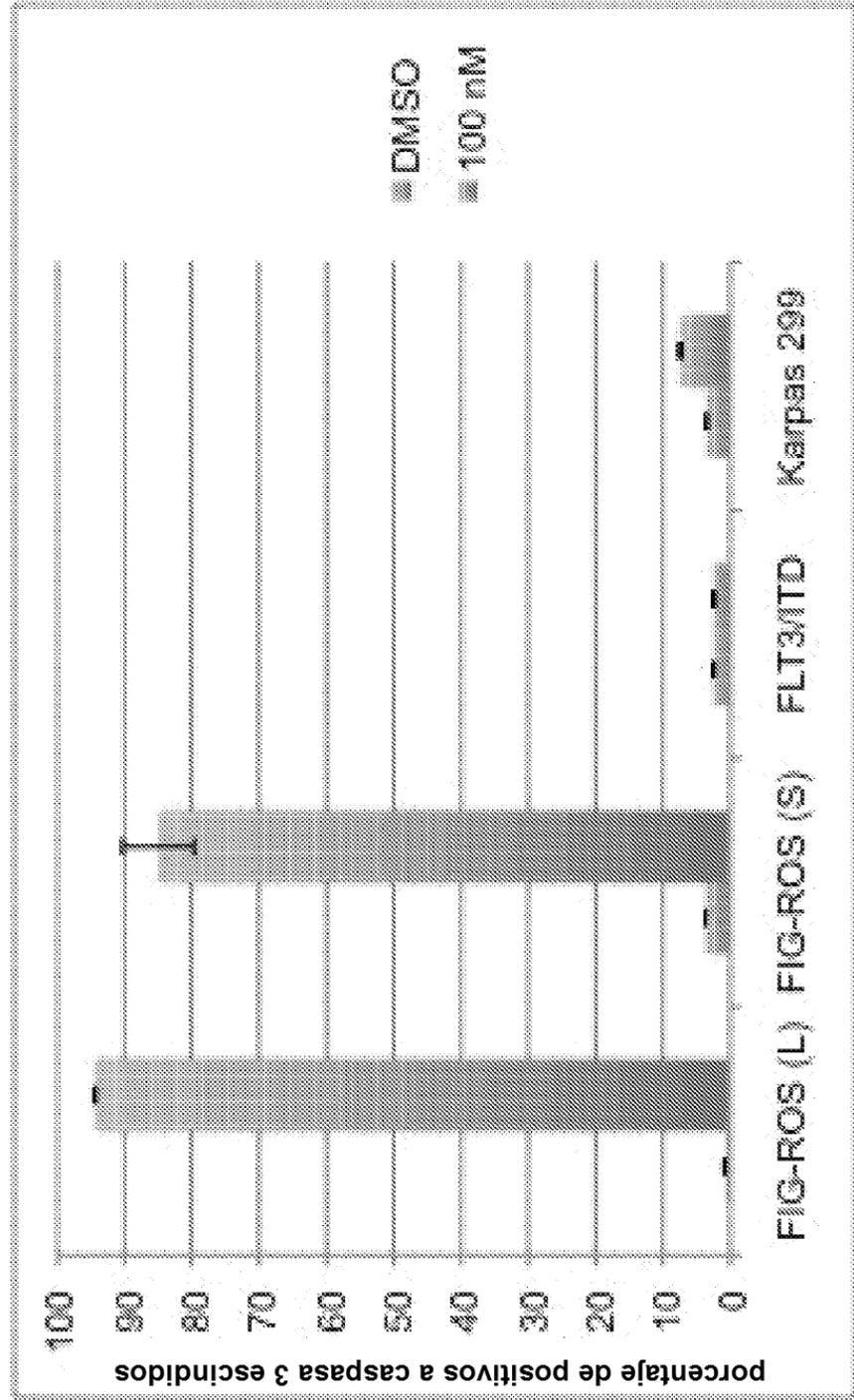


Figura 20: TAE-684 inhibe la fosforilación de FIG-ROS

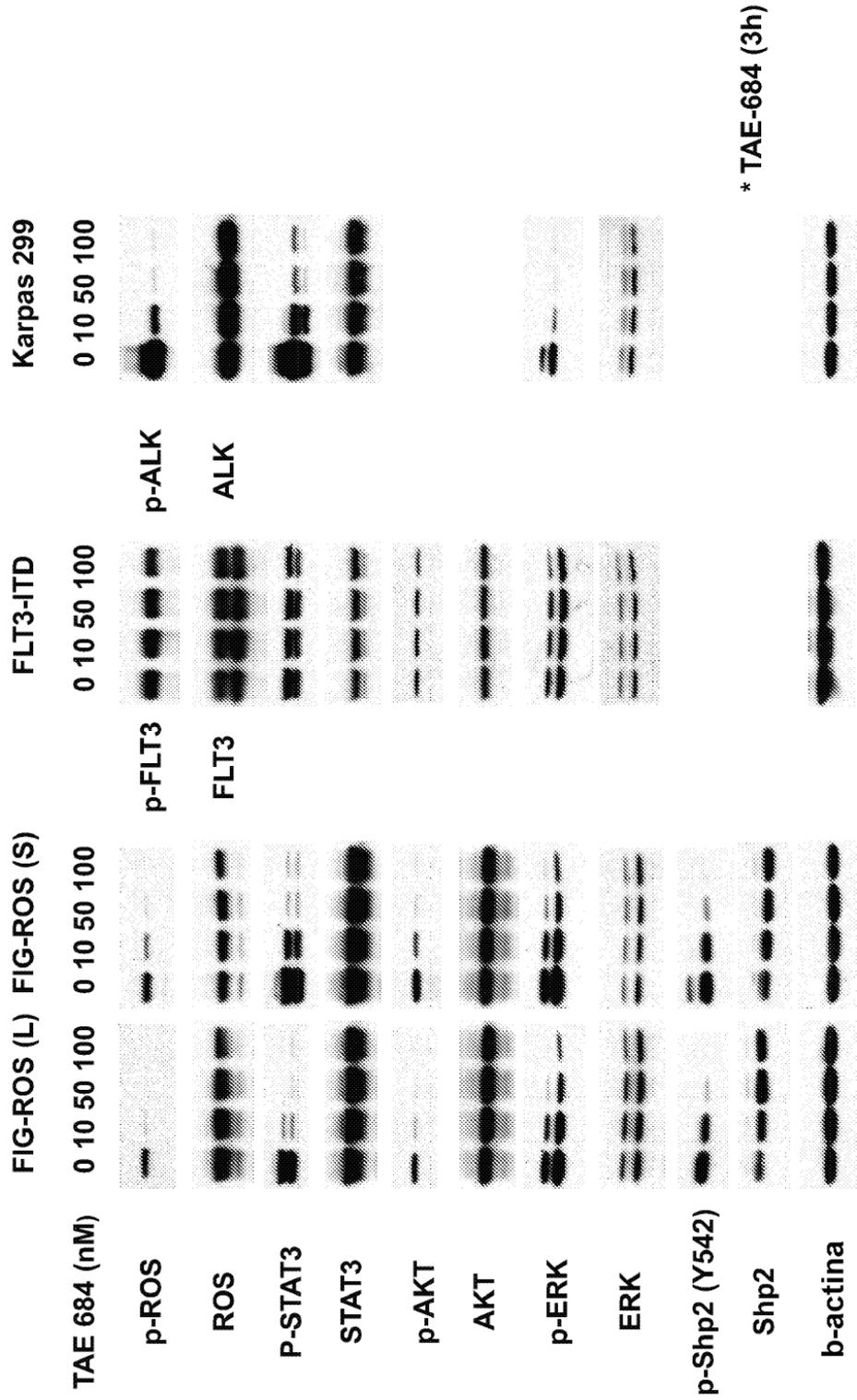


Figura 21A: TAE-684

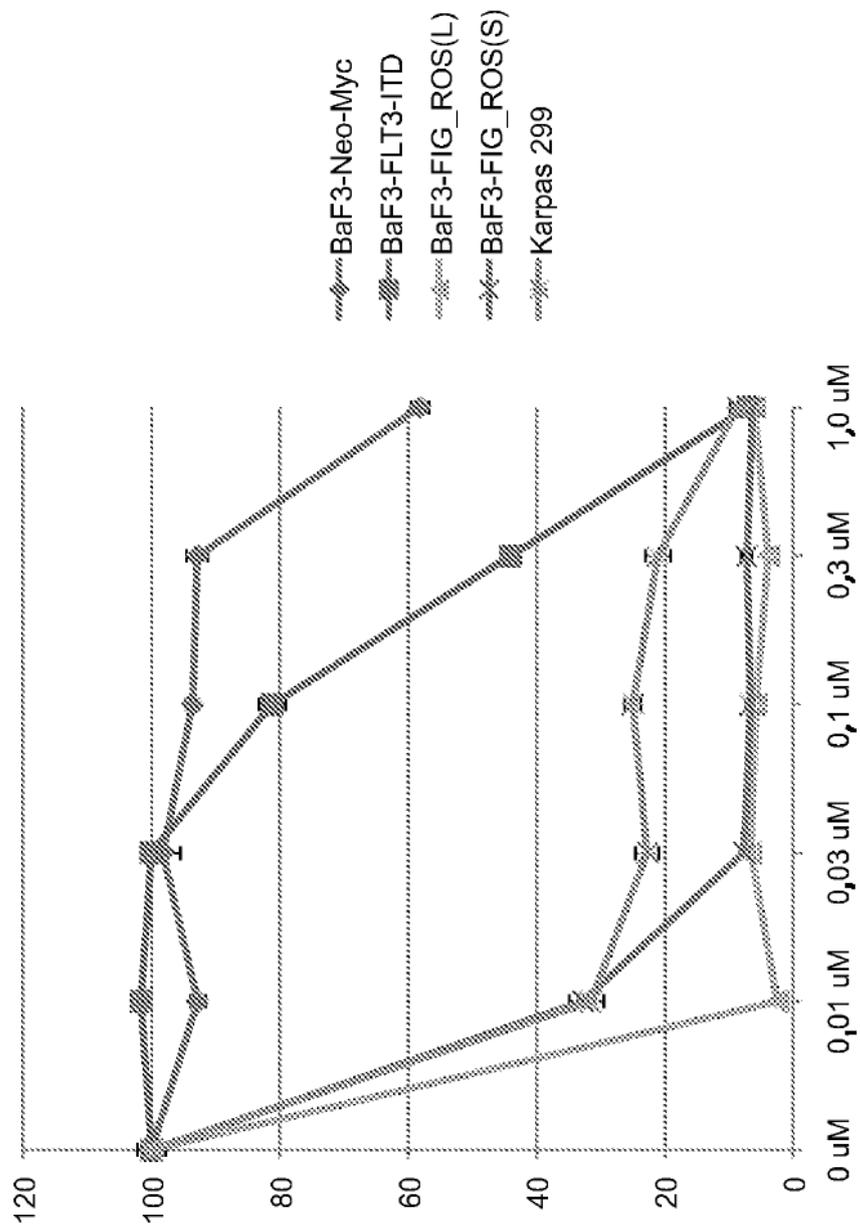


Figura 21B : Crizotinib

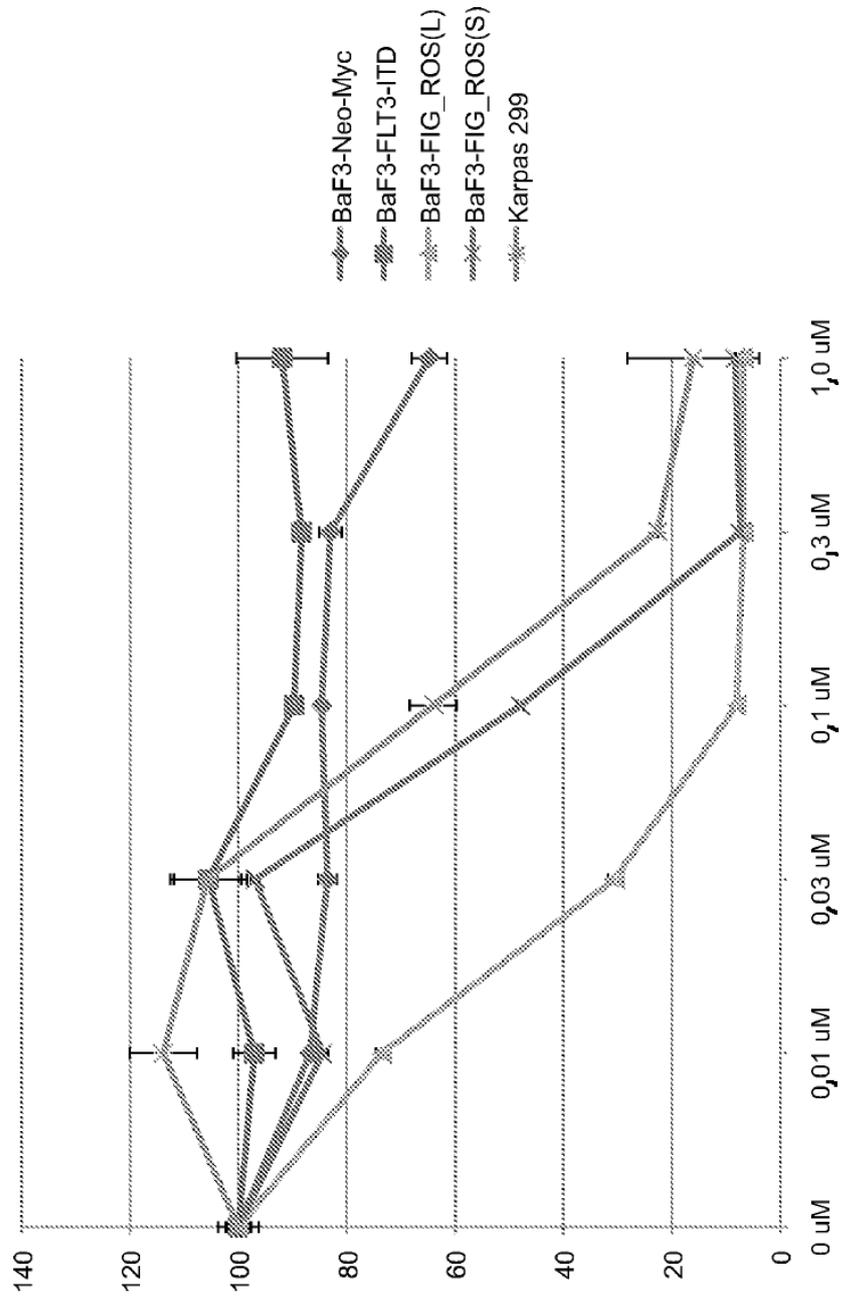


Figura 22

