



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 318 493**

51 Int. Cl.:
C12N 15/00 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05749119 .3**
96 Fecha de presentación : **07.06.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1758997**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.03.2007**

54 Título: **Gen de fusión episomal.**

30 Prioridad: **08.06.2004 EP 04102584**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2009

73 Titular/es: **VIB vzw**
Rijvisschestraat 120
9052 Zwijnaarde, BE
K.U. Leuven Research and Development

72 Inventor/es: **Cools, Jan;**
Hagemeijer, Anne y
Marynen, Peter

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 318 493 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

Gen de fusión episomal.

5 La presente invención se refiere a una estructura episomal de mamíferos que expresa un oncogen funcional, por lo que dicho oncogen es un gen de fusión de dos genes cromosómicos. Más específicamente, la invención se refiere a un producto de fusión NUP214-ABL1, importante en el desarrollo de leucemia linfoblástica aguda de células T, a métodos para detectar la fusión y a métodos para impedir la actividad oncogénica de dicho producto de fusión.

10 La leucemia aguda es una enfermedad de los leucocitos y sus precursores. Se caracteriza por la aparición de células anormales inmaduras en la médula ósea y sangre periférica. Las leucemias agudas se clasifican según criterios morfológicos, citoquímicos e inmunológicos.

15 La leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL) representa aproximadamente del 10 al 15% de casos nuevamente diagnosticados de leucemia linfoblástica aguda infantil y, generalmente, los niños con T-ALL tienen un diagnóstico peor que aquéllos con ALL del linaje del precursor B (B-ALL). Debido a que han sido identificados varios defectos genéticos como causa de T-ALL, la individualización del tratamiento de T-ALL podría mejorar el resultado y la calidad de vida a largo plazo. A pesar de un detallado entendimiento de factores de transcripción desregulados en la leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL), sólo rara vez han sido identificadas, en esta enfermedad, mutaciones en proteína tirosina quinasa (Fernando *et al.*, 2002; Pui *et al.*, 2004; Paietta *et al.*, 2004).

20 En esta invención se describe la multiplicación episomal (Maurer *et al.*, 1987) de ABL1 en 5 de 90 (5,6%) pacientes con T-ALL, una aberración que no es detectable por técnicas de citogenética convencional utilizada normalmente para determinar el tipo de mutaciones T-ALL, pero pueden ser detectadas por todas las técnicas que pueden identificar la estructura episomal, tal como FISH, hibridación genómica comparativa basada en micromatriz o PCR. Los análisis moleculares definen el amplicón como una región de 500 kb de 9q34, que contiene los oncogenes ABL1 y NUP214 (de Klein *et al.*, 1982; von Lindren *et al.*, 1992). Sorprendentemente, se identificó un mecanismo, no descrito anteriormente, para la activación de tirosina quinasa en cáncer: formación de episomas que dan como resultado la formación de una fusión entre NUP214 y ABL1. El transcrito NUP214-ABL1 se detectó en 5 pacientes con la multiplicación ABL1, en 5 de 85 (5,8%) pacientes adicionales con T-ALL, y en 3 de 22 líneas celulares T-ALL. La tirosina quinasa NUP214-ABL1 esencialmente fosforilada es sensible al inhibidor de tirosina quinasa imatinib (Capdeville *et al.*, 2002). La reorganización críptica constante NUP214-ABL1 está asociada con el aumento de la expresión de HOX (Fernando *et al.*, 2002) y la delección de CDKN2A (Hebert *et al.*, 1994), consistente con una patogénesis multietapa de T-ALL. La expresión de NUP214-ABL1 define un nuevo subgrupo de pacientes con T-ALL que se podrían beneficiar del tratamiento con imatinib.

25 Un primer aspecto de la invención es un gen de fusión aislado NUP214-ABL1, dicho gen de fusión expresa una tirosina quinasa y dicha tirosina quinasa está expresada de forma constitutiva. Dicho gen de fusión juega un papel en el desarrollo de leucemia. Preferiblemente, dicha leucemia es seleccionada del grupo que consiste en enfermedades mieloproliferativas negativas T-ALL, ALL del precursor de B, B-LL y BCR-ABL1. Más preferiblemente, dicha leucemia es T-ALL.

30 Dicho gen de fusión está situado en una estructura episomal de mamífero. Dicha estructura episomal de mamífero consiste en un fragmento cromosómico, que comprende la fusión de, al menos, NUP214 y ABL1, a través de la cual dicha fusión, preferiblemente, está expresando de forma activa un oncogen de fusión. Un fragmento cromosómico, tal como se utiliza aquí, significa que el ADN normalmente está presente en el cromosoma no mutado del mamífero. Preferiblemente, dicho fragmento cromosómico no comprende ADN que deriva directamente de ADN viral, por integración de ADN viral dentro del cromosoma. La estructura episomal de mamífero, tal como se utiliza aquí, significa un fragmento de ADN circular submicroscópico, que se auto replica en células de mamífero, tal como describen Maurer *et al.* (1987). Preferiblemente, dicha estructura episomal es más pequeña que los minicromosomas visibles al microscopio. Preferiblemente, dicha estructura episomal es más pequeña que 1Mb, incluso más preferiblemente, más pequeña que 750 kb, más preferiblemente más pequeña que 500 kb. Las estructuras episomales de mamífero son claramente diferentes de las estructuras episomales virales tal como los episomas derivados del HPV.

35 Se conoce que los genes pueden ser multiplicados en estructuras episomales y en minicromosomas. Sin embargo, todos los genes descritos que se multiplican de esta manera, incluyendo oncogenes conocidos, son genes que, tal cual, están presentes en el cromosoma de mamífero. Sorprendentemente se encontró que la formación de una estructura episomal puede crear un nuevo gen de fusión expresado que codifica una proteína funcional.

40 Todavía otro aspecto de la invención es un método para detectar un gen de fusión según la invención. Preferiblemente, dicho método comprende una técnica seleccionada del grupo que consiste en FISH, micromatriz-CGH y PCR. Es importante observar que un gen de fusión, situado en una estructura episomal de mamífero, normalmente es pasado por alto por un cariotipado clásico y se debe prestar especial atención para detectar aquellas estructuras.

45 Otro aspecto de la invención es un método para determinar el tipo de leucemia, que comprende la detección de un gen de fusión NUP214-ABL1 según la invención. Preferiblemente, dicha leucemia es seleccionada del grupo que consiste en enfermedades mieloproliferativas negativas T-ALL, B-ALL, LL del precursor de B y BCR-ABL1. Más

preferiblemente, incluso más preferiblemente, dicha leucemia es T-ALL. Dicho método es el de permitir la detección de un gen de fusión situado en una estructura episomal de mamífero.

Otro aspecto de la invención es un método para inhibir una quinasa constitutivamente activada expresada por el gen de fusión NUP214-ABL1. Preferiblemente, dicho método comprende el uso de imatinib (también conocido como mesilato de imanitibe, Glivec, Gleevec o STI-571; llamado químicamente como metanosulfonato de 4-[(4-metil-1-piperazimil)metil]-N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]fenil]benzamida) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Otro aspecto de la invención es el uso de imatinib, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para tratar la T-ALL. Preferiblemente, dicha T-ALL se caracteriza por una fusión NUP214-ABL1.

Todavía otro aspecto de la invención es el uso de imatinib, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para tratar un cáncer que se caracteriza por una fusión NUP214-ABL1. Dicho cáncer es una leucemia, incluso más preferiblemente, dicha leucemia se selecciona del grupo que consiste en B-ALL, LL del precursor de B y enfermedades mieloproliferativas BCR-ABL1 negativas.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1. *Cartografía FISH y matriz-CGH de la región amplificada en 9q34.* a Resultados FISH para el paciente 3. Multiplicación extracromosómica de ABL1 identificado con la sonda BCR-ABL1 LSI (Vysis) en interfase y 1 metafase. Se indican cromosomas 22 normales (BCR) y 1 cromosoma 9. El otro cromosoma 9 tiene una delección de ASS, FUBP3 y ABL1. Se observaron nueve de 15 copias extra de ABL1. También están demostradas la multiplicación de 3' ABL1, LAMC3 y NUP214, mientras que ASS, FUBP3, 5' ABL1 y VAV2 no están amplificadas. CDKN2A muestra delección heteróloga. b Los resultados de la matriz-CGH, que muestran señales para 138 clones del cromosoma 9, confirman la multiplicación de ABL1 y LAMC3. NTNG1 no está amplificado y 5' ABL1 sólo está amplificado en el paciente 1. La matriz no contiene una sonda en la posición ("locus") NUP214. El clon 149/2 contiene CDKN2A. c Ubicación de las sondas utilizadas para FISH y matriz-CGH y su ubicación a lo largo del cromosoma 9 (basado en datos ensambl) las cajas negras representan genes, las cajas grises representan BACs.

Fig. 2. *Detección del transcrito de fusión NUP214-ABL1 por TR-PCR y Transferencia Northern.* a Detección de diferentes transcritos de fusión NUP214-ABL1 en 5 pacientes con T-ALL con multiplicación de ABL1 (pacientes 1-4 y 6), y ausencia de esta fusión en pacientes con T-ALL con falta de multiplicación de ABL1 (pacientes na1-na3). También se detectó el transcrito de fusión NUP214-ABL1 en 5 de los 85 pacientes con T-ALL adicionales escrutados por RT-PCR (pacientes 7-11). b Detección, por RT-PCR, de diferentes transcritos de fusión NUP214-ABL1 en 4 líneas celulares T-ALL. c Detección de transcritos ABL1 aberrantes en las líneas celulares PEER, ALL-SIL y BE-13 por transferencia Northern. d Detección, transferencia Northern, de transcritos ABL1 aberrantes en las líneas celulares PEER, ALL-SIL y BE-13 d Secuencia de los transcritos NUP214-ABL1 detectados que muestran las distintas variantes. Todas las fusiones son en fase ("in-frame") (secuencia traducida con las abreviaturas de aminoácido de 1 letra).

Fig. 3. *Representación esquemática de la región amplificada y la proteína de fusión NUP214-ABL1.* a Esquema detallado de la región amplificada con los genes y clones BAC indicados. b Representación esquemática de las proteínas NUP214 y ABL1 con los dominios más importantes indicados. Se generaron dos proteínas de fusión NUP214-ABL1 principales: una fusión más corta (239 kDa), detectada sólo en 1 paciente, y una fusión más larga (319 a 333 kDa), detectada en la mayoría de los pacientes. Todas las fusiones contienen dominios de espiral enrollada pronosticados de NUP214 y los dominios SH3, SH2 y tirosina quinasa de ABL1.

Fig. 4. *Caracterización de la proteína de fusión NUP214-ABL1.* a Utilizando anticuerpos anti-ABL1 y anti-NUP214, se pudo detectar la proteína de fusión NUP214-ABL1 en las líneas celulares ALL-SIL, BE-13 y PEER, pero no en la línea celular NUP214-ABL1 negativa LOUCY. NUP214-ABL1 estaba fosforilada en 3 líneas celulares, y también se detectó la fosforilación de ABL1 en ALL-SIL. La fosforilación de NUP214-ABL1 se correlacionaba con la fosforilación de CRKL. b El tratamiento con imatinib de ALL-SIL da como resultado una disminución dosis dependiente en la fosforilación de NUP214-ABL1 y CRKL. c El tratamiento con imatinib tiene un efecto inhibitor dependiente de dosis sobre el crecimiento de la línea celular ALL-SIL. Tal como se esperaba, no se observó efecto en la línea celular LOUCY, indicando también que el efecto inhibitor observado con ALL-SIL no es debido a un efecto tóxico general del imatinib sobre las células T. d El tratamiento con imatinib de células primarias de médula ósea del paciente 4 da como resultado la disminución en la fosforilación de CRKL, demostrando un efecto inhibitor del imatinib sobre NUP214-ABL1 en células leucémicas primarias de este paciente.

Fig. 5. *Los elementos extracromosómicos (episomas) no son detectados por análisis citogenético clásico.* Resultados FISH con la sonda LSI BCR-ABL1 (Vysis) para el paciente 3, que muestran hibridación de la sonda ABL1 (rojo) sobre un cromosoma 9 (el otro cromosoma 9 tiene una delección de ABL1 y, por ello, no es detectado) y sobre múltiples elementos extracromosomales (a), que no son visibles por tinción invertida con DAPI (b). La sonda BSR (verde) hibrida en los 2 cromosomas 22 normales (a, c).

Ejemplos

Material y métodos para los ejemplos

5 *Pacientes*

Se seleccionaron retrospectivamente 90 casos de T-ALL con células fijadas disponibles para el escrutinio inicial con FISH. Más tarde se añadió al estudio un paciente adicional (paciente 6), y se hizo un escrutinio, por RT-PCR, de un conjunto de 85 pacientes con T-ALL del Dana Farber Cancer Institute (Boston, MA, USA) para la presencia de la fusión NUP214-ABL1. Se revisaron los datos de diagnóstico clínico, morfología e inmunofenotipo. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de la Facultad de Medicina de la Universidad de Leuven.

15 *Citogenética y FISH*

Los estudios de citogenética se realizaron en médula ósea o células sanguíneas utilizando cultivos directos o a corto plazo sin mitógenos y banda R. Se describieron los cariotipos según el Sistema Internacional para la Nomenclatura de Citogenética Humana (ISCN) (Mitelman, 1995). En casos sin invasión en médula ósea, se hizo un cariotipo de los nódulos linfáticos y/o los derrames pleurales. Tal como se describe (Dierlamm *et al.*, 1996), se llevó a cabo un FISH en suspensión de células fijadas almacenadas usadas originalmente para hacer el cariotipo. Se pudieron hibridar de forma exitosa las mismas metafases hasta 3 veces. Se realizó un escrutinio inicial utilizando la sonda de translocación LSI BCR-ABL ES (Vysis, Downers Grove II). En promedio, se marcaron 10 metafases y 200 núcleos. Además, se investigaron casos que mostraron señales de hibridación aberrante utilizando un panel de sondas BAC que cartografían 9q34 desde 125,7 a 134,7 Mb según ensembl (www.ensembl.org). Las sondas FISH están enumeradas en la figura 1 y la tabla 1. Los BACs se obtuvieron de la biblioteca RPCI11 del Roswell Park Institute (<http://bacpac.chori.org>).

30 *Micro matriz CGH*

Se realizó una matriz CGH utilizando Code Linked Slides (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) que contienen los clones 3527 de BAC del Grupo de Clones de 1 Mb del Wellcome Trust Sanger Institute, un regalo del Dr. Carter (Fiegler *et al.*, 2003). Se multiplicó el ADN de BAC por "PCR cebada con oligonucleótido degenerado" (DOP-PCR) (Fiegler *et al.*, 2003). Los productos amino-unidos de la PCR se motearon con una concentración de 200 ng/nl en los portas por uso de una impresora Molecular Dynamics Generation III (Amersham). Los clones se imprimieron en dos duplicados en diferentes posiciones sobre la matriz. Se marcó el ADN de prueba y el de referencia por etiquetado al azar del cebador (Bioprime DNA Labelling System, Invitrogen, Carisbad, CA) utilizando dCTPs marcados en Cy3 y Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech). La preparación de la sonda y el bloqueo previo de la muestra se llevó a cabo tal como se describe (Fiegler *et al.*, 2003). La hibridación se llevó a cabo durante 48 horas bajo una cubreobjetos en una cámara húmeda saturada con formamida al 20% y SSC 2x. Se realizaron los lavados tras la hibridación, y el análisis de imágenes y datos según condiciones clásicas. Las intensidades de los puntos se corrigieron para el fondo local. Sólo se conservaron los puntos con intensidades de señal de Cy5 y Cy3 dos veces por encima de las intensidades de señal de fondo. Para cada clon, se calculó una relación de intensidad de fluorescencia de Cy5 sobre Cy3. La normalización de los datos se consiguió dividiendo la relación de intensidad de fluorescencia en cada punto por la media de todas las relaciones de los autosomas. Se hizo la media de dos valores de los clones duplicados y se calculó un valor \log_2 . Si la variación entre las dos relaciones de intensidad era más grande de 10%, el elemento de dato era eliminado del análisis. Las relaciones de \log_2 entre -0,2 y 0,2 se aceptaron como normales. Las relaciones por debajo o por encima de este intervalo normal se interpretaron respectivamente como debidas a una delección o duplicación hecha. Si la relación de \log_2 estaba por encima de 1, entonces el hecho se consideraba multiplicado.

50 *Cultivo celular y transferencia Western*

Se incubaron células de médula ósea en RPMI-1640 suplementado con FCS al 10% durante un periodo de 2 horas en presencia de diferentes concentraciones de imatinib. Se lisaron las células en tampón de muestra 1,5x, se separaron utilizando SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF. Se cultivaron líneas celulares de T-ALL en RPMI-1640 suplementado con FCS al 20%. Para curvas de dosis-respuesta, se crecieron, en placas de 24 pocillos, 3×10^5 células/ml, con diferentes concentraciones de imatinib, y el número de células viables se determinó al principio y tras 24 y 48 horas de incubación. El porcentaje de células viables con relación al control (sin imatinib) se calculó en cada punto de tiempo para 3 pocillos independientes. Para la transferencia Western, las líneas celulares se cultivaron en presencia de diferentes concentraciones de imatinib durante 2 horas, se agruparon y lisaron en tampón de lisis frío que contiene NaVO_4 1 mM, e inhibidores de proteasa. Las proteínas se separaron en geles NuPAGE Tris-Acetato (Invitrogen) y se transfirieron a membranas de PVDF. Los anticuerpos utilizados fueron: anti-fosfo-AVL, anti-ABL, anti-fosfo-CRKL y anti-CRKL (Cell Signaling); anti-ratón-PO y anti-conejo-PO (Amersham Pharmacia Biotech). El anticuerpo Anti-NUP214 dirigido frente la parte C-terminal de NUP214 (Fornerod *et al.*, 1995) fue amablemente proporcionado por G. Grosveld (St Jude Children's Research Hospital, Memphis).

ES 2 318 493 T3

PCR

Se realizó una rápida multiplicación de los extremos del cDNA (RACE) tal como se describió anteriormente (Cools *et al.*, 1999). Brevemente, la síntesis de cDNA se llevó a cabo con ABL1-R1 (5'-gcgtgatgtagttgcttg), seguido de PCR con los cebadores adaptadores (Cools *et al.*, 1995) y los cebadores anidados ABL1, ABL1-R2 (5'-acaccattcccattgtgattat) y ABL1-R3 (5'-ccggagctttcaccttagtta). Los productos de PCR se clonaron y secuenciaron. Se llevó a cabo la RT-PCR para escrutar la presencia de los transcritos de NUP214-ABL1 utilizando NUP20 (exón 20, 5'-aatccttgcccaaagtaccag), NUP28 (exón 28, 5'-tcacaccaacacctctct), NUP29 (exón 29, 5'-aggaggctctgtctttggt), NUP31 (exón 31, 5'-agagggggaggtttctcagt), combinados respectivamente con ABL1-R2 y ABL1-R3. Se secuenciaron todos los productos de la PCR.

Transferencia Southern y Northern

Para la transferencia Southern, se digirieron 8 μ g de ADN con BamHI, se fraccionaron por tamaño en un gel de agarosa al 0,7%, y se transfirieron a membranas Hybond-N+ (AP Biotech). La sonda contenía exón 2-8 de ratón Abl1 y se mezcló con una sonda para el gen TCRD en 14q11 (control interno). Las señales de hibridación se cuantificaron por análisis densitométrico utilizando un Software Phosphor Imager e Imager Quani 3.0 (Molecular dynamics, Sunnyvale, CA).

Para la transferencia Northern, se fraccionaron 10 μ g de ARN total en un gel de agarosa al 1%, y se transfirieron a membranas Hybond-N+ (AP Biotech). La sonda fue un producto de PCR de ABL1 de 300 pb.

Ejemplo 1

ABL1 está implicado en la leucemia linfoblástica aguda de células T

La traslocación Philadelphia, que codifica el gen de fusión BCR-ABL1 (BCR-ABL), se encuentra típicamente en leucemia mieloide crónica (CML) y en leucemia linfoblástica aguda del precursor de células B (B-ALL), pero es excepcionalmente rara en T-ALL (Pui *et al.*, 2004; de Klein *et al.*, 1982; de Klein *et al.*, 1986). Para estudiar la potencial implicación de los reordenamientos del gen ABL1 en tumores de células T, se escrutaron 90 casos de T-ALL por hibridación de fluorescencia (FISH), utilizando sondas BCR y ABL1. No se observaron señales de fusión BCR-ABL1, confirmando la baja frecuencia de este reordenamiento en T-ALL. Sin embargo, se observó una marcada multiplicación (> 10 señales por núcleo) de ABL1 en 6 de 9 pacientes con T-ALL (figura 1a, tabla 1, tabla 2, pacientes 1-6). Sorprendentemente, las señales adicionales de ABL1 eran extracromosómicas. Anteriormente se ha observado multiplicación extracromosómica de oncogenes sobre minicromosomas (dmin) (Hahn, 1993), que son visibles por citogenética clásica, o en unidades citogenéticamente invisibles, llamadas episomas (Maurer *et al.*, 1987). En nuestros casos, dmin no eran visibles por bandas G o R, por lo que la multiplicación de ABL1 ocurrió más probablemente en episomas.

La cartografía FISH más detallada de los episomas confirmó que contenían ABL1, LAMC3 y NUP214 (CAN), 3 genes localizados dentro de una región de 500kb en la región 9q34 del cromosoma (figura 1a, 1c). Las sondas que contienen los genes ASS, FUBP2 y VAV2 no hibridaron con los episomas (figura 1a, 1c). Además, el extremo 5' de ABL1 no pudo ser detectado en los episomas en 4 de los 6 casos, definiendo el punto de rotura proximal en el primer intrón de ABL1 y el punto de rotura telomérico entre NUP214 y VAV2. La hibridación genómica comparativa basada en micro matriz (matriz CGH), utilizando una matriz del cromosoma artificial de Bacteria de 1Mb (BAC) (Fliegler *et al.*, 2003), confirmó la multiplicación de ABL1 y LAMC3 en los 4 casos que pudieron ser analizados por este método (figura 1b, 1c). Las secuencias BAC-57C19 (5'ABL1) sólo fueron amplificadas en el paciente 1, confirmando los hallazgos de FISH (figura 1b, tabla 1). Las secuencias BAC-5N16 no fueron multiplicadas en ninguno de los 4 pacientes, delimitando así la región multiplicada a un tamaño máximo de 1Mb (figura 1b, 1c). Además, la matriz CGH también mostró delección de BAC-149I2, que contiene el gen de supresión tumoral CDKN2A, en pacientes 2-4, una observación que también fue confirmada por FISH (figura 1a, 1b, tabla 1). En los pacientes 1-3, también se confirmó la multiplicación de ABL1 por transferencia Southern.

Ejemplo 2

ABL1 está fusionado a NUP214

La presencia de puntos de rotura dentro del intrón 1 del gen ABL1, y la ausencia selectiva del extremo 5' de ABL1 en la multiplicación, sugerían que ABL1 podría estar implicado en la generación de un gen de fusión. Para probar esto, se llevó a cabo una RACE-PCR sobre los transcritos ABL1 del paciente 4. La secuenciación de los productos de PCR revelaron una fusión en fase ("in-frame") entre el exón 31 de NUP214 y el exón 2 del ABL1 (figura 2a, 2d). Estos resultados son compatibles con un modelo en el que la región genómica entre ABL1 y NUP214 estaba circularizada, generando un gen de fusión NUP214-ABL1 (figura 3a). Luego, el número de copias del episoma aumentó debido a una segregación desigual durante la división celular. En el paciente 3, la formación del episoma podría haber sido originada a partir de una delección, ya que un cromosoma 9 lleva una delección de una región ligeramente mayor que

la región multiplicada (figura 1a, 1b, tabla 1). Se describieron deleciones similares asociadas con la multiplicación de MYC en dmin o episomas (Carroll *et al.*, 1988).

A continuación, se llevó a cabo la RT-PCR para detectar los transcritos de fusión de NUP214-ABL1 en los 5 pacientes con multiplicación de ABL1 cuyo cDNA estaba disponible. Todos los casos expresaron un transcrito de fusión NUP214-ABL1 que estaba ausente en casos de T-ALL sin multiplicación de ABL1 (figura 2a). Para confirmar estos descubrimientos, se escrutaron por RT-PCR 85 pacientes adicionales con T-ALL. El transcrito de fusión NUP214-ABL1 se detectó en 5 pacientes adicionales (pacientes 7-11) (figura 2a). A continuación, se analizaron líneas celulares de T-ALL humanas para la presencia de la fusión. El transcrito NUP214-ABL1 se detectó en 3 de las 22 líneas celulares T-ALL independientes: ALL-SIL, PEER, y TALL-104, y en BE-13, una sublínea tetraploide de PEER (figura 2b, tabla 3). También se confirmó, por transferencia Northern, la presencia de un transcrito aberrante de ABL1 en las líneas celulares (figura 2c). En conjunto, estos datos indican que aproximadamente el 6% de los pacientes con T-ALL albergan una fusión críptica de NUP214 a ABL1.

Se observaron variantes del gen de fusión NUP214-ABL1 entre los casos de T-ALL debido a diferentes puntos de rotura en NUP214 (en intervalos entre los intrones 23 a 34) (figura 2d). Todos los puntos de rotura en ABL1 ocurrieron en el intrón 1, con el exón 2 de ABL1 presente así en todas las variantes de fusión. Así, el uso del exón de ABL1 no varió y coincidió con el punto de rotura de ABL1 observado en CML y B-ALL Philadelphia positivo. Los ARNm de fusión de NUP214 ABL1 están pronosticados para codificar proteínas de 2210 a 3175 aminoácidos con pesos moleculares de aproximadamente 239 a 333 kDa (figura 3b).

NUP214 es una proteína que contiene repeticiones FXFG, que es un componente del complejo del poro nuclear, que media el transporte nucleocitoplásmico (Kraemer *et al.*, 1994). El gen NUP214 está ampliamente expresado y está implicado en la patogénesis de leucemia mieloide aguda asociada a la fusión t(6;9)(p23;q34)/DEK-NUP214 (Von Lindem *et al.*, 1992). Sin embargo, en la proteína de fusión DEK-NUP214, está presente la región C-terminal de NUP214 (codificada por exones 18-36), mientras que las fusiones predichas NUP213-ABL1 conservan la región N-terminal de NUP214 (codificada por variantes en el intervalo entre los exones 1-23 a los exones 1-34) que incluyen los dominios predichos de espiral enrollada de NUP214 que pueden servir como motivos de oligomerización (figura 3b).

Ejemplo 3

NUP214-ABL1 actúa como tirosina quinasa constitutivamente activa

ABL1 es una tirosina quinasa citoplásmica expresada de forma ubicua que está fusionada a BCR en casos de CML y ALL del precursor de B con t(9;22)(q34;q11) (de Klein *et al.*, 1982; de Klein *et al.*, 1986) y a ETV6 en leucemias con t(9;12)(q34;p13) (Golub *et al.*, 1996). Semejantes a las proteínas de fusión BCR-ABL1 y ETV6-ABL1, las fusiones NUP214-ABL1 contienen los dominios SH3, SH2 y quinasa de ABL1 (figura 3b), sugiriendo que NUP214-ABL1 actúa como una tirosina quinasa constitutivamente activada. Esto se evaluó por análisis del estado de fosforilación de la tirosina de NUP214-ABL1 y CRKL, una diana directa de la quinasa de ABL1 (Oda *et al.*, 1994). La proteína de fusión NUP214-ABL1 se detectó en las líneas celulares PEER, BE-13, y ALL-SIL, utilizando anticuerpos dirigidos frente a ABL1 o NUP214 (figura 4a). Además, NUP214-ABL1 y CRKL se fosforilaron en las líneas celulares que expresan NUP214-ABL1, mientras que CRKL no estaba fosforilado en la línea celular NUP214-ABL1 negativa LOUCY (figura 4a). La adición de imatinib, un inhibidor selectivo de la actividad quinasa de ABL1 (Capdeville *et al.*, 2002), hizo decrecer la fosforilación de NUP214-ABL1 y CRKL (figura 4a) e inhibió la proliferación de ALL-SIL (figura 4c). También se inhibió la fosforilación de CRKL por imatinib en células primarias de médula ósea del paciente 4 (figura 4d). Estos resultados indican que NUP214-ABL1 es una tirosina quinasa constitutivamente activada que activa rutas similares tal como BCR-ABL1, y es sensible a la inhibición con imatinib.

Mientras que las tirosinas quinasas constitutivamente activadas son suficientes para inducir la enfermedad mieloproliferativa, éstas requieren del efecto cooperativo de otras mutaciones para inducir la leucemia aguda (Kelly y Gilliland, 2002). De acuerdo con esto, se identificaron mutaciones adicionales en las células que expresaban la fusión NUP214-ABL1. Se detectó la deleción de los genes de supresión tumoral CDKN2A/B (p16/p15) en 7 de 8 casos evaluados, y se observó la deleción de 12p, una región que puede albergar un gen supresor de tumores (Hoo- maert *et al.*, 2003) en el paciente sin deleción CDKN2A/B. El escrutinio molecular para los oncogenes conocidos de T-ALL reveló la sobre expresión mutuamente excluyente de TLX1 (HOX11) y TLX3 (HOX11L2), respectivamente, en los pacientes 4 y 5 (Tabla 2). Se observaron descubrimientos similares en las líneas celulares T-ALL, donde se describió la expresión de TLX1 y NKX2-5 para ALL-SIL y PEER, respectivamente (tabla 3) (Ángel *et al.*, 2003). Estos datos proporcionan soporte genético para una patogénesis en multi etapa de T-ALL: deleción de un gen supresor de tumores (CDKN2A/B o un supresor de tumores del cromosoma putativo 12p), expresión desregulada de un factor de transcripción (HOX11, HOX11L2), y expresión de una tirosina quinasa constitutivamente activada (NUP214-ABL1).

Los resultados identifican la fusión episomal de NUP214 a ABL1 como un mecanismo nuevo para la generación de un gen de fusión. Este reordenamiento genético se encipta por citogenética convencional (figura 5), pero se detecta fácilmente por FISH utilizando una sonda ABL1 disponible comercialmente. Es más, Barber *et al.* describieron recientemente multiplicación de ABL1 en un subconjunto de pacientes con T-ALL, aunque las consecuencias moleculares y

ES 2 318 493 T3

5 fisiológicas de una multiplicación no fueron claras (Barber *et al.*, 2004). FISH con las sondas ABL1 es característico, y parece ser patognomónico para la presencia de la fusión NUP214-ABL1 en T-ALL. La hibridación ABL1 en 9q34 se observó como se esperaba, y en múltiples lugares extra cromosómicos en metafases, así como múltiples señales en la mayoría de las células en interfase. Este estudio también demuestra el poder de la matriz CGH de alta resolución para la detección de desequilibrios genéticos adquiridos en células cancerosas. Se muestra que además de deleciones crípticas (Cools *et al.*, 2003) también las multiplicaciones crípticas pueden generar nuevos genes de fusión, que sugieren que los escrutinios amplios de genoma para deleciones y amplificaciones en un amplio espectro de tumores hematológicos y tumores sólidos pueden revelar más de estas aberraciones.

10 Será interesante investigar si esta fusión también ocurre en T-ALL como resultado de t(9;9)(q43;q34), o en otros tumores hematológicos, en ALL de precursor de B y enfermedades mieloproliferativas BCR-ABL1 negativas. Los datos de supervivencia de nuestros 11 pacientes indican un curso bastante agresivo de la enfermedad en los 4 adultos (2 recaídas tempranas y 2 muertes tóxicas) (tabla 2). El descubrimiento de que NUP214-ABL1 es sensible al inhibidor de tirosina quinasa imatinib sugiere nuevos enfoques terapéuticos para mejorar el resultado y la morbilidad potencialmente disminuida relacionada con el tratamiento en el subconjunto de casos de T-ALL que expresan el gen de fusión NUP214-ABL1.

20 (Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 1: Resultados FISH en 6 pacientes con patrón de hibridación de ABL 1 anormal

Paciente	LSI BCR-ABL1	Número de señales observadas con las sondas BAC utilizadas											
		373J8	202H3	618A2/17L7	57C19	83J21	143H20	544A12	153P4	83N9			
	Núcleos	(NIBL)	(GPR107)	(ASS/FUBP3)	(5ÁBL1)	(3ÁBL1)	(LAMC3)	(NUP214)	(VAV2)	(LHX3)			
1 ^{mo}	m (82%)	3/9	2	2	2	m	m	m	2	2			
2 ^{sp}	m (75%)	12/19	2	2	2	m	m	m	2	2			
3 ^{mo}	m (76%)	14/20	2	1	1	m	m	m	2	2			
4 ^{mo}	m (23%)	16/20	2	2	2	m	m	m	3(20%)	2			
5 ^{mo}	m (6%)	13/30	2	2	2	m	m	m	2	2			
6 ^{dp}	m (96%)	9/10	na	na	2	m	na	m	2	na			
6 ^{mo}	m (16%)	1/1											

Todas las sondas BAC provienen del banco RPCI-11, la localización de muchos de los BACs/genes se muestra en la figura 1c. m, múltiplo (> 10); m^o en médula ósea; dp en derrame pleural; sp en sangre periférica; na, no analizado; 1 número de metafases anormales/total examinadas.

Tabla 2: Características de 11 pacientes con T-ALL con multiplicación de ABL1 y/o fusión NUP214/ABL1

Paciente	Sexo/edad	WBC (x10 ⁹ /L)	%volumen(BM)	Inmuno fenotipo	Cariotipo ^b	Resultados FISH			Resultados moleculares		Respuesta a terapia/resultado	OS (meses)
						CDKN2A ^c	ABL1	NUP214- ABL1	Otro ^d			
1	H/52	134	96	Cortical	46,XY,del (12)(p13)[4]/46,XY [1]	+/+	Mult.	+	HOX11	RC, recaída temprana	7	
2	H/3	162	95	Cortical	46,XY [12]	-/-	Mult.	+	HOX11	RC	57+	
3	H/23	81	92	Cortical	48,X,- Y,t(3;1)(p12;p15), t(7;10)(q35;q24), t(8;10)(q21;q21), +11,+12 [5]/46,XY [4]	-/+	Mult.	+	HOX11	RC, AlloBMT/muerte tóxica	10	
4	H/7	196	88	Maduro	46,XY [33]	-/+	Mult.	+	HOX11L 2	RC	40+	
5	H/6	52	82	Pre-T	47,XY,del(6)(q21), +8 [12] / 46,XY [4]	+/+	Mult.	nd	nd	RC, recaída temprana	14	
6	H/25	8	40 ^e	Maduro ^f	46,add(X)(p22)Y, t(8;22)(p22;q12), del(13)(q14q22)	-/+	Mult.	+	HOX11 L2	Muerte tóxica temprana	0,5	
7	M/pediátrico	nd	96	Cortical	Cerca de tetraploidia con del(1)(q23)	-/-	nd	+	HOX11 L2	RC	194+	
8	M/pediátrico	nd	86	Maduro ^f	nd	-/-	nd	+	HOX11 L2	RC, recaída temprana	7	
9	H/pediátrico	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	HOX11 L2	RC	14+	
10	H/pediátrico	nd	nd	nd	nd	-/-	nd	+	HOX11	RC	176+	
11	M/31	nd	75	Pre-T	46,XX[20]	nd	nd	+	HOX11	Muerte tóxica temprana	1	

nd, no disponible; OS, supervivencia global en meses; CR, remisión completa; ped, pediátrico;

^a Clasificación EGIL siguiente

^b Cariotipo obtenido de cultivo de médula ósea en el diagnóstico, excepto para el paciente 2, donde se analizó la sangre periférica.

^c +/+ no deleción; -/+ deleción hemizigótica, -/- deleción homocigótica.

^d Escrutinio molecular para los transcritos BCD-ABL1, SIL-TAL 1 y ETV6-AML1, reordenamientos TLX1, TLX3 y MLL (Transferencia Southern).

^e 40% volumen en médula ósea y 77% en derrame pleural

^f Fenotipo T maduro con expresión de CD13 aberrante.

TABLA 3

	Línea celular	NUP214-ABL1	TLX1	TLX3	NKX2-5
5	1 ALL-SIL	+	+	-	-
	2 BE-13*	+	-	-	+
	3 CCRF-CEM	-	-	-	+
10	4 DND-41	-	n.d.	n.d.	n.d.
	5 DU-528	-	-	-	-
	6 HPB-ALL	-	-	+	-
	7 HSB-2	-	-	-	-
15	8 JURKAT	-	-	-	-
	9 KARPAS-45	-	-	-	-
	10 KE-37	-	-	-	-
20	11 KOPT-6	-	n.d.	n.d.	n.d.
	12 LOUCY	-	-	-	-
	13 MHH-TALL1	-	-	-	-
	14 MHH-TALL2	-	-	-	-
25	15 MOLT-3	-	n.d.	n.d.	n.d.
	16 MOLT-4	-	-	-	-
	17 MOLT-13§	-	-	-	-
30	18 MOLT-14§	-	n.d.	n.d.	n.d.
	19 MOLT-16#	-	-	-	-
	20 MOLT-17#	-	n.d.	n.d.	n.d.
35	21 P12-ICHIKAWA	-	-	-	-
	22 PEER*	+	+	-	+
	23 RPMI-8402	-	-	-	-
40	24 SUP-T1	-	-	-	-
	25 SUP-T11	-	n.d.	n.d.	n.d.
	26 TALL-104	+	-	-	-

45 Lista de las 26 líneas celulares escrutadas por RT-PCR para la presencia de la fusión NUP214-ABL1. Esta colección contiene 22 líneas celulares T independientes, y 4 líneas celulares hermanas (indicadas por * § #). Los datos de expresión en TLX1, TLX3, y NKX2-5 se describieron en Nagel *et al.* (2003).

50 Referencias

50 **Barber, K.E. et al.** Amplification of the ABL gene in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 18, 1153-1156 (2004).

55 **Capdeville, R., et al.** Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 493-502 (2002).

Carroll, S.M. et al. Double minute chromosomes can be produced from precursors derived from a chromosomal deletion. *Mol. Cell Biol.* 8, 1525-1533 (1988).

60 **Cools, J. et al.** Fusion of a novel gene, BTL, to ETV6 in acute myeloid leukemias with a t(4;12)(q11-q12;p13). *Blood* 94, 1820-1824 (1999).

Cools, J. et al. A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N. Engl. J. Med.* 348, 1201-1214 (2003).

65 de **Klein, A. et al.** A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukemia. *Nature* 300, 765-767 (1982).

ES 2 318 493 T3

de **Klein, A. et al.** bcr rearrangement and translocation of the c-abl oncogene in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 68, 1369-1375 (1986).

5 **Dierlamm, J. et al.** Successful use of the same slide for consecutive fluorescence in situ hybridization experiments. *Genes Chromosomes Cancer* 16, 261-264 (1996).

Ferrando, A.A. et al. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 1, 75-87 (2002).

10 **Fiegler, H. et al.** DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones. *Genes Chromosomes Cancer* 36, 361-374 (2003).

15 **Fomerod, M. et al.** Relocation of the carboxyterminal part of CAN from the nuclear envelope to the nucleus as a result of leukemia-specific chromosome rearrangements. *Oncogene* 10, 1739-1748 (1995).

Golub, T.R. et al. Oligomerization of the ABL tyrosine kinase by the Ets protein TEL in human leukemia. *Mol. Cell Biol.* 16, 4107-4116 (1996).

20 **Hahn, P.J.** Molecular biology of double-minute chromosomes. *Bioessays* 15, 477-484 (1993).

Hebert, J., et al. Candidate tumor-suppressor genes MTS1 (p16INK4A) and MTS2 (p15INK4B) display frequent homozygous deletions in primary cells from T- but not from B-cell lineage acute lymphoblastic leukemias. *Blood* 84, 4038-4044 (1994).

25 **Hoomaert, I., et al.** MAPK phosphatase DUSP16/MKP-7, a candidate tumor suppressor for chromosome region 12p12-13, reduces BCR-ABL-induced transformation. *Oncogene* 22, 7728-7736 (2003).

30 **Kelly, L.M. & Gilliland, D.G.** Genetics of myeloid leukemias. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 3, 179-198 (2002).

Kraemer, D., et al., The human CAN protein, a putative oncogene product associated with myeloid leukemogenesis, is a nuclear pore complex protein that faces the cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 1519-1523 (1994).

35 **Maurer, B.J., et al.,** Novel submicroscopic extrachromosomal elements containing amplified genes in human cells. *Nature* 327, 434-437 (1987).

Mittelman, F. ISCN 1995: an international system for human cytogenetic nomenclature. *Karger* (1995).

40 **Nagel, S., et al.,** The cardiac homeobox gene NKX2-5 is deregulated by juxtaposition with BCL11B in pediatric T-ALL cell lines via a novel t(5;14)(q35.1;q32.2). *Cancer Res.* 63, 5329-5334 (2003).

45 **Oda, T. et al.** Crkl is the major tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia. *J. Biol. Chem.* 269, 22925-22928 (1994).

Paietta, E. et al. Activating FLT3 Mutations in CD117/KIT Positive T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemias. *Blood* (2004).

50 **Pui, C.H., et al.,** Acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 350, 1535-1548 (2004).

von **Lindem, M. et al.** The translocation (6;9), associated with a specific subtype of acute myeloid leukemia, results in the fusion of two genes, dek and can, and the expression of a chimeric, leukemia-specific dek-can mRNA. *Mol. Cell Biol.* 12, 1687-1697 (1992).

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un gen de fusión que:

- 5 - está situado sobre una estructura episomal en células de pacientes con leucemia,
- comprende partes de los oncogenes ABL1 y NUP214, y
10 - codifica una tirosina quinasa constitutivamente fosforilada que es sensible a inhibición con imatinib, donde dichas partes se deben a puntos de rotura en intrones 23 a 34 de NUP214 e intrón 1 de ABL1.

15 2. Un gen de fusión según la reivindicación 1, donde dichos pacientes con leucemia tienen leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL), leucemia linfoblástica aguda de células B (B-ALL), leucemia linfoblástica del precursor de células B (LL del precursor de B) o una enfermedad mieloproliferativa BCR-ABL1 negativa.

3. Un método *in vitro* para detectar un gen de fusión según las reivindicaciones 1-2 que comprende:

- 20 a. obtener células, y
b. determinar la presencia de dicho gen de fusión en dichas células.

25 4. Un método *in vitro* según la reivindicación 3 donde dicha determinación de la presencia de dicho gen de fusión en dichas células implica análisis de Hibridación Fluorescente *In Situ* (FISH), Hibridación Genómica Comparativa en micromatriz (CGH) o una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

30 5. Un método *in vitro* para determinar el tipo de leucemia seleccionada del grupo que consiste en leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL), leucemia linfoblástica aguda de células B (B-ALL), leucemia linfoblástica del precursor de células (LL del precursor de B) o enfermedad mieloproliferativa BCR-ABL1 negativa que comprende las etapas del método según la reivindicación 3.

6. Uso de imatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la preparación de un medicamento para tratar leucemia, **caracterizado** por la presencia de un gen de fusión según la reivindicación 1.

35 7. Uso según la reivindicación 6, donde dicha leucemia es leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL).

40

45

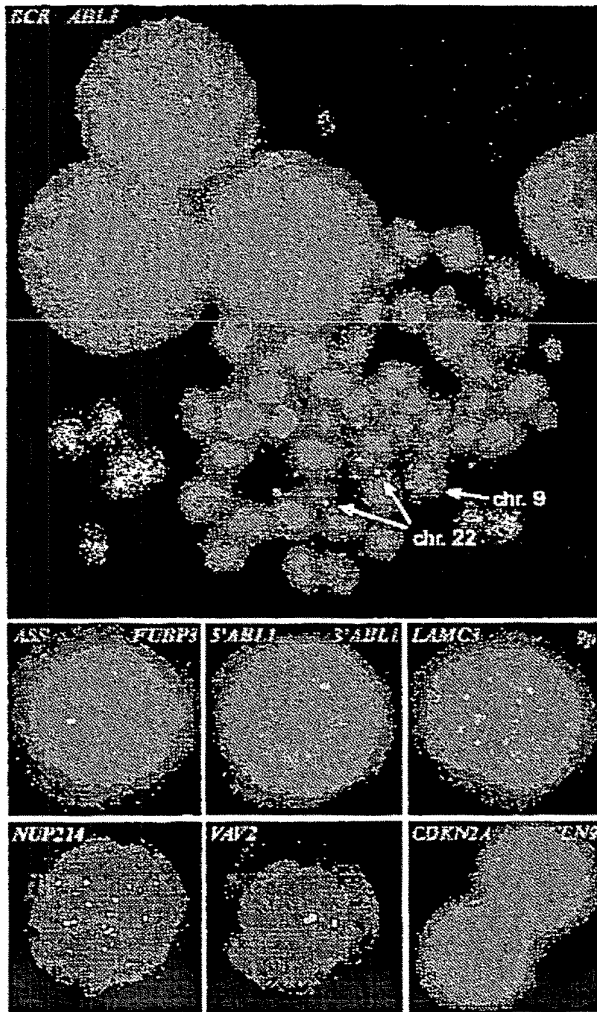
50

55

60

65

Fig. 1:
a



b

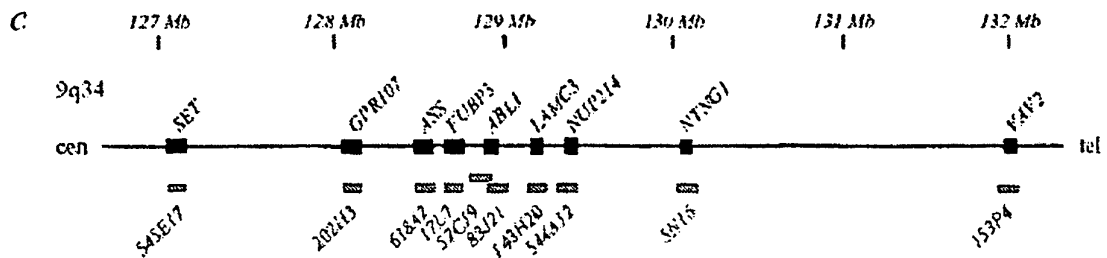
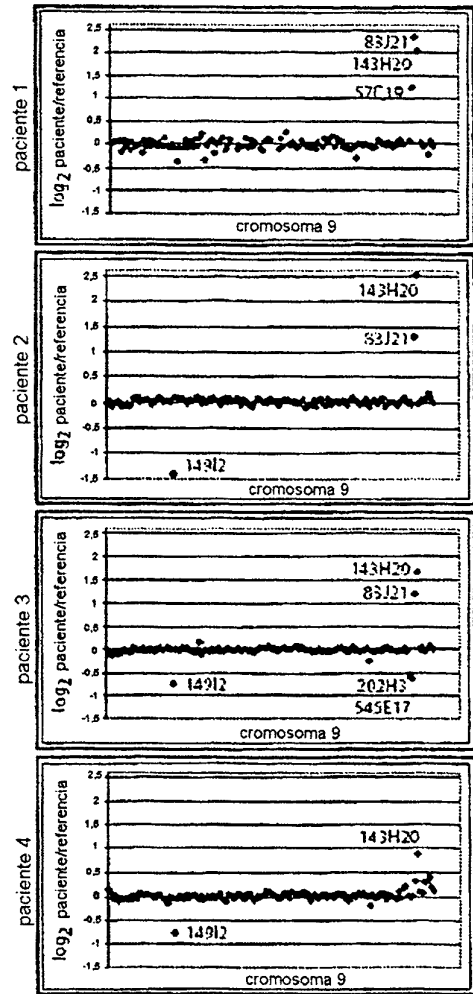


Fig. 2:

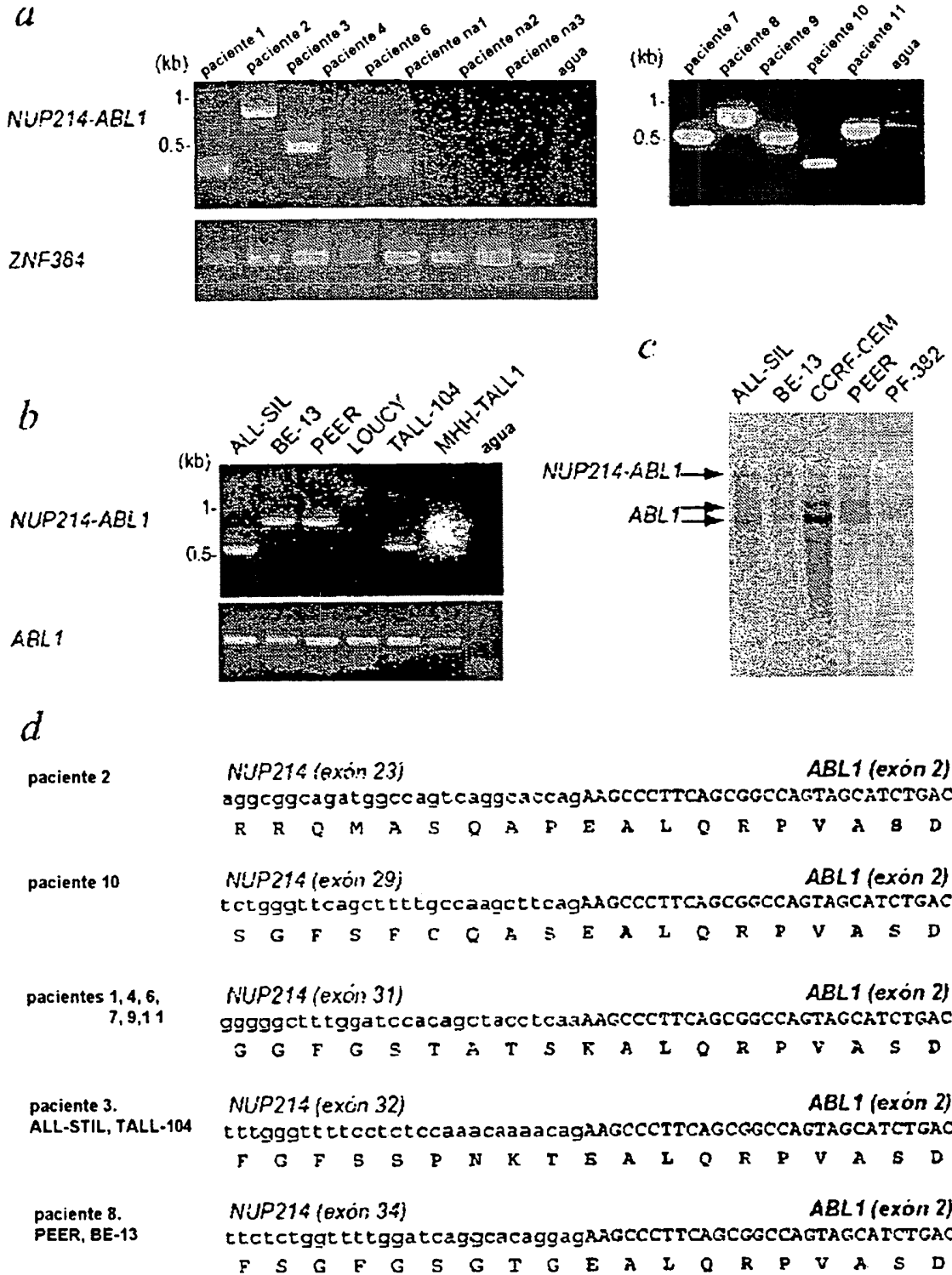
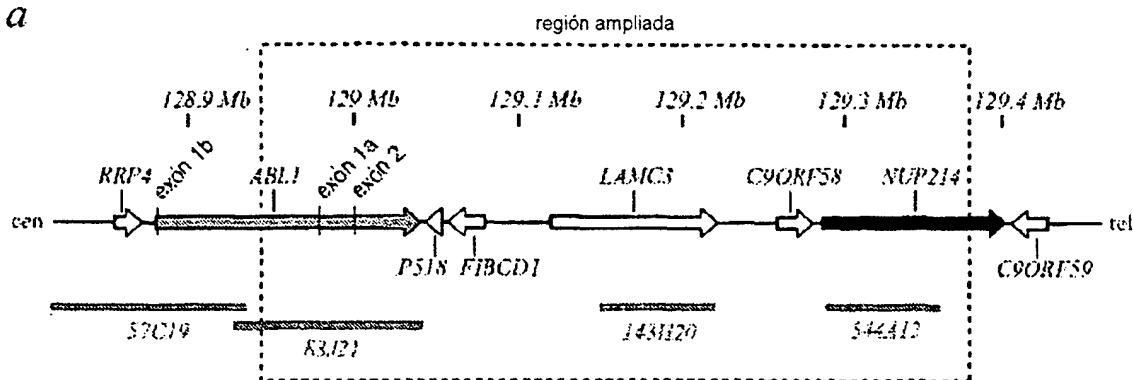


Fig. 3:
a



b

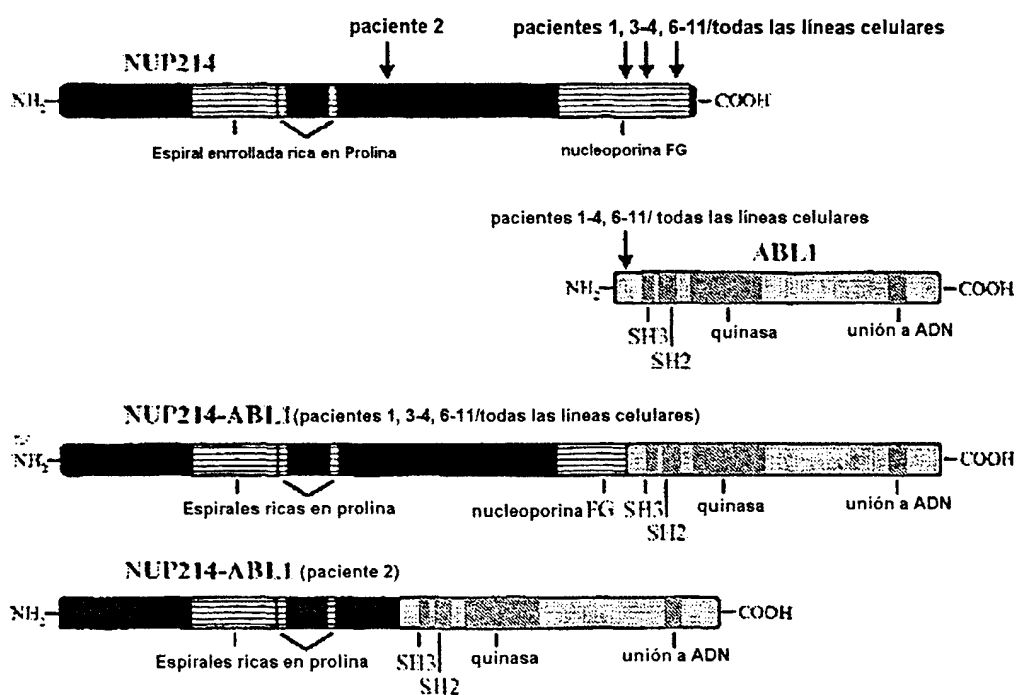


Fig. 4:

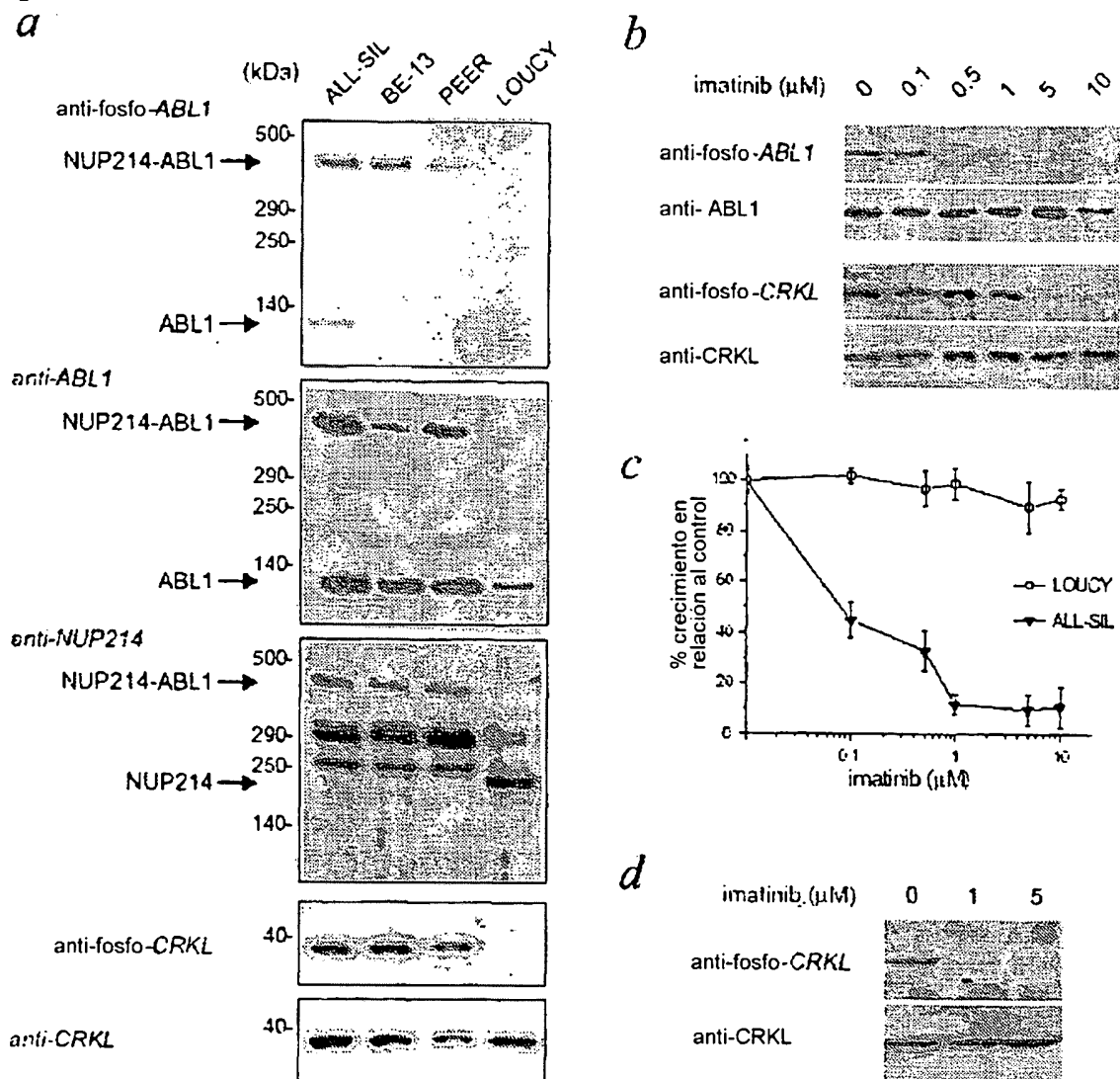
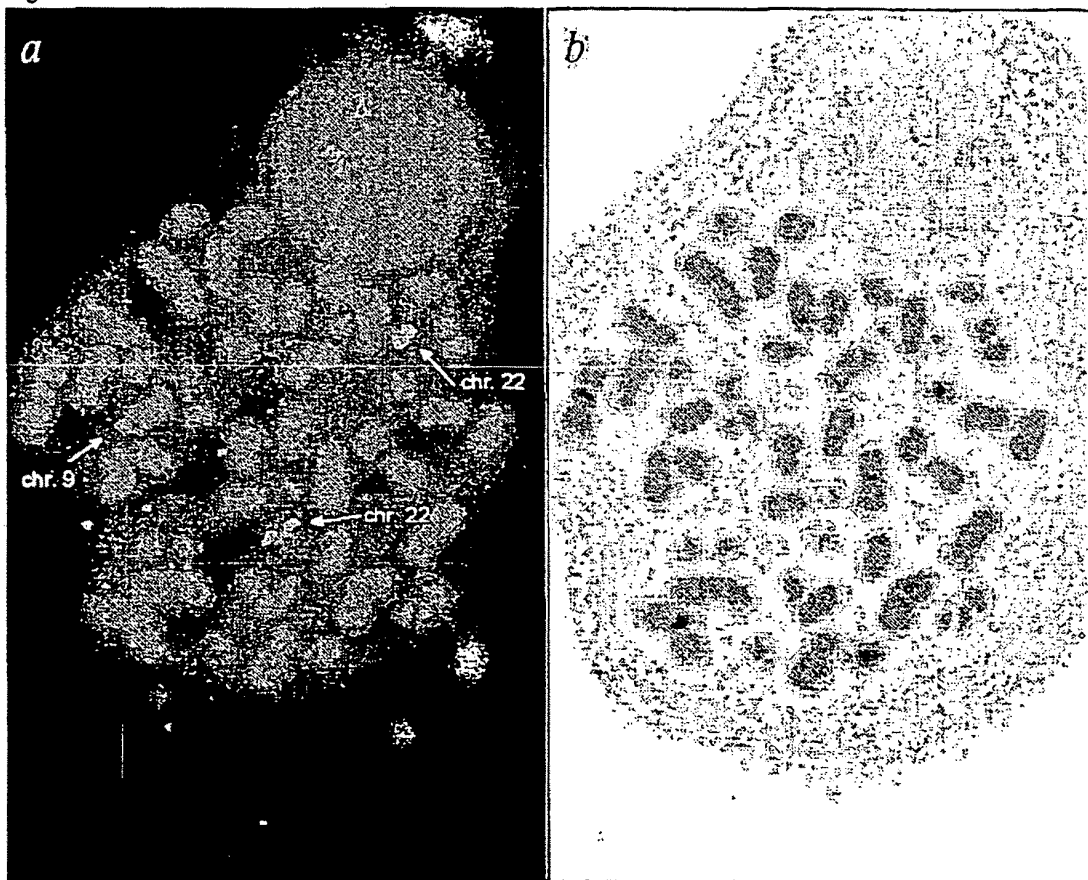


Fig. 5:



ES 2 318 493 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> VIB vzw
K.U. LEUVEN R&D
5

<120> GEN DE FUSIÓN EPISOMAL

<130> PMA/NUP/V185
10

<150> EP04102584.2
<151> 2004-06-08

15 <160> 17

<170> PatentIn versión 3.1

20 <210> 1
<211> 18
<212> DNA
<213> secuencia artificial

25 <220>
<223> cebador ABL1-R1

30 <400> 1
gcgtagatga gttgcttg 18

<210> 2
35 <211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> cebador ABL1-R2

<400> 2
45 **acaccattcc ccattgat tat** 23

<210> 3
<211> 23
50 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
55 <223> cebador ABL1-R3

<400> 3
60 **ccggagctt tcaccttag tta** 23

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
65 <213> Secuencia Artificial

ES 2 318 493 T3

<220>
<223> NUP20

5 <400> 4
 aatccttgcc caaagtacca g **21**
<210> 5
10 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> NUP28

<400> 5
20 **tcacaccaac accgtcttct** **20**
<210> 6
 <211> 20
25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
30 <223> NUP29

<400> 6
35 **aggaggctc tgtcttgg** **20**
<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
40 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> NUP31

45 <400> 7
 agagggggag gtttctcag t **21**
50 <210> 8
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> *Homo sapiens*

55 <220>
 <221> característica miscelánea
 <223> *Tránsito de fusión NUP214-ABL1 - paciente 2*

60 <220>
 <221> CDS
65 <222> (1)..(57)
 <223>

ES 2 318 493 T3

<400> 11

Ser Gly Phe Ser Phe Cys Gln Ala Ser Glu Ala Leu Gln Arg Pro Val

5

1 5 10 15

10

Ala Ser Asp

<210> 12

<211> 57

15 <212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> Característica miscelánea

20 <223> *Tránsito de fusión NUP214-ABL1 - paciente 1, 4, 6, 7, 9, 11*

<220>

<221> CDS

25 <222> (1)..(57)

<223>

<400> 12

30 **ggg ggc ttt gga tcc aca gct acc tca aaa gcc ctt cag cgg cca gta 48**
Gly Gly Phe Gly Ser Thr Ala Thr Ser Lys Ala Leu Gln Arg Pro Val
1 5 10 15

35 **gca tct gac 57**
Ala Ser Asp

<210> 13

<211> 19

40 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> Característica miscelánea

45 <223> *Tránsito de fusión NUP214-ABL1 - paciente 1, 4, 6, 7, 9, 11*

<400> 13

50 **Gly Gly Phe Gly Ser Thr Ala Thr Ser Lys Ala Leu Gln Arg Pro Val**
1 5 10 15

Ala Ser Asp

55

<210> 14

<211> 57

<212> DNA

60 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> Característica miscelánea

<223> *Tránsito de fusión NUP214-ABL1 - paciente 3*

65

<220>

<221> CDS

ES 2 318 493 T3

<222> (1)..(57)
 <223>

5 <400> 14

	ttt ggg ttt tcc tct cca aac aaa aca		gaa gcc ctt cag cgg cca gta	48
	Phe Gly Phe Ser Ser Pro Asn Lys Thr		Glu Ala Leu Gln Arg Pro Val	
	1	5	10	15

10 **gca tct gac** **57**
Ala Ser Asp

<210> 15
 <211> 19
 15 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 20 <221> Característica miscelánea
 <223> Tránsito de fusión NUP214-ABL1 - paciente 3

<400> 15

	Phe Gly Phe Ser Ser Pro Asn Lys Thr		Glu Ala Leu Gln Arg Pro Val	
	1	5	10	15

30 **Ala Ser Asp**

<210> 16
 <211> 57
 35 <212> DNA
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> Característica miscelánea
 40 <223> Tránsito de fusión NUP214-ABL1 - paciente 8
 <220>
 <221> CDS
 45 <222> (1) .. (57)
 <223>

<400> 16

	ttc tct ggt ttt gga tca ggc aca gga		gaa gcc ctt cag cgg cca gta	48
	Phe Ser Gly Phe Gly Ser Gly Thr Gly		Glu Ala Leu Gln Arg Pro Val	
	1	5	10	15

50 **gca tct gac** **57**
Ala Ser Asp

55 <210> 17
 <211> 19
 <212> PRT
 60 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> Característica miscelánea
 65 <223> Tránsito de fusión NUP214-ABL1 - paciente 8

ES 2 318 493 T3

<400> 17

Phe Ser Gly Phe Gly Ser Gly Thr Gly Glu Ala Leu Gln Arg Pro Val
1 5 10 15

5

Ala Ser Asp

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65