

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 055**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.02.2011 PCT/IB2011/000255**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.08.2011 WO2011098901**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2011 E 11715264 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2534261**

54 Título: **ASXL1 como nuevo marcador de diagnóstico de neoplasias mieloides**

30 Prioridad:

12.02.2010 US 303971 P

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

09.06.2017

73 Titular/es:

**QIAGEN MARSEILLE (33.3%)
3 avenue du Canada, ZA de Courtaboeuf, Parc
Technopolis
91940 Les Ulis, FR;
INSTITUT PAOLI-CALMETTES (33.3%) y
INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE (33.3%)**

72 Inventor/es:

**GELSI-BOYER, VÉRONIQUE y
BIRNBAUM, DANIEL**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 616 055 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

ASXL1 como nuevo marcador de diagnóstico de neoplasias mieloides

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere a marcadores genéticos para diagnosticar neoplasias mieloides, más particularmente a un nuevo gen supresor de tumor identificado. Más particularmente, se describe ASXL1 como marcador, que es útil para diagnosticar MDS, CMML, MPN y AML.

Antecedentes

10 La hematopoyesis se mantiene por un sistema jerárquico donde las células madre hematopoyéticas (CMH) dan lugar a progenitores multipotentes, que de uno en uno se diferencian en todos los tipos de células sanguíneas maduras. Los mecanismos moleculares que controlan la multipotencialidad, autorrenovación, quiescencia y compromiso de CMH han sido estudiados exhaustivamente. Sin embargo, quedan por tratar numerosos asuntos y quedan por identificar importantes genes que regulan estos procesos.

15 La Leucemia Mielode Aguda (AML, del inglés "Acute Myeloid Leukemia"), las neoplasias mieloproliferativas (MPN, del inglés "Myeloproliferative neoplasms"), los síndromes mielodisplásicos (MDS, del inglés "myelodysplastic syndromes") y los trastornos mielodisplásicos/mieloproliferativos son trastornos malignos de la célula madre clónica.

20 Se han correlacionado numerosas mutaciones genéticas con la AML, y se reconocen cuatro grupos: (i) AML con anomalías genéticas recurrentes AML t(8;21)(q22;q22) con gen de fusión RUNX1-ETO; AML con eosinófilos de médula ósea anormales y reordenación de inv(16)(p13;q22) o t(16;16)(p13;q22) con CBFβ/MYH11; leucemia promielocítica aguda APL con t(15;17)(q22;q12) PML/RARA; AML con anomalías 11q23 (MLL); (ii) AML con displasia multilineaje seguido de MDS o MDS/MPN o sin antecedente de MDS o MPN; (iii) terapia de AML o MDS relacionada y (iv) otras AML no clasificadas, las cuales comprenden el grupo de AML con cariotipo normal cuya prognosis se basa en el análisis molecular de oncogenes tales como mutaciones de FLT3-ITD o NPM1.

25 Las neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas incluyen cuatro enfermedades mieloides agrupadas en 1999 por la OMS: leucemia mielomonocítica crónica (CMML, del inglés "Chronic Myelomonocytic Leukemia"), leucemia mielomonocítica juvenil (JMML, del inglés "Juvenile Myelomonocytic Leukemia"), leucemia mielode crónica atípica (aCML, del inglés "atypical Chronic Myeloid Leukemia") y síndromes mielodisplásicos/mieloproliferativos no clasificados (U-MDS MPS, del inglés "unclassified Myelodysplastic/Myeloproliferative Syndromes").

30 Las MPN incluyen leucemia mielogenosa crónica (CML, del inglés "chronic Myelogenous Leukemia"), policitemia vera (PV), trombocitopenia esencial (ET, del inglés "Essential Thrombocytopenia") y mielofibrosis idiopática (IMF, del inglés "Idiopathic Myelofibrosis"). Las MPN se caracterizan por una proliferación incrementada de uno o varios linajes mieloides y comúnmente están asociadas a una actividad de la quinasa constitutiva adquirida, ilustrado por la mutación JA 2V617F en Policitemia Vera.

35 Los MDS se clasifican en varias clases que incluyen la anemia refractaria (RA, del inglés "Refractory Anemia"), y citopenia refractaria con displasia multilineaje (RCMD, del inglés "Refractory Cytopenia with Multilineage Dysplasia") y RA con exceso de blastos (RAEB, del inglés "RA with Excess of Blasts"). Los MDS se caracterizan por hematopoyesis ineficaz en uno o más de los linajes de la médula ósea, pero los defectos moleculares subyacentes aún son escasamente entendidos. Actualmente no hay disponibles marcadores biológicos, excepto características morfológicas, para diagnosis temprana y prognosis.

40 La familia de genes ASXL ("additional sex combs") tiene tres miembros en los seres humanos que codifican proteínas escasamente caracterizadas que contienen un dedo PHD C-terminal (homeodominio de planta). Ahora se espera que estas proteínas ASXL regulen la remodelación de cromatina y estén potencialmente ligadas a la regulación de la transcripción.

45 Más específicamente, el gen ASXL1 ("additional sex combs like 1") (también conocido como IAA0978; MGC71111; MGC117280) está localizado en la región cromosómica 20q11, comprende 12 exones de aproximadamente 100 kb. Este gen está referido bajo el número de acceso ID 171023 y su ADNc (Número de acceso NM 015338, SEQ ID N°1) codifica una proteína de 1.541 aminoácidos (Número de acceso NP 056153, SEQ ID N°2).

50 La proteína ASXL1 ayuda a reclutar los complejos de polycomb y thirithorax a dominios específicos y comparte cuatro dominios conservados que consisten en i) el dominio ASXN (aminoácidos 1 a 86), ii) el ASXM (aminoácidos 250 a 361), iii) la caja NR (los aminoácidos 1.107 a 1.112) e i) el dominio PHD (aminoácidos 1.506 a 1.541, SEQ ID N°3). La proteína ASXL1 juega un papel en la regulación de la transcripción de los programas de diferenciación (por ejemplo, la ruta del ácido retinoico) y autorrenovación.

Gelsi-Boyer et al., 2009, *British Journal of Haematology*, 145(6):788-800, informa de las mutaciones del gen ASXL1 en los síndromes mielodisplásicos y la leucemia mielomonocítica crónica. Carbuccia et al., 2009, *Leukemia*, 23(11):2.183-2.186, y Carbuccia et al., 2009, *Leukemia*, 24(2):469-473, revelan las mutaciones de ASXL1 en

neoplasias mieloproliferativas. Abdel-Wahab et al., 2010, *Cancer Research*, 70(2):447-452, hacen referencia a la transformación de la neoplasia mieloproliferativa crónica (MPN) a leucemias mieloides agudas (AML).

Compendio de la invención

5 Se describen mutaciones del gen ASXL1 en los síndromes de mielodisplasia (MDS), en neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas (es decir, leucemia mielomonocítica crónica (CMML)), en MPN, y en Leucemia Mieloide Aguda (AML).

La invención está definida en las reivindicaciones.

10 Además, se describe un método para diagnosticar un cáncer mieloide en un sujeto, que comprende la etapa de analizar una muestra biológica de dicho sujeto determinando la presencia o la ausencia de una mutación en el gen ASXL1 ("additional sex combs like 1") que codifica el polipéptido que tiene la secuencia SEQ ID N°2, en donde la presencia de tal mutación está correlacionada con un cáncer mieloide. La identificación de la presencia o la ausencia de la mutación se puede realizar por comparación con un control normal, por ejemplo, una línea celular, que no comprende dicha mutación. El método además puede comprender la etapa de registrar la presencia o la ausencia de dicha mutación en una posición concreta.

15 En un aspecto concreto, dicho método es para diagnosticar una neoplasia mieloproliferativa (MPN) en un sujeto, preferiblemente dicha MPN es una mielofibrosis primaria (PMF, del inglés "Primary Myelofibrosis"), mielofibrosis post-policitemia vera (post-PV MF, del inglés "post-Polycythemia Vera Myelofibrosis") o mielofibrosis post-trombocitemia esencial (post-ET MF, del inglés "post-Essential Thrombocythemia Myelofibrosis").

20 Ventajosamente, dicha mutación se selecciona en el grupo que consiste en inserciones, deleciones, y mutaciones puntuales que corresponden a mutación de aminoácido ("missense") y mutaciones terminadoras ("nonsense"), preferiblemente en el grupo que consiste en inserciones, deleciones y mutaciones terminadoras.

Preferiblemente, dicha mutación da como resultado la expresión de una proteína ASXL1 mutada, dicha proteína ASXL1 mutada no comprende por más tiempo su Homeodominio de Planta (dominio PHD, del inglés "Plant HomeoDomain", SEQ ID N°3) o un fragmento del mismo.

25 También se describe un kit para diagnosticar cáncer mieloide en un sujeto que comprende al menos una sonda de ácido nucleico u oligonucleótido o al menos un anticuerpo, el cual se puede usar en un método como se definió previamente para determinar la presencia o la ausencia de una mutación en el gen ASXL1 ("additional sex combs like 1") que codifica el polipéptido que tiene la secuencia SEQ ID N°2, en donde la presencia de tal mutación está correlacionada con un cáncer mieloide.

30 Además se describe un método para la prognosis del resultado de un cáncer mieloide en un sujeto, que comprende la etapa de analizar una muestra biológica de dicho sujeto determinando la presencia o la ausencia de una mutación en el gen ASXL1 ("additional sex combs like 1") que codifica el polipéptido que tiene la secuencia SEQ ID N°2, en donde la presencia de la mutación es indicativo de una prognosis mala de dicho paciente, y la ausencia de la mutación sugiere una prognosis buena de dicho paciente. Las mutaciones que son adecuadas para dicha prognosis incluyen, pero no se limitan a, mutaciones descritas en el gen ASXL1. La presencia o la ausencia de la mutación se puede realizar por comparación con un control normal, por ejemplo, una línea celular, que no comprende dicha mutación. El método además puede comprender la etapa de registrar la presencia o ausencia de dicha mutación en una posición concreta.

40 En un primer aspecto, dicho cáncer mieloide es una policitemia vera (PV) y el método de la invención es para la prognosis de la progresión de dicha PV a mielofibrosis post-policitemia vera (post-PV-MF). La presencia de una mutación en ASXL1 es indicativo de un riesgo de una progresión de dicha PV a Post-PV MF.

En otro aspecto, dicho cáncer mieloide es una trombocitemia esencial (ET) y el método de la invención es para la prognosis de la progresión de dicha PV a mielofibrosis post-trombocitemia esencial (post-ET MF). La presencia de una mutación en ASXL1 es indicativo de un riesgo de una progresión de dicha ET a Post-PV ET.

45 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra la representación de la proteína ASXL1 con motivos y dominios conocidos.

La Tabla I muestra los pares de secuencias cebadoras ("primers") usados para amplificar y secuenciar el gen ASXL1.

La Tabla II muestra las características moleculares de 40 casos de MDS estudiados.

50 La Tabla III muestra las mutaciones de ASXL1 en CMML.

La Tabla IV muestra los datos clínicos y moleculares de 112 pacientes de MPN con mutaciones en ASXL1.

La Tabla V muestra las características clínicas y biológicas de pacientes de CMML con ASXL1 mutado o no mutado.

La Figura 2 muestra las curvas de supervivencia total de Kaplan-Meier de pacientes de CMML según el estado mutacional de ASXL1.

5 La Figura 3 muestra las curvas de supervivencia total de Kaplan-Meier de pacientes de CMML según el estado mutacional de ASXL1 en pacientes cuya enfermedad no ha evolucionado a leucemia aguda.

Descripción detallada

La presente invención se base en el descubrimiento por parte de los presentes inventores de que el gen ASXL1 con frecuencia está marcado por mutaciones y/o deleciones en células tumorales en pacientes que padecen de MDS, neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas, MPN o AML.

10 Se describe un método para diagnosticar un cáncer mielóide en un sujeto, el cual comprende la etapa de analizar una muestra biológica de dicho sujeto determinando la presencia o la ausencia de una mutación en el gen ASXL1 ("additional sex combs like 1") que codifica el polipéptido que tiene la secuencia SEQ ID N°2, en donde la presencia de tal mutación está correlacionada con un cáncer mielóide.

15 Tal como se usa en la presente memoria, el término "sujeto" se refiere a un mamífero, preferiblemente un ser humano.

Dicho sujeto puede estar sano, pero el método descrito en la presente memoria es particularmente útil para ensayar un sujeto que se cree que desarrolla o está predispuesto a desarrollar un cáncer mielóide. En ese caso, el método permite confirmar que dicho sujeto desarrolla o está predispuesto a desarrollar un cáncer mielóide.

Dicho método es para diagnosticar una neoplasia mieloproliferativa (MPN) en un sujeto.

20 De hecho, los inventores han establecido sobre un grupo de pacientes de MPN que al menos el 8 % de ellos comprende una mutación en ASXL1.

Preferiblemente, dicha MPN es una mielofibrosis primaria (PMF) puesto que los inventores han establecido sobre un grupo de pacientes de PMF que al menos el 33 % de ellos comprende una mutación en ASXL1.

25 Preferiblemente aún, dicha MPN es mielofibrosis post-policitemia vera (post-PV MF) puesto que los inventores han establecido que al menos el 66 % de ellos comprenden una mutación en ASXL1.

Preferiblemente aún, dicha MPN es mielofibrosis post-trombocitemia esencial (post-ET MF) puesto que los inventores han establecido que al menos el 25 % de ellos comprenden una mutación en ASXL1.

30 Preferiblemente aún, dicha MPN es trombocitemia esencial (ET) y la presencia de una mutación en el gen ASXL1 excluye una trombocitosis reactiva (RT, del inglés "Reactive Thrombocytosis") puesto que los inventores han establecido que los pacientes de trombocitosis reactiva no comparten ninguna mutación en ASXL1.

35 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "muestra biológica" se refiere a tejidos sólidos tales como, por ejemplo, una biopsia de pulmón; frotis bucal, fluidos y excreciones tales como, por ejemplo, esputo, esputo inducido, sangre, suero, plasma, orina. Preferiblemente, dicha muestra biológica es una muestra de sangre o de médula ósea, preferiblemente una muestra de médula ósea. Preferiblemente, solamente se requiere una muestra biológica que contenga células que incluyan ADN genómico (u opcionalmente ARN) del sujeto a ensayar.

40 Tal como se usa en la presente memoria, el término "mutación" corresponde a cualquier modificación en la secuencia de la secuencia original de ácidos nucleicos. Estas mutaciones comprenden mutaciones a pequeña escala, o mutaciones a gran escala. Mutaciones a pequeña escala son aquellas que afectan a un gen en uno o unos pocos nucleótidos, incluyendo mutaciones puntuales, inserciones o deleciones de uno o más nucleótidos extras en el ADN. Las mutaciones puntuales pueden ser silenciosas, de aminoácido y terminadora. Mutación a gran escala en la estructura genómica, tal como duplicaciones de gen, deleciones o mutaciones cuyo efecto es yuxtaponer piezas de ADN previamente separadas, juntando potencialmente genes separados para formar genes de fusión funcionalmente distintos.

45 Preferiblemente, dicha mutación se selecciona en el grupo que consiste en inserciones, deleciones y mutaciones puntuales que corresponden a mutación de aminoácido y mutaciones terminadoras.

Más preferiblemente, dicha mutación se selecciona en el grupo que consiste en inserciones, deleciones y mutaciones terminadoras.

50 Además, los inventores han establecido que el exón 12 del gen codificador del dominio PHD de la proteína ASXL1 de manera preferente está dirigido por las mutaciones perjudiciales en los pacientes estudiados (véase los ejemplos).

Por tanto, y preferiblemente aún, dicha mutación da como resultado la expresión de una proteína ASXL1 mutada que no comprende ningún dominio PHD (SEQ ID N°3) o un fragmento del mismo.

5 Dicha proteína mutada puede resultar de la introducción de una mutación terminadora que conduce a la introducción de un codón de parada (X) en el marco de lectura abierto de la proteína ASXL1. Como ejemplo, dicha mutación terminadora se selecciona en el grupo que comprende Tyr591X, Gln592X, Lys618X, Arg693X, Gln759X, Gln768X, Leu775X y Arg1068X.

10 Dicha proteína mutada también puede resultar de un cambio de marco de lectura (FS, del inglés "Frame-Shift") debido a una inserción o una deleción en el gen ASXL1. Como ejemplo, dicha inserción o deleción se selecciona en el grupo de los que inducen la expresión de la proteína ASXL1 mutada con las siguientes mutaciones Gly64Trp FS, Arg596Pro FS, Ala611Arg FS, His630Pro FS, Gly646Trp FS, Leu762Phe FS, Trp796Gly FS, Thr882Asn FS, Thr836Leu FS, Ser846Gln FS, Asp879Glu FS, Lys888Glu FS, Leu1213Ile FS, Pro1263Gln FS, Leu1266His FS, Trp1271Lys FS o Ser1457Pro FS.

En otra realización preferida de la invención, la etapa de determinación se hace sobre el ADN genómico.

15 Técnicas típicas para detectar la presencia de una mutación en ADN pueden incluir polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción, técnicas de hibridación, secuenciación de ADN, resistencia a exonucleasa, microsecuenciación, extensión en fase sólida usando ddNTPs, extensión en solución usando ddNTPs, ensayos de ligación de oligonucleótidos, métodos para detectar polimorfismos de nucleótido sencillo tal como hibridación específica a alelo dinámica, reacción en cadena de ligación, minisequenciación, "chips" de ADN, método de fusión a alta resolución (HRM, del inglés "High Resolution Melting"), método de sistema de mutación refractario por amplificación (ARMS, del inglés "Amplification-Refractory Mutation System"), hibridación de oligonucleótido específica a alelo con sondas con marcación simple o doble mezclada con PCR o con balizas moleculares, sondas Scorpion® (DxS Genotyping), sondas MGB® (Minor Groove Binding) (NANOGEN) y otros.

Ventajosamente, la mutación se detecta sobre el ADNc del gen ASXL1 mediante o bien PCR y secuenciación, matriz de SNP o CGH, todos los cuales son bien conocidos por los expertos en la técnica.

25 La hibridación genómica comparativa (CGH, del inglés "Comparative Genomic Hybridization") es un método citogenético molecular de investigación de un tumor para cambios genéticos. Las alteraciones se clasifican como ganancias y pérdidas de ADN y revelan un patrón característico que incluye mutaciones a niveles cromosómicos y subcromosómicos. El método se base en la hibridación de ADN del tumor fluorescentemente marcado (frecuentemente fluoresceína (FITC)) y ADN normal (frecuentemente rodamina o Rojo Texas) con preparaciones de metafase humana normal. Usando el microscopio de epifluorescencia y el análisis de imagen cuantitativo, se pueden detectar diferencias regionales en la proporción de ganancias/pérdidas de fluorescencia frente al ADN control y se puede usar para identificar regiones anormales en el genoma. CGH detectará solamente cambios cromosómicos desequilibrados. Normalmente no se pueden detectar las aberraciones cromosómicas estructurales tales como translocaciones o inversiones recíprocas equilibradas, ya que no cambian sistemáticamente el número de copia.

35 En otra realización preferida de la invención, la etapa de determinación se realiza sobre el ARNm/ADNc de ASXL1.

40 Tal análisis se puede valorar preparando ARNm/ADNc de células en una muestra biológica de un sujeto, e hibridando el ARNm/ADNc con un polinucleótido de referencia. El ARNm/ADNc preparado se puede usar en ensayos de hibridación o amplificación que incluyen, pero no se limitan a, análisis tipo Southern o Northern, análisis de reacción en cadena de la polimerasa, tal como PCR cuantitativa (TAQMAN), y matrices de sondas tales como Matrices de ADN GENECHIP (AFFYMETRIX).

En aún otras realizaciones preferidas de la invención, la etapa de determinación se realiza sobre la proteína ASXL1.

45 Tal análisis se puede valorar usando un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo radiomarcado, marcado con cromóforo, marcado con fluoróforo o marcado con enzima), un derivado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de anticuerpo con un sustrato o con la proteína o el ligando de una proteína de un par proteína/ligando (por ejemplo, biotina-estreptavidina), o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de cadena sencilla, un dominio hipervariable de anticuerpo aislado, etc.) que se une específicamente a la proteína traducida a partir del gen ASXL1 (SEQ ID N°2), y preferiblemente al dominio PHD (SEQ ID N°3) de la proteína ASXL1.

50 Dicho análisis se puede valorar mediante una diversidad de técnicas bien conocidas por un experto en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, ensayo inmunoenzimático (EIA, del inglés "Enzyme Immunoassay"), radioinmunoensayo (RIA, del inglés "Radioimmunoassay"), análisis de transferencia tipo Western y ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA, del inglés "Enzyme Linked Immunoabsorbant Assay").

55 Los anticuerpos policlonales se pueden preparar inmunizando un animal adecuado, tal como ratón, conejo o cabra, con la proteína ASXL1 (SEQ ID N°2) o su dominio PHD (SEQ ID N°3). Se puede hacer un seguimiento del título del anticuerpo en el animal inmunizado a lo largo del tiempo mediante técnicas estándar, tales como con un ELISA usando polipéptido inmovilizado. En un momento apropiado después de la inmunización, por ejemplo, cuando los

títulos del anticuerpo específico son los más altos, las células productoras de anticuerpo se pueden obtener del animal y se pueden usar para preparar anticuerpos monoclonales (mAb) mediante técnicas estándar.

El experto en la técnica también puede usar los anticuerpos monoclonales de ASXL1 comercialmente disponibles, tales como los anticuerpos monoclonales comercializados por ABCAM o por SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY Inc.

5 Además, se describe un kit para diagnosticar cáncer mieloides en un sujeto que comprende al menos una sonda de ácido nucleico u oligonucleótido o al menos un anticuerpo, que se puede usar en un método como se definió previamente, para determinar la presencia o la ausencia de una mutación en el gen ASXL1 ("additional sex combs like 1") que codifica el polipéptido que tiene la secuencia SEQ ID N°2, en donde la presencia de tal mutación está correlacionada con un cáncer mieloides.

10 Preferiblemente, el oligonucleótido es al menos un cebador de PCR, preferiblemente se proporciona un conjunto de cebadores de PCR, que permite amplificar el gen ASXL1 o un fragmento del mismo. El experto en la técnica fácilmente proporciona tal oligonucleótido o conjunto de cebadores de PCR que permite amplificar una región del gen ASXL1, siempre y cuando la secuencia de ácidos nucleicos del gen ASXL1 sea bien conocida (Número de acceso NC 000020.10, nucleótidos 30.946.153 a 31.027.122; y el número de acceso NM_015338 para el correspondiente ADNC, SEQ ID N°1).

15 Como ejemplo, dichos pares de cebadores de PCR se seleccionan en el grupo que comprende SEQ ID N°4 y SEQ ID N°5, SEQ ID N°6 y SEQ ID N°7, SEQ ID N°8 y SEQ ID N°9, SEQ ID N°10 y SEQ ID N°11, SEQ ID N°12 y SEQ ID N°13, SEQ ID N°14 y SEQ ID N°15, SEQ ID N°16 y SEQ ID N°17, SEQ ID N°18 y SEQ ID N°19, SEQ ID N°20 y SEQ ID N°21, SEQ ID N°22 y SEQ ID N°23, SEQ ID N°24 y SEQ ID N°25, SEQ ID N°26 y SEQ ID N°27, SEQ ID N°28 y SEQ ID N°29, SEQ ID N°30 y SEQ ID N°31, y SEQ ID N°32 y SEQ ID N°33. Tales cebadores están revelados en la tabla I.

20 Tal como se usa en la presente memoria, el término "kit" se refiere a cualquier sistema de reparto para repartir los materiales. En el contexto de los ensayos de reacción, tales sistemas de reparto incluyen sistemas que permiten el almacenamiento, transporte, o reparto de reactivos de reacción (por ejemplo, oligonucleótidos, enzimas, etc, en los recipientes apropiados) y/o materiales de soporte (por ejemplo, tampones, instrucciones por escrito para la realización del ensayo, etc) desde una localización a otra. Por ejemplo, los kits incluyen uno o más recintos (por ejemplo, cajas) que contienen los reactivos de reacción relevantes y/o materiales de soporte. Tal como se usa en la presente memoria, el término "kit fragmentado" se refiere a sistemas de reparto que comprenden dos o más recipientes separados que cada uno contiene una subparte de los componentes del kit total. Los recipientes se pueden repartir al receptor previsto juntos o por separado. Por ejemplo, un primer recipiente puede contener una enzima para usarse en un ensayo, mientras que un segundo recipiente contiene los oligonucleótidos. El término "kit fragmentado" se pretende que abarque los kits que contienen Reactivos Específicos Analíticos (ASR, del inglés "Analyte Specific Reagent") regulados bajo la sección 520(e) del "Federal Food, Drug and Cosmetic Act", pero no se limitan a ellos. De hecho, cualquier sistema de reparto que comprende dos o más recipientes separados que cada uno contiene una subparte de los componentes del kit total están incluidos en el término "kit fragmentado". Por el contrario, un "kit combinado" se refiere a un sistema de reparto que contiene todos los componentes de un ensayo de reacción en un recipiente único (por ejemplo, una caja única que alberga cada uno de los componentes deseados). El término "kit" incluye tanto los kits fragmentados como los combinados.

35 Los presentes kits también pueden incluir uno o más reactivos, tampones, medios de hibridación, ácidos nucleicos, cebadores, nucleótidos, sondas, marcadores de peso molecular, enzimas, soportes sólidos, bases de datos, programas informáticos para calcular los órdenes de dispensación y/o equipo de laboratorio desechable, tal como placas multipocillos, para facilitar fácilmente la puesta en práctica de los presentes métodos. Las enzimas que se pueden incluir en los presentes kits incluyen polimerasas de nucleótidos y similares. Los soportes sólidos pueden incluir microesferas y similares mientras que los marcadores de peso molecular pueden incluir marcadores conjugables, por ejemplo, biotina y estreptavidina o similares.

En una realización, el kit está compuesto de instrucciones para llevar a cabo el método descrito en la presente memoria para diagnosticar un cáncer mieloides en un sujeto. Las instrucciones se pueden proporcionar en cualquier forma inteligible a través de un medio tangible, tal como un impreso sobre papel, medios leíbles por ordenador, o similares.

50 Se describe un método para la prognosis del resultado de un cáncer mieloides en un sujeto, el cual comprende la etapa de analizar una muestra biológica de dicho sujeto determinando la presencia o la ausencia de una mutación en el gen ASXL1 ("additional sex combs like 1") que codifica el polipéptido que tiene la secuencia SEQ ID N°2, en donde la presencia de la mutación es indicativo de una prognosis mala de dicho paciente, y la ausencia de la mutación sugiere una prognosis buena de dicho paciente. Las mutaciones que son adecuadas para dicha prognosis incluyen, pero no se limitan a, mutaciones descritas en el gen ASXL1. La presencia o la ausencia de la mutación se puede realizar por comparación con un control normal, por ejemplo, línea celular, que no comprende dicha mutación. El método además puede comprender la etapa de registro de la presencia o ausencia de dicha mutación en una posición concreta.

En un aspecto, dicho cáncer mielóide es una policitemia vera (PV) y el método de la invención es para la prognosis de la progresión de dicha PV a mielofibrosis post-policitemia vera (post-PV MF). La presencia de una mutación en ASXL1 es indicativo de un riesgo de una progresión de dicha PV a Post PV MF.

5 En un aspecto adicional, dicho cáncer mielóide es una trombocitemia esencial (ET) y el método de la invención es para la prognosis de la progresión de dicha PV a mielofibrosis post-trombocitemia esencial (post-ET MF). La presencia de una mutación en ASXL1 es indicativo de un riesgo de una progresión de dicha ET a Post PV ET.

10 En lo siguiente, la invención se describe en más detalle en referencia a secuencias de aminoácidos, secuencias de ácidos nucleicos y los ejemplos. Sin embargo, no se pretende ninguna limitación de la invención por los detalles de los ejemplos. Preferible, la invención concierne a cualquier realización que comprenda detalles que no se mencionan explícitamente en los ejemplos en la presente memoria, pero que los expertos en la técnica encuentran sin excesivo esfuerzo.

Ejemplos

1) Alteración del gen ASXL1 en pacientes que padecen de MDS

Tres tipos de perfiles aCGH en MDS.

15 Se recogieron una serie de muestras de médula ósea (BM, del inglés "Bone Marrow") de pacientes con MDS, con AML con displasia multilineal (AML-MLD), y con AML secundaria a CMML.

Según los criterios de la "French-American-British (FAB)" y la OMS, el grupo de MDS comprendía tres RA, nueve RARS (incluyendo una con mielofibrosis idiopática), tres RCMD (incluyendo dos con sideroblastos en anillo), 10 RAEB1, ocho RAEB2 y dos MDS-U.

20 La mayoría de las muestras de MDS se recogieron en el momento del diagnóstico; algunos estaban en abstención terapéutica de un MDS conocido y algunos estaban bajo tratamiento sintomático. Todos *de novo* excepto dos casos secundarios para el tratamiento de tumores sólidos.

Se usaron matrices de alta densidad de amplio genoma para estudiar los perfiles aCGH de 40 muestras de MDS/AML de 38 pacientes.

25 El ADN se extrajo por el kit de aislamiento de ADN/ARN ALLPREP de MACHEREY NAGEL de células de médula ósea totales, como recomienda el proveedor.

30 Se analizaron desequilibrios de ADN por hibridación genómica comparativa por matriz (aCGH, del inglés "Array Comparative Genomic Hybridization") usando Micromatrices de CGH 244K (Hu-244A; AGILENT TECHNOLOGIES) y la resolución era hasta 6 kb. El cribado se hizo con Agilent Autofocus Dynamic Scanner (G2565BA; AGILENT TECHNOLOGIES). El análisis de datos se realizó como se describió previamente en Gelsi-Boyer et al. (*BMC Cancer*, vol. 8, p:299-314, 2008) y se visualizó con el programa informático CGH ANALYTICS 3.4 (AGILENT TECHNOLOGIES). La extracción de datos (\log_2 proporción) se hizo con procesos analíticos de CGH mientras que el \log_2 proporciones normalizado y filtrado se obtuvo a partir del programa informático FEATURE EXTRACTION (AGILENT TECHNOLOGIES). Los cambios de número de copia se caracterizaron como se informa en Gelsi-Boyer et al. (anteriormente mencionado, 2008).

35

Los resultados están resumidos en la Tabla II.

En estos resultados, se observaron tres tipos principales de perfiles.

40 Los perfiles de tipo 1 mostraron ganancias o pérdidas que ya eran visibles en el cariotipo y afectaban a grandes regiones del genoma, tales como la trisomía 8, deleciones de parte de los brazos 5q y 20q, o deleción o reorganizaciones del cromosoma 7. Las deleciones en el brazo 5q eran bastantes grandes y siempre comprendían *RPS14*, *HSPA9B* y muchos otros genes, incluyendo *CXXC5* (CXXC dedo 5).

45 Los perfiles de Tipo 2 mostraron ganancias y pérdidas raras y limitadas que afectaban a pocos genes. Un caso (es decir, el caso 190) mostró varias regiones con pequeñas deleciones. Una de estas en 20q11 contenía los genes *ASXL1* ("additional sex combs 1") y *DNMT3B* (ADN citosina-5-metiltransferasa 3 beta) y otra en 2p23 los genes parálogos *ASXL2* y *DNMT3A*. El mismo caso también mostró una deleción de *BAZ2B* en el brazo 2q del cromosoma. También se observaron ganancias (es decir, *MAP3K4* en el caso 167) pero menos frecuentemente que las deleciones.

50 En casos con un perfil tipo 3 no se pudo detectar aberración del número de copia genómico (CNA, del inglés "Copy Number Aberration"). Este perfil no se encontró en 22/40 casos (55 %). Hemos indicado esto por "no CNA" en la Tabla I.

Mutaciones de genes candidatos en MDS

Analizamos las secuencias de diversos genes candidatos en nuestras muestras de MDS.

Las mutaciones somáticas de los genes HRAS, KRAS, NRAS, RUNX1, NFIA, CTNNB1, TET2 y ASXL1 se investigaron mediante la secuenciación de exones y sitios de corte y empalme consenso después de la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ADN genómico (véase la Tabla I para ASXL1). Las amplificaciones por PCR se hicieron en un volumen total de 25 µl de mezcla de PCR que contenía al menos 5 ng de ADN patrón, tampón Taq, 200 µmol de cada desoxinucleótido trifosfato, 20 pmol de cada cebador y 1 unidad de HOT STAR TAQ (QIAGEN).

Las condiciones de amplificación por PCR eran como sigue: 95 °C 10 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s a 1 min dependiendo de la longitud del producto de PCR durante 35 ciclos; 72 °C 10 min.

Los productos de PCR se purificaron usando placa MILLIPORE MSNU030 (MILLIPORE SAS). Se usaron alícuotas (1 µl) de los productos de PCR purificados para la secuenciación usando el kit Big Dye Terminator V1.1 (APPLIED BIOSYSTEMS) que incluye el cebador directo e inverso.

Después de purificación G50, las secuencias se cargaron sobre un ABI 3130XL AUTOMAT (APPLIED BIOSYSTEMS). Los ficheros de datos de secuencia se analizaron usando el programa informático SEQSCAPE y todas las mutaciones se confirmaron sobre un producto de PCR independiente.

Los resultados se presentan en la Tabla I y muestran que no se encontró mutación de los tres genes RAS, del gen NFIA o del gen CTNNB1.

Se encontró mutación en RUNX1 en un caso de cada 24 ensayados.

Encontramos diversos casos mutados para TET2 (a informar en detalle en otro lugar). Se han descubierto mutaciones y deleciones de este gen recientemente en aproximadamente 15 a 20 % de diversas enfermedades mieloides que incluyen los MDS.

Investigamos mutaciones en el gen ASXL1, un alelo del cual se sometió a deleción en el caso 190. Encontramos seis mutaciones en cinco pacientes (una de estas mutaciones se encontró en tanto los MDS como los estados transformados) (Tabla II). Las mutaciones estaban causadas por deleción o duplicación de un nucleótido. La Figura 1A y B muestra una representación esquemática de la proteína ASXL1 con la localización deducida de las mutaciones. Todas las mutaciones se encontraron en el exón 12 del gen y deberían conducir al truncamiento del terminal C de la proteína, el cual contiene un dedo PHD.

Finalmente, así hemos encontrado mutaciones en el gen ASXL1 en el 11 % de los pacientes de MDS.

2) Alteración del gen ASXL1 en pacientes que padecen de trastornos mielodisplásicos/mieloproliferativos

30 *Mutación de ASXL1 en CMML*

Para determinar si las mutaciones en ASXL1 se pueden encontrar fuera de los MDS analizamos como se describió previamente la secuencia de ASXL1 en las muestras de médula ósea de pacientes que padecen de CMML, una enfermedad relacionada.

Según los criterios de la FAB y la OMS, las series de CMML comprendían 21 formas mieloproliferativas (MP-CMML), 18 mielodisplásicas (MD-CMML) y siete CMML intensamente transformadas (AT-CMML, del inglés "Acutely-Transformed CMML"). Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado. La proyección y la recogida de muestras fue revisada por la junta de revisión científica del "Paoli-Calmettes Institute", según las regulaciones y los intereses éticos actuales.

Se encontraron un total de 19 mutaciones en 44 pacientes (46 casos) (43 %) (Tabla III). La localización y naturaleza de estas mutaciones se muestran en la Figura 1C.

Como en MDS, todas las mutaciones se encontraron en el exón 12 y eran deleciones, duplicaciones, inserciones o sustituciones de nucleótidos. Encontramos 13 mutaciones en 21 casos de MP-CMML (62 %), cuatro en 18 de MD-CMML (22 %) y dos en siete de AT-CMML (28 %), siendo significativa la diferencia entre los casos de MP y MD.

Correlaciones entre la mutación en ASXL1 y las características clínicas y biológicas en CMML

Se recogieron una serie de muestras de médula ósea consecutivas obtenidas de 53 pacientes, todos los cuales firmaron un consentimiento informado. Entre estos 31 eran MP-CMML y 22 eran MD-CMML como inicialmente se definió por el grupo FAB con un recuento de leucocito superior o inferior a 13 g/l, respectivamente. Se observó un cariotipo normal en 40 pacientes (20 MP-CMML y 20 MD-CMML); se encontró una del(20q)(q11;q13) en 3 pacientes (2 MP-CMML y 1 MD-CMML); se halló una trisomía de unos cromosomas comúnmente afectados (8, 19, 21) en 4 MP-CMML. Uno de MD-CMML tenía una inversión 11q, uno de MP-CMML tenía una t(10;11)(p12;p15) y uno de MP-CMML tenía una t(1;3)(p36;q21).

- 5 Los perfiles de aCGH de 51 de los 53 casos de CMML se establecieron como previamente se describió y se revelaron alteraciones que se observaron por citogenéticas convencionales (9/51) excepto para 3 pacientes con translocaciones equilibradas (HD-0201, HD-0316, HD-0178), y para el caso de HD-0367 con una del(20)(q11q13) para el cual aCGH no mostró una delección franca en 20q probablemente debido al bajo número de células afectadas.
- Para nueve casos (17 %) aCGH detectó pérdidas o ganancias raras y limitadas, no visibles en el cariotipo. Afectaron muy pocos genes incluyendo algunos con función supresora de tumor conocida y actividad leucemogénica (*NF1*, *RB1* y *TET2*). Finalmente, y en el 70 % de los casos (35/51) no se observaron aberraciones del número de copia.
- 10 Los resultados también muestran que las alteraciones genómicas detectadas por citogenéticas convencionales o aCGH eran diferentes en MP-y MD-CMML con 15 alteraciones de los 31 MP-CMML y 4 alteraciones de los 22 MD-CMML. Por tanto, las MP-CMML tenían más alteraciones genómicas que las MD-CMML ($p=0,049$).
- Estudiamos las secuencias codificadoras de 13 genes en los 53 casos. En 25 casos (49 %) encontramos 20 cambios de marco de lectura (incluyendo 7 veces el mismo p.Gly646Trpfsx12) y 5 mutaciones terminadoras en el exón 12 de *ASXL1*. Se encontraron mutaciones del exón 8 de *CBL* en el 10 % de los casos (5/47).
- 15 Un caso (HD-0223) tenía una delección homocigota. Un caso (HD-0367) tenía una duplicación en tándem interna de *FLT3*. Encontramos 5 mutaciones de *IDH* en 48 casos (10 %); todas estaban en *IDH2* (4 veces el mismo p.Arg140Gln). Siete pacientes de los 53 casos tenían una mutación de *K* o *NRAS* (13 %). Doce de los 53 pacientes (21 %) estaban mutados para *RUNX1* y el 36 % de los pacientes estaban mutados para *TET2*. No se encontró mutación en *NPM1*, *JAK2* y *WT1*.
- 20 A continuación, estudiamos la prevalencia de los genes mutados en MP y MD-CMML. Diecinueve de las 25 mutaciones en *ASXL1* se encontraron en 30 MP-CMML frente a 6 en 22 MD-CMML. Las mutaciones en *ASXL1*, pero no en *RUNX1* o *TET2*, eran más frecuentes en MP que en MD-CMML ($p=0,03$). No se observó diferencia entre las dos formas para *CBL*, *FLT3*, *IDH1/2*, *PTPN11*, *RAS*, *RUNX1* o *TET2*. Todo el número de mutaciones (*ASXL1* y genes de proliferación) era mayor en las MP (69/273 casos) que en las MD-CMML (26/172) ($p=0,0018$).
- 25 Puesto que la clasificación de CMML siempre ha sido un tema de debate, por tanto, la mutación en *ASXL1* corresponde a una base molecular a la separación de CMML en formas MP y MD inicialmente definidas por el grupo FAB.
- En el presente estudio *ASXL1* aparece como el gen más frecuentemente mutado en CMML, como es en los MDS.
- 30 Se examinaron las principales características clínicas y biológicas de 51 casos de CMML con respecto a las mutaciones en *ASXL1* (Tabla V).
- Los resultados mostraron que la presencia de una mutación en *ASXL1* estaba asociada con mayor RGB (30 g/l frente a 15 g/l) ($p=0,006$), mayor monocitosis en sangre ($p=0,005$) y en médula ósea ($p=0,04$) y con menor nivel de hemoglobina en sangre ($p=0,03$). No se indicó diferencia en el volumen celular medio, recuento de neutrófilos y plaquetas en sangre, o blastos en médula ósea. En MP-CMML la mutación en *ASXL1* se correlacionó con un nivel menor de recuento de hemoglobina ($p=0,03$) y plaquetas ($p=0,002$) y con una mayor monocitosis ($p=0,04$). En MD-CMML, no se observaron correlaciones con la mutación en *ASXL1*.
- 35 Entre los casos de *ASXL1* mutado (25/51), once (9 MP y 2 MD) habían evolucionado a transformación aguda (Tabla V), mientras que no se observó transformación aguda en los casos no mutados. En otras palabras, todos los casos transformados tenían una mutación en *ASXL1*, pero no todos los casos de *ASXL1* mutado habían progresado a AML.
- 40 Por tanto, la mutación en *ASXL1* y la transformación aguda estaban correlacionadas ($p=0,0005$). Si algunos casos mutados no habían progresado a fase aguda, esto puede ser debido a que los pacientes habían muerto antes de experimentar leucemia aguda.
- Se hizo el análisis de supervivencia total (seguimiento medio de 29,5 meses) para los 53 pacientes y la supervivencia total media determinada fue de 27,6 meses. El estado de *ASXL1* se pudo determinar en el momento del muestreo de 51 pacientes. El análisis Kaplan-Meier mostró un índice de supervivencia total inferior en los pacientes con *ASXL1* mutado (Fig. 2), sin impacto significativo de transformación aguda sobre la supervivencia total (datos no mostrados). Los resultados también han mostrado que con respecto a la forma MP/MD, solamente se observó una tendencia a una mejor supervivencia de los pacientes de MD (datos no mostrados).
- 45 Para determinar si *ASXL1* tenía impacto de pronóstico independientemente de la transformación aguda, comparamos la supervivencia total de los pacientes mutados para *ASXL1*, pero los cuales no habían experimentado progresión aguda con la de los pacientes no mutados: la mutación en *ASXL1* estaba asociada a un mal resultado (Fig. 3). Finalmente, dentro de los pacientes de MP-CMML, los casos mutados para *ASXL1* tenían una supervivencia peor que los casos no mutados. Hicimos el mismo análisis para el estado mutacional de *TET2*. A diferencia de *ASXL1*, *TET2* no tenía impacto sobre la supervivencia total (datos no mostrados).
- 50
- 55

3) Alteración del gen *ASXL1* en pacientes que padecen de MPN

Mutación de ASXL1 en MPN

Para determinar si *ASXL1* podría estar implicado en otros tipos de enfermedades mieloides, estudiamos el gen *ASXL1* en 64 neoplasias mieloproliferativas (MPN).

5 Nuestras series comprendían 10 casos de policitemia vera, 35 casos de trombocitemia esencial (ET), 10 casos de mielofibrosis primarias (PMF), 1 caso de PMF prefibrótica, 5 MPN en fase blástica y 3 MPN no clasificadas.

También investigamos las mutaciones en 12 casos de no-MPN que comprendían 7 trombocitosis secundarias y 5 eritrocitosis secundarias. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado y el estudio fue aprobado por nuestro comité ético.

10 Investigamos las mutaciones en *ASXL1* como se describió previamente, y simultáneamente para las mutaciones en *JAK2* (V617F) y *TET2* (todos los exones).

Los resultados han demostrado que las mutaciones por cambio de marco de lectura de *TET2* heterocigoto se encuentran en 4 de los 64 casos de MPN (6,2 %), 2 de ET y 2 de PMF.

15 También encontramos mutaciones por cambio de marco de lectura de *ASXL1* en 5 casos (7,8 %) incluyendo 1 ET de los 35, 3 PMF de los 10 (1 estaba en la fase acelerada) y 1 leucemia mieloide aguda (AML) post-ET. Ninguno de los cinco casos con *ASXL1* mutado llevaba una mutación *JAK2* V617F y solamente uno de estos cinco casos (una PMF) también estaba mutado para *TET2*. Los otros cuatro casos de *TET2* no tenían una mutación en *TET2*, pero dos de ellos mostraron un cariotipo anormal.

20 Analizamos las mismas secuencias en ADN extraído de células purificadas de CD34 de tres pacientes con mutación en *ASXL1* y/o *TET2* en su ADN de célula sanguínea (HD-0496, HD-0536 y HD-0540). Se detectaron las mismas mutaciones en *ASXL1* y *TET2* en el correspondiente ADN de CD34. Esto concuerda con lo que se conoce de la fisiopatología de las MPN y sugiere que las mutaciones en *ASXL1* se dan tempranamente durante la evolución de la enfermedad.

25 Finalmente, se encontraron mutaciones en *ASXL1* en casi el 8 % de los pacientes que padecen de MPN, y más especialmente en el 33 % de los pacientes que padecen de PMF.

Mutación de ASXL1 en MPN no-CML

30 El análisis anterior se hizo para 112 nuevos casos de MPN que comprendían 97 PV, ET y MF, 9 PV/ET/MF en fase blástica y 6 formas de MPN/MDS y MPN no clasificadas. También investigamos las mutaciones en 32 casos no MPN que comprendían 10 trombocitosis reactivas (RT) y 22 eritrocitosis reactivas (RE, del inglés "Reactive Erythrocytosis").

Se encontraron mutaciones en *ASXL1* en 13 casos (11,6 %). Todas estas mutaciones eran heterocigotas y comprendían 10 cambios de marco de lectura (incluyendo 7 c.1934dupG p.Gly646TrpfsX12) o mutaciones terminadoras que se supone que truncan la proteína desde su terminal C que incluye el dominio de dedo de homeodominio de planta (PHD) (Tabla IV).

35 Las frecuencias mutacionales específicas a enfermedad fueron del 8 % en PV, 4 % en ET, 12 % en PMF, 66 % en post-PV MF, 25 % en post-ET MF, 22 % en PV/ET/MF en fase blástica y 66 % en MPN/MDS. Las mutaciones en *TET2* estaban presentes en 11 de 112 pacientes (10 %). Interesantemente, ninguno de los 32 casos reactivos estaba mutado para *ASXL1*.

40 Debido a que el diagnóstico diferencial entre ET (MPN) y trombocitosis reactiva puede ser difícil, la presencia de una mutación en *ASXL1* podría ayudar en el diagnóstico de MPN para excluir una trombocitosis reactiva.

La presencia de una mutación en *ASXL1* no influyó el recuento de leucocito, los niveles de hemoglobina o hematocritos, pero el recuento de plaquetas era más bajo en los casos con *ASXL1* mutado (416×10^9 células/litro, $p=0,009$) en comparación con *ASXL1* en peso (625×10^9 células/litro).

45 Finalmente, observamos una alta incidencia de mutación en *ASXL1* en pacientes de MF incluyendo PMF, post-ET MF y post-PV MF y una baja incidencia en ET y PV, implicando que *ASXL1* puede estar asociado a un fenotipo más agresivo. Además, la proporción de las mutaciones en *ASXL1* eran altas en post-PV MF y post-ET MF (66 % y 25 %, respectivamente); sugiriendo que el estado de *ASXL1* se podría usar para predecir el riesgo de evolución de PV y ET a MF.

4) Alteración del gen *ASXL1* en pacientes que padecen de AML

50 Para determinar si *ASXL1* está implicado en AML, usamos secuenciación de ADN y aCGH como se describió previamente para investigar las mutaciones y deleciones del gen en 46 casos de AML con cariotipo normal y 17

casos con trisomía 8 (n=14), delección 9q (HD-0632), trisomía 11 (HD-0304) o delección 20q11-13 (HD-0381) como una única anomalía cariotípica.

5 Las 63 AML eran 46 casos primarios y 17 transformaciones de una enfermedad mielóide previa. No incluimos AML relacionadas a terapia. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado y el estudio fue aprobado por nuestra junta de revisión institucional.

En total, 41 de los 50 casos estudiados por aCGH no mostraron ninguna aberración del número de copia (la trisomía 8 aislada no se tomó en cuenta).

10 Encontramos mutaciones por cambio de marco de lectura o terminadoras heterocigotas de ASXL1 en 11 de los 63 casos (17,5 %). También encontramos varios casos de sustitución, los cuales no tomamos en cuenta debido a que pueden representar polimorfismos. La delección de la región cromosómica 20q11-13 (HD-0381), la cual era visible en el cariotipo, implicaba ASXL1. Por tanto, en total, 12 casos de los 63 mostraron alteración de ASXL1 (19 %).

En dos casos, secuenciamos ASXL1 en ADN extraído de frotis bucales del paciente con mutación en ASXL1; ASXL1 no estaba mutado, mostrando que la mutación se adquiría.

15 De acuerdo con lo que se sabe para AML con cariotipo normal, casi la mitad de los casos (28 de cada 63, 44 %) mostraron mutaciones en NPM1 en el exón 12. Las mutaciones de NPM1 eran mutuamente exclusivas con las alteraciones de ASXL1: ninguno de los 28 casos con NPM1 mutado mostraron mutación o delección en ASXL1, mientras que 12 de los 35 (34 %) casos no-NPM1 mutados estaban mutados o sometidos a delección para ASXL1.

Se encontraron mutaciones en FLT3 y duplicaciones en tándem internas (ITD, del inglés "Internal Tandem Duplications") en 19 casos (30 %) y no se observaron con mutaciones en ASXL1 excepto en un caso (HD-0282).

20 Tres casos estaban mutados en o bien K o NRAS, y un caso en JAK2. Los datos sobre CEBPA, disponibles para 11 casos, revelaron no mutación.

25 En realidad, la diferencia entre las mutaciones en NPM1 y ASXL1 pueden preferir reflejar dos rutas diferentes de leucemogénesis que dos coincidencias ("hits") alternadas sobre la misma ruta. Las mutaciones en NPM1 no son comunes en AML secundarias a una enfermedad mielóide crónica. Por el contrario, 9 de las 17 AML secundarias (es decir, 53 %) mostraron mutación o delección en ASXL1 (frente a 3 de las 46 AML primarias, incluyendo un caso con displasia de linaje mezclado) y las alteraciones de ASXL1 se observaron prominentemente en AML secundarias a una enfermedad mielóide crónica (9 de 12, 75 %), mientras que no era el caso para las mutaciones en NPM1 (2 de 28).

30 Se validó esta hipótesis mediante el estudio de más casos, la detección de mutaciones en ASXL1 ayudarían a distinguir entre AML primarias y secundarias y, por consiguiente, ayudaría a orientar la prognosis, incluso en ausencia de fases crónicas conocidas.

Por el contrario, se encontraron que las mutaciones en TET2 en una serie de AML no están correlacionadas ni con la presencia o ausencia de mutaciones en NPM1 o FLT3 ni con un antecedente de enfermedad mielóide crónica.10 En otras series, se encontraron tres de cuatro mutaciones en TET2 en casos secundarios.

35 Aunque TET2 y ASXL1 pueden funcionar en rutas similares de la regulación epigenética, podría haber diferencias en su relación con NPM1 y en su ventana de acción durante el transcurso de la enfermedad.

En el caso de que tenga tanto alteración de ASXL1 como de FLT3, determinamos que la mutación en ASXL1, pero no la ITD de FLT3, estaba presente en la fase crónica, sugiriendo que las mutaciones en ASXL1 y FLT3 pueden cooperar en casos raros.

40 Finalmente, las mutaciones raras en RAS se dieron indiferentemente en casos primarios o secundarios; una se encontró en un caso de ASXL1 mutado, lo cual no fue inesperado, ya que previamente hemos mostrado que las mutaciones en RAS y ASXL1 se pueden dar en conjunto.2 Ahora será interesante determinar qué otras alteraciones pueden asociarse con o bien la ruta de NPM1 o ASXL1 de leucemogénesis.

5) La mutación por cambio de marco de lectura p.Gly646Trpfsx12 está fuertemente correlacionada con RAEB2

45 Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado y el estudio fue aprobado por nuestra junta de revisión institucional. Incluyen 65 casos de MDS. Según los criterios de la OMS, el grupo comprendía 5 casos de anemia refractaria (RA), 13 de anemia refractaria con sideroblastos en anillo (RARS, del inglés "Refractory Anemia with Ring Sideroblasts") (incluyendo uno con mielofibrosis), 7 de citopenia refractaria con displasia multilineaje (RCMD), 16 de anemia refractaria con exceso de blastos tipo 1 (RAEB1), 19 de anemia refractaria con exceso de blastos tipo 2 (RAEB2) y 5 de MDS no clasificado (MDS-U). Seis casos eran secundarios a enfermedades hematopoyéticas o no hematopoyéticas. La mayoría de las muestras de MDS se recogieron en el momento del diagnóstico; algunos estaban en abstención terapéutica de un MDS conocido y algunos estaban bajo tratamiento sintomático. Diecisiete casos eran IPPS de bajo riesgo (0), 23 eran int-1 (0,5 a 1), 12 eran int-2 (1,5 a 2) y 7 eran de alto riesgo (≥2,5).

50

La secuenciación de ADN de secuencias codificadoras de exón de *ASXL1*, *CBL*, *FLT3*, *IDH1*, *IDH2*, *JAK2*, *KRAS*, *NPM1*, *NRAS*, *RUNX1*, *TET2* y *WT1* se hicieron como sigue. Las amplificaciones por PCR de ADN de célula de médula ósea se hicieron en un volumen total de 25 µl de mezcla de PCR que contenía al menos 5 ng de ADN patrón, tampón Taq, 200 µmol de cada desoxinucleótido trifosfato, 20 pmol de cada cebador y 1 unidad de Hot Star Taq (Qiagen). Las condiciones de amplificación por PCR eran las siguientes: 95 °C 10 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s a 1 min dependiendo de la longitud del producto de PCR durante 35 ciclos; 72 °C 10 min. Los productos de PCR se purificaron usando la placa MILLIPORE MSNU030. Se usó un microlitro de los productos de PCR purificados para secuenciar usando el kit del Big Dye terminador v1.1 (APPLIED BIOSYSTEMS) que incluye el cebador directo o inverso. Después de purificación G50, se cargaron las secuencias sobre un ABI 3130XL automat (APPLIED BIOSYSTEMS). Los archivos de datos de secuencia se analizaron usando tanto los programas informáticos SEQSCAPE como PHRED/PHRAP/CONSED y todas las mutaciones se confirmaron sobre un producto de PCR independiente.

Las mutaciones por cambio de marco de lectura del exón 12 de *ASXL1* (11 veces el mismo p.Gly646Trpfsx12) se observaron en 12 de los 65 casos de MDS (18,5 %) que incluyen 1 de los 5 RA (20 %), 2 de los 16 RAEB1 (12,5 %) y 9 de los 19 RAEB2 (47,4 %).

Encontramos 12 casos con mutación en *TET2* (18,5 %) y 4 con mutación en *RUNX1* (6,2 %). Un paciente (HD-0311) tenía dos mutaciones en *TET2*. Las mutaciones en *TET2* eran frecuentes en RAEB1 (7/16, 43,8 %). Las mutaciones en *RUNX1* y *TET2* eran mutuamente exclusivas, pero ambas podían asociarse con las mutaciones en *ASXL1*: dos casos mostraron tanto una mutación en *ASXL1* como una en *TET2* y tres casos tanto una mutación en *ASXL1* como una en *RUNX1*. Se ha informado de un caso de delección en *ASXL1* (HD-0190) y un caso de delección en *TET2* (HD-0145). Un caso (HD-0232) tenía una rotura en *RUNX1* detectada por aCGH (no mostrado).

No encontramos ninguna mutación en *FLT3*, *NPM1* o *WT1*. Un MDS-U tenía una mutación en *JAK2* y un caso de RCMD una mutación en *KRAS*. Cinco casos, todos de RAEB2, estaban mutados en *CBL*. En uno de estos la mutación era homocigota. Se dio una sustitución en el caso con trisomía 11 (HD-0264), y mostró una proporción de 2/3 con el residuo de tipo natural, sugiriendo que el alelo mutado estaba duplicado.

Encontramos 5 mutaciones de IDH en los 65 casos (7,7 %), que incluían 2 mutaciones en *IDH1* y 3 en *IDH2*.

Basándose en las funciones conocidas de las proteínas, sobre un modelo y una clasificación anterior en donde las mutaciones estaban presentes (MDS y/o AML secundarias y/o AML primarias) y sobre cómo se combinan, provisionalmente agrupamos los genes en cuatro clases.

La primera clase (denominamos “iniciadores”) incluyen *RUNX1* y *TET2*. Pueden causar dominancia clónica de células madre hematopoyéticas.

ASXL1 y *NPM1* constituirían la clase II (“seleccionadores”). Las mutaciones en estos genes pueden seleccionar una ruta leucemogénica que conduce o bien a AML primaria o secundaria.

Los genes asociados con la proliferación (*CBL*, *FLT3*, *JAK2*, *RAS*) definen la clase III (“amplificadores”). La mutación en *JACK2* juega el papel principal en los MDS y las NK-AML.

Finalmente, por tres razones, agrupamos *IDH1*, *IDH2* y *WT1* en una clase IV putativa que provisionalmente denominamos “reforzadores”. Primera, las mutaciones en *IDH* y *WT1* eran exclusivas pero podían darse conjuntamente con mutaciones en genes de otras clases. Segunda, se daban principalmente en AML y eran raras en MDS (y también en neoplasias mieloproliferativas). Tercera, las mutaciones de estos genes podían estar asociadas con modificaciones de las rutas de detección de oxígeno y HIF1. Las mutaciones de clase IV están bastantes asociadas a la fase aguda.

En general, los casos de AML tenían cero, una o tres mutaciones. Debido a esto, y aunque ningún caso tenía cuatro mutaciones, proponemos que AML se desarrolla siguiendo, al menos, cuatro mutaciones cooperantes, una de cada clase. Esto es especulativo y la identificación de nuevos genes diana y el estudio de otros conducirá a una visión más precisa.

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> GELSI-BOYER, Véronique BIRNBAUM, Daniel	
	<120> ASXL1 como nuevo marcador de diagnóstico de neoplasias mieloides	
5	<130> IPS-B-0001 PCT	
	<150> us 61/303,971	
	<151> 2010-02-12	
10	<160> 33	
	<170> PatentIn version 3.5	
15	<210> 1	
	<211> 7056	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
20	<400> 1	
	cacacccacg gcagacacgc acgcacccgg gcgccgaagg gaaagccgcg tctcgccttc	60
	ccgccccgcc gtcggtcctg tctcagtccc tcagcagagc gggaaagcgg aggccggagc	120
	cgtgacctct gaccccgtgg ttatgcggag ccgccgcatt ccttagcgat cgcggggcag	180
	ccgccgctgc cgccgtgggc gactgacgca gcgcggggcg gtggagccgc cgccgccccct	240
	ccccaccgc cgtctcgcgc ccagccggtc cccgcgtgcc cgcccccttct ccccggccgc	300
	acccgagacc tcgcgcgccc ccgctgccac gcgcccccc caccgcccgc gccgccccag	360
	ccccgcgcca ccgccccagc ccgcccagcc cggaggctcc gcgtggagct gccgcccgcg	420
	ccggggagaa ggtgaagga caaacagaag aagaagaagg agcgcacgtg ggccgaggcc	480
	gcgcgcctgg tattagaaaa ctactcggat gctccaatga caccaaaaca gattctgcag	540
	gtcatagagg cagaaggact aaaggaaatg agaagtggga ctccccctct cgcagtcctc	600
	aatgctatgc tacattcaa ttcaagagga ggagaggggt tgttttataa actgcctggc	660
	cgaatcagcc tttcacgct caagaaggat gccctgcagt ggtctcgcca tccagctaca	720
	gtggagggag aggagccaga ggacacggct gatgtggaga gctgtgggtc taatgaagcc	780
	agcactgtga gtggtgaaaa cgatgtatct cttgatgaaa catcttcgaa cgcacctctg	840
	tctacagaat ctcagagtcg acctctttcc aatcccaggg acagctacag agcttcctca	900
	caggcgaaca aacaaaagaa aaagactggg gtgatgctgc ctcgagttgt cctgactcct	960
	ctgaaggtaa acggggccca cgtggaatct gcatcagggt tctcgggctg ccacgccgat	1020
	ggcgagagcg gcagcccgtc cagcagcagc agcggctctc tggccctggg cagcgtgct	1080
	attcgtggcc aggccgaggt caccaggac cctgccccgc tcctgagagg cttccggaag	1140
	ccagccacag gtcaaatgaa gcgcaacaga ggggaagaaa tagattttga gacacctggg	1200
	tccattcttg tcaacaccaa cctccgtgcc ctgatcaact ctcggacctt ccatgcctta	1260
	ccatcacact tccagcagca gtcctcttc ctctgctcg aagtagacag acaggtgggg	1320
	acggatggcc tgttgcgtct cagcagcagt gcactaaata acgagttttt taccatgcg	1380

ES 2 616 055 T3

gctcagagct ggcgggagcg cctggctgat ggtgaattta ctcagatgat gcaagtcagg 1440
atacgacagg aatgggagaa ggaaaagaag gtggaacaat ggaaagaaa gttctttgaa 1500
gactactatg gacagaagct gggtttgacc aaagaagagt cattgcagca gaacgtgggc 1560
caggaggagg ctgaaatcaa aagtggcttg tgtgtcccag gagaatcagt gcgtatacag 1620
cgtggtccag ccacccgaca gcgagatggg cattttaaga aacgctctcg gccagatctc 1680
cgaaccagag ccagaaggaa tctgtacaaa aaacaggagt cagaacaagc aggggttgct 1740
aaggatgcaa aatctgtggc ctcagatggt cccctctaca aggatgggga ggctaagact 1800
gaccagcag ggctgagcag tccccatctg ccaggcacat cctctgcagc acccgacctg 1860
gagggtcccg aattcccagt tgagtctgtg gcttctcggg tccaggctga gccagacaac 1920
ttggcacgtg cctctgcatc tccagacaga attcctagcc tgccctcagga aactgtggat 1980
caggaaccca aggatcagaa gaggaaatcc tttgagcagg cggcctctgc atcctttccc 2040
gaaaagaagc cccggcttga agatcgtcag tcctttcgta acacaattga aagtgttcac 2100
accgaaaagc cacagcccac taaagaggag cccaagctc cgcccatccg gattcaactt 2160
tcacgtatca aaccaccctg ggtggttaa ggtcagccca cttaccagat atgccccgg 2220
atcatcccca ccacggagtc ctctgcccg ggttgactg gcgccaggac cctcgcagac 2280
attaaagccc gtgctctgca ggtccgaggg gcgagaggtc accactgcca tagagaggcg 2340
gccaccactg ccatcggagg ggggggtggc ccgggtggag gtggcggcg ggccaccgat 2400
gaggagggtg gcagaggcag cagcagtggt gatgggtggg aggcctgtgg ccaccctgag 2460
cccaggggag gcccgagcac ccctggaag tgtacgtcag atctacagcg aacacaacta 2520
ctgccgctt atcctctaaa tggggagcat acccaggccg gaactgccat gtccagagct 2580
aggagagagg acctgccttc tctgagaaag gaggaaagct gcctactaca gagggttaca 2640
gttggactca cagatgggct aggagatgcc tcccaactcc ccgttgctcc cactggggac 2700
cagccatgcc aggccttgcc cctactgtcc tcccaactc cagtagctga gagattagtg 2760
gagcagcctc agttgcatcc ggatgttaga actgaatgtg agtctggcac cacttcttg 2820
gaaagtgatg atgaggagca aggaccacc gttcctgcag acaatggctc cattccgtct 2880
ctagtgggag atgatacatt agagaaagga actggccaag ctcttgacag tcatcccact 2940
atgaaggatc ctgtaaagt gacccccagt tccacacctg aatcctcacc gactgattgc 3000
ctgcagaaca gagcatttga tgacgaatta gggcttggg gctcatgccc tcctatgagg 3060
gaaagtgata ctagacaaga aaacttgaaa accaaggctc tcgtttctaa cagttctttg 3120
cattggatac ccacccatc gaatgatgag gtagtgaac agcccaaacc agaatccaga 3180
gaacacatac catctgttga gcccaggtt ggagaggagt gggagaaagc tgctcccacc 3240
cctcctgcat tgccctggga tttgacagct gaggagggtc tagatcctct tgacagcctt 3300
acttactct ggactgtgcc atctcgagga ggcagtgaca gcaatggcag ttactgtcaa 3360
caggtggaca ttgaaaagct gaaaatcaac ggagactctg aagcactgag tcctcacggt 3420

ES 2 616 055 T3

gagtccacgg atacagcctc tgactttgaa ggtcacctca cggaggacag cagtgaggct 3480
gacactagag aagctgcagt gacaaagga tcttcggtgg acaaggatga gaaaccaat 3540
tggaaaccaat ctgccccact gtccaagggtg aatggtgaca tgcgtctggt tacaaggaca 3600
gatgggatgg ttgctcctca gagctgggtg tctcgagtat gtgcggtccg ccaaagatc 3660
ccagattccc tactgctggc cagtactgag taccagccaa gagccgtgtg cctgtccatg 3720
cctgggtcct cagtggaggc cactaaccca cttgtgatgc agttgctgca gggtagcttg 3780
cccctagaga aggttcttcc accagcccac gatgacagca tgtcagaatc cccacaagta 3840
ccacttacia aagaccagag ccatggctcg ctacgcatgg gatctttaca tggctctgga 3900
aaaaacagtg gcatggttga tggaaagcag cccagttctt taagggcttt gaaggagcct 3960
cttctgccag atagctgtga aacaggcact ggtcttgcca ggattgaggc caccaggtc 4020
cctggagcac cccaaaagaa ttgcaaggca gtccaagtt ttgactccct ccatccagtg 4080
acaaatccca ttacatcctc taggaaactg gaagaaatgg attccaaaga gcagtctctt 4140
tcctttagtt gtgaagatca gaaggaagtc cgtgctatgt cacaggacag taattcaaat 4200
gctgctccag gaaagagccc aggagatctt actacctga gaacacctcg tttctcatct 4260
ccaaatgtga tctcctttgg tccagagcag acaggtcggg ccctgggtga tcagagcaat 4320
gttacaggcc aaggaagaa gctttttggc tctgggaatg tggctgcaac ccttcagcgc 4380
cccaggcctg cggacccgat gcctcttctt gctgagatcc ctccagtttt tcccagtggtg 4440
aagttgggac caagcaciaa ctccatgtct ggtgggttac agactccaag ggaagactgg 4500
gctccaaagc cacatgcctt tgttggcagc gtcaagaatg agaagacttt tgtggggggt 4560
cctcttaagg caaatgccga gaacaggaaa gctactgggc atagtcccct ggaactggtg 4620
ggtcacttgg aagggatgcc ctttgtcatg gacttgcctt tctggaaatt accccgagag 4680
ccaggaagg ggctcagtga gcctctggag cttcttctc tcccctcca actcagcatc 4740
aagcaggcat tttatgggaa gctttctaaa ctccaactga gttccaccag ctttaattat 4800
tcctctagct ctcccacctt tcccaaaggc cttgctggaa gtgtggtgca gctgagccac 4860
aaagcaact ttggtgcgag ccacagtgca tcactttcct tgcaaatgtt cactgacagc 4920
agcacggtgg aaagcatctc gctccagtgt gcgtgcagcc tgaaagccat gatcatgtgc 4980
caaggctgcg gtgcgttctg tcacgatgac tgtattggac cctcaaagct ctgtgtattg 5040
tgccttgggtg tgagataata aattatggcc atgggaaaca ttgtatattt agtgtgtgta 5100
ttttgataat gattgatctt aaatctgtat acagaatatac attgatataa tactctttag 5160
gcaggagcac tcttgcttc cccaaaatt tacactgcta aagccctctg tcacttggcg 5220
acccttctgg tcttgcctga ggggttctt gggataacc cattgggctg cccaaggcca 5280
gccagcctga gctctcctgc aagacagagc ctgatgtggc acggagtggg gttgcggggg 5340
gtggggggac tgcctgactc ccagagggac ttgaaactga agcaagaagg ttgcattctc 5400
caccaagggg gttaacctac ctgaactaag tagaaatgcc agtcttccac taccctctcc 5460

ES 2 616 055 T3

ctgccatctt ttcttctgct actttgggga gttgatggcc aggaaagaag ccagcacagg 5520
 gttaaagtaa ctcttgccat tgcccaccag ggggctggtg cacctgctga cctcagggtc 5580
 acagttgagt catttgccag ttgacggagc aagtttgacc ttggttctgt tgctgaagca 5640
 aatttggaac ttttctgtct cagtgtgatc cactaacca caggatcatt tggaaccttg 5700
 aatagctctg cttggacaat ggggttgggg aatagggttg tctttcctat gaaaatgcc 5760
 tctgtagacc ttgtgagtc gccgtccaga tgtttgagg tgaattcctc tgcttgacat 5820
 cctccctgtc actttggacc ctatgggagt gggcatctcc acgcacctgt gtatgtgaaa 5880
 gtcattttac atttcaaagc agtgtgtgtt tcttattttt atatttttaa ctctttattc 5940
 ttggatgtat aaagtgaact ttttggcttc tgtaagtatg ctctatgcac ctctaagt 6000
 ttatcatgta tttatatggt gtacacagta ctggctgatt ctgtaaagg atgtattgta 6060
 cagagaacat gaacgtctct tcctaatttt acatcttcag catcattgca ttaaagtgg 6120
 gtaatctct tctctacatc tgttgtcaga gccactgagt gctgtgctgc tcgacgtgag 6180
 ggtgaaatga ttgacttggt acctgccagg ttgcccgatg cctgttggg tcaccggctg 6240
 gacctgctgc agcctgcaga gccacagtca gcctgcccac atgccaccga gcaaacgcat 6300
 cttgcttttc acatctctcc tcctacagcc ttaatggctg cttgctgcca tatgtgacaa 6360
 atcaccacca ccagtgttaa gtgcttctgg attcatgggt gaggttcctg ggcagcccc 6420
 aggaaggcct tccagatctg gctccagggt caccacctgt cacagcaata cctgggacca 6480
 tgctctcctg ggactgtgag gctccttttg acgtactttt gacatcaggc aggtttggga 6540
 agaaacaaag ccatgcctgc tcctgcctct ctcccaacat gtttccagca agtagatgcc 6600
 cctgtgtgtg ttttcccttg ccttgtttcc tgccttatat cttgtatttc gacttattac 6660
 agagttgagg gttcttgctt aatttagatc aagtataaaa ttgtatgac ttcaagtctc 6720
 attttatctg aaaggttttt ttctcattta atctgatgtg gcattttcgt catctgaagc 6780
 atgagtgaca agttgggaat gatgtggtga tttagaatgc agtattggcc aagtccaagt 6840
 tgtcaactta agcgtctggt taccaaagac cgggaacagg ggcccaaaca tgtccagtcc 6900
 tcttcttccc tctgctggaa ctttgggga cactcaaggg tacagtttga cactgatctg 6960
 gtccatgagg ctgccagag aaagcactgc ttctgtatgt ctcttggtt attggaacaa 7020
 taaccctgta caacctgcaa aaaaaaaaa aaaaaa 7056

<210> 2
 <211> 1541
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Lys Asp Lys Gln Lys Lys Lys Lys Glu Arg Thr Trp Ala Glu Ala
 1 5 10 15

Ala Arg Leu Val Leu Glu Asn Tyr Ser Asp Ala Pro Met Thr Pro Lys
 20 25 30

5

10

ES 2 616 055 T3

Gln Ile Leu Gln Val Ile Glu Ala Glu Gly Leu Lys Glu Met Arg Ser
 35 40 45

Gly Thr Ser Pro Leu Ala Cys Leu Asn Ala Met Leu His Ser Asn Ser
 50 55 60

Arg Gly Gly Glu Gly Leu Phe Tyr Lys Leu Pro Gly Arg Ile Ser Leu
 65 70 75 80

Phe Thr Leu Lys Lys Asp Ala Leu Gln Trp Ser Arg His Pro Ala Thr
 85 90 95

Val Glu Gly Glu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Asp Val Glu Ser Cys Gly
 100 105 110

Ser Asn Glu Ala Ser Thr Val Ser Gly Glu Asn Asp Val Ser Leu Asp
 115 120 125

Glu Thr Ser Ser Asn Ala Ser Cys Ser Thr Glu Ser Gln Ser Arg Pro
 130 135 140

Leu Ser Asn Pro Arg Asp Ser Tyr Arg Ala Ser Ser Gln Ala Asn Lys
 145 150 155 160

Gln Lys Lys Lys Thr Gly Val Met Leu Pro Arg Val Val Leu Thr Pro
 165 170 175

Leu Lys Val Asn Gly Ala His Val Glu Ser Ala Ser Gly Phe Ser Gly
 180 185 190

Cys His Ala Asp Gly Glu Ser Gly Ser Pro Ser Ser Ser Ser Ser Gly
 195 200 205

Ser Leu Ala Leu Gly Ser Ala Ala Ile Arg Gly Gln Ala Glu Val Thr
 210 215 220

Gln Asp Pro Ala Pro Leu Leu Arg Gly Phe Arg Lys Pro Ala Thr Gly
 225 230 235 240

Gln Met Lys Arg Asn Arg Gly Glu Glu Ile Asp Phe Glu Thr Pro Gly
 245 250 255

Ser Ile Leu Val Asn Thr Asn Leu Arg Ala Leu Ile Asn Ser Arg Thr
 260 265 270

Phe His Ala Leu Pro Ser His Phe Gln Gln Gln Leu Leu Phe Leu Leu
 275 280 285

Pro Glu Val Asp Arg Gln Val Gly Thr Asp Gly Leu Leu Arg Leu Ser
 290 295 300

ES 2 616 055 T3

Ser Ser Ala Leu Asn Asn Glu Phe Phe Thr His Ala Ala Gln Ser Trp
 305 310 315 320
 Arg Glu Arg Leu Ala Asp Gly Glu Phe Thr His Glu Met Gln Val Arg
 325 330 335
 Ile Arg Gln Glu Met Glu Lys Glu Lys Lys Val Glu Gln Trp Lys Glu
 340 345 350
 Lys Phe Phe Glu Asp Tyr Tyr Gly Gln Lys Leu Gly Leu Thr Lys Glu
 355 360 365
 Glu Ser Leu Gln Gln Asn Val Gly Gln Glu Glu Ala Glu Ile Lys Ser
 370 375 380
 Gly Leu Cys Val Pro Gly Glu Ser Val Arg Ile Gln Arg Gly Pro Ala
 385 390 395
 Thr Arg Gln Arg Asp Gly His Phe Lys Lys Arg Ser Arg Pro Asp Leu
 405 410 415
 Arg Thr Arg Ala Arg Arg Asn Leu Tyr Lys Lys Gln Glu Ser Glu Gln
 420 425 430
 Ala Gly Val Ala Lys Asp Ala Lys Ser Val Ala Ser Asp Val Pro Leu
 435 440 445
 Tyr Lys Asp Gly Glu Ala Lys Thr Asp Pro Ala Gly Leu Ser Ser Pro
 450 455 460
 His Leu Pro Gly Thr Ser Ser Ala Ala Pro Asp Leu Glu Gly Pro Glu
 465 470 475 480
 Phe Pro Val Glu Ser Val Ala Ser Arg Ile Gln Ala Glu Pro Asp Asn
 485 490 495
 Leu Ala Arg Ala Ser Ala Ser Pro Asp Arg Ile Pro Ser Leu Pro Gln
 500 505 510
 Glu Thr Val Asp Gln Glu Pro Lys Asp Gln Lys Arg Lys Ser Phe Glu
 515 520 525
 Gln Ala Ala Ser Ala Ser Phe Pro Glu Lys Lys Pro Arg Leu Glu Asp
 530 535 540
 Arg Gln Ser Phe Arg Asn Thr Ile Glu Ser Val His Thr Glu Lys Pro
 545 550 555 560
 Gln Pro Thr Lys Glu Glu Pro Lys Val Pro Pro Ile Arg Ile Gln Leu
 565 570 575

ES 2 616 055 T3

Ser Arg Ile Lys Pro Pro Trp Val Val Lys Gly Gln Pro Thr Tyr Gln
580 585 590

Ile Cys Pro Arg Ile Ile Pro Thr Thr Glu Ser Ser Cys Arg Gly Trp
595 600 605

Thr Gly Ala Arg Thr Leu Ala Asp Ile Lys Ala Arg Ala Leu Gln Val
610 615 620

Arg Gly Ala Arg Gly His His Cys His Arg Glu Ala Ala Thr Thr Ala
625 630 635 640

Ile Gly Gly Gly Gly Gly Pro Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Thr Asp
645 650 655

Glu Gly Gly Gly Arg Gly Ser Ser Ser Gly Asp Gly Gly Glu Ala Cys
660 665 670

Gly His Pro Glu Pro Arg Gly Gly Pro Ser Thr Pro Gly Lys Cys Thr
675 680 685

Ser Asp Leu Gln Arg Thr Gln Leu Leu Pro Pro Tyr Pro Leu Asn Gly
690 695 700

Glu His Thr Gln Ala Gly Thr Ala Met Ser Arg Ala Arg Arg Glu Asp
705 710 715 720

Leu Pro Ser Leu Arg Lys Glu Glu Ser Cys Leu Leu Gln Arg Ala Thr
725 730 735

Val Gly Leu Thr Asp Gly Leu Gly Asp Ala Ser Gln Leu Pro Val Ala
740 745 750

Pro Thr Gly Asp Gln Pro Cys Gln Ala Leu Pro Leu Leu Ser Ser Gln
755 760 765

Thr Ser Val Ala Glu Arg Leu Val Glu Gln Pro Gln Leu His Pro Asp
770 775 780

Val Arg Thr Glu Cys Glu Ser Gly Thr Thr Ser Trp Glu Ser Asp Asp
785 790 795 800

Glu Glu Gln Gly Pro Thr Val Pro Ala Asp Asn Gly Pro Ile Pro Ser
805 810 815

Leu Val Gly Asp Asp Thr Leu Glu Lys Gly Thr Gly Gln Ala Leu Asp
820 825 830

Ser His Pro Thr Met Lys Asp Pro Val Asn Val Thr Pro Ser Ser Thr
835 840 845

ES 2 616 055 T3

Pro Glu Ser Ser Pro Thr Asp Cys Leu Gln Asn Arg Ala Phe Asp Asp
 850 855 860

Glu Leu Gly Leu Gly Gly Ser Cys Pro Pro Met Arg Glu Ser Asp Thr
 865 870 880

Arg Gln Glu Asn Leu Lys Thr Lys Ala Leu Val Ser Asn Ser Ser Leu
 885 890 895

His Trp Ile Pro Ile Pro Ser Asn Asp Glu Val Val Lys Gln Pro Lys
 900 905 910

Pro Glu Ser Arg Glu His Ile Pro Ser Val Glu Pro Gln Val Gly Glu
 915 920 925

Glu Trp Glu Lys Ala Ala Pro Thr Pro Pro Ala Leu Pro Gly Asp Leu
 930 935 940

Thr Ala Glu Glu Gly Leu Asp Pro Leu Asp Ser Leu Thr Ser Leu Trp
 945 950 955 960

Thr Val Pro Ser Arg Gly Gly Ser Asp Ser Asn Gly Ser Tyr Cys Gln
 965 970 975

Gln Val Asp Ile Glu Lys Leu Lys Ile Asn Gly Asp Ser Glu Ala Leu
 980 985 990

Ser Pro His Gly Glu Ser Thr Asp Thr Ala Ser Asp Phe Glu Gly His
 995 1000 1005

Leu Thr Glu Asp Ser Ser Glu Ala Asp Thr Arg Glu Ala Ala Val
 1010 1015 1020

Thr Lys Gly Ser Ser Val Asp Lys Asp Glu Lys Pro Asn Trp Asn
 1025 1030 1035

Gln Ser Ala Pro Leu Ser Lys Val Asn Gly Asp Met Arg Leu Val
 1040 1045 1050

Thr Arg Thr Asp Gly Met Val Ala Pro Gln Ser Trp Val Ser Arg
 1055 1060 1065

Val Cys Ala Val Arg Gln Lys Ile Pro Asp Ser Leu Leu Leu Ala
 1070 1075 1080

Ser Thr Glu Tyr Gln Pro Arg Ala Val Cys Leu Ser Met Pro Gly
 1085 1090 1095

Ser Ser Val Glu Ala Thr Asn Pro Leu Val Met Gln Leu Leu Gln
 1100 1105 1110

ES 2 616 055 T3

Gly Ser Leu Pro Leu Glu Lys Val Leu Pro Pro Ala His Asp Asp
 1115 1120 1125
 Ser Met Ser Glu Ser Pro Gln Val Pro Leu Thr Lys Asp Gln Ser
 1130 1135 1140
 His Gly Ser Leu Arg Met Gly Ser Leu His Gly Leu Gly Lys Asn
 1145 1150 1155
 Ser Gly Met Val Asp Gly Ser Ser Pro Ser Ser Leu Arg Ala Leu
 1160 1165 1170
 Lys Glu Pro Leu Leu Pro Asp Ser Cys Glu Thr Gly Thr Gly Leu
 1175 1180 1185
 Ala Arg Ile Glu Ala Thr Gln Ala Pro Gly Ala Pro Gln Lys Asn
 1190 1195 1200
 Cys Lys Ala Val Pro Ser Phe Asp Ser Leu His Pro Val Thr Asn
 1205 1210 1215
 Pro Ile Thr Ser Ser Arg Lys Leu Glu Glu Met Asp Ser Lys Glu
 1220 1225 1230
 Gln Phe Ser Ser Phe Ser Cys Glu Asp Gln Lys Glu Val Arg Ala
 1235 1240 1245
 Met Ser Gln Asp Ser Asn Ser Asn Ala Ala Pro Gly Lys Ser Pro
 1250 1255 1260
 Gly Asp Leu Thr Thr Ser Arg Thr Pro Arg Phe Ser Ser Pro Asn
 1265 1270 1275
 Val Ile Ser Phe Gly Pro Glu Gln Thr Gly Arg Ala Leu Gly Asp
 1280 1285 1290
 Gln Ser Asn Val Thr Gly Gln Gly Lys Lys Leu Phe Gly Ser Gly
 1295 1300 1305
 Asn Val Ala Ala Thr Leu Gln Arg Pro Arg Pro Ala Asp Pro Met
 1310 1315 1320
 Pro Leu Pro Ala Glu Ile Pro Pro Val Phe Pro Ser Gly Lys Leu
 1325 1330 1335
 Gly Pro Ser Thr Asn Ser Met Ser Gly Gly Val Gln Thr Pro Arg
 1340 1345 1350
 Glu Asp Trp Ala Pro Lys Pro His Ala Phe Val Gly Ser Val Lys
 1355 1360 1365

ES 2 616 055 T3

Asn Glu Lys Thr Phe Val Gly Gly Pro Leu Lys Ala Asn Ala Glu
 1370 1375 1380
 Asn Arg Lys Ala Thr Gly His Ser Pro Leu Glu Leu Val Gly His
 1385 1390 1395
 Leu Glu Gly Met Pro Phe Val Met Asp Leu Pro Phe Trp Lys Leu
 1400 1405 1410
 Pro Arg Glu Pro Gly Lys Gly Leu Ser Glu Pro Leu Glu Pro Ser
 1415 1420 1425
 Ser Leu Pro Ser Gln Leu Ser Ile Lys Gln Ala Phe Tyr Gly Lys
 1430 1435 1440
 Leu Ser Lys Leu Gln Leu Ser Ser Thr Ser Phe Asn Tyr Ser Ser
 1445 1450 1455
 Ser Ser Pro Thr Phe Pro Lys Gly Leu Ala Gly Ser Val Val Gln
 1460 1465 1470
 Leu Ser His Lys Ala Asn Phe Gly Ala Ser His Ser Ala Ser Leu
 1475 1480 1485
 Ser Leu Gln Met Phe Thr Asp Ser Ser Thr Val Glu Ser Ile Ser
 1490 1495 1500
 Leu Gln Cys Ala Cys Ser Leu Lys Ala Met Ile Met Cys Gln Gly
 1505 1510 1515
 Cys Gly Ala Phe Cys His Asp Asp Cys Ile Gly Pro Ser Lys Leu
 1520 1525 1530
 Cys Val Leu Cys Leu Val Val Arg
 1535 1540

<210> 3
 <211> 36
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 Cys Ala Cys Ser Leu Lys Ala Met Ile Met Cys Gln Gly Cys Gly Ala
 1 5 10 15

Phe Cys His Asp Asp Cys Ile Gly Pro Ser Lys Leu Cys Val Leu Cys
 20 25 30

Leu Val Val Arg
 35

10 <210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Cebador ASXL1 ex1 F

20 <400> 4
 tgacctctga ccccggtgtt at 22

<210> 5
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador ASXL1 Ex1 R
 <400> 5
 10 ggctgtcccg ttcttaaagg aagat 25
 <210> 6
 <211> 24
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador ASXL1 Ex2 F
 20 <400> 6
 tcaccagcgg tacctcatag cata 24
 <210> 7
 <211> 24
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador ASXL1 Ex2 R
 30 <400> 7
 ttcactacc agacacagaa gcac 24
 <210> 8
 <211> 25
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Cebador ASXL1 Ex3 F
 <400> 8
 gaatgagttg gagggattag gtctt 25
 45 <210> 9
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Cebador ASXL1 Ex3 R
 <400> 9
 55 ttcatggccc ctattccaga ccta 24
 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador ASXL1 Ex4-5 F
 <400> 10
 65 cacctgagtt gtaccttgct 20

<210> 11
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador ASXL1 Ex4-5 R
 <400> 11
 10 gggatctgc cttatacctg tcat 24
 <210> 12
 <211> 24
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador ASXL1 Ex6 F
 20 <400> 12
 ctgcagtga ctgggctct cttt 24
 <210> 13
 <211> 21
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador ASXL1 Ex6 R
 30 <400> 13
 tcatccattg gcaggctct t 21
 <210> 14
 <211> 24
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Cebador ASXL1 Ex7 F
 <400> 14
 gctggagaa atgagctgt ctga 24
 45 <210> 15
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Cebador ASXL1 Ex7 R
 <400> 15
 55 aatagagggc cacccaagaa gt 22
 <210> 16
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador ASXL1 Ex8-9 F
 <400> 16
 65 gtgctgtca ccaaagttt ccca 24

<210> 17
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador ASXL1 Ex8-9 R
 <400> 17
 10 aacccttga gaagagcgag cttg 24
 <210> 18
 <211> 22
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador ASXL1 Ex10 F
 20 <400> 18
 actgggagat tcagctgtcc at 22
 <210> 19
 <211> 23
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador ASXL1 Ex10 R
 30 <400> 19
 tatcccctca aaacccaga cca 23
 <210> 20
 <211> 24
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Cebador ASXL1 Ex11 F
 <400> 20
 ggctgaaac tgatggctgt gatt 24
 45 <210> 21
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Cebador ASXL1 Ex11 R
 <400> 21
 55 tgacctcaa agaaaacctg gctc 24
 <210> 22
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador ASXL1 EX12-1 F
 <400> 22
 65 aggtcagatc acccagtcag tt 22

<210> 23
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador ASXL1 EX12-1 R
 <400> 23
 10 tagcccatct gtgagtcca ctgt 24
 <210> 24
 <211> 24
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador ASXL1 EX12-2 F
 20 <400> 24
 agaggacctg ccttctctga gaaa 24
 <210> 25
 <211> 24
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador ASXL1 Ex12-2 R
 30 <400> 25
 ttcgatggga tgggtatcca atgc 24
 <210> 26
 <211> 22
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Cebador ASXL1 EX12-3 F
 <400> 26
 actgaaaac caaggctctc gt 22
 45 <210> 27
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Cebador ASXL1 EX12-3 R
 <400> 27
 55 gcaacctcc catctgtct tgta 24
 <210> 28
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador ASXL1 EX12-4 F
 <400> 28
 65 ggtggacaag gatgagaaac ccaa 24

<210> 29
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador ASXL1 EX12-4 R
 <400> 29
 10 tgtcctgtga catagcacgg actt 24
 <210> 30
 <211> 25
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador ASXL1 EX12-5 F
 20 <400> 30
 tggattcaa agagcagttc tcttc 25
 <210> 31
 <211> 24
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador ASXL1 EX12-5 R
 30 <400> 31
 catgacaaag ggcacccctt ccaa 24
 <210> 32
 <211> 24
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Cebador ASXL1 Ex12-6 F
 <400> 32
 acagaaaagc tactgggcat agtc 24
 45 <210> 33
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Cebador ASXL1 EX12-6 R
 <400> 33
 55 caagagtgtc cctgcctaaa gagt 24

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la prognosis de la progresión de una policitemia vera (PV) a una mielofibrosis post-policitemia vera (post-PV MF, del inglés "Post-Polycythemia Vera Myelofibrosis") en un sujeto, comprendiendo dicho método la etapa de analizar una muestra biológica de dicho sujeto que padece de una PV determinando la presencia o la ausencia de una mutación en el gen *ASXL1* ("additional sex combs like 1") que codifica el polipéptido que tiene la secuencia SEQ ID N°2, en donde la presencia de una mutación en *ASXL1* es indicativo de un riesgo de una progresión de dicha PV a Post-PV MF.
- 10 2. Un método para la prognosis de la progresión de una trombocitemia esencial (ET, del inglés "Thrombocythemia Essential") a una mielofibrosis post-trombocitemia esencial (post-ET MF, del inglés "Post-Essential Thrombocythemia Myelofibrosis") en un sujeto, comprendiendo dicho método la etapa de analizar una muestra biológica de dicho sujeto que padece de una ET determinando la presencia o la ausencia de una mutación en el gen *ASXL1* ("additional sex combs like 1") que codifica el polipéptido que tiene la secuencia SEQ ID N°2, en donde la presencia de una mutación de *ASXL1* es indicativo de un riesgo de una progresión de dicha ET a Post-ET MF.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde dicho sujeto es un ser humano.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha muestra biológica es una muestra de médula ósea.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha mutación se selecciona entre inserciones, deleciones y mutaciones puntuales que corresponden a mutaciones de aminoácido y mutaciones terminadoras.
- 20 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha mutación da como resultado la expresión de una proteína *ASXL1* mutada, dicha proteína *ASXL1* mutada no comprende ningún dominio PHD (SEQ ID N°3) o un fragmento del mismo.
- 25 7. El método según la reivindicación 6, en donde dicha mutación es una mutación terminadora que conduce a la introducción de un codón de parada (X) en el marco de lectura abierto de la proteína *ASXL1* y preferiblemente se selecciona en el grupo que comprende Tyr591X, Gln592X, Lys618X, Arg693X, Gln759X, Gln768X, Leu775X y Arg1068X.
- 30 8. El método según la reivindicación 6, en donde dicha proteína mutada puede resultar de un cambio de marco de lectura (FS, del inglés "Frame Shift") debido a una inserción o una deleción en el gen *ASXL1* y dicha mutación preferiblemente se selecciona en el grupo que comprende Gly64Trp FS, Arg596Pro FS, Ala611Arg FS, His630Pro FS, Gly646Trp FS, Leu762Phe FS, Trp796Gly FS, Thr822Asn FS, Thr836Leu FS, Ser846Gln FS, Asp879Glu FS, Lys888Glu FS, Leu1213Ile FS, Pro1263Gln FS, Leu1266His FS, Trp1271Lys FS o Ser1457Pro FS.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la etapa de determinación se lleva a cabo sobre ADN genómico o sobre ARNm/ADNc de *ASXL1*.
- 35 10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la etapa de determinación se lleva a cabo sobre la proteína *ASXL1*.

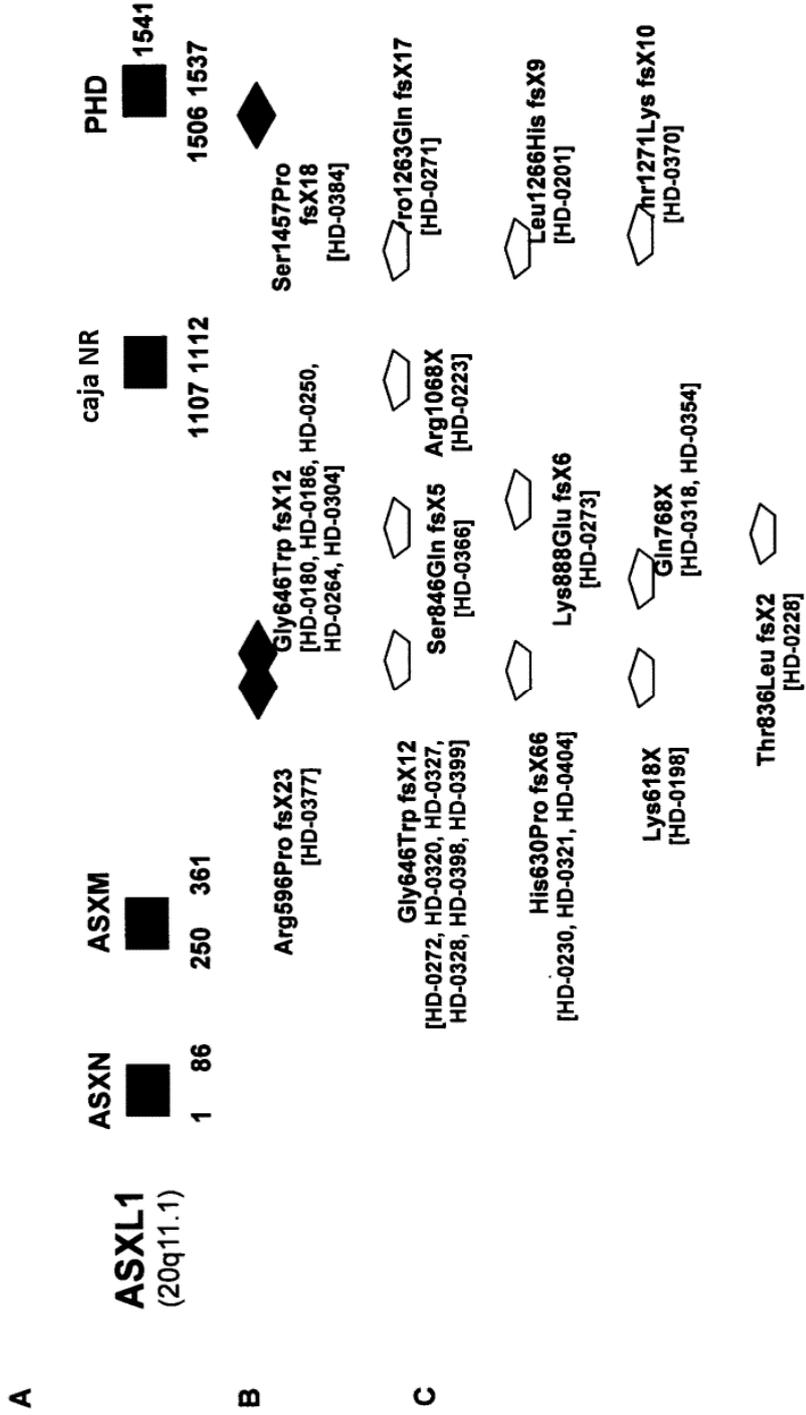


Figura 1

Tabla I

amplificón ASXL1	Directo	Inverso	Producto PCR (pb)
exón 1	TGACCTCTGACCCCGTGGTTAT (SEQ ID N°4)	GGCTGTCCCGTCTTAAAGGAAGAT (SEQ ID N°5)	509
exón 2	TCACCAGCGGTACCCTCATAGCATA (SEQ ID N°6)	TCTCACTACCAGACACAGAAAGCAC (SEQ ID N°7)	306
exón 3	GAATGAGTTGGAGGGATTAGGTCTT (SEQ ID N°8)	TTCATGGCCCCCTATTCCAGACCTA (SEQ ID N°9)	279
exones 4 - 5	CACCTGAGTTGTACCTTGCT (SEQ ID N°10)	GGGATCTTGCCCTATACCTGTGCAT (SEQ ID N°11)	383
exón 6	CTGCAGTTGACTGGGCTCTCTT (SEQ ID N°12)	TCATCCATTGGCAGGGCTCTT (SEQ ID N°13)	276
exón 7	GCTGGGAGAAATGAGCTTGCTGA (SEQ ID N°14)	AATAGAGGGCCACCACCAAGAAAGT (SEQ ID N°15)	356
exones 8 - 9	GGTGTGTCACCAAAGTTTTCCCA (SEQ ID N°16)	AACCCCTTGAGAAGAGCGGAGCTTG (SEQ ID N°17)	548
exón 10	ACTGGGAGATTCAGCTGTCCAT (SEQ ID N°18)	TATCCCTCAAAAACCCCGAGACCA (SEQ ID N°19)	232
exón 11	GGCCTGAAACTGATGGCTGTGATT (SEQ ID N°20)	TGACCCCTCAAAGAAAACCTGGCTC (SEQ ID N°21)	724
exón 12-1	AGGTCAGATCACCCAGTCAGT (SEQ ID N°22)	TAGCCCATCTGTGAGTCCAACCTGT (SEQ ID N°23)	561
exón 12-2	AGAGGACCTGCCCTTCTCTGAGAAA (SEQ ID N°24)	TTCGATGGGATGGGTATCCAATGC (SEQ ID N°25)	558
exón 12-3	ACTTGAAAACCAAGGCTCTCGT (SEQ ID N°26)	GCAACCATCCCATCTGTCTTGTA (SEQ ID N°27)	532
exón 12-4	GGTGGACAAGGATGAGAAACCCAA (SEQ ID N°28)	TGTCCTGTGACATAGCACGGACTT (SEQ ID N°29)	674
exón 12-5	TGGATTTCCAAAGAGCAGTCTCTTC (SEQ ID N°30)	CATGACAAAAGGGCATCCCTCCAA (SEQ ID N°31)	533
exón 12-6	ACAGGAAAGCTACTGGGCATAGTC (SEQ ID N°32)	CAAGAGTGCTCCTGCCTAAAGAGT (SEQ ID N°33)	593

Tabla II. características moleculares de los 40 casos de MDS estudiados

Muestra	Diagnóstico	aCGH	HRAS	KRAS	NRAS	RUNX1	NFIA	CTNBN1	TET2	ASXL1
HD-0288	RA	no CNA	nd	no	no	no	no	no	no	no
HD-0378	RA	20q11-q13 pérdida	nd	nd	nd	nd	nd	nd	no	no
HD-0384	RA	5q14-q34 pérdida	nd	nd	nd	nd	nd	nd	no	c.4369delT; p.Ser1457ProfsX18
HD-0145	RARS	4q24 pérdida (CXXC4, TET2)	no	no	no	no	no	no	no	no
HD-0165	RARS	no CNA	no	no	no	no	no	no	no	no
HD-0173	RARS	no CNA	no	no	p.Asn146Lys fsX159	no	no	no	no	no
HD-0234	RARS + IMF	2p12 pérdida (TET3)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	no	no
HD-0246	RARS	Y pérdida	no	no	no	no	no	no	no	no
HD-0260	RARS	no CNA	nd	nd	nd	nd	nd	nd	no	no
HD-0262	RARS	no CNA	no	no	no	no	no	no	c.4570C>T; p.Gln1524X	no
HD-0292	RARS	no CNA	nd	nd	nd	nd	nd	nd	no	no
HD-0302	RARS	no CNA	nd	no	no	no	no	no	no	no
HD-0172	RCMD	no CNA	no	no	no	no	no	no	no	no
HD-0235	RCMD-RS	no CNA	no	no	no	no	no	no	no	no
HD-0371	RCMD-RS	no CNA	nd	nd	nd	nd	nd	nd	no	no

HD-0167	RAEB 1	pérdida 5q14-q34, 6p22-p24, 17p13 (DVL2); 6q26 ganancia (MAP3K4)	no										
HD-0190	RAEB 1	pérdida 2p23 (ASXL2, DNMT3A), 2q24 (BAZ2B), 7p14, 7q21-qter, 12p11- p13, 12q12- q13, 13, 16p12, 16q, 18, 20q11 (ASXL1, DNMT3B), 20q11- qter, 21q21	no	nd	no	no							

HD-0205	RAEB 1	pérdida : 4q24-q31, 4q32, 4q34, 5q21-qter, 7p11-p14, 7q11-q21, 7q21-qter, 12p11- p13, 21q21, Xp11 (UTX); tri 8, 11q22- qter ganancia 19q13- qter ganancia	no	no	no								
HD-0233	RAEB 1	no CNA	no	c.4317dupA; p.Arg1440ThrfsX38	no	no							
HD-0264	RAEB 1	NA	no		c.1934dupG; p.Gly646TrpfsX12	no							
HD-0270	RAEB 1	5q14-q34 pérdida	nd	no	no	no							
HD-0286	RAEB 1	7 pérdida	nd	no	c.4723_4745del; p.Pro1575PhefsX31	no	no						
HD-0296	RAEB1	no CNA	nd	no	no	no							
HD-0300	RAEB1	2p11 pérdida	nd	c.3590A>G; p.Lys1197Arg (NC)	no	no							
HD-0394	RAEB 1	no CNA	nd	no	no	no							
HD-0169	RAEB 2	no CNA	no	no	no								
HD-0175	RAEB 2	no CNA	no	no	no								

Tabla III: Mutaciones de ASXL1 en CMML

Muestra	Diagnosis	HRAS ex 1, 2, 3, 4	KRAS ex 1, 2, 3, 4a, 4b	NRAS ex 1, 2	RUNX1 ex 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	ASXL1
HD-0200	CMML 1- MP	no	p.Ala146Val	no	no	-
HD-0228	CMML 1- MP	no	p.Gly12Ser	no	no	c.2502delT ; p.Thr836LeufsX2 (NC)
HD-0229	CMML 2- MP	no	no	no	no	no
HD-0272	CMML 1- MP	nd	no	p. Gly13Asp	no	c.1934dupG ; p.Gly646TrpfsX12
HD-0273	CMML 1- MP	nd	no	no	no	c.2661- 2661delinsTG ; p.Lys888GlufsX6
HD-0322	CMML 1- MP	no	no	no	no	no
HD-0366	CMML 1- MP	no	no	no	no	c.2535dupC ; p.Ser846GlnfsX5 (NC)
HD-0370	CMML 2- MP	no	no	no	no	c.3810-3811insAA ; p.Thr1271LysfsX10 (NC)
HD-0201	CMML 1- MP	no	no	p.Ala157Gly	no	c.3797-3812del ; p.Leu1266HisfsX9
HD-0376	CMML 2- MP	no	no	no	no	no
HD-0176	CMML 1- MP	no	no	no	no	no
HD-0182	CMML 1- MP	no	no	p.Gly12Asp	no	no

HD-0223	CMMML 1-MP	no	no	no	no	no	no	no	c.3202C>T ; p.Arg1068X
HD-0320	CMMML 2-MP	no	no	no	no	no	defecto corte y empalme	no	c.1934dupG ; p.Gly646TrpfsX12
HD-0321	CMMML 2-MP	no	no	no	no	no	p.Arg166X	no	c.1888-1909del ; p.His630ProfsX66
HD-0327	CMMML 1-MP	no	no	no	no	p.Gly12Asp	p.Tyr377LeufsX223	no	c.1934dupG ; p.Gly646TrpfsX12
HD-0318	CMMML 1-MP	no	no	no	no	no	p.Arg166X	no	c.2302C>T ; p.Gln768X
HD-0398	CMMML 1-MP	nd	nd	nd	nd	nd	no	no	c.1934dupG ; p.Gly646TrpfsX12
HD-0257	CMMML 1-MP	nd	nd	nd	nd	nd	nd	no	no
HD-0397	CMMML 1-MP	nd	nd	nd	nd	nd	nd	no	no
HD-0399	CMMML 1-MP	nd	nd	nd	nd	nd	nd	no	c.1934dupG ; p.Gly646TrpfsX12
HD-0404	CMMML 2-MP	nd	nd	nd	nd	nd	nd	no	c.1888-1909del ; p.His630ProfsX66
HD-0367	CMMML 2-MP	no	no	no	no	no	no	no	no
HD-0197	CMMML 1-MD	no	no	no	no	no	no	no	no
HD-0242	CMMML 1-MD	no	no	no	no	no	no	no	no
HD-0271	CMMML 1-MD	nd	no	no	no	no	no	no	c.3788delC ; p.Pro1263GlnfsX17
HD-0328	CMMML 1-MD	no	no	no	no	no	no	no	c.1934dupG ; p.Gly646TrpfsX12
HD-0340	CMMML 1-MD	no	no	no	no	no	no	no	no
HD-0355	CMMML 1-MD	no	no	no	no	no	no	no	no

HD-0372	CMMML 1-MD	no	no	no	no	no	no	no	no
HD-0380	CMMML 1-MD	no	no	no	no	no	no	no	no
HD-0323	CMMML 2-MD	no	no	no	no	no	no	no	nd
HD-0178	CMMML 1-MD	no	no	no	no	no	no	no	no
HD-0259	CMMML 1-MD	nd	no	no	no	no	nd	no	no
HD-0230	CMMML 1-MD	nd	no	no	no	no	no	no	c.1888-1909del ; p.His630ProfsX66
HD-0248	CMMML 2-MD	nd	no	no	no	no	no	no	no
HD-0254	CMMML 2-MD	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	no
HD-0388	CMMML 1-MD	nd	no	no	no	no	no	no	no
HD-0396	CMMML 1-MD	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	no
HD-0024	AT-CMMML	no	no	no	no	no	no	no	no
HD-0198	AT-CMMML	no	no	no	no	no	no	no	c.1851dupT ; p.Lys618X (NC)
HD-0349	AT-CMMML	no	no	no	no	no	no	no	no
HD-0354	AT-CMMML (HD-0318)	no	no	no	no	no	p.Arg166X	no	c.2302C>T ; p.Gln768X
HD-0374	AT-CMMML	no	no	nd	nd	no	no	no	no
HD-0381	AT-CMMML	no	no	no	no	no	no	no	no
HD-0402	AT-CMMML (HD-0259)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	no

Tabla IV: Datos clínicos y moleculares en 112 pacientes de MPN

Muestra	Diagnosis	ASXL1 (exón 12)
HD-0659	PV	c.1934dupG ; p.Gly646TrpfsX12
HD-0842	PV	c.2324T>A p.Leu775X
HD-0537	ET	c.2385delC p.Trp796GlyFSX22
HD-0757	ET	c.1934dupG ; p.Gly646TrpfsX12
HD-0540	PMF	c.1934dupG ; p.Gly646TrpfsX12
HD-0862	PMF	c.1934dupG ; p.Gly646TrpfsX12
HD-0601	Post-ET MF	c.1888-1909del p.His630ProFSX66 nfsX5 (NC)
HD-0758	Post-PV MF	c.1774C>T p.Gln592X
HD-0789	Post-PV MF	c.1934dupG ; p.Gly646TrpfsX12
HD-0535	PMF fase blástica	c.2285dupT p.Leu762Phe FSX12
HD-0536	PMF fase blástica	c.1934dupG ; p.Gly646TrpfsX12
HD-0496	MPN/MDS	c.1934dupG ; p.Gly646TrpfsX12
HD-0752	MPN/MDS	c.2279C>T p.Gln759X

Tabla V

CMML	Número de pacientes	ASXL1 mutado	ASXL1 no mutado	p-valor
proporción de sexo	51	3,16	1,27	0,23
Edad: media (intervalo)	51	74 (46-88)	71 (41-88)	0,39
Recuento Leucocito: media (intervalo)	51	30 (6-188)	15 (2,8-26,4)	0,006
Nivel de hemoglobina (g/dl): media (intervalo)	50	10 (8,1-14,1)	12,5 (7,4-16,2)	0,03
MCV: media (intervalo)	35	92 (86-106)	93 (79-101)	0,33
Recuento de neutrófilo (g/l): media (intervalo)	41	15 (1,5-41)	2 (0,1-12,9)	0,07
Recuento monocito en sangre (g/l): media (intervalo)	50	4,65 (1-60)	2 (1-46)	0,005
Recuento plaquetas (g/l): media (intervalo)	50	117,5 (34-420)	208 (39-660)	0,07
Blastos en médula ósea (%): media (intervalo)	51	7 (2-18)	6 (1-14)	0,11
Monocitos en médula ósea (%): media (intervalo)	50	20 (6-35)	15 (3-45)	0,04
MP-CMML	30	19	11	0,03
MD-CMML	21	6	15	
Transformación no aguda	51	14	26	
Transformación aguda	51	11	0	0,0005

MIP CMMML	Número de pacientes	ASXL1 mutado	ASXL1 no mutado	p-valor
Proporción de sexo		2,8	0,8	0,25
Edad: media (intervalo)	30	74 (55-88)	70,5 (42-87)	0,13
Recuento leucocito: media (intervalo)	30	35 (6-188)	17 (15-26,5)	0,08
Nivel hemoglobina (g/dl): media (intervalo)	29	11 (8,1-12,5)	11,5 (8,5-15,2)	0,03
MCV: media (intervalo)	21	92 (80-106)	88,5 (74-101)	0,11
Recuento neutrófilo (g/l): media (intervalo)	26	25 (7-41)	10 (7-12,9)	0,54
Recuento monocito en sangre (g/l) media (intervalo)	30	10 (1-60)	4,5 (1,2-46)	0,04
Recuento plaquetas (g/l) media (intervalo)	29	118 (34-420)	272 (57-660)	0,002
Blastos en médula ósea (%) media (intervalo)	30	7 (2-16)	6 (2-14)	0,54
Monocitos en médula ósea (%) media (intervalo)	29	25 (6-35)	14 (3-45)	0,16

MD CMML	Número de pacientes	ASXL1 mutado	ASXL1 no mutado	p-valor
Proporción de sexo	21	5	1,8	0,75
Edad: media (intervalo)	21	76,5 (46-83)	75 (41-88)	0,9
Recuento leucocito: media (intervalo)	21	8,9 (4-12)	7,1 (2,8-12,8)	0,6
Nivel Hemoglobina (g/l): media (intervalo) e)	21	12 (8,9-14,1)	14 (7,4-16,2)	0,77
MCV: media (intervalo)	13	89 (86-100)	93,5 (91-101)	0,46
Recuento neutrófilo (g/l): media (intervalo)	19	5 (1,5-7)	7,1 (0,1-7,7)	0,15
Recuento monocito en sangre (g/l): media (intervalo)	21	1,3 (1-4,5)	1,4 (1-2,6)	0,55
Recuento plaquetas (g/l): media (intervalo)	21	122 (43-414)	130 (39-399)	0,5
Blastos en médula ósea (%): media (intervalo)	21	7 (4-18)	5 (4-13)	0,2
Monocitos en médula ósea (%): media (intervalo)	21	16 (10-20)	15 (10-13)	0,83

MCV: volumen celular medio; En negrita: p valor significativo

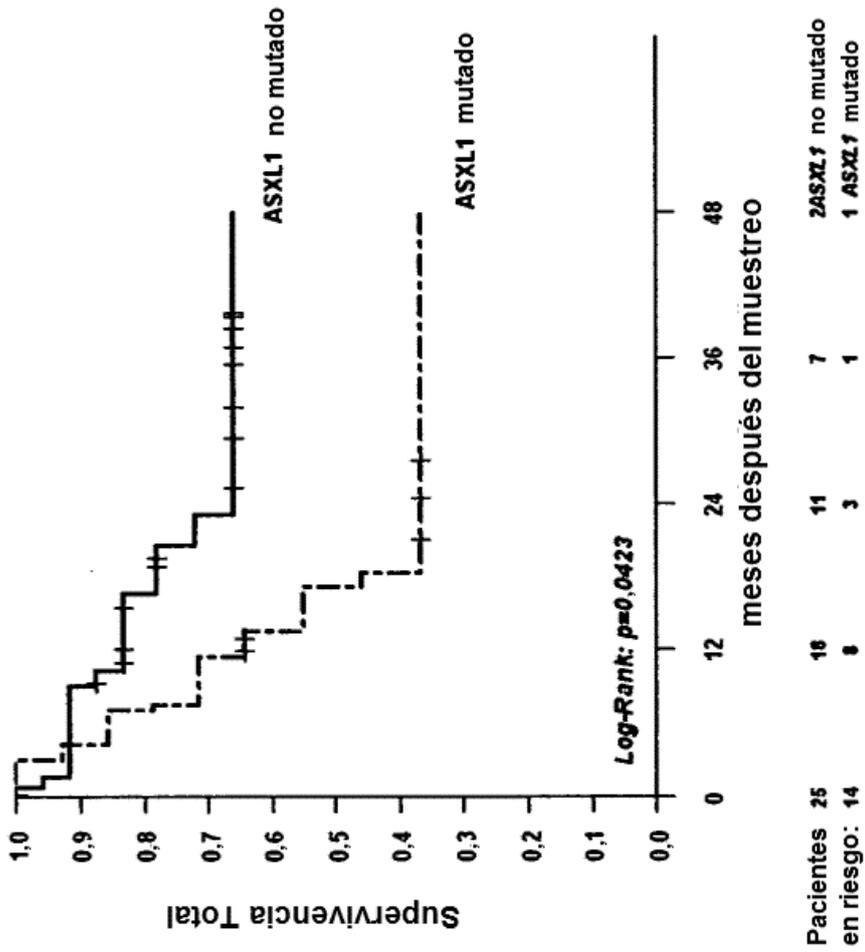


Figura 3