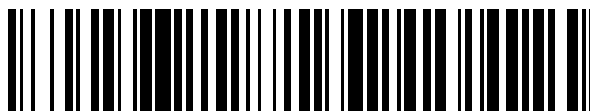


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 573**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.10.2014 PCT/EP2014/071372**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.04.2015 WO15052147**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.10.2014 E 14781520 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 3055422**

54 Título: **Procedimientos y composiciones para detectar mutaciones en el gen EZH2 humano**

30 Prioridad:

09.10.2013 US 201361888660 P

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

26.03.2019

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel , CH**

72 Inventor/es:

**MA, XIAOJU, MAX;
MANOHAR, CHITRA y
TSAN, ALISON**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 705 573 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

Procedimientos y composiciones para detectar mutaciones en el gen EZH2 humano

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere al diagnóstico del cáncer y al diagnóstico con fines terapéuticos para tratamientos del cáncer. En particular, la invención se refiere a la detección de mutaciones que son útiles para el diagnóstico y pronóstico, así como para predecir la eficacia del tratamiento contra el cáncer.

10

Antecedentes de la invención

EZH2 es una enzima modificadora de la cromatina que se dirige a las proteínas histonas. Específicamente, la proteína EZH2 es la subunidad catalítica del complejo represor Polycomb 2 (PRC2), que es una histona metiltransferasa específica para la lisina-27 (K27) de la histona 3 (H3). La H3-K27 metilada se asocia con la represión génica. Se han encontrado niveles anormalmente elevados de EZH2 en varios tejidos cancerosos y se asocian con represión génica, revisado en Simon, J. y Lange, C. (2008) *Roles of EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics*, Mut. Res. 647:21. También se descubrió que mutaciones específicas alteran la función de modificación de histonas de la proteína EZH2 al alterar su preferencia de sustrato. EZH2 mutado en la posición Y646 (véase Wiggle, T., *et al.* (2011) FEBS Lett. 585:3011) es anormalmente activo en la metilación de H3 dimetilada (H3K27me₂) para obtener la forma trimetilada (H3K27me₃). Los oligonucleótidos se usan, por ejemplo, como cebadores de extensión para la detección de variantes de nucleótidos en el codón Y646 del gen EZH2 en muestras de pacientes con linfoma (véase, por ejemplo, Saieg M.A. *et al.* (2013) Cancer Cytopathology 121:377; documento WO2013/049770). Saieg *et al.* en particular, divulga las mutaciones Y646N, Y646F e Y646C en el gen EZH2 para detectarlas con cebadores que terminan en el nucleótido situado antes de la posición de la variante. El documento WO2013/049770 divulga varias variantes de EZH2 en el codón Y646 (incluido Y646H) analizadas utilizando la secuenciación de NGS o Sanger (véase también Bödör C. *et al.* (2013) Blood 3165-3168). EZH2 mutado en la posición A692 (véase Majer, C. *et al.* (2012) FEBS Lett, 586:3348) es anormalmente activa en la dimetilación; y EZH2 mutado en la posición A682 (véase McCabe, M. *et al.* (2012), PNAS 109:2989) es anormalmente activo en las tres etapas de metilación. En el cáncer humano se ha demostrado que estas mutaciones promueven la represión génica a través de la hipermetilación de histonas.

Se han desarrollado tratamientos dirigidos a EZH2. Se ha demostrado que los inhibidores selectivos de EZH2 de moléculas pequeñas bloquean la actividad de EZH2 (y PRC2) y promueven la destrucción de células cancerosas *in vitro* (Knutson, S. *et al.* (2012) Nature Chem. Bio. 8:890). El inhibidor es excepcionalmente eficaz en la destrucción de células con EZH2 mutante anormalmente activo sin afectar a las células con EZH2 natural (id.). Por lo tanto, es necesaria una prueba diagnóstica con fines terapéuticos para identificar a los pacientes cuyos tumores tienen EZH2 mutante y que es probable que se beneficien de los inhibidores de EZH2. Es esencial que una prueba clínica para las mutaciones en EZH2 se dirija a tantas mutaciones como sea posible con una sensibilidad adecuada. Esto garantizará que los pacientes con mutaciones raras no reciban un resultado de prueba "negativo falso" y se pierdan un tratamiento que puede salvar vidas. Al mismo tiempo, la prueba debe ser altamente específica para garantizar que los pacientes no reciban un resultado "positivo falso" y reciban un tratamiento costoso e ineficaz.

Una técnica que es sensible y susceptible de combinación es la PCR específica de alelo (PCR-EA). Esta técnica detecta mutaciones o polimorfismos en secuencias de ácido nucleico en presencia de variantes naturales de las secuencias. En una PCR específica de alelo satisfactoria se amplifica la variante deseada del ácido nucleico diana, mientras que las demás variantes no, al menos no a un nivel detectable. En una PCR específica de alelo, al menos un cebador es específico de alelo, de manera que la extensión del cebador se produce solo cuando la variante específica de la secuencia está presente. Uno o más cebadores específicos de alelo que se dirigen a uno o más sitios polimórficos pueden estar presentes en la misma mezcla de reacción. El diseño de cebadores específicos de alelo satisfactorios es una técnica impredecible. Aunque es habitual diseñar un cebador para una secuencia conocida, no existe ninguna fórmula para diseñar un cebador que pueda discriminar entre secuencias muy similares.

En el contexto de un ensayo de diagnóstico, se requiere una discriminación precisa. Por ejemplo, en el contexto de la detección de la mutación en EZH2, el rendimiento del cebador específico de alelo puede determinar el curso del tratamiento contra el cáncer de un paciente. Por lo tanto, existe la necesidad de un ensayo completo que pueda detectar un número máximo de mutaciones en EZH2 con máxima especificidad y sensibilidad.

Sumario de la invención

La invención es un oligonucleótido aislado para detectar mutaciones en el gen EZH2 humano que consiste en la secuencia de un oligonucleótido basado en Y646H_R (SEQ ID NO: 11), excepto que comprende al menos un emparejamiento erróneo con las secuencias naturales del gen EZH2 humano, en el que el emparejamiento erróneo se ubica en la posición n-2 o n-3 del nucleótido del extremo 3' del oligonucleótido, siempre que n sea el nucleótido del extremo 3' del oligonucleótido, en el que el nucleótido aislado se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15, 16 y 18-20. Cada una de las SEQ ID NO: 15, 16 y 18-20 comprende al menos un doblete TT y un codón

CTC. La longitud de cualquiera de dichas SEQ ID NO es entre 20 y 30 nucleótidos. En variaciones de estos modos de realización, el oligonucleótido comprende además al menos un nucleótido no natural.

En otro modo de realización, la invención es un procedimiento para detectar mutaciones en el ácido nucleico EZH2 humano en una muestra, que comprende: (a) poner en contacto el ácido nucleico en la muestra con al menos un oligonucleótido descrito en las reivindicaciones 1 o 2; (b) incubar la muestra en condiciones que permitan la hibridación del oligonucleótido con la secuencia diana dentro del ácido nucleico EZH2; (c) generar el producto de amplificación que contiene la secuencia diana dentro del ácido nucleico EZH2; y (d) detectar la presencia del producto amplificado, detectando así la presencia de la mutación en el ácido nucleico EZH2. Además de este modo de realización, el ácido nucleico en la muestra se puede poner en contacto con un oligonucleótido seleccionado de los cebadores específicos de alelo enumerados en las tablas 2-4 y que comprende al menos un emparejamiento erróneo con la secuencia natural del gen EZH2 humano.

En otro modo de realización, la invención es un procedimiento para determinar si un paciente que tiene un tumor maligno es probable que responda a los inhibidores de EZH2, que comprende: (a) poner en contacto el ácido nucleico en la muestra del paciente con al menos un oligonucleótido descrito en las reivindicaciones 1 o 2; (b) incubar la muestra en condiciones que permitan la hibridación del oligonucleótido con la secuencia diana dentro del ácido nucleico EZH2; y la generación del producto de amplificación que contiene la secuencia diana dentro del ácido nucleico EZH2; (c) detectar la presencia del producto amplificado, detectando así la presencia de la mutación en el ácido nucleico EZH2, en el que la presencia de la mutación indica que es probable que el paciente responda a los inhibidores de EZH2.

En otro modo de realización más, la invención es un kit para detectar mutaciones en el gen EZH2 humano que comprende al menos un oligonucleótido descrito en las reivindicaciones 1 o 2 y, opcionalmente, al menos un reactivo adicional para su uso en PCR. En variaciones de este modo de realización, el kit comprende, además de las SEQ ID NO: 15, 16, 18, 19 o 20, una o más de las SEQ ID NO: 1-14, 17, 21-51, 58-68 y 72-83. En variaciones adicionales de este modo de realización, el kit comprende además dos o más oligonucleótidos, cada uno específico de la mutación seleccionada de mutaciones en las posiciones Y646, A682 y A692. En variaciones adicionales de este modo de realización, el kit comprende dos o más oligonucleótidos, cada uno específico de las mutaciones seleccionadas de Y646N, Y646H, Y646S, Y646F, Y646C, A682G y A692V.

Se divulga además un procedimiento para tratar a un paciente que tiene un cáncer, que comprende administrar al paciente una dosis adecuada de un inhibidor de EZH2, en el que el tumor del paciente alberga una mutación somática en el gen EZH2 detectada con un oligonucleótido seleccionado de los cebadores específicos de alelo enumerados en las tablas 2-4 y que comprende al menos un emparejamiento erróneo con la secuencia natural del gen EZH2 humano.

Otro modo de realización divulgado es un procedimiento para tratar a un paciente que tiene un cáncer, que comprende analizar la muestra del paciente para detectar mutaciones en el gen EZH2 usando al menos un oligonucleótido seleccionado de los cebadores específicos de alelo enumerados en las tablas 2-4 y que comprende al menos un emparejamiento erróneo con la secuencia natural del gen EZH2 humano y, si se encuentra una mutación, administrar al paciente una dosis de inhibidor de EZH2. En variaciones de este modo de realización, la mutación está en las posiciones Y646, A682 y A692. En otras variaciones de este modo de realización, la mutación se selecciona de Y646N, Y646H, Y646S, Y646F, Y646C, A682G y A692V. En otras variaciones de este modo de realización, los oligonucleótidos se seleccionan de las SEQ ID NO: 1-51, 58-68 y 72-83. En otras variaciones de este modo de realización, el inhibidor de EZH2 se selecciona de E11 EPZ6438 (E7438), GSK343 o GSK126. En otras variaciones de este modo de realización, el cáncer es un linfoma.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Para facilitar la comprensión de la presente divulgación, se proporcionan las siguientes definiciones de los términos usados en el presente documento.

El término "X[n]Y" se refiere a una mutación de aminoácido que da como resultado una sustitución del aminoácido X por el aminoácido Y en la posición [n] dentro de la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, el término "Y646C" se refiere a una mutación en la que la tirosina en la posición 646 se reemplaza por cisteína.

La expresión "cebador específico de alelo" o "cebador EA" se refiere a un cebador que hibrida con más de una variante de la secuencia diana, pero que puede discriminar entre las variantes de la secuencia diana de modo que solo con una de las variantes el cebador se extiende de manera eficaz mediante la ácido nucleico polimerasa en condiciones adecuadas. Con otras variantes de la secuencia diana, la extensión es menos eficaz o ineficaz.

La expresión "cebador común" se refiere al segundo cebador del par de cebadores que incluye un cebador específico de alelo. El cebador común no es específico de alelo, es decir, no discrimina entre las variantes de la

secuencia diana entre las que sí discrimina el cebador específico de alelo.

Los términos "complementarias" o "complementariedad" se usan en referencia a las cadenas antiparalelas de polinucleótidos relacionadas mediante las reglas de apareamiento de bases de Watson y Crick. Las expresiones "perfectamente complementarias" o "100 % complementarias" se refieren a las secuencias complementarias que tienen apareamiento de Watson y Crick de todas las bases entre las cadenas antiparalelas, es decir, no hay ningún emparejamiento erróneo entre dos bases cualesquiera de la doble hélice polinucleotídica. Sin embargo, se forman dobles hélices entre cadenas antiparalelas incluso en ausencia de complementariedad perfecta. Las expresiones "parcialmente complementarias" o "incompletamente complementarias" se refieren a cualquier alineación de bases entre cadenas polinucleotídicas antiparalelas que sea menos de un 100 % perfecta (por ejemplo, existe al menos un emparejamiento erróneo o una base no emparejada en la doble hélice polinucleotídica). Las dobles hélices entre cadenas parcialmente complementarias son, en general, menos estables que las dobles hélices entre cadenas perfectamente complementarias.

El término "muestra" se refiere a cualquier composición que contiene o que se supone que contiene ácido nucleico. Esto incluye una muestra de tejido o líquido aislado de un individuo, por ejemplo, piel, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, líquido linfático, líquido sinovial, orina, lágrimas, células sanguíneas, órganos y tumores, y también muestras de cultivos *in vitro* establecidos a partir de células obtenidas de un individuo, incluyendo tejidos incluidos en parafina fijados con formol (FFPET) o biopsias por punción con aguja gruesa y ácidos nucleicos aislados de los mismos.

Los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" se usan de manera intercambiable. "Oligonucleótido" es un término usado a veces para describir un polinucleótido más corto. Un oligonucleótido puede comprender al menos 6 nucleótidos, por ejemplo, al menos aproximadamente 10-12 nucleótidos, o al menos aproximadamente 15-30 nucleótidos correspondientes a una región de la secuencia de nucleótidos designada.

La expresión "secuencia principal" se refiere a la secuencia de nucleótidos en un polinucleótido u oligonucleótido. Las modificaciones de nucleótidos, tales como modificaciones de bases nitrogenadas, modificaciones de azúcares u otras modificaciones de la cadena principal, no son parte de la secuencia principal. Los marcadores, tales como cromóforos conjugados a los oligonucleótidos, tampoco son parte de la secuencia principal. Por tanto, dos oligonucleótidos pueden compartir la misma secuencia principal, pero diferir con respecto a las modificaciones y a los marcadores.

El término "cebador" se refiere a un oligonucleótido que hibrida con una secuencia en el ácido nucleico diana y puede actuar como un punto de iniciación de la síntesis a lo largo de una cadena complementaria de ácido nucleico en condiciones adecuadas para dicha síntesis. Como se usa en el presente documento, el término "sonda" se refiere a un oligonucleótido que hibrida con una secuencia en el ácido nucleico diana y normalmente se marca de manera detectable. La sonda puede tener modificaciones, tales como una modificación en el extremo 3' que haga que la sonda no sea extensible mediante las ácido nucleico polimerasas y uno o más cromóforos. Un oligonucleótido con la misma secuencia puede servir como un cebador en un ensayo y como una sonda en un ensayo diferente.

La expresión "emparejamiento erróneo" se refiere a la ausencia de apareamiento de bases de Watson y Crick entre las cadenas complementarias en la doble hélice de ácido nucleico. Por ejemplo, se produce un emparejamiento erróneo cuando una adenina (en lugar de guanina) se encuentra frente a una citosina en la cadena complementaria. Si se dice que un ácido nucleico monocatenario (como un cebador de amplificación) tiene un emparejamiento erróneo, eso significa que cuando hibrida con su secuencia diana, el cebador tiene un nucleótido con una base sin apareamiento de Watson y Crick con la base correspondiente en la cadena complementaria.

Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia diana", "ácido nucleico diana" o "diana" se refiere a una porción de la secuencia de ácido nucleico que se va a amplificar, detectar o bien ambas.

Los términos "hibridada" e "hibridación" se refieren a la interacción por apareamiento de bases entre dos ácidos nucleicos que da como resultado la formación de una doble hélice. No es un requisito que dos ácidos nucleicos tengan un 100 % de complementariedad a lo largo de su longitud completa para lograr la hibridación y la extensión de cadena.

El gen EZH2 humano se ha encontrado frecuentemente mutado en cáncer. La tabla 1 muestra las mutaciones más comunes descritas hasta la fecha.

Tabla 1. Mutaciones en el gen EZH2 humano

Aminoácido	Codón
Y646	TAC

Y646F	TTC
Y646N	AAC
Y646S	TCC
Y646H	CAC
Y646C	TGC
A692	GCA
A692V	GTA
A682	GCA
A682G	GGA

La PCR específica de alelo se ha descrito en la patente de EE. UU. n.º 6.627.402. En una PCR específica de alelo, el cebador discriminante tiene una secuencia complementaria a la variante deseada de la secuencia diana, pero con emparejamientos erróneos con las variantes no deseadas de la secuencia diana. Típicamente, el nucleótido discriminante del cebador, es decir, el nucleótido que solo se empareja con una variante de la secuencia diana, es el nucleótido del extremo 3'. Sin embargo, el extremo 3' del cebador solo es uno de muchos determinantes de especificidad. La especificidad en una PCR específica de alelo se deriva de una tasa de extensión mucho más lenta del cebador con emparejamientos erróneos con respecto a la del cebador sin emparejamientos erróneos, lo que finalmente reduce la eficiencia de amplificación relativa de la diana con emparejamientos erróneos. La cinética de extensión reducida y, por tanto, la especificidad de la PCR están influenciadas por muchos factores, incluida la naturaleza de la enzima, los componentes de reacción y sus concentraciones, la temperatura de extensión y el contexto de secuencia general del emparejamiento erróneo. El efecto de estos factores sobre cada cebador particular no se puede cuantificar de manera fiable. Sin una estrategia cuantitativa fiable y con una enorme cantidad de variables, el diseño de cebadores específicos de alelo es una cuestión de prueba y error con resultados a menudo sorprendentes. En el caso de los alelos mutantes de EZH2 descritos a continuación, solo una fracción de los cebadores probados dieron un rendimiento adecuado, es decir, una eficiencia de PCR aceptable y, al mismo tiempo, discriminación entre el molde mutante y el molde natural.

Un enfoque para aumentar la especificidad de los cebadores específicos de alelo es incluir un nucleótido interno emparejado erróneamente además del emparejamiento erróneo del extremo, véase la publicación de patente de EE. UU. n.º 2010/0099110. El nucleótido interno emparejado erróneamente en el cebador se puede emparejar erróneamente con las secuencias diana deseadas y no deseadas. Debido a que los emparejamientos erróneos desestabilizan los híbridos cebador-molde con los moldes deseados y no deseados, algunos de los emparejamientos erróneos pueden evitar la amplificación de ambos moldes y provocar un fallo de la PCR. Por lo tanto, el efecto de estos emparejamientos erróneos internos sobre un cebador de PCR específica de alelo particular no se puede predecir.

Para una extensión exitosa de un cebador, el cebador necesita tener al menos complementariedad parcial con la secuencia diana. En general, la complementariedad en el extremo 3' del cebador es más crucial que la complementariedad en el extremo 5' del cebador (Innis *et al.* eds. *PCR Protocols*, (1990) Academic Press, capítulo 1, pág. 9-11). Por lo tanto, la presente invención se puede combinar con los cebadores divulgados en las tablas 1-7, así como las variantes de estos cebadores con variaciones en el extremo 5'.

Se ha descrito previamente que, para la amplificación por PCR en general, la especificidad del cebador se puede incrementar mediante el uso de modificación química de los nucleótidos del cebador. Los nucleótidos con modificaciones covalentes de los grupos amino exocíclicos y el uso de dichos nucleótidos en la PCR se han descrito en la patente de EE. UU. n.º 6.001.611. Debido a que las modificaciones alteran los puentes de hidrógeno de Watson y Crick en los híbridos cebador-molde con los moldes deseados y no deseados, algunas de las modificaciones pueden evitar la amplificación de ambos moldes y provocar un fallo de la PCR. Por lo tanto, el efecto de estas modificaciones covalentes sobre la PCR específica de alelo no se puede predecir.

Además, se divulgan oligonucleótidos aislados para detectar simultáneamente múltiples mutaciones de EZH2 en un solo tubo. En un modo de realización, los oligonucleótidos aislados son adecuados para detectar específicamente mutaciones en la posición Y646 del gen EZH2 humano (tabla 2). En otro modo de realización, los oligonucleótidos aislados son adecuados para detectar específicamente mutaciones en la posición A682 del gen EZH2 humano (tabla 3). En otro modo de realización más, los oligonucleótidos aislados son adecuados para detectar específicamente mutaciones en la posición A692 del gen EZH2 humano (tabla 4). Algunos de estos cebadores oligonucleotídicos contienen emparejamientos erróneos internos, por ejemplo, nucleótidos que no están presentes en las secuencias naturales o mutantes que se producen naturalmente, como se muestra en las tablas 2-4. Algunos cebadores oligonucleotídicos contienen nucleótidos no naturales, como se muestra en las tablas.

5 Como lo demuestran los resultados experimentales (tablas 5-7), el rendimiento de los cebadores específicos de alelo diseñados de acuerdo con los mismos principios varía enormemente. La presente invención implica oligonucleótidos aislados como se define en las reivindicaciones 1-2, cada uno específico para una de varias secuencias estrechamente relacionadas (es decir, series de mutaciones en el codón único 646). Como se muestra en las tablas 5-7, los cebadores pueden distinguir especialmente su mutación diana de mutaciones similares y de la secuencia natural en el mismo codón.

10 Como opción, en un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los cebadores específicos de alelo divulgados en las tablas 2-4 se pueden emparejar con un segundo cebador "común", es decir, un cebador no específico de alelo, divulgado en las tablas 2-4 y, cuando sea apropiado, con una sonda de detección también divulgada en las tablas 2-4. Un experto en la técnica reconocerá inmediatamente que se pueden diseñar cebadores y sondas de detección comunes alternativos y que se pueden combinar con los cebadores específicos de alelo de la presente invención para detectar mutaciones en las posiciones Y646, A682 y A692 del gen EZH2 humano mediante PCR-EA.

15 *Tabla 2. Oligonucleótidos para detectar mutaciones en la posición Y646*

Cebadores específicos de alelo			
SEQ ID NO:	Oligo_ID	Secuencia	Ubicación EE* y secuencia
1	EZH2_Y646N_R:	TCAGTGCCTTACCTCTCCACAGTT	ninguna
2	EZH2_Y646N_R1:	TCAGTGCCTTACCTCTCCACAGAT	n-1, AT
3	EZH2_Y646N_R2	TCAGTGCCTTACCTCTCCACAGGT	n-1, GT
4	EZH2_Y646N_R3	TCAGTGCCTTACCTCTCCACAGCT	n-1, CT
5	EZH2_Y646N_R4	TCAGTGCCTTACCTCTCCACAATT	n-2, AG
6	EZH2_Y646N_R5	TCAGTGCCTTACCTCTCCACATTT	n-2, TG
7	EZH2_Y646N_R6	TCAGTGCCTTACCTCTCCACACTT	n-2, CG
8	EZH2_Y646N_R7	TCAGTGCCTTACCTCTCCACGGTT	n-3, GA
9	EZH2_Y646N_R8	TCAGTGCCTTACCTCTCCACTGTT	n-3, TA
10	EZH2_Y646N_R9	TCAGTGCCTTACCTCTCCACCGTT	n-3, CA
11	EZH2_Y646H_R	AGTGCCTTACCTCTCCACAGTG	ninguna
12	EZH2_Y646H_R1	AGTGCCTTACCTCTCCACAGAG	n-1, AT
13	EZH2_Y646H_R2	AGTGCCTTACCTCTCCACAGGG	n-1, GT
14	EZH2_Y646H_R3	AGTGCCTTACCTCTCCACAGCG	n-1, CT
15	EZH2_Y646H_R4	AGTGCCTTACCTCTCCACAATG	n-2, AG
16	EZH2_Y646H_R5	AGTGCCTTACCTCTCCACATTG	n-2, TG
17	EZH2_Y646H_R6	AGTGCCTTACCTCTCCACACTG	n-2, CG
18	EZH2_Y646H_R7	AGTGCCTTACCTCTCCACGGTG	n-3, GA
19	EZH2_Y646H_R8	AGTGCCTTACCTCTCCACTGTG	n-3, TA
20	EZH2_Y646H_R9	AGTGCCTTACCTCTCCACCGTG	n-3, CA
21	EZH2_Y646F_R	TCAGTGCCTTACCTCTCCACAGA	ninguna
22	EZH2_Y646F_R1	TCAGTGCCTTACCTCTCCACAAA	n-1, AG
23	EZH2_Y646F_R2	TCAGTGCCTTACCTCTCCACATA	n-1, TG
24	EZH2_Y646F_R3	TCAGTGCCTTACCTCTCCACACA	n-1, CG
25	EZH2_Y646F_R4	TCAGTGCCTTACCTCTCCACGGA	n-2, GA
26	EZH2_Y646F_R5	TCAGTGCCTTACCTCTCCACTGA	n-2, TA
27	EZH2_Y646F_R6	TCAGTGCCTTACCTCTCCACCGA	n-2, CA

ES 2 705 573 T3

28	EZH2_Y646F_R7	TCAGTGCCTTACCTCTCCAAAGA	n-3, AC
29	EZH2_Y646F_R8	TCAGTGCCTTACCTCTCCAGAGA	n-3, GC
30	EZH2_Y646F_R9	TCAGTGCCTTACCTCTCCATAGA	n-3, TC
31	EZH2_Y646S_R	TCAGTGCCTTACCTCTCCACAGG	ninguna
32	EZH2_Y646S_R1	TCAGTGCCTTACCTCTCCACAAG	n-1, AG
33	EZH2_Y646S_R2	TCAGTGCCTTACCTCTCCACATG	n-1, TG
34	EZH2_Y646S_R3	TCAGTGCCTTACCTCTCCACACG	n-1, CG
35	EZH2_Y646S_R4	TCAGTGCCTTACCTCTCCACTGG	n-2, TA
36	EZH2_Y646S_R5	TCAGTGCCTTACCTCTCCACCGG	n-2, CA
37	EZH2_Y646S_R6	TCAGTGCCTTACCTCTCCACGGG	n-2, GA
38	EZH2_Y646S_R7	TCAGTGCCTTACCTCTCCAAAGG	n-3, AC
39	EZH2_Y646S_R8	TCAGTGCCTTACCTCTCCATAGG	n-3, TC
40	EZH2_Y646S_R9	TCAGTGCCTTACCTCTCCAGAGG	n-3, GC
41	EZH2_Y646C_R	AGTGCCTTACCTCTCCACAGC	ninguna
42	EZH2_Y646C_R1	AGTGCCTTACCTCTCCACAAC	n-1, AG
43	EZH2_Y646C_R2	AGTGCCTTACCTCTCCACATC	n-1, TG
44	EZH2_Y646C_R3	AGTGCCTTACCTCTCCACACC	n-1, CG
45	EZH2_Y646C_R4	AGTGCCTTACCTCTCCACTGC	n-2, TA
46	EZH2_Y646C_R5	AGTGCCTTACCTCTCCACCGC	n-2, CA
47	EZH2_Y646C_R6	AGTGCCTTACCTCTCCACGGC	n-2, GA
48	EZH2_Y646C_R7	AGTGCCTTACCTCTCCAGAGC	n-3, GC
49	EZH2_Y646C_R8	AGTGCCTTACCTCTCCAAAGC	n-3, AC
50	EZH2_Y646C_R9	AGTGCCTTACCTCTCCATAGC	n-3, TC
51	EZH2-WT_Y646_R	TCAGTGCCTTACCTCTCCACAGTA	ninguna (WT)
Otros oligonucleótidos			
SEQ ID NO:	Oligo_ID	Secuencia	Función
52	EZH2_EX16_cFWD	ATTGCTGGCACCATCTGACGT	Cebador F común
53	EZH2E16_R_PRB1	FTTTATCAAQAGATCCTGTGCAG AAAAATGAATTCATCTCAP**	Sonda
54	EZEX16_CPRB3	FTTTATQCAAAGATCCTGTGCAG AAAAATGAATTCATCTCAP**	
55	EZH2_EX16CFWD2	TTGCTGGCACCATCTGACGTG	Cebador F común
56	EZH2_EX16CFWD3	TATTGCTGGCACCATCTGACG	Cebador F común
57	EZH2_EX16CFWD4	CTATTGCTGGCACCATCTGAC	Cebador F común

* "Ubicación de EE (emparejamiento erróneo)" indica la distancia desde el extremo 3' hasta el nucleótido emparejado erróneamente. "Secuencia" indica el cambio de nucleótido que da como resultado el emparejamiento erróneo, por ejemplo, "AT" significa que una T se ha reemplazado por una A.

5

** F = indicador, Q = finalizador, P = grupo fosfato

Tabla 3. Oligonucleótidos para detectar mutaciones en la posición A682

Cebadores específicos de alelo

ES 2 705 573 T3

SEQ ID NO:	Oligo_ID	Secuencia	Ubicación EE* y secuencia
58	EZH2_A682G_WTR	CGAATTTTGTACCCTTGCGGGTTC	ninguna, WT
59	EZH2_A682G_R	CGAATTTTGTACCCTTGCGGGTTC	ninguna
60	EZH2_A682G_R1	CGAATTTTGTACCCTTGCGGGTAC	n-1, AT
61	EZH2_A682G_R2	CGAATTTTGTACCCTTGCGGGTCC	n-1, CT
62	EZH2_A682G_R3	CGAATTTTGTACCCTTGCGGGTGC	n-1, GT
63	EZH2_A682G_R4	CGAATTTTGTACCCTTGCGGGATC	n-2, AT
64	EZH2_A682G_R5	CGAATTTTGTACCCTTGCGGGCTC	n-2, CT
65	EZH2_A682G_R6	CGAATTTTGTACCCTTGCGGGGTC	n-2, GT
66	EZH2_A682G_R7	CGAATTTTGTACCCTTGCGGATTC	n-3, AG
67	EZH2_A682G_R8	CGAATTTTGTACCCTTGCGGTTTC	n-3, TG
68	EZH2_A682G_R9	CGAATTTTGTACCCTTGCGGCTTC	n-3, CG
Otros oligonucleótidos			
SEQ ID NO:	Oligo_ID	Secuencia	Función
69	EZH2_A682G_cFWD	GTTTACTTATAACTGAAATTATTCACTGGGC	Cebador F
70	EZ_A682G_R_fJ9	JTGCTTACTTTTQTTCTTTTATAGATTTTGTGGTGGAP*	Sonda
71	EZ_A682G_R_fP1	ETGCTTACTTTTQTTCTTTTATAGATTTTGTGGTGGAP*	Sonda

* J = indicador, E = indicador, Q = finalizador, P = fosfato

Tabla 4. Oligonucleótidos para detectar mutaciones en la posición A692

5

Cebadores específicos de alelo			
SEQ ID NO:	Oligo_ID	SECUENCIA	Ubicación EE* y secuencia
72	EZH2_A692V_WT_R	TAGCAGTTTGGATTTACCGAATGATTTG	ninguna, WT
73	EZH2_A692V_R	TAGCAGTTTGGATTTACCGAATGATTTA	ninguna
74	EZH2_A692V_R1	TAGCAGTTTGGATTTACCGAATGATTAA	n-1, AT
75	EZH2_A692V_R2	TAGCAGTTTGGATTTACCGAATGATTCA	n-1, CT
76	EZH2_A692V_R3	TAGCAGTTTGGATTTACCGAATGATTGA	n-1, GT
77	EZH2_A692V_R4	TAGCAGTTTGGATTTACCGAATGATATA	n-2, AT
78	EZH2_A692V_R5	TAGCAGTTTGGATTTACCGAATGATCTA	n-2, CT
79	EZH2_A692V_R6	TAGCAGTTTGGATTTACCGAATGATGTA	n-2, GT
80	EZH2_A692V_R7	TAGCAGTTTGGATTTACCGAATGAATTA	n-3, AT
81	EZH2A692VR8	TAGCAGTTTGGATTTACCGAATGACTTA	n-3, CT
82	EZH2A692VR9	TAGCAGTTTGGATTTACCGAATGAGTTA	n-3, GT
83	EZH2A692VR1F	TAGCAGTTTGGATTTACCGAATGATFFA*	n-1, FT
Otros oligonucleótidos			
SEQ ID NO:	Oligo_ID	Secuencia	Función
84	EZH2_A692V_cFWD	CACTGGGCTGTGCTTACTTTTTTC	Cebador F
85	EZH2_A692V_R_fP1	ETTTAGATQTTTGTGGTGGATGCAACCCGCAAP**	Sonda

* F = N6-metil-dA

** E = indicador, Q = finalizador, P = fosfato

La presente invención se refiere además a un procedimiento de diagnóstico para detectar mutaciones en EZH2 usando los oligonucleótidos divulgados en las tablas 2-4. El procedimiento comprende poner en contacto una muestra de prueba que contenga ácido nucleico con uno o más cebadores específicos de alelo para detectar una mutación en EZH2, seleccionado de las tablas 2-4, en presencia del correspondiente segundo cebador (opcionalmente también seleccionado de las tablas 2-4), nucleósidos trifosfato y un ácido nucleico polimerasa, de modo que el uno o más cebadores específicos de alelo solo se extiendan de manera eficaz cuando en la muestra está presente una mutación en EZH2; y detectar la presencia o ausencia de una mutación en EZH2 detectando la presencia o ausencia del producto de extensión.

En un modo de realización particular, la presencia del producto de extensión se detecta con una sonda. En variaciones de este modo de realización, la sonda se selecciona de las tablas 2-4. La sonda se puede marcar con un marcador radioactivo, fluorescente o cromóforo. Por ejemplo, la mutación se puede detectar detectando la amplificación del producto de extensión mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (rt-PCR), en el que la hibridación de la sonda con el producto de extensión produce la digestión enzimática de la sonda y la detección de la fluorescencia resultante (procedimiento de la sonda TaqMan™, Holland *et al.* (1991) P.N.A.S. USA 88:7276-7280). La presencia del producto de amplificación en rt-PCR también se puede detectar detectando un cambio en la fluorescencia debido a la formación de una doble hélice de ácido nucleico entre la sonda y el producto de extensión (publicación de patente de EE. UU. n.º 2010/0143901). De forma alternativa, la presencia del producto de extensión y el producto de amplificación se puede detectar mediante electroforesis en gel seguida de tinción o mediante transferencia e hibridación como se describe, por ejemplo, en Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning*, 3.ª ed. CSHL Press, capítulos 5 y 9.

En otro modo de realización más, la invención se refiere a una combinación de oligonucleótidos para detectar simultáneamente mutaciones en las posiciones Y646, A682 y A692 en el gen EZH2 humano. En variaciones de este modo de realización, la combinación comprende al menos un cebador específico de alelo de cada una de las tablas 2-4 y, opcionalmente, al menos un cebador común de cada una de las tablas 2-4 y, más opcionalmente, al menos una sonda de cada una de las tablas 2-4. Como se demuestra, por ejemplo, en la tabla 5, los oligonucleótidos aislados son especialmente adecuados para que se combinen en kits de prueba. La tabla 5 demuestra que cada oligonucleótido es específico para su mutación diana, incluso cuando la mutación estrechamente relacionada está presente en la muestra.

En otro modo de realización, la invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de un paciente que tiene un tumor que alberga posiblemente células con un gen EZH2 mutante. El procedimiento comprende poner en contacto una muestra del paciente con uno o más cebadores específicos de alelo para detectar una mutación en EZH2, seleccionados de las tablas 2-4, en presencia de un segundo cebador o cebadores correspondientes (opcionalmente también seleccionados de las tablas 2-4), realizar la amplificación específica de alelo y detectar la presencia o ausencia de una mutación en EZH2 detectando la presencia o ausencia del producto de extensión y, si se encuentra al menos una mutación, administrar al paciente un compuesto que inhiba la señalización de la proteína EZH2 mutante codificada por el gen mutado. En variaciones de este modo de realización, el inhibidor de EZH2 se selecciona de E11 (Qi, W., *et al.* (2012) PNAS USA 109(52):21360); EPZ6438-E7438 (Knutson, S.K., *et al.* (2012) Nat Chem Biol. 8(11):890); GSK343 o GSK126 (McCabe, M.T., *et al.* (2012) Nature 108:108); o cualquier otro inhibidor selectivo de EZH2 adecuado que esté o estará disponible.

En otro modo de realización más, la invención se refiere a un kit que contiene reactivos necesarios para detectar mutaciones en el gen EZH2. Los reactivos comprenden uno o más cebadores específicos de alelo para una mutación en EZH2, seleccionados de las tablas de cada una de las tablas 2-4, uno o más segundos cebadores correspondientes (opcionalmente también seleccionados de las tablas de cada una de las tablas 2-4) y, opcionalmente, una o más sondas (opcionalmente también seleccionadas de las tablas de cada una de las tablas 2-4). El kit puede comprender además reactivos necesarios para la realización del ensayo de amplificación y detección, tales como nucleósidos trifosfato, ácido nucleico polimerasa y tampones necesarios para la función de la polimerasa. En algunos modos de realización, la sonda se marca de manera detectable. En dichos modos de realización, el kit puede comprender reactivos para marcar y detectar el marcador.

Ejemplos

Condiciones de reacción ejemplares

Las condiciones de reacción ejemplares utilizadas para analizar el rendimiento de los cebadores son las siguientes. Una mezcla de PCR que incluye Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), cloruro de potasio 75-90 mM, 160 µM de cada uno de dATP, dCTP y dGTP, dUTP 320 µM, 0,075-0,2 µM de cada uno de cebador selectivo y común, sonda 0,05-0,1 µM, ADN diana (100 y 10.000 copias de un plásmido recombinante con un mutante, o 10.000 copias de ADN genómico natural (ADN genómico combinado, Promega, Madison, Wisc., n.º ref. DD2011), 0,2 U/µl de uracil-N-glucosilasa, aptámero NTQ21-46A 200 nM, ADN polimerasa 40 nM, EDTA 0,1 mM, DMSO al 1,25 %-2 %, acetato de magnesio 2,5 mM. La amplificación y el análisis se realizaron utilizando el instrumento Roche LightCycler® 480 (Roche Applied

Science, Indianapolis, Ind.). Se usó el siguiente perfil de temperatura: 50 °C, 5 minutos; 2 ciclos de 95 °C (10 segundos) a 62 °C (30 segundos), seguidos de 55 ciclos de 93 °C (10 segundos) a 62 °C (30 segundos), 1 ciclo de enfriamiento a 37 °C (10 segundos) y 1 ciclo de enfriamiento a 25 °C (10 segundos). Los datos de fluorescencia se recogieron al inicio de cada etapa a 62 °C durante los 55 ciclos. Opcionalmente, las reacciones contenían un molde de control positivo endógeno.

El éxito de la PCR específica de alelo se midió comparando el C_t obtenido con la secuencia diana y el C_t obtenido con una secuencia no diana, por ejemplo, una secuencia con una mutación diferente o una secuencia natural en la misma posición.

Ejemplo 1

Cebadores para detectar mutaciones en la posición Y646 del gen EZH2 humano

Los cebadores y las sondas que se muestran en la tabla 2 se sometieron a prueba en las condiciones experimentales expuestas anteriormente. La tabla 5 muestra la amplificación (medida por C_t).

Tabla 5. Rendimiento de cebadores en la posición Y646 del gen EZH2 humano

SEQ ID NO:	Y646H*	Y646F	Y646S	Y646C	Mezcla Mut/WT**	ID de cebador
1	34,26	42,17	47,54	38,58	30,90	EZH2_Y646N_R
2	47,82	36,50	29,78	35,79	34,41	EZH2_Y646N_R1
3	35,51	47,75	42,02	41,62	30,90	EZH2_Y646N_R2
4	48,14	42,68	42,47	38,26	33,01	EZH2_Y646N_R3
5	35,56	30,70	38,04	34,09	31,99	EZH2_Y646N_R4
6	43,42	42,79	55,00	39,46	33,02	EZH2_Y646N_R5
7	44,14	44,84	46,99	42,00	38,49	EZH2_Y646N_R6
8	29,52	35,71	37,57	37,78	30,77	EZH2_Y646N_R7
9	28,83	37,46	47,21	38,36	30,78	EZH2_Y646N_R8
10	31,09	37,60	55,00	36,71	30,74	EZH2_Y646N_R9
11	25,87	48,78	51,29	43,49	28,59	EZH2_Y646H_R
12	39,07	39,45	48,71	55,00	47,27	EZH2_Y646H_R1
13	36,19	48,35	30,26	48,55	41,78	EZH2_Y646H_R2
14	26,93	46,10	37,19	31,39	31,31	EZH2_Y646H_R3
15	26,82	38,71	41,92	44,76	31,36	EZH2_Y646H_R4
16	27,43	55,00	55,00	55,00	32,40	EZH2_Y646H_R5
17	30,82	52,65	41,11	45,74	36,52	EZH2_Y646H_R6
18	25,84	55,00	49,40	55,00	30,31	EZH2_Y646H_R7
19	26,03	55,00	50,18	55,00	30,46	EZH2_Y646H_R8
20	25,95	55,00	45,69	55,00	30,32	EZH2_Y646H_R9
21	37,98	25,50	32,10	40,84	31,01	EZH2_Y646F_R
22	50,54	28,47	49,25	55,00	34,89	EZH2_Y646F_R1
23	45,35	28,41	43,39	44,07	34,44	EZH2_Y646F_R2
24	30,88	28,96	27,85	29,12	30,52	EZH2_Y646F_R3
25	51,19	25,61	28,78	39,00	31,22	EZH2_Y646F_R4
26	50,05	26,26	37,85	41,62	31,74	EZH2_Y646F_R5

ES 2 705 573 T3

27	55,00	25,22	38,65	39,78	30,89	EZH2_Y646F_R6
28	41,84	25,37	48,65	39,30	31,65	EZH2_Y646F_R7
29	39,69	25,51	40,73	40,24	31,24	EZH2_Y646F_R8
30	40,01	25,36	45,36	44,63	30,72	EZH2_Y646F_R9
31	37,50	29,90	25,27	33,56	30,76	EZH2_Y646S_R
32	36,94	35,25	26,79	33,44	32,58	EZH2_Y646S_R1
33	35,71	44,05	26,32	43,26	31,73	EZH2_Y646S_R2
34	55,00	55,00	30,09	55,00	43,81	EZH2_Y646S_R3
35	44,38	40,31	25,09	42,49	30,87	EZH2_Y646S_R4
36	38,92	35,91	24,94	34,12	30,63	EZH2_Y646S_R5
37	38,53	39,11	24,94	41,34	30,59	EZH2_Y646S_R6
38	42,98	44,23	25,50	35,28	31,23	EZH2_Y646S_R7
39	37,98	39,91	25,03	40,85	30,93	EZH2_Y646S_R8
40	55,00	55,00	41,56	55,00	51,47	EZH2_Y646S_R9
41	27,90	31,06	43,15	25,25	28,67	EZH2_Y646C_R
42	42,03	55,00	55,00	26,14	31,09	EZH2_Y646C_R1
43	45,47	55,00	55,00	26,79	31,68	EZH2_Y646C_R2
44	44,28	48,93	46,45	30,05	36,71	EZH2_Y646C_R3
45	38,69	55,00	55,00	25,52	30,27	EZH2_Y646C_R4
46	37,63	45,69	55,00	25,48	30,20	EZH2_Y646C_R5
47	38,32	50,07	55,00	25,40	30,07	EZH2_Y646C_R6
48	39,69	55,00	55,00	25,38	30,13	EZH2_Y646C_R7
49	40,88	55,00	55,00	25,56	30,12	EZH2_Y646C_R8
50	38,56	55,00	55,00	25,61	30,10	EZH2_Y646C_R9

* En estas reacciones, el molde era una muestra pura de ADN mutante

** En estas reacciones, el molde era una mezcla de ADN con la mutación diana y ADN natural

5

Ejemplo 2

Cebadores para detectar mutaciones en la posición A682 del gen EZH2 humano

10 Los cebadores y las sondas que se muestran en la tabla 3 se sometieron a prueba en las condiciones experimentales expuestas anteriormente. La tabla 6 muestra la especificidad de la amplificación medida por C_t y ΔC_t (entre los moldes emparejados (mutantes) y emparejados erróneamente (naturales)).

Tabla 6. Resultados de cebadores en la posición A682 del gen EZH2 humano

15

Cebador	R	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	WT
SEQ ID NO:	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	58
Diana Mut/WT	30,51	35,56	30,61	33,81	29,17	28,86	31,62	28,54	28,36	29,01	39
Diana WT	39,9	44,76	44,28	24,35	39,12	40,86	32,92	43,04	32,85	38,88	21,75

ΔCt	9,39	9,2	13,67	-9,46	9,95	12	1,31	14,51	4,49	9,87	-----
------------	------	-----	-------	-------	------	----	------	-------	------	------	-------

Ejemplo 3

Cebadores para detectar mutaciones en la posición A692 del gen EZH2 humano

5 Los cebadores y las sondas que se muestran en la tabla 4 se sometieron a prueba en las condiciones experimentales expuestas anteriormente. La tabla 7 muestra la especificidad de la amplificación medida por C_t y ΔC_t (entre los moldes emparejados (mutantes) y emparejados erróneamente (naturales)).

10 *Tabla 7. Resultados de cebadores en la posición A682 del gen EZH2 humano*

Molde	R	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	WTR
SEQ ID NO:	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	58
Diana WT/Mut	25,84	28,58	26,59	55	55	55	27,6	26,2	26,11	26,29	26,67
Diana WT	22,3	38,18	33,13	55	55	55	33,67	32,67	32,18	32,15	18,72
ΔCt	-3,54	9,6	6,54	N/A	N/A	N/A	6,07	6,48	6,07	5,86	-7,95

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> ROCHE DIAGNOSTICS GMBH F. HOFFMANN-LA ROCHE AG	
5	<120> PROCEDIMIENTOS Y COMPOSICIONES PARA DETECTAR MUTACIONES EN EL GEN EZH2 HUMANO	
	<130> 31749 WO-KOE	
10	<150> 61/888.660 <151> 09-10-2013	
	<160> 85	
15	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1 <211> 24 <212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220> <221> source <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
25	<400> 1 tcagtgccctt acctctccac agtt	24
	<210> 2 <211> 24 <212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220> <221> source <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
35	<400> 2 tcagtgccctt acctctccac agat	24
40	<210> 3 <211> 24 <212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220> <221> source <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
50	<400> 3 tcagtgccctt acctctccac aggt	24
	<210> 4 <211> 24 <212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220> <221> source <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
60	<400> 4 tcagtgccctt acctctccac agct	24
65	<210> 5	

	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<221> source	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 5	
10	tcagtgcctt acctctccac aatt	24
	<210> 6	
	<211> 24	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> source	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
20	<400> 6	
	tcagtgcctt acctctccac attt	24
	<210> 7	
25	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<221> source	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 7	
35	tcagtgcctt acctctccac actt	24
	<210> 8	
	<211> 24	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> source	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
45	<400> 8	
	tcagtgcctt acctctccac gggt	24
	<210> 9	
	<211> 24	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> source	
55	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 9	
	tcagtgcctt acctctccac tggt	24
60	<210> 10	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	

<221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

5 <400> 10
tcagtgcctt acctctccac cgtt 24

10 <210> 11
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

20 <400> 11
agtgccttac ctctccacag tg 22

25 <210> 12
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

35 <400> 12
agtgccttac ctctccacag ag 22

40 <210> 13
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

50 <400> 13
agtgccttac ctctccacag gg 22

55 <210> 14
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

65 <400> 14
agtgccttac ctctccacag cg 22

70 <210> 15
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

75 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

80 <400> 15
agtgccttac ctctccacaa tg 22

<210> 16
 <211> 22
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 10
 <400> 16
agtgccttac ctctccacat tg 22

 <210> 17
 <211> 22
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 20
 <400> 17
agtgccttac ctctccacac tg 22
 25
 <210> 18
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 35 <400> 18
agtgccttac ctctccacgg tg 22

 <210> 19
 <211> 22
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 45
 <400> 19
agtgccttac ctctccactg tg 22

 <210> 20
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 55
 <400> 20
agtgccttac ctctccaccg tg 22
 60
 <210> 21
 <211> 23
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 5
 <400> 21
tcagtgctt acctctccac aga 23
 <210> 22
 10 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 22
tcagtgctt acctctccac aaa 23
 20 <210> 23
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 30 <400> 23
tcagtgctt acctctccac ata 23
 <210> 24
 35 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 24
tcagtgctt acctctccac aca 23
 45 <210> 25
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 25
 55 **tcagtgctt acctctccac gga** 23
 <210> 26
 <211> 23
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 65

<400> 26
tcagtgccctt acctctccac tga 23

5 <210> 27
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

15 <400> 27
tcagtgccctt acctctccac cga 23

20 <210> 28
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

30 <400> 28
tcagtgccctt acctctccaa aga 23

35 <210> 29
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

45 <400> 29
tcagtgccctt acctctccag aga 23

50 <210> 30
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

60 <400> 30
tcagtgccctt acctctccat aga 23

65 <210> 31
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

<400> 31
tcagtgccctt acctctccac agg 23

<210> 32
 <211> 23

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

 <400> 32
 10 **tcagtgccctt acctctccac aag** 23

 <210> 33
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 20
 <400> 33
tcagtgccctt acctctccac atg 23

 <210> 34
 <211> 23
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 30 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

 <400> 34
tcagtgccctt acctctccac acg 23

 35 <210> 35
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

 <400> 35
 45 **tcagtgccctt acctctccac tgg** 23

 <210> 36
 <211> 23
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 55
 <400> 36
tcagtgccctt acctctccac cgg 23

 <210> 37
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 65 <221> source

	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 37 tcagtgcctt acctctccac ggg	23
5	<210> 38 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <221> source <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
15	<400> 38 tcagtgcctt acctctccaa agg	23
20	<210> 39 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> source <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 39 tcagtgcctt acctctccat agg	23
30	<210> 40 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <221> source <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
40	<400> 40 tcagtgcctt acctctccag agg	23
45	<210> 41 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <221> source <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 41 agtgccttac ctctccacag c	21
55	<210> 42 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <221> source <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
65	<400> 42 agtgccttac ctctccacaa c	21

<210> 43
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 10 <400> 43
 agtgccttac ctctccacat c 21
 <210> 44
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 20 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 44
 agtgccttac ctctccacac c 21
 25 <210> 45
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 45
 35 **agtgccttac ctctccactg c** 21
 <210> 46
 <211> 21
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 45 <400> 46
 agtgccttac ctctccaccg c 21
 <210> 47
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 47
 60 **agtgccttac ctctccacgg c** 21
 <210> 48
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65

<220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

5 <400> 48
 agtgccttac ctctccagag c 21

<210> 49
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> source
 15 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

<400> 49
 agtgccttac ctctccaaag c 21

20 <210> 50
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

30 <400> 50
 agtgccttac ctctccaaag c 21

<210> 51
 <211> 24
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> source
 40 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

<400> 51
 tcagtgctt acctctccac agta 24

45 <210> 52
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

<400> 52
 attgctggca ccatctgacg t 21

55 <210> 53
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética"

	<400> 53 tttatcaaag atcctgtgca gaaaaatgaa ttcattctca	39
5	<210> 54 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <221> source <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética"	
15	<400> 54 tttatcaaag atcctgtgca gaaaaatgaa ttcattctca	39
20	<210> 55 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> source <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
30	<400> 55 ttgctggcac catctgacgt g	21
35	<210> 56 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <221> source <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
45	<400> 56 tattgctggc accatctgac g	21
50	<210> 57 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <221> source <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
60	<400> 57 ctattgctgg caccatctga c	21
	<210> 58 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <221> source <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 58 cgaattttgt tacccttgcg ggttg	25

<210> 59
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 10 <400> 59 **cgaattttgt tacccttgcg ggttc** 25
 <210> 60
 <211> 25
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 20 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 60 **cgaattttgt tacccttgcg ggtac** 25
 25 <210> 61
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 35 <400> 61 **cgaattttgt tacccttgcg ggtcc** 25
 <210> 62
 <211> 25
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 45 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 62 **cgaattttgt tacccttgcg ggtcc** 25
 50 <210> 63
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 63 **cgaattttgt tacccttgcg ggatc** 25
 60 <210> 64
 <211> 25
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <221> source
 5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

<400> 64
cgaattttgt tacccttgcg ggctc 25

10 <210> 65
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

20 <400> 65
cgaattttgt tacccttgcg gggtc 25

<210> 66
 <211> 25
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

30 <400> 66
cgaattttgt tacccttgcg gattc 25

<210> 67
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

40 <400> 67
cgaattttgt tacccttgcg gtttc 25

45 <210> 68
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

55 <400> 68
cgaattttgt tacccttgcg gcttc 25

<210> 69
 <211> 31
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> source

	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 69 gtttacttat aactgaaatt attcactggg c	31
5	<210> 70 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <221> source <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética"	
15	<400> 70 tgcttacttt tttcttttta gattttgtgg tgga	34
20	<210> 71 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> source <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética"	
	<400> 71 tgcttacttt tttcttttta gattttgtgg tgga	34
30	<210> 72 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <221> source <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
40	<400> 72 tagcagtttg gatttaccga atgatttg	28
45	<210> 73 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <221> source <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 73 tagcagtttg gatttaccga atgattta	28
55	<210> 74 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <221> source <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 74	

	tagcagtttg gatttaccga atgattaa	28
	<210> 75	
	<211> 28	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> source	
10	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 75	
	tagcagtttg gatttaccga atgattca	28
15	<210> 76	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<221> source	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 76	
25	tagcagtttg gatttaccga atgattga	28
	<210> 77	
	<211> 28	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> source	
35	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 77	
	tagcagtttg gatttaccga atgatata	28
40	<210> 78	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<221> source	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 78	
50	tagcagtttg gatttaccga atgatcta	28
	<210> 79	
	<211> 28	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> source	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
60	<400> 79	
	tagcagtttg gatttaccga atgatgta	28
	<210> 80	

	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<221> source	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 80	
10	tagcagtttg gatttaccga atgaatta	28
	<210> 81	
	<211> 28	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> source	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
20	<400> 81	
	tagcagtttg gatttaccga atgactta	28
	<210> 82	
25	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<221> source	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 82	
35	tagcagtttg gatttaccga atgagtta	28
	<210> 83	
	<211> 27	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> source	
	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
45	<400> 83	
	tagcagtttg gatttaccga atgatta	27
	<210> 84	
	<211> 24	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> source	
55	<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 84	
	cactgggctg tgcttacttt tttc	24
60	<210> 85	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

<220>
<221> source
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética"

5

<400> 85
tttagatttt gtggtggatg caaccgcaa

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un oligonucleótido aislado para detectar mutaciones en el gen EZH2 humano que comprende la secuencia del oligonucleótido Y646H_R (SEQ ID NO: 11), excepto que comprende al menos un emparejamiento erróneo con las secuencias naturales del gen EZH2 humano, en el que el emparejamiento erróneo se ubica en la posición n-2 o n-3 del nucleótido del extremo 3' del oligonucleótido, siempre que n sea el nucleótido del extremo 3' del oligonucleótido, en el que el oligonucleótido aislado se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 15, 16 y 18-20.
- 10 2. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además al menos un nucleótido no natural.
3. Un procedimiento para detectar una mutación en el ácido nucleico EZH2 humano en una muestra de ácido nucleico, que comprende:
- 15 (a) poner en contacto la muestra de ácido nucleico con un oligonucleótido de la reivindicación 1 o 2;
- (b) incubar la muestra de ácido nucleico en condiciones que permitan la hibridación del oligonucleótido con la secuencia diana dentro del ácido nucleico EZH2;
- 20 (c) generar un producto de amplificación que contiene la secuencia diana dentro del ácido nucleico EZH2; y
- (d) detectar la presencia del producto amplificado, detectando así la presencia de la mutación en el ácido nucleico EZH2.
- 25 4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la muestra de ácido nucleico se obtiene a partir de células sanguíneas, plasma, suero o una muestra de tejido incluida en parafina fijada con formol.
5. Un procedimiento para determinar si un paciente que tiene un tumor maligno es probable que responda a un inhibidor de EZH2, que comprende:
- 30 (a) poner en contacto una muestra de ácido nucleico del paciente con un oligonucleótido de la reivindicación 1 o 2;
- (b) incubar la muestra en condiciones que permitan la hibridación del oligonucleótido con la secuencia diana dentro del ácido nucleico EZH2; y la generación del producto de amplificación que contiene la secuencia diana dentro del ácido nucleico EZH2;
- 35 (c) detectar la presencia del producto amplificado, detectando así la presencia de la mutación en el ácido nucleico EZH2, en el que la presencia de la mutación indica que es probable que el paciente responda a un inhibidor de EZH2.
- 40 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el tumor maligno es una indicación de cáncer, en el que el cáncer es un linfoma.
7. Un kit para detectar una mutación en el gen EZH2 humano que comprende un oligonucleótido de la reivindicación 1 o 2 y al menos un reactivo adicional para su uso en PCR, en el que el oligonucleótido se selecciona de las SEQ ID
- 45 NO: 15, 16, 18, 19 y 20.
8. El kit de la reivindicación 7, que comprende además uno o más segundos cebadores correspondientes, una o más sondas que podrían estar marcadas, nucleótidos trifosfato, un ácido nucleico polimerasa y/o un tampón.