

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 828**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C12Q 1/68 (2008.01)
G01N 33/15 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.08.2012 PCT/JP2012/069711**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2013 WO13018866**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2012 E 12820708 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 2757153**

54 Título: **Método para la evaluación de la predisposición al síndrome mielodisplásico o al tumor mielóide, polipéptido y anticuerpo para ello, y método de cribaje de candidatos para el fármaco terapéutico o el fármaco profiláctico para ello**

30 Prioridad:

02.08.2011 JP 2011169662

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

04.02.2020

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF TOKYO (100.0%)
 3-1, Hongo 7-chome, Bunkyo-ku
 Tokyo 113-8654, JP**

72 Inventor/es:

**OGAWA, SEISHI;
 SANADA, MASASHI y
 YOSHIDA, KENICHI**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

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

ES 2 739 828 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

Método para la evaluación de la predisposición al síndrome mielodisplásico o al tumor mielóide, polipéptido y anticuerpo para ello, y método de cribaje de candidatos para el fármaco terapéutico o el fármaco profiláctico para ello.

CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente invención se refiere a un método para evaluar la predisposición a los síndromes mielodisplásicos o a un tumor mielógeno y un polipéptido y anticuerpo para ello así como a un método de cribaje de un agente terapéutico candidato o un agente profiláctico candidato para síndromes mielodisplásicos o un tumor mielógeno.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

[0002] Los síndromes mielodisplásicos (MDS), los cuales son un trastorno en el que los eritrocitos, leucocitos y plaquetas disminuyen en la sangre periférica aunque se producen células hematopoyéticas en la médula ósea, se cree que son causados por la transformación oncogénica a nivel de célula madre porque a menudo progresan hacia leucemia aguda. Actualmente, el síndrome se clasifica como anemia refractaria (RA), anemia refractaria con sideroblastos en anillo (RARS), citopenia refractaria con displasia multilineaje (RCMD), citopenia refractaria con displasia multilineaje con sideroblastos en anillo (RCMD-RS), anemia refractaria con exceso de blastos (RAEB), síndrome 5q y similares. En particular, la leucemia mielógena aguda (AML) es la complicación más importante, pero no se conoce el proceso por el cual los síndromes mielodisplásicos progresan hacia leucemia.

Un tumor mielógeno, el cual se caracteriza por que puede progresar hacia la producción incontrolada de células sanguíneas displásicas y hacia leucemia mielógena, también es un trastorno asociado de los síndromes mielodisplásicos.

[0003] Para impedir el progreso de los síndromes mielodisplásicos o de un tumor mielógeno hacia leucemia mielógena aguda, son necesarios un diagnóstico y un tratamiento precoces. Sin embargo, convenientemente, solamente hay disponible un análisis de sangre que se puede usar sólo para confirmar el diagnóstico de los trastornos.

[0004] Como la evolución clínica es indolora antes de la transformación leucémica y la hematopoyesis ineficaz, que son los síntomas de que tienen lugar síndromes mielodisplásicos, se sugiere un inicio diferente del involucrado en la leucemia mielógena aguda primaria. Sin embargo, las bases genéticas de estos trastornos no ha sido elucidada completamente. Varias mutaciones genéticas y cambios citogenéticos están involucrados al comienzo, y *RAS*, *TP53*, *RANX1*, *ASXL1*, *c-CBL*, *IDH1/2*, *TET2* y *EZH2* se incluyen en las dianas genéticas en las cuales se encuentra más frecuentemente una mutación en la displasia mielóide. Sin embargo, por ejemplo, dado que no se han encontrado alteraciones genéticas conocidas en aproximadamente el 20 % de los casos, una mutación en este conjunto de genes no explica completamente el comienzo. Se han obtenido revelaciones interesantes para este problema a partir de los resultados de la investigación sobre la haploinsuficiencia en *RPS14* y *miR-145/146* asociada al síndrome 5q. Sin embargo, en particular, no se ha estudiado suficientemente una alteración genética causante de un fenotipo de metaplasia.

[0005] Mientras, el reciente desarrollo de la tecnología de secuenciación paralela masiva ha proporcionado una nueva oportunidad para demostrar una alteración genética a lo largo del genoma entero o las secuencias enteras codificantes de proteínas en el cáncer humano a nivel de nucleótido.

LISTA DE CITAS

Bibliografía no patentada

[0006] Bibliografía no patentada 1: Wahl, M. C., Will, C. L. & Luhrmann, R. The spliceosome design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 136, 701-718 (2009)

Bibliografía no patentada 2: Tronchere, H., Wang, J. & Fu, X. D. A protein related to splicing factor UA2F35 that interests with U2AF56 and SR proteins in splicing of pre-mRNA. *Nature* 388, 397-400 (1997)

Bibliografía no patentada 3: Calvo, S. E., *et al.* High-throughput, pooled sequencing identifies mutations in NUBPL and FOXRED1 in human complex I deficiency. *Nat Genet* 42, 851-858 (2010)

Bibliografía no patentada 4: Bevilacqua, L., *et al.* A population-specific HTR2B stop codon predisposes to severe impulsivity. *Nature* 468, 1061-1066 (2010)

Bibliografía no patentada 5: Chen, M. & Manley, J. L. Mechanisms of alternative splicing regulation insights from molecular and genomic approaches. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 741-754 (2009)

Bibliografía no patentada 6: Subramanian, A., *et al.* Gene set enrichment analysis a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expresión profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 15545-15550 (2005)

5 Bibliografía no patentada 7: Bhuvanagiri, M., Schlitter, A. M, Hentze, M. W. & Kulozik, A. E. NMD RNA biology meets human genetic medicine. *Biochem J* 430, 365-377 (2010)

Bibliografía no patentada 8: Maquat, L. E. Nonsense-mediated mRNA decay splicing, translation and mRNP dynamics. *NatRev Mol Cell Biol* 5, 89-99 (2004)

10 Bibliografía no patentada 9: Shen, H., Zheng, X., Luecke, S. & Green, M.R. The U2AF35-related protein Urp contacts the 3' splice site to promote U12-type intron splicing and the second step of U2-type intron splicing. *Genes Dev* 24, 2389-2394 (2010)

15 RESUMEN DE LA INVENCION

PROBLEMA TÉCNICO

[0007] En consecuencia, un objeto de la presente invención es proporcionar, basado en el diagnóstico genético usando tecnología de secuenciación paralela masiva, un método para evaluar la predisposición a síndromes mielodisplásicos o a un tumor mielógeno, y un polipéptido y un anticuerpo para ello, así como un método de cribaje para un agente terapéutico candidato o un agente profiláctico candidato para síndromes mielodisplásicos o un tumor mielógeno.

25 SOLUCION AL PROBLEMA

[0008] El método para evaluar la predisposición a síndromes mielodisplásicos y a un tumor mielógeno de acuerdo con la presente invención es un método para evaluar si un sujeto tiene predisposición al posible desarrollo de síndromes mielodisplásicos o un tumor mielógeno, comprendiendo el método la etapa de detección de una mutación genética en al menos un gen entre el gen *U2AF35* (también denominado *U2AF1*), el gen *ZRSR2*, el gen *SFRS2* y el gen *SF3B1* usando una muestra que contiene genes humanos del sujeto.

[0009] Aquí, en un caso en que se detecta al menos una de las mutaciones siguientes: una sustitución de S con F o Y en un residuo aminoácido en la posición 34 de una proteína traducida del gen *U2AF35*, una sustitución de Q con R o P en un residuo aminoácido en la posición 157 de la proteína traducida del gen *U2AF35*, cualquier mutación inactivante en una proteína traducida del gen *ZRSR2*, una sustitución de P con H o L o R en un residuo aminoácido en la posición 95 de una proteína traducida del gen *SFRS2*, una sustitución de K con E en un residuo aminoácido en la posición 700, una sustitución de E con D en un residuo aminoácido en la posición 622, una sustitución de H con Q o D en un residuo aminoácido en la posición 662, una sustitución de K con N o T o E o R en un residuo aminoácido en la posición 666 de una proteína traducida del gen *SF3B1*, se evalúa la predisposición de un sujeto al posible desarrollo de síndromes mielodisplásicos o a un tumor mielógeno, y a la inversa, en un caso donde no se detectan, el sujeto puede ser evaluado indirectamente como que no es probable que tenga la predisposición.

45 Para detectar una sustitución de aminoácido descrita arriba, se puede detectar una mutación en un gen correspondiente a la sustitución del aminoácido, o se puede detectar una mutación en una proteína y un polipéptido traducidos del mismo.

50 Debe tenerse en cuenta que como abreviaturas de aminoácidos, S representa Ser (serina), F representa Phe (fenilalanina), Y representa Tyr (tirosina), Q representa Gln (glutamina), R representa Arg (arginina), P representa Pro (prolina), E representa Glu (ácido glutámico), X representa Xaa (desconocido u otros aminoácidos), H representa His (histidina), L representa Leu (leucina), R representa Arg (arginina), K representa Lys (lisina), D representa Asp (ácido aspártico), N representa Asn (asparagina) y T representa Thr (treonina).

[0010] Un polipéptido de acuerdo con la presente invención comprende al menos una porción del gen *U2AF35*, y tiene al menos una de las sustituciones de S con F o Y en un residuo aminoácido en la posición 34 o la sustitución de Q con R o P en un residuo aminoácido en la posición 157, siendo capaz el polipéptido de servir como un marcador para evaluar la predisposición a síndromes mielodisplásicos o a un tumor mielógeno.

[0011] De forma similar, un polipéptido de acuerdo con la presente invención puede comprender al menos una porción del gen *ZRSR2*, y tiene cualquier mutación inactivante de aminoácido, siendo capaz el polipéptido de servir como un marcador para evaluar la predisposición a síndromes mielodisplásicos o a un tumor mielógeno.

[0012] Un polipéptido de acuerdo con la presente invención puede comprender al menos una porción del gen *SFRS2*, y tiene al menos una de las sustituciones de P con H o L o R en un residuo aminoácido en la posición 95, siendo capaz el polipéptido de servir como un marcador para evaluar la predisposición a síndromes mielodisplásicos o a un tumor mielógeno.

[0013] Un polipéptido de acuerdo con la presente invención puede comprender al menos una porción del gen *SF3B1*, y tiene al menos una de las sustituciones de K con E en un residuo aminoácido en la posición 700, una sustitución de E con D en un residuo aminoácido en la posición 622, una sustitución de H con Q o D en un residuo aminoácido en la posición 662, una sustitución de K con N o T o E o R en un residuo aminoácido en la posición 666, siendo capaz el polipéptido de servir como un marcador para evaluar la predisposición a síndromes mielodisplásicos o a un tumor mielógeno.

[0014] Un polipéptido de acuerdo con la presente invención puede comprender una secuencia de aminoácidos en la cual uno o varios aminoácidos han sido eliminados, sustituidos o añadidos en cualquiera de los polipéptidos de arriba, funcionando los polipéptidos como un antígeno contra un anticuerpo, reconociendo el anticuerpo uno de los polipéptidos originales.

[0015] Un anticuerpo de acuerdo con la presente invención está caracterizado por reconocer uno de los polipéptidos anteriores.

[0016] El método de cribaje para un agente terapéutico candidato o un agente profiláctico candidato para síndromes mielodisplásicos y un tumor mielógeno de acuerdo con la presente invención es un método de cribaje para un agente farmacéutico para síndromes mielodisplásicos o un tumor mielógeno, comprendiendo el método las etapas de evaluación de si una sustancia de prueba puede inhibir una expresión o una actividad de una proteína traducida de al menos uno de los genes entre el gen *U2AF35*, el gen *ZRSR2*, el gen *SFRS2* y el gen *SF3B1* usando una muestra que contiene genes humanos del sujeto y seleccionando la sustancia de prueba capaz de inhibir la expresión o la actividad de la proteína traducida de al menos uno de estos genes como una sustancia eficaz para la prevención o el tratamiento de un estado o una enfermedad resultado de síndromes mielodisplásicos o un tumor mielógeno.

EFFECTOS VENTAJOSOS DE LA INVENCION

[0017] La presente invención puede proporcionar un diagnóstico sencillo y preciso para síndromes mielodisplásicos y un tumor mielógeno usando diagnóstico genético, contribuyendo al tratamiento y la prevención precoz. Además, la presente invención también puede ser útil para la clasificación de patologías y la selección de terapias.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

[0018] La Fig. 1 muestra una tabla que indica las mutaciones genéticas que aparecen repetidamente en 32 casos revelados del análisis del exón completo.

La Fig. 2 muestra (a) un diagrama que ilustra la frecuencia de las mutaciones genéticas encontradas en los complejos de empalme E/A y los componentes de los mismos, (b) diagramas que ilustran las mutaciones en múltiples componentes de los complejos de empalme E/A en un tumor mielóide.

La Fig. 3 muestra gráficos indicando (a) frecuencias de genes de la ruta del espliceosoma, (b) distribuciones de los mismos.

La Fig. 4 muestra (a) una fotografía de un análisis Western Blot en el cual se expresó un mutante S34F de *U2AF35*, (b) un gráfico que muestra la activación de la ruta NMD del mismo, (c) un gráfico que muestra los resultados de qPCR del mismo, (d) un gráfico que muestra una expresión de la relación de exones e intrones del mismo, (e) un gráfico que muestra una expresión de la relación de exones e intrones del mismo.

La Fig. 5 muestra (a) una fotografía de un análisis Western Blot en el cual se expresó la inducibilidad por doxíciclin de un mutante y el tipo salvaje de *U2AF35*, (b) gráficos que muestran cambios en el ciclo celular de los mismos, (c) un gráfico que muestra cambios en el ciclo celular de los mismos, (d) un gráfico que muestra la inducción de la apoptosis del mismo, (e) un gráfico que muestra el análisis funcional de un mutante de *U2AF35* del mismo.

DESCRIPCION DE LAS REALIZACIONES

[0019] Abajo, se describen realizaciones de acuerdo con la presente invención. Los documentos de la técnica anterior y las tecnologías convencionalmente conocidas se pueden usar de forma apropiada como ayuda para cambiar diseños de las realizaciones.

[0020] Los presentes inventores han llevado a cabo el análisis somático del exoma celular usando muestras de sangre de 32 casos de pacientes de síndromes mielodisplásicos y personas sanas, y han obtenido evidencias de que hay anomalías en los genes involucrados en el empalme de ARN y que en ellos se producen sustituciones de aminoácidos. Dado que las anomalías genéticas se han encontrado en un 40 % de las muestras de pacientes, las pruebas de las anomalías genéticas pueden identificar si un paciente tiene una anomalía mielóide. Además, como resultado de la investigación de 159 casos de pacientes con síndromes mielodisplásicos, 88 casos de paciente de leucemia mielomonocítica crónica (CMML) y similares, se han encontrado anomalías similares en aproximadamente

el 40 % de ellos. Además, este es el primer caso que puede probar que la anomalía del empalme del ARN puede desencadenar el inicio de una enfermedad.

5 [0021] Los presentes inventores han identificado mutaciones en el gen *U2AF35*, el gen *ZRSR2*, el gen *SFRS2* y el gen *SF3B1* encontrados en pacientes de síndromes mielodisplásicos o un tumor mielógeno.

10 Específicamente, son una sustitución de S con F o Y en un residuo aminoácido en la posición 34 de una proteína traducida del gen *U2AF35*, una sustitución de Q con R o P en un residuo aminoácido en la posición 157 de la proteína traducida del gen *U2AF35*, cualquier mutación inactivante en una proteína traducida del gen *ZRSR2*, una sustitución de P con H o L o R en un residuo aminoácido en la posición 95 de una proteína traducida del gen *SFRS2*, una sustitución de K con E en un residuo aminoácido en la posición 700, una sustitución de E con D en un residuo aminoácido en la posición 622, una sustitución de H con Q o D en un residuo aminoácido en la posición 662, una sustitución de K con N o T o E o R en un residuo aminoácido en la posición 666 de una proteína traducida del gen *SF3B1*. Se debe tener en cuenta que para las mutaciones en el gen *ZRSR2*, las sustituciones de E con X en un residuo aminoácido en posición 362 y similares se mencionan en el Ejemplo, pero incluyen cualquier mutación de inactivación en una proteína traducida.

20 [0022] En un caso en el que se detecta cualquiera de estas, se evalúa la predisposición de un sujeto al posible desarrollo de síndromes mielodisplásicos o un tumor mielógeno, y a la inversa, en un caso en el que no se detecta, el sujeto puede evaluarse indirectamente como que no es probable que tenga la predisposición.

[0023] Un polipéptido con cualquiera de las mutaciones genéticas anteriores se puede usar como marcador para evaluar la predisposición a síndromes mielodisplásicos o un tumor mielógeno.

25 Debe tenerse en cuenta que un polipéptido se refiere a una sustancia en la cual dos o varios residuos aminoácido se conectan vía enlace peptídico, incluyendo péptidos relativamente cortos o los denominados oligopéptidos y cadenas largas denominadas proteínas. Cuando se produce un anticuerpo para la detección de un polipéptido, el polipéptido puede comprender un residuo aminoácido diferente de los 20 residuos aminoácido codificados genéticamente o un residuo aminoácido modificado. Las modificaciones en ellos incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, biotilación, enlace covalente con un lípido y un derivado de lípido, formación de enlaces cruzados, un enlace disulfuro, adición de una cadena de carbohidratos, adición de un anclaje GPI, fosforilación, prenilación y similares en una cadena principal con un enlace peptídico, una cadena lateral de aminoácido, un amino terminal y un carboxilo terminal.

30 [0024] El polipéptido de acuerdo con la presente invención puede comprender también una o varias deleciones, sustituciones, adiciones de aminoácidos además de las sustituciones de aminoácidos en los productos génicos anteriores, mientras pueda servir como antígeno contra un anticuerpo que reconoce el polipéptido. Estas mutaciones se pueden incluir en una porción diferente al epítipo que es reconocido por un anticuerpo.

35 [0025] Estos polipéptidos se pueden preparar mediante la preparación directa de los péptidos por síntesis química. Además, también se pueden preparar mediante producción de polinucleótidos que codifican éstos mediante el método de mutagénesis dirigida al sitio y similares, y después su expresión en un sistema apropiado.

40 [0025] Estos polipéptidos se pueden preparar aislándolos de una muestra como células sanguíneas, tomada de un paciente de síndromes mielodisplásicos o un tumor mielógeno en un caso en el que los polipéptidos se incluyen como productos génicos de polinucleótidos en la muestra; sintetizándolos químicamente en base a la información de secuencias de aminoácidos incluyendo los correspondientes residuos aminoácido mutados; transformando las células huésped apropiadas mediante la tecnología de ADN recombinante usando vectores apropiados que contienen polinucleótidos y similares, y produciéndolos en las células transformadas; y similares.

45 [0026] Además, un polinucleótido se puede aislar mediante cribaje de una biblioteca de ADNc preparada a partir del ARNm total en una muestra tomada de un paciente de síndromes mielodisplásicos o un tumor mielógeno usando un polinucleótido correspondiente como sonda. Además, se puede preparar un polinucleótido introduciendo una mutación de base en al ADNc del gen de tipo salvaje basado en mutagénesis dirigida al sitio usando un sistema de mutación disponible comercialmente y similares.

50 [0027] Dicho polinucleótido se puede amplificar mediante el método PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), el método RT-PCR, el método NASBA (Amplificación basada en secuencia de ácidos nucleicos), el método TMA (Amplificación mediada por transcripción), el método SDA (Amplificación con desplazamiento de hebras) y similares usando, por ejemplo, ADN o ARNm genómico preparado a partir de una muestra como células sanguíneas obtenidas de un paciente de síndromes mielodisplásicos o un tumor mielógeno como una plantilla, y usando primers apropiados.

55 [0028] Un anticuerpo de acuerdo con la presente invención se caracteriza por el reconocimiento específico de cualquiera de los polipéptidos anteriores. El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal. No está limitado a un anticuerpo con la estructura original intacta, y pueden ser varios derivados del anticuerpo intacto,

tales como fragmentos, mientras se mantenga una actividad de enlace. Estos anticuerpos son útiles como componentes para un sistema de detección usado para un método de detección de un gen mutado.

5 El anticuerpo puede producirse usando un polipéptido o un complejo del polipéptido y un adyuvante apropiado, como un inmunógeno. Por ejemplo, se puede obtener un anticuerpo policlonal a partir de suero sanguíneo tras la inmunización de un animal con un inmunógeno.

10 [0029] Un anticuerpo puede detectarse, por ejemplo, usando reacciones inmunológicamente específicas, como EIA y ELISA en las cuales se usa el anticuerpo de acuerdo con la presente invención; mediante secuenciación de aminoácidos de un polipéptido como un secuenciador en fase gas usando el método Edman; mediante espectrometría de masas como el método MALDI-TOF/MS y el método ESIQ-TOF/MS.

EJEMPLOS

15 [0030] La secuenciación del exoma completo de ADN derivado de médula ósea se llevó a cabo en 32 pacientes que padecían síndromes mielodisplásicos o un tumor mielode relacionado, utilizando células T positivas CD3 apareadas o mucosa oral como un control de célula germinal. El enfoque del exoma completo es un método bien establecido, barato y de alta eficacia para la obtención de un registro completo de mutaciones en códigos de proteína, aunque las mutaciones no codificantes y las reordenaciones de genes son indetectables. En promedio, el 79 % de las secuencias diana fueron analizadas con una profundidad de más de 20 plegamientos. Todos los candidatos (N = 509) para una mutación de nucleótido único no sinonímica (SNV) y una pequeña inserción/eliminación (indel) fueron revisados exhaustivamente mediante la utilización del método de secuenciación de Sanger. Finalmente, se encontraron 248 mutaciones somáticas (7,8 por muestra) incluyendo 191 mutaciones de cambio de sentido, 24 mutaciones sin sentido, 9 mutaciones de sitio de unión y 24 indels inducidos por desplazamiento del marco de lectura. Junto con un perfil del número de copias del genoma obtenido del análisis cariotípico de la matriz SNP, se obtuvo una visión general del genoma de displasia mielode mediante esta matriz de mutación somática.

30 [0031] Un conjunto de muestras sin sesgo de los genes mutados incluyendo la mayoría de las dianas genéticas frecuentemente observadas en la displasia mielode se utilizó junto con un perfil típico del número de copias del genoma. Tal y como se esperaba las mutaciones en las dianas genéticas conocidas sólo llegaban al 13,3 % de todas las mutaciones detectadas (N = 33) y las restantes 215 mutaciones se encontraron en genes donde previamente no se había detectado una mutación para estos tumores. De todos modos, no fue fácil distinguir un evento conductor de un evento pasajero en el último caso. En muchos casos, una mutación sin sentido o de desplazamiento de marco de lectura es más probable que impida la función de la proteína, y una diana de la misma sea buena candidata para un gen supresor de tumores. Adicionalmente, la inclusión de rutas genéticas comunes que han estado implicadas en la displasia mielode hasta la fecha podrían apoyar que no son eventos pasajeros, sino que pueden jugar un rol causal.

40 [0032] Por lo tanto, las mutaciones en los genes relacionados con la ruta TP53 (*DAPK1*, *TP53BP1*) y los genes involucrados en la regulación de cromatina (*PHF6*, *DOT1-L*, *PHF8*) son candidatos razonables para mutaciones conductoras. Por ejemplo, existe un informe en el que un ratón deficiente en *Dot1-L* desarrolló anemia severa debido a una producción defectuosa de eritrocitos en la médula ósea. Mutaciones congénitas sin sentido en *PHF6* (Xq26.3) y *PMF8* (Xp11.2) son responsables del síndrome de retraso mental ligado a X. *PHF8* es miembro de la familia de proteínas enzimas de desmetilación de histonas que están ampliamente aceptadas como dianas de mutación frecuentemente observadas en cánceres humanos incluyendo la displasia mielode mientras que las mutaciones de pérdida de función en *PHF6* han sido descritas en cerca del 30 % de leucemias linfoblásticas agudas de células T (TODAS).

50 [0033] Adicionalmente, en la serie de casos extendida del Ejemplo, se identificaron 11 mutaciones en *PHF6* en 10 de los 164 casos de displasia mielode. Por otro lado, había una posibilidad de que las mutaciones observadas en múltiples casos pudieran ser mutaciones conductoras interesantes dado que era posible que estuvieran presentes frecuentemente en la displasia mielode. De hecho, 9 de cada 12 genes en los que ocurren mutaciones frecuentemente fueron incluidos en la diana conocida más frecuente, y estaban involucrados en una ruta genética de importancia crítica en la displasia mielode.

55 [0034] Los 3 genes restantes (*URAF1*, *ZRSR2*, *SFRS2*) no han sido descritos hasta la fecha, y han pertenecido a la ruta común conocida como maquinaria de empalme de ARN, p. ej. el espliceosoma. Las mutaciones genéticas que aparecen repetidamente en los 32 casos revelados mediante el análisis del exón completo se muestran en una tabla de la Fig. 1.

60 Destacablemente, cuando 3 genes (*SF3A1*, *SF3B1*, *PRPF40B*), que mostraron una mutación en un caso único, se incluyeron adicionalmente se encontraron mutaciones mutuamente excluyentes en 6 componentes de la maquinaria de empalme en 15 de 32 casos (47 %).

[0035] La Fig. 2 (a) muestra un diagrama ilustrando la frecuencia de las mutaciones genéticas observadas en los complejos de empalme E/A y componentes de los mismos. Las flechas indican los componentes mutados identificados por la secuenciación del exoma completo.

5 En las primeras etapas del empalme de ARN, al mismo tiempo que es reclutada U1 snRNP al 5'SS de Pre-ARNm durante la transcripción, SF1 y una subunidad más grande U2AF2 del factor auxiliar U2 (U2AF) se unen a la secuencia del punto de ramificación (BPS) y a la región de polipirimidina descendente del mismo. Una subunidad más pequeña (U2AF35) de U2AF se une al dinucleótido AG en el extremo 3'SS, e interacciona con las dos proteínas U2AF2 y SF (por ejemplo, SFRS2 (sc35)) a través de su dominio UHD y SR, respectivamente, para formar un complejo de empalme inmediato-temprano (complejo E). ZRSR2, p. ej., Urp también interacciona con U2AF y una proteína SR para jugar un rol esencial en el empalme de ARN. Después del reconocimiento de 3'SS por estos factores, U2 snRNP del complejo multicomponente proteína/ARNs comprendiendo SF3A1 y SF3B1 es reclutado en 3'SS para formar el complejo de empalme A.

15 En la displasia mieloide, múltiples componentes de estos complejos de empalme están afectados por mutaciones genéticas, resultando en ejemplos nuevos y notables de mutaciones de ruta en cánceres humanos.

[0036] La mayoría de secuencias codificantes (exones) de genes de metazoos están separadas por secuencias interpuestas no codificantes (intrones) que es necesario eliminar del Pre-ARNm antes de que se produzca el ARNm mediante un proceso denominado empalme de ARN. Dicha funcionalidad se consigue de esta forma: un conjunto de ribonucleoproteínas nucleares de pequeñas moléculas (snRNP), complejos (U1, U2, U4/5/6, U11/12) y muchos otros componentes proteicos son reclutados en el Pre-ARNm de una forma controlada, se reorganizan allí y se liberan entonces de tal forma que los límites exón-intrón son reconocidos. Posteriormente ocurren dos transesterificaciones: la primera entre un sitio de empalme 5' (5'SS) y la secuencia del punto de ramificación (BPS) y entonces entre 5'SS y 3'SS tal que el intrón enlazado se escinde para dejar un exón conectado.

[0037] Un punto que debe ser resaltado en relación con esto es un hecho que todos los componentes mutados de espliceosomas, excepto PRPF40B cuya función en el empalme de ARN no ha sido elucidada, están involucrados en las etapas iniciales del empalme de ARN. SF1, y el factor auxiliar de U2 (U2AF) comprendiendo el heterodímero U2AF2/U2AF35 formado mediante la interacción física con una proteína SR como SFRS1 o SFRS2 (sc35), están involucrados en el reconocimiento de 3'SS y la región polipirimidina adyacente. Se cree que esto es necesario para posteriormente reclutar U2 snRNP comprendiendo SF3A1 y SF3B1 para establecer el complejo de empalme A (Bibliografía no patentada 1).

[0038] Mientras tanto, ZRSR2 también conocido como Urp (una proteína relacionada con U2AF35) es otro componente esencial de la maquinaria de empalme. ZRSR2, que posee una estructura muy similar a U2AF35 y también interacciona físicamente con U2AF2 así como con SFRS1 y SFRS2, juega un papel muy diferente de su homólogo U2AF35 (Bibliografía no patentada 2).

[0039] Para confirmar y ampliar los descubrimientos iniciales desde la secuenciación del exoma completo, los 6 genes anteriores en muchos tumores mieloides (N = 582), y adicionalmente 3 genes relacionados con el espliceosoma incluyendo *U2AF65*, *SF1* y *SRSF1*, se investigaron para mutaciones mediante la aplicación de un examen sistemático de mutaciones de alta eficacia sobre el conjunto de ADN y, a continuación, confirmando/identificando mutaciones candidatas (Bibliografía no patentada 3 y 4).

Como resultado se identificaron un total de 219 mutaciones en 209 de 582 tumores mieloides mediante el examen de 313 eventos positivos tentativos del cribaje del conjunto de ADN. Las mutaciones en cuatro genes, *U2AF35* (N = 37), *SRSF2* (N = 56), *ZRSR2* (N = 23) y *SF3B1* (N = 79) formaron la mayoría de mutaciones, y las tasas de mutación en *SF3A1* (N = 8), *PRPF40B* (N = 7), *U2AF65* (N = 4) y *SF1* (N = 5) fueron mucho más bajas.

[0040] La Fig. 2 (b) muestra los diagramas que ilustran las mutaciones en los múltiples componentes de los complejos E/A de empalme en los tumores mieloides. Las flechas indican las mutaciones en 6 componentes del espliceosoma de los complejos de empalme E/A, mientras que los cuadrados indican dominios de la estructura conocidos.

Las mutaciones en *U2AF35* y *SFRS2* (así como *SF3B1* en algunos casos) están involucradas en diferentes lugares críticos, mientras que las mutaciones en *ZRSR2* están ampliamente distribuidas a lo largo de toda su longitud, y la mayor parte de ellas son mutaciones sin sentido que son responsables del truncamiento temprano de una proteína o mutaciones del sitio de empalme, p. ej., indels.

[0041] La Fig. 3 (a) muestra las frecuencias de las mutaciones en la ruta del espliceosoma en 513 casos de tumores mieloides incluyendo los 32 primeros casos analizados en el estudio del exoma completo. Las frecuencias se muestran por cada tipo de tumor, es decir, MDS, CMML, AML/MDS (incluyendo tanto AML con cambios relacionados con la displasia mieloide, como AML relacionada con tratamiento), AML primario y un tumor mieloproliferativo (MPN).

Las mutaciones en la maquinaria de empalme fueron muy específicas para enfermedades que muestran características de la displasia mieloide tales como MDS con un incremento de sideroblastos en anillo (84,9 %) o MDS sin incremento de sideroblastos en anillo (43,9 %), leucemia mielomonocítica crónica (CMML) (54,5 %) y AML relacionada con tratamiento o AML con cambios relacionados con displasia mieloide (25,8 %), pero fueron raras en AML primaria (6,6 %) y un tumor mieloproliferativo (MPN) (9,4 %). Además, sorprendentemente, para la anemia refractaria con sideroblastos en anillo (RARS) y la anemia refractaria con displasia multilineaje con sideroblastos en anillo (RCMD-RS), se encontraron muchas mutaciones en *SF3B1*, mostrando 82,6 % y 76 % respectivamente.

[0042] La Fig. 3(b) muestra las distribuciones de dos o más mutaciones de rutas de espliceosomas para estos ocho genes. El diagnóstico para cada uno de los pacientes se muestra en la fila superior.

Se observaron patrones de mutación mutuamente excluyentes en estos genes de la ruta de empalme en los casos de series largas, sugiriendo que mutaciones diferentes en genes que regulan el empalme acaban en un resultado común.

[0043] Mientras tanto, las frecuencias de las mutaciones mostraron diferencias significativas en todos los tipos de enfermedades. Sorprendentemente, Las mutaciones en *SF3B1* fueron encontradas en su mayor parte en los casos de MDS caracterizados por el incremento de sideroblastos en anillo, p. ej., anemia refractaria con sideroblastos en anillo (RARS) (19/23, es decir, 82,6 %) y anemia refractaria con displasia multilineaje con sideroblastos en anillo ($\geq 15\%$)(RCMD-RS)(38/50, es decir, 76 %) mientras que la frecuencia de mutación en otros tumores mieloides fue mucho menor. RARS y RCMD-RS representan el 4,3 % y el 12,9 % de los casos de MDS, respectivamente. En estos desordenes, el metabolismo incontrolado del hierro aparenta ser el responsable de la anemia refractaria. Dado que la frecuencia y la especificidad de la mutación fueron muy altas, tal y como se ha descrito anteriormente, las mutaciones de *SF3B1* fueron virtualmente patognomónicas para estos subtipos de MDS que están caracterizados por el incremento de sideroblastos en anillo, sugiriendo que están altamente involucrados en el principio de MDS de estas categorías. La frecuencia de mutaciones de *SRSF2* fue significativamente mayor en los casos de CMML aunque no fue muy sorprendente.

Por tanto, diferentes mutaciones tienen un efecto común en el complejo E/A de empalme, mientras que también podrían tener un efecto diferente en funciones celulares, contribuyendo a la determinación de un fenotipo individual de enfermedad. Por ejemplo, se ha mostrado que *SRSF2* también está involucrado en la regulación de la estabilidad del ADN y que la disminución en *SRSF2* puede resultar en mayor frecuencia de mutaciones del ADN. A este respecto, de forma interesante, se mostró que una muestra con una mutación en *SRSF2* contenía significativamente más mutaciones en otros genes en comparación con las mutaciones de *U2AF35* independientemente de los subtipos de enfermedad ($p = 0,001$, análisis por regresión lineal múltiple).

[0044] Notablemente, suponiendo que A26V en un caso es una rara excepción, las mutaciones de *U2AF35* se encontraron principalmente en dos posiciones de aminoácido altamente conservadas (S34 o Q157) dentro de los patrones de dedos de zinc en el extremo N-terminal y el extremo C-terminal adyacentes al dominio de UHM. Las mutaciones de *SRSF2* se encontraron principalmente en P95 dentro de una secuencia interviniente entre el dominio RPM y el dominio RS. Similarmente, las mutaciones de *SF3B1* se encontraron mayoritariamente en K700E, y en menor medida se encontraron en K666, H662 y E622, las cuales se conservan entre especies.

Aunque la aparición frecuente de localizaciones de aminoácidos encontrados en estos genes de espliceosomas sugiere fuertemente que estas mutaciones tienen una propiedad de ganancia de función, este es un escenario ampliamente probado incluso para otras mutaciones oncogénicas incluyendo mutaciones *RAS* encontradas en los codones 12, 13 y 61 así como para V617F, la mutación *JAK2*, V600E, la mutación *BRAF* y la encontrada recientemente Y641, la mutación *EZH2*.

[0045] Por otro lado, 23 mutaciones en *ZRSR2* (Xp22.1) estaban ampliamente distribuidas a lo largo de toda la región codificadora (Fig. 2(b)). Entre estas, 14 mutaciones eran sin sentido o de desplazamiento del marco de lectura, o se encontraron en los sitios dador/aceptor para empalme, las cuales pueden ser responsables del truncamiento temprano o de un gran cambio estructural de una proteína que lleva a la pérdida de función. Junto con el hecho de que las mutaciones están fuertemente sesgada en los varones (14/14), *ZRSR2* tiene probablemente una función como gen supresor tumoral mediante un mecanismo de acción genético recesivo ligado a X. Las restantes 9 mutaciones de *ZRSR2*, las cuales eran mutaciones de cambio de sentido, estaban ligadas tanto en varones (6 casos) como en hembras (3 casos) mientras que aquellas originadas de células somáticas sólo se encontraron en dos casos.

De todos modos, estos nucleótidos de cambio de sentido no estaban incluidos ni en la base de datos dbSNP (Constructos 131 y 132) ni en la base de datos de 1000 genomas humanos (llamada de snp de mayo de 2011). Esto sugiere que muchas de estas SNV de cambio de sentido, sino todas, representan probablemente mutaciones somáticas funcionales encontradas particularmente en varones. Aunque estos sitios preferentes de mutación en *U2AF35* y *SRSF2* fueron investigados, las mutaciones no se encontraron en TODOS ($N = 24$) o en tumores linfoides como el linfoma no Hodgkin ($N = 87$).

[0046] Todas las mutaciones genéticas son específicas de MDS, y la frecuencia de mutación es baja en otras enfermedades, especialmente en tumores mieloides. Algunos casos de AML incluyen aquellos que han progresado desde MDS, pero la frecuencia de mutación en estos grupos de genes es significativamente más alta que en los casos de AML nuevo (*de novo* AML). Esto también es eficaz para distinguir AML de AML derivado de MDS.

En RARS particularmente, la tasa de mutación es alta en el gen *SF3B1*, y estas mutaciones genéticas son determinantes esenciales de esta enfermedad. Se ha mostrado estadísticamente que un grupo con una mutación en el gen *SRSF2* presenta a menudo una mutación en otros genes. La frecuencia de ocurrencia de las mutaciones del gen *SRSF2* es también característica de CMML.

Un grupo de enfermedades clasificado como RCMD de acuerdo con la clasificación actual de WHO, se puede dividir en dos grupos dependiendo de la presencia de mutaciones en los genes *SF3B1*, *SRSF2*. El pronóstico de un grupo con estas mutaciones puede ser mejor que el de un grupo sin mutación. Por tanto, esto es útil para la predicción de un pronóstico.

[0047] Las mutaciones del espliceosoma en la displasia mieloide afectaron ampliamente los componentes principales de los complejos de empalme E/A de forma mutuamente exclusiva. Esto sugiere lógicamente que las dianas funcionales comunes de estas mutaciones son el reconocimiento exacto de un límite exón-intrón, y el posterior reclutamiento de U2 snRNP al pre-ARNm mediante estos complejos (Bibliografía no patentada 1, 5).

Para poder entender esto y obtener un entendimiento de los efectos biológicos/bioquímicos resultantes de estas mutaciones de empalme, el tipo salvaje *U2AF35* y el mutante (S34F) *U2AF35* se expresaron en células HeLa mediante el método de transferencia genética con retrovirus utilizando EGFP como marcador.

Fig. 4 (a) muestra una fotografía del análisis por Western Blot. Se muestra la expresión del tipo salvaje *U2AF35* o el mutante (S34F) *U2AF35* introducido en las células HeLa, se utilizaron células TF-1 para el análisis de la expresión genética.

[0048] Se recogieron células positivas GFP 48 horas después de la transferencia genética. Después se analizaron los perfiles de expresión genética de las células introducidas del mutante *U2AF35* y del tipo salvaje utilizando análisis matricial GeneChip® human genome U133 plus 2.0 y análisis de enriquecimiento funcional de genes (GSEA). Se llevó a cabo posteriormente el análisis de enriquecimiento funcional (GSEA) (Bibliografía no patentada 6).

[0049] En el presente GSEA, todos los genes expresados se ordenaron primero en orden descendente de las diferencias de expresión genética entre las células introducidas del tipo salvaje *U2AF35* y las del mutante *U2AF35*. A continuación se investigó un conjunto de genes enriquecido *in situ*. Los resultados iniciales de GSEA revelaron múltiples conjuntos de genes enriquecidos en las células introducidas mutantes *U2AF35*. Entre estos, fue particularmente interesante el conjunto de genes involucrados en la exportación de ARN nuclear ($P = 0,012$). Esto es porque se incluyeron una serie de genes ($N = 6$) involucrados en el decaimiento de ARNm mediado por mutaciones sin sentido (NMD) en el conjunto de genes, todos los cuales estaban involucrados en el enriquecimiento del núcleo.

[0050] La Fig. 4 (b) muestra un gráfico ilustrando la activación de la ruta NMD resultante de un mutante *U2AF35*, y muestra los resultados desde el GSEA inicial utilizando un conjunto de genes de símbolo c5.bp.v2.5. (the Gene Ontology). Se muestra un enriquecimiento significativo de un conjunto de genes de una exportación de ARN nuclear en las células HeLa con el mutante *U2AF35* introducido comparadas con las células HeLa con *U2AF35* de tipo salvaje.

En la siguiente etapa, se seleccionaron los genes relacionados con NMD a partir de un conjunto de genes exportado de ARN nuclear para obtener genes adicionales relacionados con NMD, lo cual proporcionó un conjunto de genes más completo de la ruta NMD. Se muestra un enriquecimiento más significativo en el conjunto de genes de NMD. Se muestra un enriquecimiento más completo del conjunto de genes de NMD en las células HeLa con el mutante *U2AF35* introducido. La importancia del conjunto de genes se determinó experimentalmente mediante la reordenación del conjunto de 1000 genes.

[0051] Ciertamente, este enriquecimiento se volvió más importante incluso cuando se llevó a cabo GSEA en el cual se incluyó un conjunto de genes de NMD más completo ($P = 0,0026$) (Bibliografía no patentada 7). Los datos de expresión en micromatriz fueron confirmados mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).

La Fig. 4(c) muestra los resultados de la qPCR. Se obtuvieron los resultados en micromatriz de la expresión de 9 genes que contribuyen al enriquecimiento del núcleo del conjunto de genes de NMD. Después de normalizar contra la expresión promedio (+ S. E.) en las células HeLa con el tipo salvaje *U2AF35* introducido, se representó gráficamente la expresión promedio (+ S. E.) de los genes de NMD pseudo introducidos en células HeLa, del tipo salvaje *U2AF35* introducido en células HeLa y del mutante *U2AF35* introducido en células HeLa. Los valores P se determinaron mediante pruebas U de Mann-Whitney.

[0052] Se observó también un enriquecimiento similar en el perfil de expresión genética de S34F mutante introducido en TF-1 (una línea celular derivada de síndromes mielodisplásico en la cual no se conoce mutación de espliceosoma).

5 Los resultados del GSEA del mutante de *U2AF35* introducido en las células TF-1 mostraron que el conjunto de genes de la ruta NMD fueron enriquecidos en células con *U2AF35* introducido.

[0053] Dado que la ruta NMD es conocida como un mecanismo de control de calidad de ARNm, proporciona un mecanismo de transcripción donde un producto de transcripción anormal que termina la traslación prematuramente es reconocido y eliminado (Bibliografía no patentada 8), los resultados de GSEA sugieren fuertemente que tiene lugar una transcripción anormal, la cual produce probablemente una especie de ARN que no se empalma, para inducir una actividad NMD en las células con mutante *U2AF35* introducido.

[0054] Para confirmar esto, se utilizó una matriz GeneChip® human exon 1.0 ST (Affymetrix Inc.) para realizar el análisis de transcriptoma total de estas células. En el análisis, dos conjuntos de sondas separadas mostrando diferentes niveles de evidencia de que son exones, es decir, se monitorizaron individualmente los comportamientos del conjunto "núcleo" (exón verdadero) y del conjunto "no-núcleo" (más probablemente intrón). Los resultados mostraron que las sondas del conjunto núcleo y las sondas del conjunto no-núcleo se enriquecieron diferentemente en las sondas mostrando diferencias significativas de expresión entre las células con el tipo salvaje introducido y las células con el mutante introducido (FDR = 0,01). Las sondas del conjunto núcleo se enriquecieron en sondas significativamente infrarreguladas en las células con el mutante *U2AF35* introducido comparadas con las células con el tipo salvaje *U2AF35* introducido mientras las sondas del conjunto no-núcleo estuvieron significativamente enriquecidas en sondas significativamente sobrerreguladas en las células con el mutante *U2AF35* introducido. Incluso cuando se incluyeron todos los conjuntos de sondas, se encontraron enriquecimientos significativamente diferentes.

25 Adicionalmente, las sondas del conjunto núcleo que mostró expresión diferencial significativa tendían a estar sobrerreguladas e infrarreguladas en las células con el tipo salvaje *U2AF35* introducido y las células con el mutante *U2AF35* introducido, respectivamente, en comparación con las células pseudo introducidas, pero las sondas del conjunto no-núcleo que mostraron expresión diferencial también presentaron esta misma tendencia.

30 Esto es, que estos resultados de la matriz de exones sugirieron que el tipo salvaje *U2AF35* promovió correctamente el empalme de ARN verdadero, mientras que el mutante *U2AF35* probablemente inhibió este proceso para producir un no-núcleo, resultando en una secuencia de intrón abandonada sin empalmar.

[0055] Para confirmar los resultados del análisis de la matriz de exones y para conseguir mostrar una evidencia más directa del empalme anormal en las células con mutante introducido, se llevó a cabo análisis de secuenciación para el ARNm extraído de células HeLa en las cuales las expresiones del tipo salvaje *U2AF35* y el mutante (S34F) *U2AF35* se indujeron mediante doxiciclina. El enriquecimiento diferencial de los conjuntos de sondas se reprodujo entre las dos muestra de HeLa mediante el conteo directo de las lecturas respectivas de las sondas del conjunto núcleo y las sondas del conjunto no-núcleo.

40 El empalme anormal en las células con el mutante *U2AF35* introducido quedó más directamente probado mediante la evaluación de los conteos de lectura en varios segmentos, es decir, exones, intrones y regiones intergénicas así como regiones de conexión exón/intrón. Primero, después de ajustar contra las lecturas del mapeado total, las células con el tipo salvaje *U2AF35* introducido mostraron lecturas con incremento en segmentos de exón, pero lecturas reducidas en otros segmentos en comparación con las células con el mutante *U2AF35* introducido. Las lecturas de las células con el mutante introducido fueron mapeadas más ampliamente a lo largo de toda la región genómica en comparación con las células con el tipo salvaje *U2AF35* introducido, lo que podría apenas ser explicado por las lecturas de los no-exones.

[0056] Las Fig. 4 (d) y (e) muestran los resultados de los estudio en los que el tipo salvaje (normal) *U2AF35* y el mutante *U2AF35* fueron expresado en células HeLa, y se llevó a cabo la secuenciación del ARN para comparar el tipo salvaje con el mutante para investigar una tasa de expresión de exones e intrones. En la Fig. 4 (e) se muestran exones, intrones y similares en los genomas de las células respectivas en las cuales se introdujo el gen de tipo salvaje o el mutante.

50 En un caso donde se introdujo el gen de tipo salvaje, se observaron muchos exones pero casi ningún intrón. En contraste, en un caso donde se introdujo el gen mutante, se observaron muchos intrones pero casi ningún exón.

[0057] Adicionalmente, cuando se incluyeron las regiones de conexión exón/intrón, el número de lecturas se incrementó significativamente en las células con el mutante *U2AF35* introducido en comparación con las células con el tipo salvaje introducido. Estos resultados mostraron claramente que el fallo en el empalme ocurrió ubicuamente en las células con el mutante *U2AF35* introducido.

[0058] A continuación, se estudiaron los efectos de un trastorno funcional del complejo de empalme E/A debido a una mutación genética en un fenotipo de una célula hematopoyética. Primero, se introdujeron constructos de lentivirus en células TF-1 y en células HeLa, los cuales expresan el mutante S34F *U2AF35* y el tipo salvaje *U2AF35* bajo control

de un promotor inducible mediante tetraciclina. Después de inducir su expresión, se estudiaron los efectos del mutante *U2AF35* en la proliferación celular.

5 La Fig. 5(a) muestra un fotografía del análisis de Western Blot. Muestra la expresión inducible por doxiciclina del mutante (S34F) y del tipo salvaje *U2AF35* en las células HeLa y las células TF-1 después de 72 horas de la inducción.

[0059] Inesperadamente, después de inducir la expresión del gen con doxiciclina, las células con el mutante *U2AF35* introducido mostraron una reducción de la proliferación celular, la cual no se observó en las células con el tipo salvaje *U2AF35* introducido.

10 Cuando se examinó el análisis funcional del mutante *U2AF35*, los ensayos de proliferación celular de las células HeLa y las células TF-1 mostraron que el crecimiento se suprimió significativamente después de inducir la expresión de *U2AF35* en las células con el mutante *U2AF35* introducido, pero no en las células con el tipo salvaje *U2AF35* introducido.

15 [0060] Para confirmar estos resultados observados en células de cultivo primario, se introdujeron constructos de mutante (S34F, Q157P, Q157R) o bien un constructo de tipo salvaje *U2AF35* y un pseudo-constructo cada uno de ellos con un marcador EGFP, en una población de células madre hematopoyéticas altamente purificadas (CD34⁺ c-Kit⁺ Scal⁺ Lin⁻, CD34⁺KSL) preparadas a partir de médula ósea de un ratón C57BL/6 (B6)-Ly5.1

20 A continuación, se estudió la capacidad de reconstitución de la médula ósea de estas células transferidas genéticamente mediante un ensayo de reconstitución competitiva de médula ósea. Después de mezclar con células de médula ósea totales de un ratón B6-Ly5.1/5.2, las células transferidas genéticamente fueron trasplantadas a un recipiente B6-Ly5.2 el cual había recibido una dosis letal de radiación. Seis semanas más tarde se evaluó mediante citometría de flujo el quimerismo sanguíneo periférico originado por las células positivas GFP.

25 La evaluación de EGFP % en las células con transferencia genética y la proliferación global mediante estudios de seguimiento *ex vivo*, confirmó que cada ratón recipiente había recibido un número similar de células con GFP positivo entre varios grupos de retrovirus.

30 [0061] La Fig. 5 (b) y (c) muestra gráficos ilustrando como el tipo salvaje (normal) del gen *U2AF35* expresado en células HeLa afecta a los ciclos celulares. Cuando se expresa el gen mutado, se ha encontrado que muchas células están atrofiadas en G2/M. Además, en un caso donde se expresa el tipo salvaje del gen *U2AF35* se observan ciclos celulares similares incluso cuando se compara con el grupo de control en el cual no se expresa ninguno de estos genes. Esto sugiere que los ciclos celulares están atrofiados únicamente en G2/M en aquellos donde los genes mutados son expresados.

35 [0062] La Fig. 5(d) muestra un gráfico ilustrando que la expresión del tipo salvaje (normal) y el mutante *U2AF35* en células HeLa ha inducido apoptosis. La inducción de apoptosis se detecta utilizando anexyn V positivo y 7AAD negativo como indicadores. Se encontró que el único grupo en el cual se expresó el gen mutado presentó apoptosis.

40 [0063] La Fig. 5(e) muestra los resultados del ensayo de reconstitución competitiva de médula ósea de las células CD34⁺KSL a las cuales se introdujo uno de los 3 mutantes de *U2AF35*, en comparación con las células pseudo introducidas y las células con el tipo salvaje de *U2AF35* introducido. Una línea horizontal y una línea vertical muestran el promedio y la desviación estándar de los resultados obtenidos de 5 ratones, respectivamente. Los valores atípicos se excluyeron del análisis mediante el test de Grubbs. La importancia de las diferencias se determinó mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni. El eje vertical muestra el % de células Ly5.1 positivas con GFP en sangre periférica después de 6 semanas desde el trasplante.

45 50 Las células con el tipo salvaje *U2AF35* introducido mostraron una habilidad de reconstrucción de médula ósea ligeramente mayor que las células pseudo introducidas. En contraste, los recipientes de las células a las cuales se introdujo uno de los mutantes de *U2AF35* mostraron un quimerismo celular GFP⁺ menor que aquellas que recibieron células pseudo introducidas o células con tipo salvaje *U2AF35* introducido, mostrando que estaba dañada la habilidad de reconstrucción de médula ósea de las células madre/precursoras hematopoyéticas en las cuales se expresó el mutante *U2AF35*. Los comportamientos opuestos del constructo de tipo salvaje *U2AF35* y el constructo mutante *U2AF35* también sugirieron que estos mutantes causaron la pérdida de función de *U2AF35* probablemente mediante un efecto negativo dominante contra la proteína del tipo salvaje.

55 60 [0064] Los estudios de secuenciación del exoma completo descritos anteriormente han revelado la complejidad de las nuevas mutaciones de la ruta encontradas en alrededor del 40 al 60 % de los pacientes de displasia mieloide, las cuales afectan a múltiples componentes diferentes de la maquinaria de empalme (los complejos de empalme E/A).

65 El sistema de empalme de ARN es una característica única de las especies de metazoos. En este sistema, una secuencia codificante se prepara como múltiples fragmentos que están localizados separadamente en el genoma de ADN. Después de la transcripción, las secuencias intervinientes son eliminadas para reconectarlas, creando una copia

funcional de ARNm (Bibliografía no patentada 1). Esto parece un proceso tedioso o costoso. Sin embargo, las principales fuentes de proteína se obtienen de este modo, y la diversidad funcional se obtiene mediante empalme alternativo a pesar del número limitado de genes (Bibliografía no patentada 5).

5 Por lo tanto, si la integridad del transcriptoma completo está asegurada mediante el ajuste sofisticado de tan complicado proceso utilizando la maquinaria del espliceosoma, ciertamente se ha de pagar un precio a cambio. El empalme anormal de ARN, es decir, el empalme alternativo específico del cáncer, está implicado en el desarrollo de cánceres humanos incluyendo síndromes mielodisplásicos y otros tumores hematopoyéticos, aunque el mecanismo exacto del mismo no ha sido elucidado.

10 [0065] Considerando que la presente secuenciación del exoma parece tener suficiente rango y sensibilidad para detectar otros componentes del espliceosoma, es seguro decir que no se afectaron otros componentes del espliceosoma aunque las mutaciones del espliceosoma fueron amplias y se encontraron específicamente en los componentes involucrados en los complejos de empalme E/A. Estas mutaciones fueron casi completamente
15 exclusivas mutuamente y muy específicas de la displasia mieloide. Esto sugirió que un trastorno funcional de estos complejos es una consecuencia común de estas mutaciones, y estas están involucradas en el desarrollo de esta categoría distintiva de tumores mieloides mediante la alteración de los procesos fisiológicos del empalme de ARN. Aunque no hay evidencia directa que lo pruebe, estas mutaciones crean especies de ARNm empalmadas de forma anómala, la actividad NMD incrementada en células con el mutante *U2AF35* introducido sugieren fuertemente que el mutante *U2AF35* promueve el incremento de producción de las especies de ARNm con una terminación prematura del codón.

20 [0066] Mientras tanto, los resultados del ensayo de reconstitución competitiva de médula ósea y del ensayo de proliferación celular *in vitro* no se interpretan fácilmente. El mutante *U2AF35* parece suprimir la proliferación/crecimiento celular en lugar de favorecer el crecimiento y facilitar la selección clonal como se espera de los oncogenes clásicos. Interesantemente, en relación con los resultados observados, hay un informe de apoptosis inducida mediante la supresión de *ZRSR2* en células HeLa, lo que apoya la consecuencia común de las mutaciones de esta ruta (Bibliografía no patentada 9). Aunque no hay una respuesta clara para la aparente contradicción fenotípica, esto sugiere que se necesita entender un rol patogénico de una mutación *U2AF35* en el contexto de mutaciones en otros genes y/o crecimiento neoplásico de células mutantes *U2AF35* o un entorno con tumor celular compatible con selección clonal.

25 Se debe tener en cuenta que la manifestación clínica más común de los síndromes mielodisplásicos no es la proliferación celular incontrolada, sino una citopenia seria en múltiples líneas celulares debido a la hematopoyesis ineficaz, acompañada de apoptosis. A este respecto, los resultados de los estudios sobre el desarrollo del síndrome 5q indicando que se necesita entender un precursor eritrocito aumenta debido a la haploinsuficiencia *RPS14*, pero no aumenta la proliferación mieloide, puede proporcionar una sugerencia.

30 [0067] El presente descubrimiento de mutaciones de alta frecuencia en los componentes del espliceosoma mostró claramente la importancia del empalme desordenado de ARN en el desarrollo de síndromes mielodisplásicos y tumores mieloides relacionados. Muchas mutaciones *ZRSR2* causan truncamientos tempranos de una proteína mientras que las mutaciones en *U2AF35*, *SFRS2* y *SF3B1* parece que apuntan a posiciones de aminoácidos específicas y parecen ser del tipo de ganancia de función. Esta ganancia de función puede ser explicada por cualquier mecanismo dominante negativo. Estas mutaciones parecen estar involucradas en una etapa común del empalme de
40 ARN. De todos modos, también existe una diferencia en su distribución entre diferentes tipos de enfermedad. En CMML, la frecuencia de mutaciones de *SFRS2* es alta, lo cual también se superpone con otras mutaciones habituales.

45 [0068] Adicionalmente, la presente invención puede proporcionar un método de cribaje para un agente terapéutico candidato o un agente profiláctico candidato para síndromes mielodisplásicos o un tumor mielógeno.

50 Esto es, el método comprende las etapas para evaluar si una sustancia de prueba puede inhibir una expresión o una actividad de una proteína traducida a partir de al menos de uno de los genes entre el gen *U2AF35*, el gen *ZRSR2*, el gen *SFRS2* y el gen *SF3B1* utilizando una muestra conteniendo genes humanos de un sujeto; y seleccionando la sustancia del test capaz de inhibir la expresión o la actividad de traducción de proteína partiendo de los al menos uno
55 de los genes mencionados como una sustancia eficaz para la prevención o el tratamiento de un estado o enfermedad resultante de un síndrome mielodisplásico o un tumor mielógeno.

60 [0069] El método puede abarcar las etapas de administración de una sustancia de prueba para un animal no-humano; la medición de una expresión o una actividad de al menos uno de los genes entre el gen *U2AF35*, el gen *ZRSR2*, el gen *SFRS2* y el gen *SF3B1* en el animal no-humano al cual se le administra la sustancia de prueba; y la selección de la sustancia de prueba capaz de inhibir la expresión o la actividad como sustancia eficaz.

65 [0070] Se puede mencionar un gen mutado como un método similar de cribaje para un candidato a agente terapéutico o a agente profiláctico.

Esto es, el método abarca las etapas para evaluar si una sustancia puede inhibir una expresión o una actividad de una proteína traducida de al menos de uno de los genes entre el gen *U2AF35*, el gen *ZRSR2*, el gen *SFRS2* y el gen *SF3B1* utilizando una muestra conteniendo genes humanos de un sujeto; y la selección de la sustancia de prueba capaz de inhibir la expresión o la actividad de la proteína traducida a partir de al menos uno de los genes mencionados como una sustancia eficaz para la prevención o tratamiento de un estado o enfermedad resultante de síndromes mielodisplásicos o tumores mielógenos.

[0071] El método puede abarcar las etapas de administración de una sustancia de prueba a un animal no-humano; la determinación de una mutación en al menos uno de los genes entre el gen *U2AF35*, el gen *ZRSR2*, el gen *SFRS2* y el gen *SF3B1* en el animal no-humano al que se administra la sustancia de prueba; y la selección de la sustancia de prueba capaz de reducir la mutación como sustancia eficaz.

[0072] Para las mutaciones de los genes anteriores se puede utilizar de forma eficaz una sustitución de S con F o Y con un resto aminoácido en la posición 34 de una proteína traducida del gen *U2AF35*, la sustitución de Q con R o P con un resto aminoácido en la posición 157 de la proteína traducida del gen *U2AF35*, cualquier mutación inactivadora de la proteína traducida del gen *ZRSR2*, una sustitución de P con H o L o R con un resto aminoácido en la posición 95 de una proteína traducida del gen *SFRS2*, una sustitución de K con E del resto aminoácido en la posición 700, una sustitución de E con D del resto aminoácido en la posición 622, una sustitución de H con Q o D del resto aminoácido en la posición 662, una sustitución de H con Q o D del resto aminoácido en la posición 662, una sustitución de K con N o T o E o R del resto aminoácido en la posición 666 de una proteína traducida del gen *SF3B1*.

[0073] Para las sustancias de prueba se puede utilizar cualquier compuesto conocido o novedoso, incluyendo, por ejemplo, compuestos de pequeñas moléculas orgánicas, librerías de compuestos creados mediante tecnología de química combinatoria, ácidos nucleicos (nucleósidos, oligonucleótidos, polinucleótidos y similares), carbohidratos (monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos, polisacáridos y similares), lípidos (saturados o insaturados lineales, ramificados, ácidos grasos cíclicos y similares), aminoácidos, proteínas (oligopéptidos, polipéptidos y similares), librerías de péptidos aleatorios creadas mediante síntesis de fase sólida y el método de despliegue en fagos, compuestos naturales de microorganismos, animales y plantas, organismos marinos y similares.

[0074] Los animales no-humanos incluyen, por ejemplo, mamíferos como ratón, rata, hámster, cobaya, conejo, perro, mono y similares.

[0075] En un caso donde se emplea un animal no-humano, se pueden utilizar métodos convencionales conocidos para la administración de una sustancia de prueba a un animal no-humano. Incluyen, por ejemplo, administración oral y parenteral (inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intraperitoneal, infusión local y similares). La dosificación, intervalo de dosificación, periodo de dosificación y similares se seleccionan adecuadamente dependiendo de la sustancia de prueba y el animal a emplear.

[0076] Para evaluar la eficacia de la sustancia de prueba se pueden emplear métodos convencionales conocidos. Por ejemplo, expresión de niveles de proteína traducidos de los genes mencionados o genes mutados de los mismos en un animal no-humano al cual se le administra la sustancia de prueba que debe medirse.

Los niveles de expresión se pueden medir, por ejemplo, obteniendo una muestra biológica como médula ósea y sangre del animal no-humano, y midiendo un producto de transcripción y similares en la muestra.

[0077] Adicionalmente, se puede llevar a cabo una cribaje utilizando tejidos y células, y materiales biológicos, por ejemplo, médula ósea, sangre y similares de un animal no-humano.

Las células en las cuales se pueden evaluar directamente los niveles de expresión de proteínas traducidas de los genes anteriores o genes mutados de los mismos son sus células de expresión, mientras que las células en las cuales se pueden evaluar indirectamente los niveles de expresión son aquellas en las que se pueden realizar ensayos de informe para los dominios reguladores de la transcripción de los genes anteriores o genes mutados de los mismos.

Las células en las que se pueden realizar ensayos de informe para los dominios reguladores de la transcripción de los genes previamente mencionados o genes mutados de los mismos son aquellas que tienen dominios reguladores de la transcripción de los genes anteriores o genes mutados de los mismos, los genes informadores están ligados operacionalmente a los dominios.

[0078] Adicionalmente, las células que presentan los genes anteriores o genes mutados de los mismos o las células en las cuales se fuerzan mutaciones para ser expresadas, pueden ser utilizadas para evaluar si un sujeto tiene predisposición a otra enfermedad diferente a los síndromes mielodisplásicos o un tumor mielógeno.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

[0079] La presente invención es eficaz para el tratamiento precoz y la prevención de síndromes mielodisplásicos o un tumor mielógeno y tiene utilidad industrial.

5 ARNm Y SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS:

10 Las secuencias de nucleótidos de los ARNm humanos de tipo salvaje para el gen U2AF35, el gen ZRSR2, el gen SRSF2 y el gen SF3B1, y las correspondientes secuencias de aminoácidos, a las cuales se hace referencia aquí en las reivindicaciones, se presentan en el listado de secuencias adjunto. El listado contiene las secuencias siguientes:

15 SEC ID N°1:
ARNm U2AF35 de tipo salvaje (de acuerdo con el número de acceso NM_006758.2 de 16/07/2011) junto con la secuencia de aminoácidos traducida de la secuencia codificante (nt 85..807).

20 SEC ID N°2:
Secuencia de aminoácidos de la proteína U2AF35 de tipo salvaje traducida de la secuencia codificante (nt 85..807) del ARNm de acuerdo con el número de acceso NM_006758.2 de 16/07/2011 (véase SEC ID N°1).

25 SEC ID N°3:
ARNm ZRSR2 de tipo salvaje (de acuerdo con el número de acceso NM_005089.3 de 14.02.2011) junto con la secuencia de aminoácidos traducida de la secuencia codificante (nt 46..1494).

30 SEC ID N°4:
Secuencia de aminoácidos de la proteína ZRSR2 de tipo salvaje traducida de una secuencia codificante (nt 46..1494) del ARNm de acuerdo con el número de acceso NM_005089.3 de 14.02.2011 (véase SEC ID N°3).

35 SEC ID N°5:
ARNm SRSF2 de tipo salvaje (de acuerdo con el número de acceso NM_003016.4 de 30/07/2011) junto con la secuencia de aminoácidos traducida de la secuencia codificante (nt 252..917).

40 SEC ID N°6:
Secuencia de aminoácidos de la proteína SRSF2 de tipo salvaje traducida de una secuencia codificante (nt 252..917) del ARNm de acuerdo con el número de acceso NM_003016.4 de 30/07/2011 (véase SEC ID N°5).

45 SEC ID N°7:
ARNm SF3B1 de tipo salvaje junto con la secuencia de aminoácidos traducida de la secuencia codificante (nt 49..3963), secuencia conocida en la fecha de prioridad

50 SEC ID N°8:
Secuencia de aminoácidos de la proteína SF3B1 de tipo salvaje traducida de una secuencia codificante (nt 49..3963) del ARNm presentado en SEC ID N°7).

REIVINDICACIONES

1. Un método de evaluación de si un sujeto sufre síndromes mielodisplásicos o un tumor mielógeno, comprendiendo el método la etapa de

5 detección de una mutación genética en al menos un gen entre el gen *U2AF35*, el gen *ZRSR2*, el gen *SRSF2* y el gen *SF3B1* usando una muestra que contiene genes humanos del sujeto, en el que se evalúan síndromes mielodisplásicos o un tumor mielógeno en el sujeto, en un caso en el que se detecta al menos una de las siguientes:

10 una mutación del gen *U2AF35* resultando en una sustitución de S con F o Y en un residuo aminoácido en posición 34 de una proteína traducida del gen *U2AF35*, comparándose la secuencia de aminoácidos de la proteína con la secuencia de aminoácidos de una proteína traducida del ARNm con el número de acceso NM_006758.2 (SEC ID N°1),

15 una mutación del gen *U2AF35* resultando en una sustitución de Q con R o P en un residuo aminoácido en posición 157 de una proteína traducida del gen *U2AF35*, comparándose la secuencia de aminoácidos de la proteína con la secuencia de aminoácidos de una proteína traducida del ARNm con el número de acceso NM_006758.2 (SEC ID N°1),

20 una mutación del gen *ZRSR2* resultando en una proteína traducida del gen *ZRSR2*, teniendo la proteína una sustitución de I con T en posición 53, una sustitución de E con G en posición 133, una sustitución de I con N en posición 202, una sustitución de F con V en posición 239, una sustitución de N con Y en posición 261, una sustitución de C con R en posición 302, una sustitución de C con R en posición 326, una sustitución de H con R en posición 330, o una sustitución de N con K en posición 382, comparándose la secuencia de aminoácidos de la proteína con la secuencia de aminoácidos de una proteína traducida del ARNm con el número de acceso NM_005089.3 (SEC ID N°3),

25 una mutación sin sentido en el gen *ZRSR2* resultando en una mutación de un codón codificante de S en posición 40 en la proteína de tipo salvaje para un codón de parada, una mutación de un codón codificante de R en posición 126 en la proteína de tipo salvaje para un codón de parada, una mutación de un codón codificante de E en posición 148 en la proteína de tipo salvaje para un codón de parada, una mutación de un codón codificante de W en posición 291 en la proteína de tipo salvaje para un codón de parada, una mutación de un codón codificante de Y en posición 347 en la proteína de tipo salvaje para un codón de parada, una mutación de un codón codificante de E en posición 362, en la que la secuencia de aminoácidos de la proteína de tipo salvaje es la secuencia de aminoácidos de la proteína traducida del ARNm con el número de acceso NM_005089.3 (SEC ID N°3),

35 una mutación del marco de lectura en el gen *ZRSR2* resultando en la posición 96 de la proteína de tipo salvaje, un marco de lectura en posición 118 de la proteína de tipo salvaje, un marco de lectura en posición 237 de la proteína de tipo salvaje, una mutación del marco de lectura en posición 323 de la proteína de tipo salvaje, o un marco de lectura en posición 327, en la que la secuencia de aminoácidos de la proteína de tipo salvaje es la secuencia de aminoácidos de la proteína traducida del ARNm con el número de acceso NM_005089.3 (SEC ID N°3),

40 una mutación del sitio de empalme en el gen *ZRSR2* de R en posición 68, o una mutación del sitio de empalme en el gen *ZRSR2* de K en posición 257, en la que la secuencia de aminoácidos de la proteína de tipo salvaje es la secuencia de aminoácidos de la proteína traducida del ARNm con el número de acceso NM_005089.3 (SEC ID N°3),

45 una mutación en el gen *SRSF2* resultando en una sustitución de P con H o L o R en un residuo aminoácido en posición 95 de una proteína traducida del gen *SRSF2*, comparándose la secuencia de aminoácidos de la proteína con la secuencia de aminoácidos de una proteína traducida del ARNm con el número de acceso NM_003016.4,

50 una mutación en el gen *SF3B1* resultando en una sustitución de K con E en un residuo aminoácido en posición 700, una sustitución de E con D en un residuo aminoácido en posición 622, una sustitución de H con Q o D en un residuo aminoácido en posición 662, o una sustitución de K con N o T o E o R en un residuo aminoácido en posición 666 de una proteína traducida del gen *SF3B1*, comparándose la secuencia de aminoácidos de la proteína con la secuencia de aminoácidos de una proteína *SF3B1* de tipo salvaje (SEC ID N°8).

55 2. Uso de un polipéptido que comprende al menos una porción del producto génico de un gen *U2AF35* mutado, teniendo el polipéptido al menos una sustitución de S con F o Y en un residuo aminoácido en posición 34 o una sustitución de Q con R o P en un residuo aminoácido en posición 157, comparándose la secuencia de aminoácidos del polipéptido con la secuencia de aminoácidos de una proteína traducida del ARNm con el número de acceso NM_006758.2 (SEC ID N°1), como marcador para la evaluación de síndromes mielodisplásicos o un tumor mielógeno en un sujeto.

60 3. Uso de un polipéptido que comprende al menos una porción del producto génico de un gen *ZRSR2* mutado, teniendo el polipéptido al menos una sustitución de I con T en posición 53, una sustitución de E con G en posición 133, una sustitución de I con N en posición 202, una sustitución de F con V en posición 239, una sustitución de N con

Y en posición 261, una sustitución de C con R en posición 326, una sustitución de H con R en posición 330, o una sustitución de N con K en posición 382, comparándose la secuencia de aminoácidos del polipéptido con la secuencia de aminoácidos de una proteína traducida del ARNm con el número de acceso NM_005089.3 (SEC ID N°3),

5 como un marcador para la evaluación de síndromes mielodisplásicos o un tumor mielógeno en un sujeto.

4. Uso de un polipéptido que comprende al menos una porción del producto génico de un gen *SRSF2* mutado, teniendo el polipéptido al menos una sustitución de P con H o L o R en un residuo aminoácido en posición 95, comparándose la secuencia de aminoácidos de un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de un polipéptido traducido del ARNm con el número de acceso NM_003016.4 (SEC ID N°5), como un marcador para la evaluación de síndromes mielodisplásicos o un tumor mielógeno en un sujeto.

10

5. Uso de un polipéptido que comprende al menos una porción del producto génico de un gen *SF3B1* mutado, teniendo el polipéptido al menos una sustitución de K con E en un residuo aminoácido en posición 700, una sustitución de E con D en un residuo aminoácido en posición 622, una sustitución de H con Q o D en un residuo aminoácido en la posición 662, o una sustitución de K con N o T o E o R en un residuo aminoácido en la posición 666, comparándose la secuencia de aminoácidos del polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la proteína *SF3B1* de tipo salvaje (SEC ID N°8), como un marcador para la evaluación de síndromes mielodisplásicos o un tumor mielógeno en un sujeto.

15

FIG. 1

Gen anotado	Tipo de mutación	Posición	Cambio de alelo	Cambio de aminoácido	Sec. Rel	ID de muestra	Clasificación WHO
<i>ASXL1</i>	Sin sentido	Chr20:31023070	C>A	S852X	NM_015338	MDS-19	RAEB-2
<i>ASXL1</i>	Sin sentido	Chr20:31022592	C>T	R693X	NM_015338	CMML-01	CMML1
<i>BCOR</i>	Cambio de marco	ChrX:39922019	*/+C	V1351fs	NM_017745	MDS-19	RAEB-2
<i>BCOR</i>	Sin sentido	ChrX:39923047	C>T	Q1187X	NM_017745	CMML-02	CMML2
<i>DNMT3A</i>	Cambio de sentido	Chr2:25467449	G>T	G543C	NM_175629	MDS-19	RAEB-2
<i>DNMT3A</i>	Cambio de sentido	Chr2:25457242	G>A	R882H	NM_175629	CMML-02	CMML1
<i>EZH2</i>	Cambio de sentido	Chr7:148507463	A>C	D664A	NM_004456	tAML-01	AML/MRC
<i>EZH2</i>	Cambio de marco	Chr7:148506205	*/-AA	K718fs	NM_004456	CMML-01	CMML1
<i>KRAS</i>	Cambio de sentido	Chr12:25398284	G>A	G12D	NM_033360	tAML-06	AML/MRC
<i>KRAS</i>	Cambio de sentido	Chr12:25398306	A>G	K5E	NM_033360	CMML-01	CMML1
<i>NRAS</i>	Cambio de sentido	Chr1:115258744	G>A	G13D	NM_002524	MDS-19	RAEB-2
<i>NRAS</i>	Cambio de sentido	Chr1:115258744	G>A	G13D	NM_002524	MDS-20	RAEB-2
<i>NRAS</i>	Cambio de sentido	Chr1:115258748	G>A	G12S	NM_002524	MDS-20	RAEB-2
<i>NRAS</i>	Cambio de sentido	Chr1:115258748	G>A	G12S	NM_002524	tAML-05	AML/MRC
<i>RUNX1</i>	Cambio de marco	Chr21:36171602	*/+G	L294fs	NM_001001890	MDS-19	RAEB-2
<i>RUNX1</i>	Cambio de sentido	Chr21:36231792	G>A	D171N	NM_001001890	tAML-02	AML/MRC
<i>SRSF2</i>	Cambio de sentido	Chr17:74732959	C>T	P95L	NM_003016	MDS-09	RCMD
<i>SRSF2</i>	Cambio de sentido	Chr17:74732959	C>A	P95H	NM_003016	MDS-18	RAEB-2
<i>SRSF2</i>	Cambio de sentido	Chr17:74732959	C>A	P95H	NM_003016	CMML-04	CMML1
<i>TET2</i>	Cambio de marco	Chr4:106156119	*/-C	I340fs	NM_017628	MDS-06	RCMD
<i>TET2</i>	Sin sentido	Chr4:106156066	C>T	Q323X	NM_017628	MDS-16	RAEB-1
<i>TET2</i>	Cambio de marco	Chr4:106164895	*/+C	Y1255Fs	NM_017628	MDS-16	RAEB-1
<i>TET2</i>	Sin sentido	Chr4:106157573	C>G	S825X	NM_017628	MDS-19	RAEB-2
<i>TET2</i>	Cambio de marco	Chr4:106158237	*/+A	L1046fs	NM_017628	MDS-19	RAEB-2
<i>TET2</i>	Sin sentido	Chr4:106156747	C>T	R550X	NM_017628	tAML-01	AML/MRC
<i>TET2</i>	Cambio de marco	Chr4:106158081	*/-C	H994fs	NM_017628	tAML-01	AML/MRC
<i>TET2</i>	Sin sentido	Chr4:106196705	C>T	Q1680X	NM_017628	tAML-07	AML/MRC
<i>TET2</i>	Cambio de marco	Chr4:106156304	*/+A	S402Fs	NM_017628	tAML-07	AML/MRC
<i>TET2</i>	Cambio de marco	Chr4:106157345	*/-AAAT	Q749fs	NM_017628	CMML-01	CMML1
<i>TP53</i>	Cambio de sentido	Chr17:7577539	C>T	R116W	NM_001126116	MDS-09	RCMD
<i>TP53</i>	Cambio de marco	Chr17:7578532	*/-T	M1fs	NM_001126116	tAML-03	AML/MRC
<i>U2AF35</i>	Cambio de sentido	Chr21:44514777	A>G	Q157R	NM_006758	MDS-03	RA
<i>U2AF35</i>	Cambio de sentido	Chr21:44524480	C>T	A26V	NM_006758	MDS-12	RCMD
<i>U2AF35</i>	Cambio de sentido	Chr21:44514777	A>C	Q157P	NM_006758	MDS-15	RAEB-1
<i>U2AF35</i>	Cambio de sentido	Chr21:44514777	A>G	Q157R	NM_006758	CMML-01	CMML1
<i>U2AF35</i>	Cambio de sentido	Chr21:44524456	C>T	S34F	NM_006758	CMML-02	CMML2
<i>ZRSR2</i>	Sitio de empalme	ChrX:15834014	G>A	K257_splice	NM_005089	MDS-06	RCMD
<i>ZRSR2</i>	Cambio de marco	ChrX:15840883	*/-G	G323fs	NM_005089	MDS-08	RCMD
<i>ZRSR2</i>	Sin sentido	ChrX:15841000	G>T	E362X	NM_005089	MDS-16	RAEB-1
<i>ZRSR2</i>	Cambio de sentido	ChrX:15836719	A>T	N261Y	NM_005089	tAML-05	AML/MRC
<i>ZRSR2</i>	Cambio de sentido	ChrX:15833957	T>G	F239V	NM_005089	CMML-03	CMML1

Abreviaturas: RAEB-2, anemia refractaria con exceso de blastos -2; CMML1, leucemia mielomonocítica crónica 1; CMML2, leucemia mielomonocítica crónica 2; AML/MRC, leucemia mieloide aguda con cambios relacionados con mielodisplasia; RCMD, citopenia refractaria con displasia multilineaje; RAEB-1, anemia refractaria con exceso de blastos -1; RA, anemia refractaria.

FIG. 2

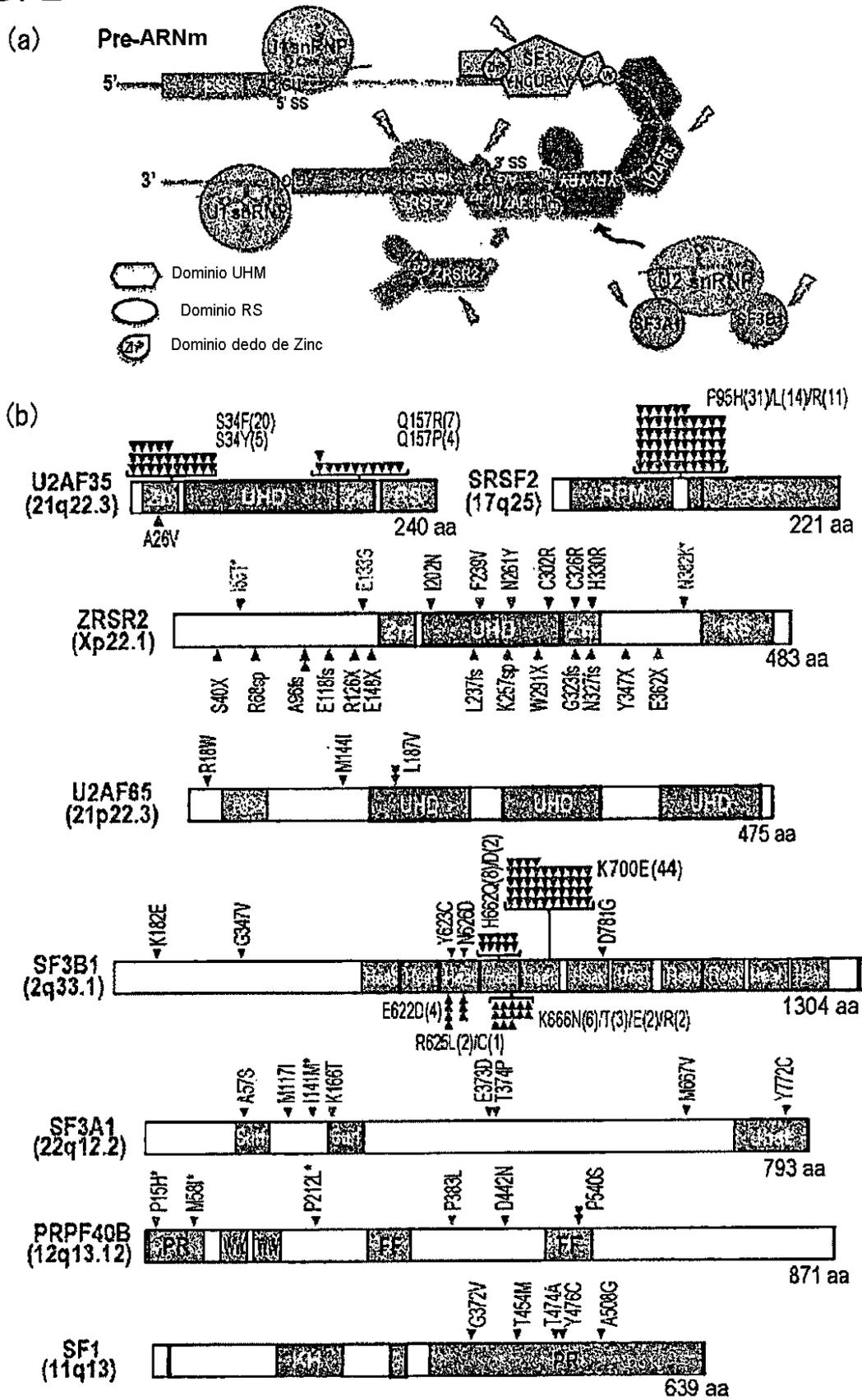


FIG. 3

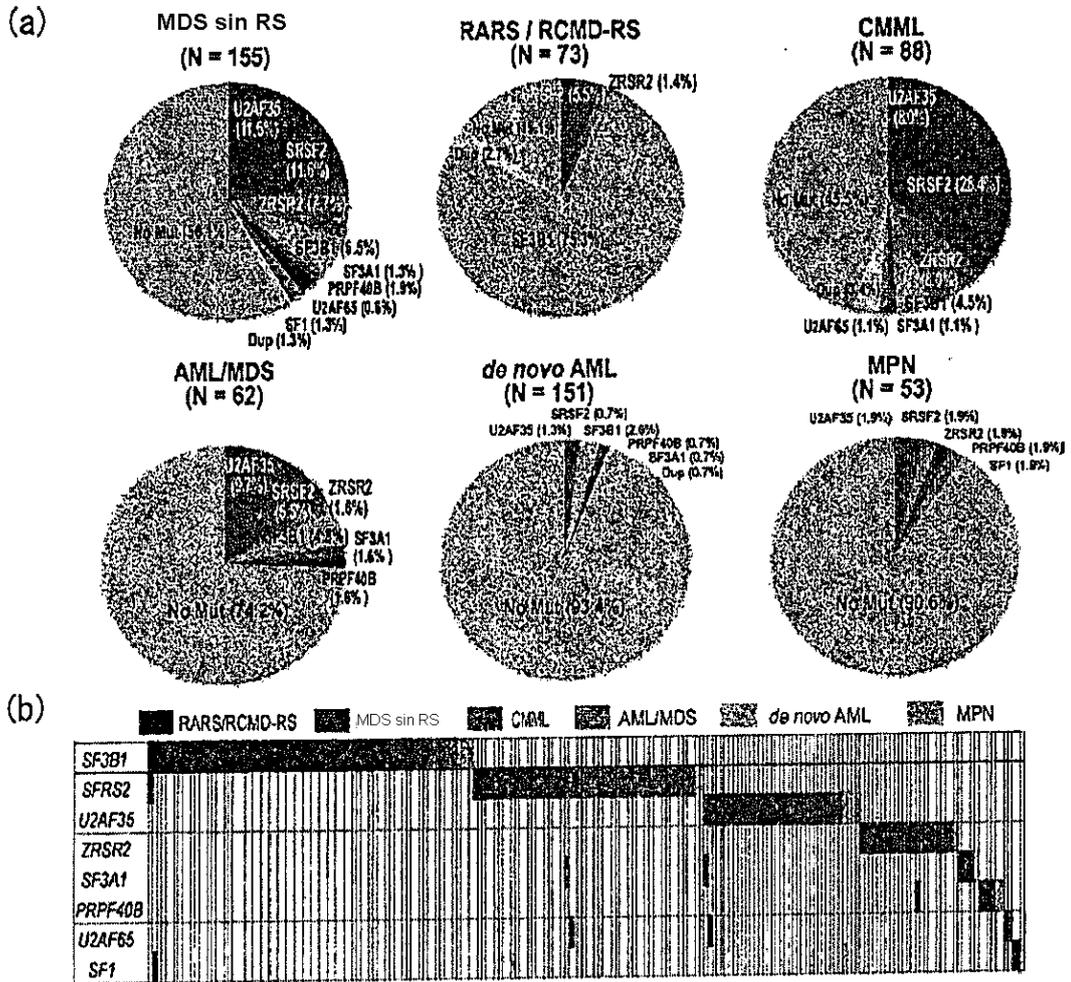


FIG. 4

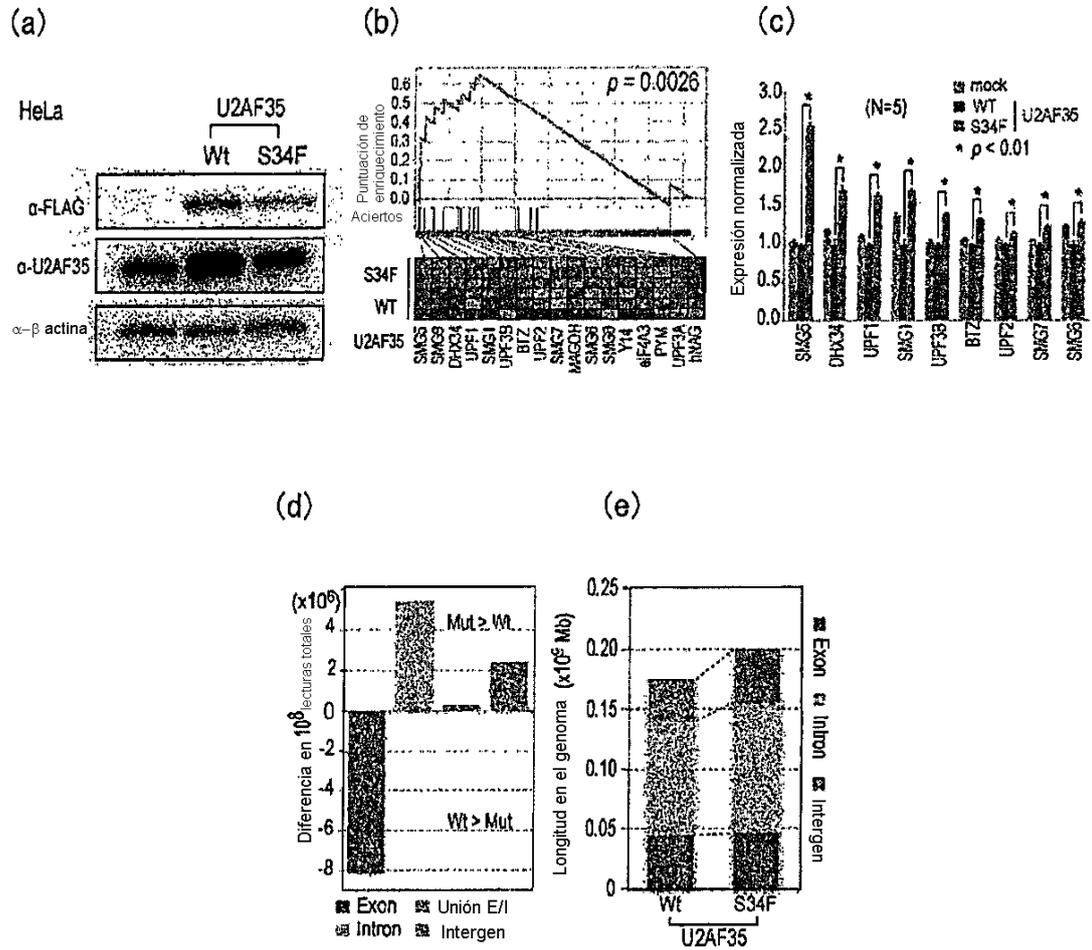


FIG. 5

