

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 719**

51 Int. Cl.:

G01N 33/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.07.2011 PCT/US2011/045693**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2012 WO12016021**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2011 E 11813168 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 2598874**

54 Título: **Métodos de determinación de la respuesta de la leucemia mieloide aguda al tratamiento con inhibidores de la farnesiltransferasa**

30 Prioridad:

28.07.2010 US 368453 P

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

26.03.2019

73 Titular/es:

**JANSSEN DIAGNOSTICS, LLC (100.0%)
700 US Highway 202
Raritan, NJ 08869, US**

72 Inventor/es:

**VENER, TATIANA, I.;
DERECHO, CARLO, C.;
PALMA, JOHN, F. y
RAPONI, MICAL**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 705 719 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

Métodos de determinación de la respuesta de la leucemia mieloide aguda al tratamiento con inhibidores de la farnesiltransferasa

Antecedentes

5 La leucemia mielógena aguda ("AML") tiene una prevalencia baja en los EE. UU. en aproximadamente 50,000 pacientes, que se cree que está muy por debajo de los 200,000 pacientes requeridos para ser etiquetados como una enfermedad huérfana. La prevalencia de AML es mayor en pacientes ancianos, en quienes la enfermedad también tiende a ser mucho más difícil de tratar. Los pacientes de edad avanzada, por lo general se definen como al menos 60 años (aunque algunas clasificaciones requieren que los pacientes tengan más de 65 o incluso 70 años), sucumben a la enfermedad a una tasa mucho mayor. Las tasas de respuesta (al tratamiento) y la supervivencia en pacientes de AML de edad avanzada promedian del 30% al 50% para una recuperación completa con una mediana de supervivencia sin recaída (RFS) de solo aproximadamente 9 a 12 meses. Muy pocos pacientes de edad avanzada sobreviven más allá de 2 años.

15 La gestión del tratamiento de pacientes de edad avanzada con AML presenta muchos desafíos. Aunque aproximadamente el setenta por ciento (70%) de los pacientes logran la remisión de la AML con la terapia de inducción convencional, debido a los efectos tóxicos de la terapia y al resultado extremadamente pobre en los pacientes de edad avanzada, la terapia de inducción convencional a menudo no se ofrece a los pacientes de edad avanzada. Las opciones de tratamiento para pacientes de edad avanzada, entonces, a menudo son poco más que tratamientos de investigación o cuidados paliativos. Sin embargo, es posible identificar subgrupos de pacientes de edad avanzada que probablemente respondan a la terapia de inducción convencional. Por ejemplo, los pacientes de edad avanzada con una citogenética favorable y sin una expresión elevada de la proteína de resistencia a múltiples fármacos (MDR1) responden bien a la terapia de inducción. Sin embargo, la demora en la identificación de tales pacientes que resulta en un retraso en el inicio de la terapia de inducción, por ejemplo, mientras se esperan los resultados de la evaluación citogenética, que puede tardar aproximadamente una semana en completarse, tiene un efecto marcadamente nocivo en el pronóstico. Otros marcadores de respuesta deficiente incluyen la presencia de la mutación FLT3/ITD o la expresión del antígeno CD34. Por lo tanto, la gestión eficaz del tratamiento de los pacientes de edad avanzada con AML requiere decisiones rápidas que, a su vez, requieren ensayos rápidos para seleccionar el tratamiento apropiado. Algunos pacientes responden bien al tratamiento, mientras que otros disminuyen y sufren los efectos secundarios.

30 Los pacientes con AML también se pueden dividir en aquellos con enfermedad recurrente/refractaria y aquellos con enfermedad recién diagnosticada. Un paciente con estado de enfermedad recurrente o refractaria no responde al tratamiento o la enfermedad ha regresado. El estado de recaída o refractario se asocia con un mal pronóstico.

Desafortunadamente, el éxito inicial de muchos tratamientos de AML suele ir seguido de recaídas. Además, la mayoría de los tratamientos no son eficaces en todos los pacientes y la remisión parcial es en gran medida ineficaz para prolongar la supervivencia.

35 Los inhibidores de la farnesiltransferasa (FTI) ofrecen un tratamiento alternativo incluso en pacientes de edad avanzada. Los inhibidores de la farnesiltransferasa (FTI) inhiben la unión covalente de las unidades estructurales farnesilo de carbono al motivo CAAX C-terminal de diversas proteínas. Los FTI, significativamente, parecen ser mejor toleradas por los pacientes de edad avanzada que la terapia de inducción convencional. Pero, solo aproximadamente el 15% al 25% de los pacientes responden al tratamiento con un inhibidor de la farnesiltransferasa. Los inhibidores de la farnesiltransferasa, tal como el Tipifarnib, funcionan inhibiendo de manera competitiva la adición de una unidad estructural farnesilo a las moléculas de señalización, tal como la RAS, que están implicadas en los cánceres. Se espera que tal inhibición obstaculice su función. Muchas FTI de interés para esta divulgación se describen en la Publicación de la Patente de los Estados Unidos 20030050323.

45 El tipifarnib, también conocido como R115777 o su marca comercial ZARNESTRA™, el primer inhibidor de la farnesiltransferasa (FTI) que se probó en la clínica, se ha mostrado prometedor para el tratamiento de muchas enfermedades. Ha demostrado una actividad significativa en trastornos hematológicos que incluyen AML, mieloma múltiple (MM), síndrome mielodisplásico (MDS), leucemia mielomonocítica juvenil (JMML), mielofibrosis con metaplasia mieloide (MMM) y leucemia mielógena crónica (CML), con tasas de respuesta completa en AML y MDS de hasta aproximadamente el 15%. Además, Tipifarnib a menudo actúa de forma sinérgica con otros tratamientos. Esta sinergia a menudo proporciona a un paciente de edad avanzada otras pocas opciones, la capacidad de someterse a un tratamiento con un inhibidor de farnesilo en combinación con otro agente mientras tiene efectos secundarios tolerables y resultados superiores que con el tratamiento de un solo agente aislado. En particular, los ensayos clínicos previos de tipifarnib por sí mismos no condujeron a un aumento notable en la supervivencia, y algunas combinaciones con otros agentes, tales como la citarabina ('ara-C') pueden incluso aumentar la mortalidad. La combinación de tipifarnib con etopósido parece superar tales inconvenientes.

El FTI preferido, tipifarnib, inhibe el crecimiento de muchos tumores/líneas celulares. En particular, las líneas celulares que expresan mutaciones de N-ras o H-ras muestran una inhibición significativa de la proliferación celular. Sin embargo,

solo aproximadamente la mitad de las líneas celulares con mutaciones K-ras, cuando se probaron, fueron inhibidas por FTI R115777 y luego también a dosis mucho más altas. FTI R115777 también presentó sinergia con muchos agentes para inhibir el crecimiento de tumores/líneas celulares. En particular, algunos cánceres y otros trastornos proliferativos se caracterizan por mutaciones o sensibilidad a diferentes tipos de mutaciones ras. De acuerdo con lo anterior, no se espera que los FTI, incluyendo R115777, sean igualmente eficaces en el tratamiento de todos los tipos de cáncer y trastornos proliferativos. De hecho, donde K-ras juega un papel importante, es poco probable que los FTI sean tan eficaces como cuando solo N-ras o H-ras tienen un papel importante.

Otro conjunto de tratamientos alternativos a la terapia de inducción convencional se basa en podofilotoxina y se describe en Publicación de la Patente de los Estados Unidos US20030050323. La podofilotoxina se extrae de la planta de mandrágora. Es el compuesto original a partir del cual se han desarrollado dos glucósidos, compuestos que muestran una actividad terapéutica significativa en varias neoplasias humanas, incluyendo leucemia pediátrica, carcinomas de células pequeñas del pulmón, tumores testiculares, enfermedad de Hodgkin y linfomas de células grandes. Estos derivados son etopósido (VP-16) que tiene el nombre químico 41-demetilepodofilotoxina-9-[4,6-O-(R)-etilideno-beta-D-glucopiranosido] y tenipósido (VM-26) que tiene el nombre químico 41-demetilepodofilotoxina-9-[4,6-O-(R)-tenilideno-beta-D-glicopiranosido]. El mecanismo de acción de estos compuestos implica la inducción de roturas de la cadena de ADN mediante una interacción con el ADN topoisomerasa II o la formación de radicales libres. Sin embargo, tanto el etopósido como el tenipósido causan efectos secundarios tóxicos, especialmente la mielosupresión.

Para aumentar la eficacia inhibitoria de los derivados antitumorales de podofilotoxina contra el crecimiento tumoral y también para proporcionar un medio para el uso de dosis más bajas de los derivados antitumorales de podofilotoxina, se han explorado combinaciones sinérgicas con otros tratamientos. Los FTI, y en particular, tipifarnib, presentan sinergias con el etopósido, lo que permite dosis eficaces menos tóxicas, una consideración importante en pacientes de edad avanzada con AML.

Los efectos secundarios de una combinación de tipifarnib y un derivado de podofilotoxina, tal como un etopósido, son más tolerables. Sin embargo, a diferencia de la tasa de respuesta del setenta por ciento (70%) en pacientes con AML más jóvenes, la tasa de respuesta a una combinación de etopósido y tipifarnib generalmente varía desde aproximadamente 15% a 25%. Dado que no todos los pacientes con AML responden al tratamiento con FTI, no es deseable tratar a un paciente con FTI si es poco probable que el paciente responda, lo que presenta un desafío antes de administrar el FTI.

Aunque el FTI preferido, R115777, ha sido eficaz en la terapia de combinación, no ha sido posible predecir de manera confiable tal sinergia entre R115777 y otros agentes en un paciente particular, en parte debido a que el grado de inhibición de la actividad de la farnesiltransferasa no correlaciona bien con los cambios clínicos. Por ejemplo, se consideró que el estado de mutación del gen RAS era un biomarcador candidato para la respuesta del paciente a los FTI. Esta justificación se basó en la evidencia preclínica de que mutaciones puntuales específicas dentro de los genes RAS causan la activación constitutiva de la vía RAS en muchos cánceres. En general, se acepta que, si los tumores dependen en gran medida de la activación de una o dos vías, los pacientes con estos tumores deben responder a los fármacos que inhiben esas vías. Sin embargo, a veces muchas vías se pueden activar por múltiples eventos y se ha encontrado que RAS puede favorecer la expresión en ausencia de la activación de mutaciones de RAS. Adicionalmente, no se ha demostrado ninguna correlación entre las mutaciones de RAS y la respuesta a los FTI en los estudios clínicos, como se ha señalado en la Publicación de la Patente de los Estados Unidos 20070048782. De hecho, mientras que varios estudios clínicos tempranos de FTI se centraron en los cánceres que presentaron altas frecuencias de mutaciones de RAS, la tasa de respuesta fue decepcionantemente baja en esos ensayos. De este modo, el problema de predecir la respuesta de un paciente en particular a los inhibidores de la farnesiltransferasa en combinación con otros tratamientos espera un ensayo de diagnóstico apropiado que sea rápido, preciso y asequible para hacer que la capacidad de predicción sea clínicamente útil.

45 Resumen

Esta divulgación identifica marcadores que predicen la respuesta al tratamiento con una combinación de un inhibidor de la farnesiltransferasa y un etopósido. Estos marcadores permiten la identificación de una terapia oncológica con un perfil de respuesta bajo que no se retiene de los posibles respondedores, al tiempo que se evita la posibilidad de que los no respondedores presenten efectos secundarios no deseados.

Las realizaciones preferidas permiten predecir de manera confiable y rápida si un paciente en particular responde a un tratamiento combinado con FTI, cuyo tratamiento incluye un FTI con uno o más de etopósido, tenipósido, tamoxifeno, sorafenib, paclitaxel, Temozolomida, Topotecán, trastuzumab y cisplatino. Un tratamiento de combinación de FTI preferido comprende tipifarnib con etopósido. Además, esta divulgación satisface la necesidad de seleccionar el tratamiento más eficaz entre muchos tratamientos posibles y de cambiar a un tratamiento más eficaz. Uno de los objetivos del tratamiento de la AML, con sus múltiples causas, complicaciones y tratamientos, es predecir de manera oportuna y precisa la efectividad de un tratamiento particular en un paciente, especialmente si el paciente es de edad avanzada. Las predicciones personalizadas descritas de la posible respuesta a los tratamientos de combinación con FTI deberían permitir que a los pacientes potencialmente no sensibles se les ofrezcan tratamientos alternativos mientras se trata a los que responden con tratamientos de combinación con FTI.

5 Los tratamientos preferidos incluyen, tipifarnib, que es un inhibidor de la farnesiltransferasa no peptidomimética disponible por vía oral, con tasas de recuperación completa demostradas en la AML y MDS de hasta el 15% en tumores malignos mieloides, incluso en adultos de edad avanzada con AML que no son candidatos para la terapia citotóxica tradicional. El tipifarnib también es eficaz en la mielodisplasia de alto riesgo y en los trastornos mieloproliferativos, incluyendo la metaplasia mieloide agnogénica y la leucemia mielógena crónica resistente al imatinib. Las mejoras significativas en esta tasa de respuesta son deseables para evitar la dosificación de pacientes con tipifarnib que tienen una alta probabilidad de no responder a este.

10 El método, para identificar si un sujeto diagnosticado con un trastorno mieloide es un candidato para el tratamiento de combinación con FTI, comprende administrar un primer ensayo con un primer resultado. Si este resultado, o el recíproco de este resultado, es menor que un umbral predeterminado, entonces se señala al sujeto como poco probable que lo ayude un primer grupo de tratamientos, cada uno de los cuales requiere la administración de un inhibidor de la farnesiltransferasa en combinación con un agente. seleccionado del grupo que consiste en etopósido, tenipósido, tamoxifeno, sorafenib, paclitaxel, Temozolomida, Topotecán, trastuzumab y cisplatino. Si el sujeto no está marcado, se selecciona luego un tratamiento del grupo de tratamientos para su administración al sujeto.

15 La elección del umbral predeterminado es preferiblemente de tal manera que el sujeto esté marcado si hay un valor predictivo negativo alto para el beneficio de un tratamiento seleccionado del grupo de tratamientos para evitar negar un tratamiento eficaz a un grupo tan grande como sea razonable. De este modo, efectivamente, el alto valor predictivo negativo requiere marcar a los sujetos con menos probabilidades de ser ayudados por el tratamiento con el inhibidor de la farnesiltransferasa en combinación con otro agente. Se debe tener en cuenta que marcar a un sujeto puede ser un acto positivo que determina que el sujeto probablemente se beneficiará de un tratamiento o un acto negativo que determina que el sujeto no se beneficiará de un tratamiento. De este modo, el etiquetado también debe entenderse como la identificación de un grupo o incluso la definición de un grupo.

20 Alternativamente, la elección del umbral predeterminado puede ser tal que se marque al sujeto si existe un valor predictivo positivo alto para el beneficio de un tratamiento seleccionado del grupo de tratamientos para mejorar la probabilidad de beneficio del tratamiento. Por lo general, esto se favorecerá si hay muchos tratamientos competitivos disponibles que se puedan distinguir entre sí.

25 Además, incluso para los sujetos identificados como propensos a beneficiarse de un tratamiento seleccionado del grupo de tratamientos, el tratamiento se selecciona basándose en un valor predictivo positivo relativo del tratamiento, preferiblemente en relación con otros tratamientos en el grupo. En una realización preferida, el trastorno mieloide es leucemia mieloide aguda.

30 En otro aspecto, el método descrito también se puede usar para identificar si, en respuesta a la detección de una reducción en la respuesta de un sujeto a un tratamiento pasado, el sujeto se debería cambiar a un tratamiento futuro diferente. Los diferentes tratamientos pueden incluir un tratamiento paliativo. Alternativamente, el tratamiento diferente puede comprender una combinación diferente de un FTI con un medicamento como etopósido, tamoxifeno, sorafenib, paclitaxel, Temozolomida, Topotecán, Trastuzumab y cisplatino.

35 Un valor predictivo positivo de un tratamiento con un inhibidor de la farnesiltransferasa en combinación con otro agente se determina con base en una fracción de sujetos que se espera que presenten una respuesta positiva al tratamiento, en el que la respuesta positiva comprende una remisión completa, en el que, además, la remisión completa se define por la presencia de menos de 5% de mieloblastos con maduración normal de todas las líneas celulares, un ANC de al menos 1000/ μ L y un recuento de plaquetas de al menos 100,000/ μ L, ausencia de blastos en la sangre periférica, ausencia de células leucémicas identificables en la médula ósea, eliminación de anomalías citogenéticas asociadas a la enfermedad y eliminación de cualquier enfermedad extramedular existente previamente.

40 Además, en una realización preferida, la respuesta positiva incluye además la remisión parcial, en la que la remisión parcial se define por la presencia de hematopoyesis trilineal en la médula ósea con recuperación de ANC y plaquetas a los niveles indicados anteriormente, pero con 5 a 25 % de blastos de médula ósea y al menos 50% de disminución en el porcentaje de blastos de médula ósea a partir de la referencia. Adicionalmente, en otra realización preferida, la respuesta positiva incluye además una mejora hematológica. La mejora hematológica se define por una disminución de al menos un 50% en los blastos de médula ósea o en cualquier enfermedad extramedular medible, la recuperación de ANC de 500 a 1000/ μ L, el recuento de plaquetas a 20,000 a 100,000/ μ L o la mejora de los requisitos de transfusión

45 En una realización preferida del método descrito, se estima un nivel de expresión de los genes RASGPR1 y APTX usando una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las reacciones de PCR se pueden realizar en un solo tubo junto con una reacción de PCR de referencia. La muestra para dicha amplificación puede ser una o más de (i) una muestra de médula ósea; y/o (ii) una muestra de sangre. La proporción de los niveles de expresión de dos marcadores, RASGRP1 y APTX, se puede estimar usando un control de normalización externo.

50 En una realización preferida, la amplificación de amplicones que comprende
 CTGGACGATCTCATTGACAGCTGCATTCAATCTTTTGATGCAGATGGAAACCT
 GTGTCGAAGTAACCAACTGTTGCAAG SEQ No. 1 para RASGRP1 y

CGCTTCCGATTGGGCTACCACGCCATTCCGAGTATGAGCCATGTACATCTTCA

TGTGATCAGCCAGGATTTTGATTCT SEQ No. 2 para APTX se realiza usando los pares de cebadores seleccionados del grupo que consiste en

(i) 5'-CGCTTCCGATTGGGCTAC-3' SEQ No. 3 cebador superior APTX

5 (ii) 5'-AGAATCAAATCCTGGCTGATC-3' SEQ No. 4 cebador inferior APTX,

(iii) 5'-CTGGACGATCTCATTGACAGC-3' SEQ No. 5 *RASGPR1*, cebador superior, y

(iv) 5'-CTTGCAACAGTTGGTTACTTCG-3' SEQ No. 6 *RASGPR1*, cebador inferior.

10 El rendimiento y la utilidad de la proporción de expresión de dos genes (*RASGRP1*: APTX) en la predicción de una respuesta clínicamente significativa a FTI como R115777, *RASGRP1* y APTX se identificaron mediante el estudio de la médula ósea de adultos ancianos con leucemia (AML) mieloide aguda sin tratamiento previo, con riesgo deficiente, para mutaciones de N-RAS mediante la expresión global de genes y/o PCR cuantitativa (qPCR) de genes específicos. El perfil de micromatrices identificó una proporción de expresión de dos genes (*RASGRP1*: APTX) que proporciona la mayor precisión para predecir la respuesta a tipifarnib. Este clasificador pronosticó la respuesta a tipifarnib en pacientes con AML reincidente o refractaria, con un valor predictivo negativo y un valor predictivo positivo de 92% y 28% respectivamente (proporción de probabilidad de 4.4). Por lo tanto, tanto en la AML recién diagnosticada como en la reincidente o refractaria, este clasificador mejora la tasa de respuesta general en aproximadamente el 50% mientras mantiene un alto NPV, y mejora significativamente la supervivencia global del paciente. El clasificador de dos genes se puede implementar con la ayuda de qPCR, usando los que en un estudio se observaron un valor predictivo negativo (NPV) y un valor predictivo positivo (PPV) de 81% y 50% respectivamente (proporción de probabilidad de 4.3). Tales datos indican que se puede usar un ensayo simple de expresión de dos genes para identificar a los pacientes con AML que probablemente respondan al tipifarnib (R115777). Adicionalmente, el ensayo de dos genes se puede usar no solo en pacientes recién diagnosticados, sino también en aquellos que presentan AML refractaria o reincidente, por ejemplo, después de una terapia de inducción y para proporcionar una terapia de mantenimiento.

25 En una realización de ejemplo, una proporción rápida de dos genes *RASGRP1*: APTX se determina mediante las etapas de recolección de una muestra de sangre periférica completa, aislando el ARN de la muestra, amplificando los amplicones descritos anteriormente usando los cebadores descritos anteriormente, amplificando en el mismo conjunto de reacciones, los amplicones descritos anteriormente en ARN Universal u otro control externo, una referencia que incluye especies de ARN de *RASGRP1* y APTX, midiendo los valores de C_t para cada reacción, rechazando muestras o reacciones en las que el C_t está por encima de 40 ciclos, más preferiblemente rechazar muestras o reacciones en las que el C_t está por encima de los 37 ciclos, incluso más preferiblemente rechazar muestras o reacciones en las que el C_t está por encima de los 35 ciclos y más preferiblemente rechazar muestras o reacciones en las que el C_t está por encima de los 30 ciclos. Luego, la proporción *RASGRP1*: APTX se calcula como se describe a continuación.

$$\text{Proporción } \textit{RASGRP1:APTX} = 2^{-(A-B)-(C-D)}$$

donde

35 A: Valor C_t de muestra *RasGRP1*

B: Valor C_t de ARN JY (o Universal) (+) *RasGRP1*

C: Valor C_t de muestra APTX

D: Valor C_t de ARN JY (o Universal) (+) APTX

40 El resultado obtenido por el ensayo se compara con la respuesta. Para estimar el rendimiento del ensayo, el valor del área bajo la curva (AUC) se calcula preferiblemente según el análisis de la curva de característica operativa del receptor (ROC), por ejemplo, usando un paquete de software MedCalc.

45 En el método preferido, si la proporción supera un umbral predeterminado, entonces el paciente se clasifica como un probable respondedor. De otra manera, el paciente es un no respondedor. El umbral predeterminado se define por, preferiblemente, el AUC correspondiente al rendimiento de ensayo deseado u otro criterio de rendimiento tal como sensibilidad o especificidad o una suma maximizada de sensibilidad y especificidad. De este modo, el valor de umbral particular puede diferir, por ejemplo, debido al ARN de referencia (Y o Universal u otro conjunto de ARN) usado, pero la especificación deseada del rendimiento del umbral en la estratificación de los pacientes permite el uso de diferentes ARN de referencia y otras condiciones experimentales en un ensayo RTPCR mientras genera una estratificación comparable del paciente.

Esta divulgación permite la selección de un umbral, en la que la proporción de los niveles de expresión RASGRP1 y APTX se compara con el umbral, para identificar un respondedor a un tratamiento con una combinación de un inhibidor de farnesilo y otro agente, que se selecciona de o es un derivado de un miembro seleccionado del grupo que consiste en etopósido, tenipósido, tamoxifeno, sorafenib, paclitaxel, Temozolomida, Topotecán, Trastuzumab y cisplatino. La selección del umbral, en una realización de ejemplo preferida, comprende procesar una muestra de sangre para generar una proporción de niveles de expresión RASGRP1 y APTX. El umbral se selecciona para aumentar uno o más de una medida del conjunto que consiste en un valor predictivo positivo del tratamiento, un valor predictivo negativo de identificar un respondedor, un AUC en un análisis de ROC, una sensibilidad y una especificidad. En una realización preferida, los niveles de expresión de RASGRP1 o APTX se miden usando RT-PCR, aunque se pueden sustituir otros métodos para medir la expresión de un gen de interés.

Se debe tener en cuenta que, en lugar del ARN universal (de STRATAGENE™, se puede usar otro ARN de control externo sin pérdida de generalidad. Sin embargo, el umbral predeterminado para la proporción RASGRP1: APTX puede necesitar un ajuste. El umbral predeterminado puede ser evaluado usando un análisis ROC para mantener constante el AUC. Por ejemplo, usando el ARN JY (obtenido de la línea celular JY) como referencia, se determinó un umbral de 5.2. El cambio al ARN universal estandarizado más ampliamente disponible dio como resultado un ajuste del umbral a 7.3 para garantizar que el AUC fuera consistente. La diferencia en el umbral refleja la diferente presencia relativa de RASGRP1 y APTX en el ARN de referencia. Otros reactivos pueden hacer una diferencia adicional en el cálculo del umbral.

Además, el umbral también se puede ajustar en función de los requisitos de sensibilidad o especificidad, si los hay. De este modo, cuando los supuestos no respondedores son candidatos para una terapia alternativa, entonces es recomendable seleccionar un umbral para maximizar el número de pacientes elegibles para cualquiera de las terapias para mejorar la probabilidad general de combatir la AML en la mayoría de los pacientes. En este sentido, en vista de la capacidad de los pacientes más jóvenes para someterse a una terapia de inducción con tasas de remisión relativamente altas, se puede usar un umbral diferente al evaluar a tales pacientes más jóvenes para el tratamiento con un FTI, solo o en combinación con otro agente, que el umbral usado para evaluar a pacientes de edad avanzada a los que no se les ofrece la terapia de inducción. Dicho umbral se puede elegir para reflejar una alta especificidad para identificar a los pacientes con mayor probabilidad de responder al tratamiento con un FTI como tipifarnib. Alternativamente, la terapia de inducción en combinación con un FTI, aunque no se sabe que sea sinérgica, proporcionará a los pacientes una puntualidad de tratamiento eficaz y oportuna, lo que es un factor crítico en la lucha contra la AML. Esto asegura que a los pacientes no se les niegue una posible terapia.

Opcionalmente, en una realización de ejemplo, el ARN de HMBS también se amplifica y detecta para verificar la integridad de la muestra, de modo que un valor anormalmente bajo de ARN de HMBS marca la muestra como cuestionable. Para el ARN de HMBS, un amplicón preferido es CCTGCCCACTGTGCTTCCTCCTGGCTTCACCATCGGAGCCATCTGCAAGCGGG AAAACCCTCATGAT SEQ No. 7, que se amplifica usando los cebadores CCTGCCCACTGTGCTTCCT SEQ No.8 HMBS cebador superior, y ATCATGAGGGTTTTCCCGCT, SEQ No. 9 HMBS, cebador inferior.

La detección de los amplicones se realiza preferiblemente usando las siguientes sondas: FAM-CATTCAATCTTTTGATGCAGATGGAAACCTG-BHQ1, sonda RASGRP1, Taqman, SEQ No. 10; Gold 540-CACGCCATTCCGAGTATGAGCCATGTAC-BHQ2, sonda APTX, TaqMan, SEQ No. 11; y Cy5-GCTTCACCATCGGAGCCATCTGCA-BHQ1, HMBS, sonda TaqMan, SEQ No. 12. Como se notará fácilmente, las sondas pueden variar no solo en la elección de las secuencias sino también en las etiquetas específicas usadas en ellas con poca pérdida de generalidad.

Esta descripción también demuestra que la proporción RASGRP1: APTX de dos genes se puede ensayar rápidamente mediante qPCR realizada en un solo tubo usando reactivos estandarizados. Este ensayo tiene una utilidad predictiva en la identificación de posibles respondedores entre la AML recién diagnosticada, así como en pacientes con AML recurrente o refractaria, incluidos los pacientes de edad avanzada. Adicionalmente, el ensayo puede usar una muestra de sangre periférica en lugar de la muestra habitual de médula ósea, lo que requiere un procedimiento mucho más invasivo que el requerido para obtener la muestra de sangre periférica.

La proporción de dos genes es útil en un método para prescribir tipifarnib a un sujeto diagnosticado con un trastorno mielóide. En uno de tales métodos, la evaluación de la expresión de RASGRP1 y APTX se realiza en una muestra, como médula ósea o sangre, mediante la amplificación de señales de dianas del ácido ribonucleico usando al menos un cebador del grupo que consiste en

- (i) 5'-CGCTTCCGATTGGGCTAC-3'
- (ii) 5'- AGAATCAAATCCTGGCTGATC-3'
- (iii) 5'- CTGGACGATCTCATTGACAGC-3' y
- (iv) 5'- CTTGCAACAGTTGGTTACTTCG -3'.

5 A continuación, el nivel de expresión de los genes RASGRP1 se estima en relación con uno o más del grupo que consiste en niveles de expresión de APTX, beta-actina y HMBS, preferiblemente en un solo tubo en un formato múltiple. Se determina la proporción de los niveles de expresión de RASGRP1 en relación con APTX. Si la proporción en un sujeto es mayor que un umbral, que preferiblemente es de aproximadamente 5.1 o de aproximadamente 5.2, se prescribe al sujeto tipifarnib. En una realización preferida, tipifarnib se prescribe con otro agente sinérgico con tipifarnib. Dicho agente puede ser uno o un derivado de un miembro seleccionado del grupo que consiste en etopósido, tenipósido, tamoxifeno, sorafenib, paclitaxel, Temozolomida, Topotecán, trastuzumab y cisplatino. La administración más preferida es de tipifarnib y etopósido.

10 La invención también facilita un método para administrar tipifarnib y etopósido a un paciente diagnosticado con un trastorno mielóide. Como antes, primero se determina si la proporción de la expresión de RASGRP1 y APTX supera un umbral de aproximadamente 5.1 o aproximadamente 5.2. Y, si la proporción supera este umbral, se administra tipifarnib. Estos y otros detalles se describen a continuación con la ayuda de las siguientes figuras, muchas de las cuales, junto con partes de la especificación, se basan y comparten con la Patente de los Estados Unidos No. 7,932,036.

Breve descripción de los dibujos

15 La figura 1 muestra el desempeño del gen RASGRP1 como un predictor de la respuesta a tipifarnib en la AML. Las tasas de precisión (A) y las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (B) usando el clasificador del gen RASGRP1 en la AML recién diagnosticada.

20 La figura 2 muestra el desempeño del par de genes RASGRP1:APTX como un pronosticador de la respuesta a tipifarnib en la AML. La supervivencia global de los pacientes con AML (A) recién diagnosticada y los pacientes con AML (C) recurrente/refractaria estratificados con el clasificador de 2 genes se representan mediante el análisis de Kaplan-Meier. Se muestran las tasas de precisión del clasificador de dos genes en la AML (B) recién diagnosticada y en la AML (D) recurrente/refractaria.

25 La figura 3 muestra el rendimiento del clasificador de genes RASGRP1: APTX usando qPCR. (A) Los valores Ct normalizados de RASGRP1: APTX para 20 respondedores y 10 pacientes con enfermedad progresiva. Las 20 muestras independientes y las 10 muestras de entrenamiento que se ejecutaron en micromatrices se muestran por separado. Las barras horizontales indican las medias del grupo. (B) Las tasas de precisión del clasificador del gen RASGRP1 en la AML recién diagnosticada para los 30 pacientes que se muestran usando un valor de corte de 0 se usaron para estratificar a los pacientes. (C) La supervivencia global asociada de los pacientes estratificados se representa mediante el análisis de Kaplan-Meier.

30 La figura 4 muestra el rendimiento del gen RASGRP1 como un predictor de respuesta a tipifarnib en la AML recurrente y refractaria. Las tasas (A) de precisión y las curvas (B) de supervivencia de Kaplan Meier usando el clasificador del gen RASGRP1 en la AML recurrente y refractaria.

35 La figura 5 muestra la supervivencia global de los pacientes con AML no tratados con FTI estratificados con la proporción de expresión del gen RASGRP1: APTX. Tres sondas de ADNc para ambos RASGRP1 y APTX estaban presentes en el conjunto de datos disponibles. Primero se calculó el valor medio para cada gen y luego se calculó la proporción de RASGRP1: APTX de estos valores. Los pacientes cuya proporción era superior a 1 se clasificaron como progresores y aquellos con una proporción inferior a 1 se clasificaron como respondedores. Luego se realizó el análisis de Kaplan-Meier.

40 La figura 6 muestra la correlación de los datos de Affymetrix y qPCR. Se compararon nueve muestras de ARN que se analizaron tanto en el Affymetrix GeneChip como mediante qPCR mediante análisis de regresión lineal. El eje Y se usa para representar los valores de qPCR en forma de un Δ Ct normalizado correspondiente a una proporción de RASGRP1: APTX. Cabe señalar que este valor, estrictamente hablando, no es una proporción sino un Δ -Ct normalizado correspondiente a la proporción, aunque los términos se usan indistintamente. Como resultado, a medida que aumenta el nivel de RASGRP1, su valor Ct correspondiente disminuye y todo lo demás es el mismo, el valor Δ Ct disminuye. El eje X representa los valores correspondientes de la proporción RASGRP1: APTX generados a partir de los datos de la matriz para las mismas muestras, valores que aumentan a medida que aumenta la proporción. Como resultado, la pendiente de la línea que muestra la correlación entre las proporciones RASGRP1: APTX generadas por Δ -Ct normalizado y la matriz es negativa.

50 La figura 7 representa la amplificación de ARN de RasGRP1, APTX y HMBS en un formato triple en un solo tubo que muestra la correspondencia cercana requerida, baja variabilidad y alta reproducibilidad.

Las figuras 8 y 13 muestran la precisión del ensayo de qPCR mejorado en un estudio de Fase 2 de tipifarnib + estudio de etopósido en AML de edad avanzada usando el análisis de Kaplan Meier de pacientes estratificados usando una corte de proporción óptimo 5.2.

Las figuras 9 y 14 representan el análisis de ROC que indica un valor discriminativo de la proporción de 2 genes como 80% (AUC = 0.80) para predecir la respuesta general con un grupo de pacientes de remisión completa (CR) usado como criterio de respuesta.

5 Las figuras 10 y 15 muestran que no existe asociación entre la proporción de 2 genes y la respuesta clínica o la supervivencia global en pacientes no tratados con un FTI. Supervivencia global de 41 pacientes con AML tratados con quimioterapia de inducción intensiva con ara-C, antraciclina y un tercer agente (flavopiridol o etopósido): estratificación por proporción alta-baja de 2 genes.

La figura 11 muestra el flujo de trabajo para comparar y determinar el problema de recolección de muestras preferido.

10 Las figuras 12A y 12B muestran el efecto de los protocolos de recolección de muestras sobre el resultado del ensayo de dos genes. La figura 12B, en particular, muestra la dispersión para cada paciente que ilustra el efecto del protocolo de recolección de muestras. El eje Y muestra la proporción de RASGRP1: APTX en la muestra al RASGRP1: APTX en un ARN de calibración/referencia, que en este caso es ARN JY. De este modo, el valor en el eje Y es una proporción de proporciones alcanzadas por el método $\Delta\Delta\text{Ct}$. El umbral usado en el ensayo preferido es un umbral basado en una estratificación deseable de los pacientes que usan el método $\Delta\Delta\text{Ct}$ para cuantificar los niveles de RASGRP1 y APTX.

15 Descripción detallada

Los agentes terapéuticos a los que se hace referencia en esta especificación incluyen FTI. Adquieren múltiples formas, pero comparten la función inhibitoria esencial de interferir o disminuir la farnesilación de proteínas implicadas en el cáncer y las enfermedades proliferativas. Preferiblemente, los FTI son aquellas indicadas para el tratamiento de leucemias tales como la AML.

20 Numerosos FTI están dentro del alcance de la divulgación e incluyen los descritos en las Patentes de los Estados Unidos 5,976,851; 5,972,984; 5,972,966; 5,968,965; 5,968,952; 6,187,786; 6,169,096; 6,037,350; 6,177,432; 5,965,578; 5,965,539; 5,958,939; 5,939,557; 5,936,097; 5,891,889; 5,889,053; 5,880,140; 5,872,135; 5,869,682; 5,861,529; 5,859,015; 5,856,439; 5,856,326; 5,852,010; 5,843,941; 5,807,852; 5,780,492; 5,773,455; 5,767,274; 5,756,528; 5,750,567; 5,721,236; 5,700,806; 5,661,161; 5,602,098; 5,585,359; 5,578,629; 5,534,537; 5,532,359; 5,523,430;

25 5,504,212; 5,491,164; 5,420,245; 5,238,922 y la Publicación de los Estados Unidos 20030050323. Se prefieren las terapias no peptídicas, denominadas "moléculas pequeñas". Los FTI más preferidas son quinolinas o derivados de quinolina tales como:

30 7-(3-clorofenil)-9-[(4-clorofenil)-1H-imidazol-1-ilmetil]-2,3-dihidro-1H,5H-benzo[ij]quinolizin-5-ona, 7-(3-clorofenil)-9-[(4-clorofenil)-1H-imidazol-1-ilmetil]-1,2-dihidro-4H-pirrol[3,2,1-ij]quinolina-4-ona, 8-[amino(4-clorofenil)(1-metil-1H-imidazol-5-il),metil]-6-(3-clorofenil)-1,2-dihidro-4H-pirrol[3,2,1-ij]quinolin-4-ona, y

8-[amino(4-clorofenil)(1-metil-1H-imidazol-5-il)metil]-6-(3-clorofenil)-2,3-dihidro-1H,5H-benzo[ij]quinolizin-5-ona. El FTI más preferido es (B)-6-[amino(4-clorofenil)(1-metil-1H-imidazol-5-il)metil]-4-(3-clorofenil)-1-metil-2(1H)-quinolinona).

35 Es deseable clasificar la respuesta al tratamiento para facilitar tanto la comprensión del efecto del tratamiento como para comparar diferentes tratamientos. Hay muchos criterios para evaluar tratamientos. Por ejemplo, un recuento de mil neutrófilos puede ser suficiente para identificar una respuesta en algunas realizaciones, mientras que otras realizaciones pueden requerir 1,400 o 1,500 neutrófilos. Del mismo modo, el recuento de plaquetas puede variar desde 100,000 a 140,000. Y, puede requerirse una mejora en una línea celular de un cierto porcentaje o en otras evaluaciones una mejora en dos o incluso una mejora en las tres líneas celulares. La duración de tiempo durante el cual se determinan dichos cambios puede variar entre un mes o dos meses o incluso más. En una realización preferida, un paciente que responde a un FTI es uno en el que al menos se observa una reducción de más del 50% de las células blásticas en la médula ósea después del tratamiento con la FTI. Por lo general, el grado de mejora requerido para la respuesta parcial tiende a ser variable, y la mejora representada por la mejora hematológica es extremadamente variable entre las evaluaciones realizadas por diferentes investigadores y/o médicos. Se pretende que estándares similares alternativos para evaluar una respuesta a la administración de un FTI estén dentro del alcance de las reivindicaciones dirigidas a predecir la respuesta al tratamiento, a menos que se indique expresamente una intención contraria.

45 En una realización preferida, las respuestas positivas al tratamiento comprenden tasas de remisión completa (CR), remisión parcial (PR) y mejora hematológica (HI). Los descriptores de enfermedad restantes son enfermedad progresiva (PD) y se considera que el resto de los no respondedores presenta una enfermedad estable (SD). Cada una de las clasificaciones de respondedores positivos se describen a continuación.

50 La remisión completa (CR) puede estar marcada por la médula ósea que muestra menos de 5% de mieloblastos con maduración normal de todas las líneas celulares, un ANC de al menos 1000/ μL y un recuento de plaquetas de 100,000 μL , ausencia de blastos en sangre periférica, ausencia de células leucémicas identificables en la médula ósea, eliminación de anomalías citogenéticas asociadas a la enfermedad y eliminación de cualquier enfermedad extramedular existente previamente. Una CR se debe confirmar de 4 a 6 semanas después de la documentación inicial. Si es posible,

- se debe realizar al menos una biopsia de médula ósea para confirmar la CR. Con la CR, se espera que la médula ósea parezca normal con menos del cinco por ciento de blastos, maduración normal y sin displasia. En la sangre periférica, se encontrará una hemoglobina de más de 11 gramos, neutrófilos de más de 1,500 por milímetro cuadrado y plaquetas de más de 100,000, sin blastos y sin displasia. Adicionalmente, para considerar la AML curada, lo ideal es que el riesgo de recaída en un paciente con CR sea el mismo que el riesgo de AML en la población general.
- 5 La remisión parcial (PR) se identifica preferiblemente por la presencia de hematopoyesis trilineal en la médula ósea con recuperación de ANC y plaquetas a los niveles indicados anteriormente, pero con 5 a 25% de blastos de médula ósea, y al menos 50% de disminución en Porcentaje de explosión de médula ósea desde el inicio. Una PR debe ser confirmada 4 a 6 semanas después de la documentación inicial.
- 10 La mejora hematológica (HI) está marcada preferiblemente por al menos un 50% de disminución en los blastos de la médula ósea o disminución en cualquier enfermedad extramedular medible, recuperación de ANC de 500 a 1000 μ L, recuento de plaquetas de 20,000 a 100,000 μ L, o mejora en los requisitos de transfusión.
- La enfermedad estable (SD) se identifica por cualquier respuesta al tratamiento que no cumple con los criterios de CR, PR, HI o PD.
- 15 La enfermedad progresiva (PD) está marcada por uno cualquiera de los siguientes:
- > 50% de aumento en el porcentaje de blastos en la médula ósea de la mejor evaluación
 - > 50% de incremento en blastos circulantes
 - Nueva aparición de blastos circulantes (en al menos 2 ocasiones consecutivas)
 - Desarrollo de la enfermedad extramedular.
- 20 • En pacientes que presentan un porcentaje inicial de blastos en la médula ósea suficientemente alto para impedir la capacidad de soportar la progresión de la enfermedad en un aumento > 50% en el porcentaje de blastos en la médula ósea, la progresión de la enfermedad debe basarse en criterios de sangre periférica, nueva aparición de blastos circulantes (en al menos 2 ocasiones consecutivas), y/o desarrollo de enfermedad extramedular.
- 25 La duración de la respuesta se mide preferiblemente desde el momento en que se cumplen los criterios de medición para CR o PR (lo que se registra primero) hasta la primera fecha en que se documenta objetivamente la enfermedad recurrente o progresiva. La duración de la CR se mide desde el momento en que se cumplen los criterios de medición para la CR hasta la primera fecha en que se documenta objetivamente la enfermedad recurrente.
- La duración de la enfermedad estable se mide en pacientes con enfermedad estable desde el inicio del tratamiento hasta que se cumplen los criterios de progresión.
- 30 La supervivencia libre de progresión ("PFS") representa el tiempo entre el ingreso al estudio y la primera fecha de la documentación objetiva de enfermedad recurrente o progresiva, o la aparición de muerte por cualquier causa. La supervivencia global se mide desde el momento de la inscripción en este estudio hasta el momento de la muerte.
- 35 La mera presencia de secuencias de ácido nucleico que tienen el potencial de expresar proteínas o péptidos ("genes") dentro del genoma no determina si una proteína o un péptido se expresa en una célula determinada. Si un gen dado capaz de expresar proteínas o péptidos lo hace o no, y en qué medida se produce dicha expresión, en todo caso, está determinado por una variedad de factores complejos. Independientemente de las dificultades para comprender y evaluar estos factores, el análisis de la expresión génica puede proporcionar información útil sobre la respuesta celular a un estímulo determinado, tal como la introducción de un fármaco u otro agente terapéutico. Las indicaciones relativas del grado en que los genes están activos o inactivos se pueden encontrar en los perfiles de expresión génica. Los perfiles de expresión génica se usan para identificar y tratar a los pacientes que probablemente se beneficiarán de una terapia determinada o excluirán a los pacientes de una terapia dada donde el paciente probablemente experimentará poca o ninguna respuesta beneficiosa al fármaco o la terapia.
- 40 Los métodos preferidos para establecer perfiles de expresión génica (incluidos los usados para llegar a las rutas biológicas relevantes) incluyen determinar la cantidad de ARN que se produce y que puede codificar una proteína o un péptido. Esto se logra mediante PCR de transcripción inversa (RT-PCR), RT-PCR competitiva, RT-PCR en tiempo real, RT-PCR de visualización diferencial, análisis Northern Blot y otras pruebas relacionadas. Si bien es posible realizar estas técnicas usando reacciones de PCR individuales, es mejor amplificar el ADN de copia (ADNc) o el ARN de copia (ARNc) producido a partir del ARNm. Algunos métodos para determinar la expresión génica se pueden encontrar en las Patentes de los Estados Unidos 6,271,002; 6,218,122; 6,218,114; y 6,004,755.
- 45 Un método preferido implica calcular la proporción RASGRP1: APTX de dos genes para determinar si es probable que una persona responda al uso de un agente terapéutico FTI. El término "proporción" o la "proporción RASGRP1: APTX
- 50

de dos genes", tal como se aplica a los valores de expresión génica, tiene un intervalo de interpretaciones técnicas en esta divulgación que se distinguen fácilmente del contexto. En un nivel básico, el significado es el mismo, aunque la forma puede diferir. Por ejemplo, cuando se usan técnicas de qPCR, se genera fácilmente un valor de ΔC_t correspondiente a una proporción de dos genes de interés, como es bien conocido para un experto en el arte. Este valor se puede generar usando valores C_t normalizados para los niveles de expresión de cada uno de los genes, por ejemplo, restando el valor C_t medio para ese gen y dividiéndolo por la desviación estándar en los valores C_t para ese gen. La diferencia entre tales valores de C_t normalizados para los dos genes, el valor de ΔC_t , corresponde a la proporción de expresión de los genes en que a medida que la proporción aumenta, el valor de ΔC_t disminuye y viceversa. Ejemplos de tales valores de ΔC_t normalizados se ven en el eje Y de la figura 6 para RASGRP1 y APTX. Tales valores de ΔC_t , o incluso valores de ΔC_t normalizados, se pueden denominar la proporción RASGRP1: APTX de dos genes en esta divulgación. Un ejemplo se encuentra en la figura 3A que muestra un umbral de 0 en términos de valor de ΔC_t en el eje Y, de tal manera que los respondedores están por debajo del umbral. Este umbral de 0 corresponde a un umbral de 1 cuando la proporción RASGRP1: APTX de dos genes se expresa en términos de datos de matriz, tal como los representados a lo largo del eje X de la figura 6. La figura 6 simplemente ilustra que es fácilmente posible pasar de una manera de determinar la proporción RASGRP1: APTX a otra. Alternativamente, la proporción se puede expresar como un número positivo basado en el valor de $\Delta \Delta C_t$, que compara diversas muestras con un calibrador estándar/ARN de referencia. El uso de dicho calibrador común hace que un ensayo sea más portátil y confiable, ya que el umbral se define principalmente por su desempeño en la estratificación de pacientes en un entorno de prueba. En una realización preferida que usa RTPCR, la proporción RASGRP1: APTX de dos genes, expresada como un número positivo basado en el valor de $\Delta \Delta C_t$ como se describe en otra parte en esta divulgación, conduce a un valor de 5.2 para estratificar a los respondedores a tipifarnib de no respondedores al tipifarnib. Un ejemplo de los valores de la proporción de dos genes de RASGRP1: APTX, expresados como un número positivo basado en los valores de $\Delta \Delta C_t$, se representan en el eje Y de la figura 12B y también se conocen como proporción RASGRP1: APTX de dos genes con el contexto, dejando claro cuál interpretación se debe usar. En sentido estricto, una persona con experiencia ordinaria en el arte se dará cuenta de que un umbral o una proporción RASGRP1: APTX de dos genes, expresado como un valor en función de uno o más del valor de $\Delta \Delta C_t$, en términos de datos de matriz, como un valor de ΔC_t y solo el valor de $\Delta \Delta C_t$, mientras que sea comparable, no se presten a una interconvertibilidad fácil en ausencia de información adicional para ayudar en dicho mapeo. Las reivindicaciones y la descripción en este documento se deben leer a la luz de esta consideración. La proporción RASGRP1: APTX de dos genes se indica, por claridad, como la proporción RASGRP1: APTX de dos genes $\Delta \Delta C_t$ o la proporción RASGRP1: APTX de dos genes ΔC_t o el umbral de $\Delta \Delta C_t$ o el umbral de ΔC_t , pero cuando no se proporciona tal aclaración, el contexto proporciona fácilmente la interpretación correcta.

Habiendo establecido un umbral para distinguir un respondedor de un no respondedor, la proporción de dos genes se fija en un medio tal como un medio legible por ordenador como se describe a continuación. Se obtiene una muestra de un paciente que contiene células enfermas (tal como las células blásticas hematopoyéticas en el caso de la AML). En una realización preferida, el ARN de la muestra se obtiene y amplifica a partir de la célula del paciente enfermo y se amplifica mediante PCR y la proporción de dos genes calculada con la ayuda de un control de normalización externo. Luego, en una realización preferida, si la proporción de dos genes es mayor que un umbral predeterminado, el paciente se identifica como un respondedor probable, o bien como un no respondedor.

De manera similar, la proporción de dos genes se puede usar para controlar la respuesta a un tratamiento que comprende un FTI en diversos períodos a lo largo del curso del tratamiento. Si la proporción de dos genes es consistente con un respondedor, entonces la terapia del paciente es continua. Si no es así, entonces se altera la terapia del paciente. Tal análisis permite la intervención y el ajuste de la terapia antes de detectar indicios clínicos o de otra manera frente a indicios clínicos ambiguos.

Las realizaciones preferidas pueden cubrir representaciones de los perfiles de expresión génica útiles para tratar, diagnosticar, pronosticar, estadificar y evaluar de otro modo enfermedades que se reducen a un medio que puede leerse automáticamente, como medios legibles por ordenador (magnéticos, ópticos y similares). Las realizaciones preferidas también pueden incluir instrucciones para evaluar los perfiles de expresión génica en tales medios. Por ejemplo, las realizaciones preferidas pueden comprender un CD ROM que tiene instrucciones informáticas para comparar los perfiles de expresión génica de las carteras de genes descritos anteriormente. Las realizaciones preferidas también pueden tener perfiles de expresión génica grabados digitalmente en los mismos, de modo que se puedan comparar con los datos de expresión génica de muestras de pacientes. Alternativamente, los perfiles se pueden grabar en diferentes formatos de representación. Una grabación gráfica es uno de esos formatos. Los algoritmos de agrupación en clúster, tal como los incorporados en los programas informáticos "OMNIVIZ" y "TREE VIEW" mencionados anteriormente, pueden ayudar mejor en la visualización de tales datos.

El efecto biológico de un fármaco puede ser una consecuencia de los cambios mediados por el fármaco en la tasa de transcripción o degradación de una o más especies de ARN, la tasa o extensión de la traducción o el procesamiento postraduccional de uno o más polipéptidos. la tasa o extensión de la degradación de una o más proteínas, la inhibición o estimulación de la acción o actividad de una o más proteínas, y así sucesivamente. Además de los FTI preferidos, los fármacos preferidos incluyen aquellos que modulan las vías de señalización de MAPK/ERK, TGF- β , WNT o vías apoptóticas. Estos incluyen, sin limitación, inhibidores de la tirosina quinasa, inhibidores de la MEK quinasa, inhibidores

de la P13K quinasa, inhibidores de la MAP quinasa, moduladores de la apoptosis y combinaciones de los mismos. Los fármacos de ejemplo más preferidos entre ellos son el inhibidor de tirosina quinasa "GLEEVEC" de Novartis, el inhibidor de la MAP quinasa U-0126, el inhibidor de la MAP quinasa PD-098059, el inhibidor de la quinasa MAP SB-203580 y el antisentido, ribozima y ADNzima Bcl-XL anti-apoptóticos. Los ejemplos de otros fármacos útiles incluyen, sin limitación, los calanólidos de la Patente de los Estados Unidos 6,306,897; los bicíclicos sustituidos de la Patente de los Estados Unidos 6,284,764; los indolines de la Patente de los Estados Unidos 6,133,305; y los oligonucleótidos antisentido de la Patente de los Estados Unidos 6,271,210.

Las composiciones farmacéuticamente útiles que comprenden los fármacos descritos en este documento se pueden formular según métodos conocidos, tales como mediante la mezcla de un portador farmacéuticamente aceptable. Se pueden encontrar ejemplos de tales portadores y métodos de formulación en Remington's Pharmaceutical Sciences. Para formar una composición farmacéuticamente aceptable apropiada para una administración eficaz, tales composiciones contendrán una cantidad eficaz del fármaco. La cantidad eficaz del fármaco puede variar según una variedad de factores, tales como la condición del individuo, el peso, el sexo y la edad. Otros factores incluyen el modo de administración. Las composiciones farmacéuticas se pueden proporcionar al individuo por una variedad de rutas tales como subcutánea, tópica, oral e intramuscular.

Los fármacos descritos en este documento incluyen derivados químicos de las moléculas de base del fármaco. Es decir, pueden contener unidades estructurales químicas adicionales que normalmente no son parte de la molécula base. Tales unidades estructurales pueden mejorar la solubilidad, vida media, absorción, etc. de la molécula base. Alternativamente, las unidades estructurales pueden atenuar los efectos secundarios indeseables de la molécula base o disminuir la toxicidad de la molécula base. Ejemplos de tales unidades estructurales se describen en una variedad de textos, como Remington's Pharmaceutical Sciences.

Los compuestos identificados según los métodos descritos en este documento se pueden usar solos a las dosis apropiadas definidas por pruebas de rutina para obtener una inhibición o actividad óptima al tiempo que se minimiza cualquier posible toxicidad. Además, la administración conjunta o la administración secuencial de otros agentes puede ser deseable.

Los fármacos descritos en este documento se pueden administrar en una amplia variedad de formas de dosificación terapéutica en vehículos convencionales para administración. Por ejemplo, los fármacos se pueden administrar en formas de dosificación oral como comprimidos, cápsulas (cada una con formulaciones de liberación prolongada y de liberación sostenida), píldoras, polvos, gránulos, elixires, tinturas, soluciones, suspensiones, jarabes y emulsiones, o por inyección. Del mismo modo, también se pueden administrar en forma intravenosa (tanto en bolo como en infusión), intraperitoneal, subcutánea, tópica con o sin oclusión o intramuscular, todas ellas usando formas bien conocidas para los expertos en el arte farmacéutico. Se puede emplear una cantidad eficaz pero no tóxica del compuesto deseado como agente modulador.

Para el tratamiento de combinación con más de un agente activo, donde los agentes activos están en formulaciones de dosificación separadas, los agentes activos se pueden administrar simultáneamente, o cada uno se puede administrar en momentos escalonados por separado.

El régimen de dosificación que usa los compuestos o moduladores descritos en este documento se selecciona de acuerdo con una variedad de factores que incluyen el tipo, especie, edad, peso, sexo y condición médica del paciente; la severidad de la condición que se va a tratar; la vía de administración; la función renal y hepática del paciente; y el fármaco particular empleado. Un médico o veterinario con experiencia ordinaria puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz del fármaco requerido para prevenir, contrarrestar o detener el progreso de la afección. La precisión óptima para lograr concentraciones de fármaco dentro del intervalo que produce eficacia sin toxicidad requiere un régimen en función de la cinética de la disponibilidad del fármaco a los sitios diana. Esto implica una consideración de la distribución, el equilibrio y la eliminación de un fármaco.

Los fármacos descritos en este documento forman el ingrediente activo, y se administran por lo general en mezcla con diluyentes, excipientes o portadores farmacéuticos apropiados (denominados colectivamente en este documento como materiales "portadores") seleccionados adecuadamente con respecto a la forma de administración prevista, es decir, comprimidos orales, cápsulas, elixires, jarabes y similares, y de acuerdo con las prácticas farmacéuticas convencionales.

Por ejemplo, para la administración oral en forma de un comprimido o cápsula, el componente activo del fármaco se puede combinar con un portador inerte, farmacéuticamente aceptable, no tóxico, oral, tal como etanol, glicerol, agua y similares. Además, cuando se desee o sea necesario, también se pueden incorporar en la mezcla aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes y agentes colorantes apropiados. Los aglutinantes apropiados incluyen, sin limitación, almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábiga, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras y similares. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen, sin limitación, oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares. Los desintegradores incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma xantana y similares.

5 Para formas líquidas, el componente de fármaco activo se puede combinar en agentes de suspensión o dispersión con sabor apropiado tales como las gomas sintéticas y naturales, por ejemplo, tragacanto, goma arábiga, metilcelulosa y similares. Otros agentes dispersantes que se pueden emplear incluyen glicerina y similares. Para administración parenteral, se desean suspensiones y soluciones estériles. Las preparaciones isotónicas, que generalmente contienen conservantes apropiados, se emplean cuando se desea la administración intravenosa.

10 Los compuestos o moduladores se pueden administrar alternativamente por vía parenteral mediante inyección de una formulación que consiste en el ingrediente activo disuelto en un portador líquido inerte. La inyección puede ser cualquiera intramuscular, intraluminal, intratraqueal o subcutánea. La formulación inyectable consiste en el ingrediente activo mezclado con un portador líquido inerte apropiado. Los portadores líquidos aceptables incluyen los aceites vegetales tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo y similares, así como solventes orgánicos tales como solketal, glicerol formal y similares. Como alternativa, también se pueden usar formulaciones parenterales acuosas. Los aceites vegetales son los portadores líquidos preferidos. Las formulaciones se preparan disolviendo o suspendiendo el ingrediente activo en el portador líquido, de modo que la formulación final contenga desde 0.005 a 10% en peso del ingrediente activo.

15 Para más antecedentes de esta divulgación, se hace referencia a las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos 60/340,938 presentadas previamente el 30 de octubre de 2001; 60/338,997 presentada el 30 de octubre de 2001, 60/340,081 presentada el 30 de octubre de 2001, 60/341,012 presentada el 30 de octubre de 2001, 10/283,975 presentada el 30 de octubre de 2002 y 11/589,660 presentada el 30 de octubre de 2006, incluidas todas las referencias citado en ese documento. La divulgación se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

20 Ejemplo 1

Materiales y métodos

Evaluación clínica

25 En un ejemplo de ejemplo, se recogen muestras de médula ósea a partir de un estudio de fase 2, no comparativo, multicéntrico, de etiqueta abierta, que investiga la eficacia y seguridad de la inhibición de la farnesiltransferasa con tipifarnib (R115777, ZARNESTRA®) en adultos ancianos con AML sin tratamiento previo, de alto riesgo.

Recolección y procesamiento de muestras

30 Se recogieron muestras de médula ósea de pacientes que habían dado su consentimiento antes del tratamiento con tipifarnib seguido de células mononucleares que se procesaban preferiblemente en el sitio. Los aspirados de médula ósea se diluyeron con PBS y se centrifugaron con diatrizoato de ficoll (1.077 g/ml). Las células sanguíneas leucémicas enriquecidas se lavaron dos veces con PBS, se volvieron a suspender en FBS con DMSO al 10% y se congelaron inmediatamente a una temperatura de -70 °C a -80 °C. El ARN total se extrajo de las muestras celulares usando el kit Trizol (Qiagen, Santa Clarita, CA). La calidad del ARN se puede determinar evaluando la presencia de bandas ribosómicas en un bioanalizador Agilent. Se procesaron adicionalmente muestras de buena calidad para el análisis de micromatrices. El ADN se aisló de la misma muestra de médula ósea procesada con Trizol según las instrucciones del fabricante (Qiagen, Santa Clarita, CA). Las muestras se analizaron para determinar la expresión génica global, mutaciones N-RAS y/o qPCR de genes específicos (figura 1).

Estado mutacional N-RAS

40 El análisis de las mutaciones de activación en N-RAS se determinó mediante análisis de PCR y RFLP como se describió anteriormente. End et al. (2001). Los exones 1 y 2 del gen N-RAS se amplificaron simultáneamente en una única reacción múltiple y se usó una parte alícuota para una segunda ronda de PCR. La resistencia a la escisión en sitios de enzimas de restricción naturales o inducidos por cebador en los amplicones de segunda ronda indicó la presencia de una mutación que había abolido el sitio en los loci que se estaban analizando. Las enzimas de restricción para el análisis de loci específicos fueron Bsl I (codones N-ras 12 y 13), Msc I (codón N-ras 61, posiciones 1 y 2) y Bfa I (codón N-ras 61, posición 3). Las reacciones se digirieron durante la noche y los productos de la PCR se analizaron en un bioanalizador Agilent.

Análisis de micromatrices

50 La síntesis de ADNc y ARNc se realizó según los protocolos de Affymetrix (Santa Clara, CA). Dado que el rendimiento de muchas muestras fue bajo, se realizaron dos rondas de amplificación lineal como se describió anteriormente en la Publicación de la Patente de los Estados Unidos No. 20070048782. Para la hibridación, se fragmentaron al azar 11 µg de ARNc por incubación a 94 °C, durante 35 minutos en Tris-acetato 40 mM, pH 8.1, acetato de potasio 100 mM y acetato de magnesio 30 mM. El ARNc fragmentado se hibridó con matrices U133A a 45 °C, durante 16 h en un horno rotiserie a 60 rpm. Después de la hibridación, las matrices se lavaron (con 6x SSPE y 0.5x SSPE que contenían Triton X-100 (0.005%)), y se tiñeron con estreptavidina-ficoeritrina (SAPE; Molecular Probes, Eugene, OR). La cuantificación de la sonda marcada unida se realizó con el escáner GeneArray Agilent G2500A (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

La intensidad de fluorescencia total para cada matriz se ajustó a un valor uniforme de 600. El rendimiento del chip se cuantificó calculando una proporción de señal a ruido (señal/ruido promedio sin procesar). Los chips se eliminaron de un análisis adicional si su proporción señal a ruido era inferior a 20 o si las llamadas actuales en el chip eran inferiores al 30%. Los genes solo se incluyeron en un análisis adicional si se llamaban "presentes" en al menos el 10% de los chips. Aproximadamente 12,000 conjuntos de sondas de Affymetrix quedaron después de este corte. La calidad de los datos de expresión génica se controló aún más identificando valores atípicos basados en el análisis de componentes principales y analizando las distribuciones normales de las intensidades genéticas (Partek Pro V5.1). Los datos de la micromatriz se han depositado en NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

Definiciones de respuesta

La respuesta a tipifarnib se definió como pacientes que tenían una respuesta completa (CR), una respuesta parcial (PR) o una mejora hematológica (HI). En resumen, la HI se definió como cualquier recuento de blastos en la médula ósea inferior al 5% o una reducción de los blastos en la médula ósea en al menos la mitad. La enfermedad progresiva (PD) se definió como un aumento > 50% en la médula ósea o % de blastos circulantes desde el inicio, o una nueva aparición de blastos circulantes (en al menos 2 ocasiones consecutivas). La enfermedad estable (SD) se definió como cualquier respuesta que no cumpliera con los criterios de CR, PR, HI o PD.

Análisis estadístico

Se usó el análisis de la característica operativa del receptor (ROC) para probar el valor predictivo global de genes individuales y/o clasificadores multigénicos. Se usaron los siguientes criterios de filtrado de genes para identificar los genes expresados diferencialmente entre los respondedores y los pacientes con enfermedad progresiva: Especificidad para identificar el "respondedor" con una sensibilidad del 100% > = 40%, valor p de la prueba T (datos transformados log2 con varianza desigual) <0.05, cambio doble > 2. Los genes que pasaron estos criterios fueron clasificados por AUC (área bajo la curva ROC).

Para construir un clasificador, se usó la puntuación de respuesta para calcular la probabilidad de cada paciente de responder a la terapia con tipifarnib. La puntuación se definió como la combinación lineal de señales de expresión ponderadas con el estadístico t como el peso. El umbral se determinó a partir de la curva ROC del conjunto de entrenamiento para garantizar una sensibilidad del 100% y la mayor especificidad. Para determinar cuántos genes debían incluirse en el predictor, se llevó a cabo la validación cruzada dejando uno fuera (LOOCV). Se registraron los puntajes de respuesta para las muestras de "excluido" en función de diferentes números de genes. Los rendimientos de los predictores con diferentes números de genes se evaluaron en función de la tasa de error de clasificación errónea, la sensibilidad, la especificidad, los valores de p que miden la separación de las curvas de Kaplan-Meier de los dos grupos pronosticados. Y el mejor predictor fue seleccionado de acuerdo con lo anterior.

El algoritmo de par de puntuación máxima (TSP) se introdujo por primera vez por Geman et al. (2004). En esencia, el algoritmo clasifica todos los pares de genes (genes i y j) en función de la diferencia absoluta (D_{ij}) en la frecuencia del evento donde el gen i tiene un valor de expresión más alto que el gen j en muestras entre la clase C1 y C2. En los casos en los que hay varios pares de puntajes superiores (todos compartiendo el mismo D_{ij}), se selecciona el par superior por un puntaje de rango secundario que mide la magnitud a la que se producen las inversiones de los niveles de expresión génica de una clase a otra dentro de un par de genes. El par superior con la frecuencia más alta de D_{ij} absoluto > 2 veces en todas las muestras se seleccionará como par candidato. El par candidato se evaluó luego en un conjunto de datos de prueba independientes.

La validación cruzada dejando uno fuera (LOOCV) se llevó a cabo en el conjunto de datos de entrenamiento para evaluar cómo funciona el algoritmo. Los resultados de los predictores se evaluaron en función de la tasa máxima de errores de clasificación errónea. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando R (R Development Core Team, 2006).

RT-PCR cuantitativa en tiempo real

Para cada muestra, fue transcrito de manera inversa 1 µg de ARN total (según lo evaluado por OD_{260}) usando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems, Foster City, CA) según las instrucciones del fabricante. Luego, las muestras se incubaron a 25 °C, durante 10 minutos y luego a 37 °C, durante 30 minutos para una conversión óptima de ARN. Se realizó QPCR usando el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA) con todas las muestras realizadas por triplicado. Cada reacción contenía 5 µl de la mezcla maestra de PCR universal TaqMan® que contiene UNG (Applied Biosystems, Foster City, CA), 4.5 µl de plantilla de ADNc y 0.5 µl de 20 x ensayo a Demand Gene Expression Assay Mix o 9 pmol de cebador tanto hacia adelante como inverso y 2.5 pmol de sonda (Applied Biosystems, Foster City, CA), en un volumen de reacción total de 10 µl. Se eligieron todos los conjuntos de cebadores y sondas debido al pequeño tamaño del amplicón (menos de 100 nucleótidos) y se usaron las sondas fluorogénicas FAM. Los cebadores y las sondas usados fueron APTX (número de producto 4331182 Applied Biosystems) y RASGRP1 (número de producto 4351372 Applied Biosystems). La proporción de expresión de RASGRP1: APTX se calculó normalizando los valores brutos de Ct restando la media de Ct del

conjunto de muestras, dividiendo por la desviación estándar, y luego calculando la diferencia de los valores de Ct normalizados de cada gen (APTX - RASGRP1).

Resultados

5 Este estudio examinó los perfiles de expresión génica de muestras de médula ósea leucémica de pacientes inscritos en un ensayo clínico de Fase 2 del inhibidor de la farnesiltransferasa tipifarnib en pacientes de edad avanzada con leucemia mielógena aguda no tratada previamente y de bajo riesgo. Lancet et al. (2006). La médula ósea de 67
10 pacientes se recolectó antes del tratamiento con tipifarnib y las células mieloides leucémicas se enriquecieron mediante centrifugación de densidad de Ficoll (Tabla 1). El ARN total de buena calidad de 13 respondedores (9 CR, 4 HI), 8 pacientes con enfermedad estable y 13 con enfermedad progresiva se amplificó, etiquetó e hibridó en el Affymetrix U133A GeneChip. Un total de 30 muestras fueron evaluadas por qPCR para la validación de genes específicos y 32 muestras fueron evaluadas para el estado mutacional de N-RAS.

Tabla 1. Comparación de pacientes perfilados.

Parámetro	Todos los pacientes tratados	Pacientes con perfil PGx
Pacientes totales, n	158	67
Ensayo de micromatrices, n		34
Ensayo qPCR, n		30
Ensayo N-Ras, n		32
Mutación N-Ras, n (%)		11 (34)
Edad mediana, e (intervalo)	74 (34-85)	73 (63-85)
sexo, n hombre (%)	95 (60)	41 (61)
MDS anterior, sí (%)	119 (75)	48 (72)
CR, no. (%)	22 (14)	14 (21)
PR, no. (%)	3 (2)	1 (2)
HI, no. (%)	12 (8)	7 (10)
SD, no. (%)	50 (32)	15 (22)
PD, no. (%)	58 (37)	30 (44)
NE, no. (%)	13 (8)	0 (0)

CR = respuesta completa; PR = respuesta parcial; HI = mejora hematológica, SD = enfermedad estable, PD = enfermedad progresiva, NE = no evaluable; PGx = estado mutacional Ras farmacogenómica y resultado del paciente.

15 Se cribó el ADN de la médula ósea de 32 pacientes con AML para detectar mutaciones activadoras de N-Ras (codones 12, 13, 61). Treinta y cuatro por ciento (11/32) de los pacientes presentaron mutaciones N-Ras con un paciente que tenía mutaciones en múltiples codones (Tabla 2). No hubo una correlación estadísticamente significativa entre el estado mutacional de N-RAS y la respuesta al tipifarnib o la supervivencia global.

Tabla 2.

ID SUJETO	RESPUESTA	Mutación N-Ras	OS	Con vida	Micromatriz	qPCR	SEXO	EDAD	MDS anterior
100101	HI	ND	378	NO	ND	SÍ	HOMBRE	68	NO
100104	PD	ND	728	NO	SÍ	SÍ	MUJER	63	NO

ES 2 705 719 T3

ID SUJETO	RESPUESTA	Mutación N-Ras	OS	Con vida	Micromatriz	qPCR	SEXO	EDAD	MDS anterior
100109	PD	ND	68	NO	SI	SI	MUJER	81	NO
100110	CR	ND	983	SI	SI	SI	MUJER	74	NO
100112	PD	ND	169	NO	ND	SI	MUJER	69	SI
100113	CR	ND	211	NO	ND	SI	HOMBRE	82	SI
100116	PD	ND	14	NO	ND	SI	MUJER	72	SI
100121	SD	ND	252	NO	SI	ND	HOMBRE	72	SI
100204	SD	N-12	493	NO	ND	ND	MUJER	69	SI
100205	PD	WT	754	NO	SI	ND	HOMBRE	74	SI
100208	PD	WT	29	NO	SI	ND	HOMBRE	76	SI
100209	PD	N61(1,2)	209	NO	SI	ND	HOMBRE	73	SI
100210	PD	N-12, N-13	654	NO	SI	ND	HOMBRE	68	SI
100212	SD	N-12	1200	SI	ND	ND	HOMBRE	70	SI
100213	CR	WT	257	NO	SI	ND	MUJER	81	SI
100214	CR	N-13	395	NO	ND	ND	MUJER	73	SI
100215	SD	WT	54	NO	ND	ND	HOMBRE	82	NO
100216	SD	N-13	116	NO	ND	ND	HOMBRE	77	SI
100302	PD	N-12	48	NO	SI	ND	MUJER	73	NO
100307	HI	WT	179	NO	SI	ND	HOMBRE	68	SI
100310	SD	WT	242	NO	ND	ND	MUJER	76	SI
100316	SD	WT	273	NO	ND	ND	MUJER	66	NO
100317	PD	WT	39	NO	ND	ND	HOMBRE	76	NO
100319	SD	WT	233	NO	SI	ND	HOMBRE	71	NO
100320	HI	WT	374	NO	ND	ND	MUJER	78	NO
100322	CR	WT	237	SI	SI	ND	HOMBRE	73	SI
100324	HI	WT	248	NO	SI	ND	HOMBRE	85	SI
100330	HI	N-12	153	NO	SI	ND	MUJER	67	NO
100333	SD	N-12	364	NO	SI	ND	HOMBRE	65	SI
100336	CR	N-12	67	NO	SI	ND	HOMBRE	80	SI
100337	PD	WT	38	NO	ND	ND	HOMBRE	72	SI
100338	PD	N-12	8	NO	SI	ND	HOMBRE	78	NO
100339	PD	WT	25	NO	SI	ND	HOMBRE	75	NO

ES 2 705 719 T3

ID SUJETO	RESPUESTA	Mutación N-Ras	OS	Con vida	Micromatriz	qPCR	SEXO	EDAD	MDS anterior
100340	SD	WT	32	NO	ND	ND	MUJER	83	NO
100341	CR	WT	433	NO	SI	ND	HOMBRE	67	SI
100604	SD	WT	64	NO	SI	ND	HOMBRE	63	SI
100605	PD	WT	74	NO	ND	ND	HOMBRE	67	SI
101008	CR	WT	548	NO	SI	ND	HOMBRE	82	NO
101021	CR	ND	991	SI	SI	SI	MUJER	69	SI
101025	CR	ND	735	SI	ND	SI	HOMBRE	70	SI
101029	PD	ND	64	NO	ND	SI	HOMBRE	70	SI
101038	SD	ND	151	NO	SI	ND	MUJER	75	SI
101039	PD	ND	50	NO	ND	SI	MUJER	85	SI
101043	SD	ND	200	NO	SI	ND	MUJER	79	SI
101046	PD	ND	53	NO	SI	SI	MUJER	66	SI
101049	CR	WT	564	NO	SI	ND	HOMBRE	65	SI
101057	CR	WT	386	NO	SI	ND	HOMBRE	85	SI
101067	PD	ND	88	NO	ND	SI	MUJER	76	SI
101069	PD	ND	94	NO	ND	SI	HOMBRE	81	SI
101075	HI	ND	659	SI	SI	SI	HOMBRE	71	SI
101077	SD	ND	574	SI	SI	ND	MUJER	75	SI
101078	PD	ND	190	NO	ND	SI	MUJER	77	NO
101079	PD	ND	429	NO	ND	SI	MUJER	70	SI
101083	PD	ND	71	NO	ND	SI	HOMBRE	73	SI
101091	CR	ND	671	SI	ND	SI	HOMBRE	71	SI
101092	PD	ND	136	NO	ND	SI	MUJER	69	SI
101094	HI	ND	579	SI	ND	SI	HOMBRE	65	SI
101095	PD	ND	108	NO	SI	SI	HOMBRE	82	SI
101096	CR	ND	390	SI	ND	SI	HOMBRE	69	SI
101101	PD	ND	91	NO	ND	SI	HOMBRE	69	SI
101102	PD	ND	76	NO	SI	SI	HOMBRE	69	SI
101103	PD	ND	29	NO	ND	SI	MUJER	80	NO
101108	PR	ND	123	NO	NO	SI	HOMBRE	70	SI
101109	SD	ND	656	SI	SI	ND	HOMBRE	68	SI

ID SUJETO	RESPUESTA	Mutación N-Ras	OS	Con vida	Micromatriz	qPCR	SEXO	EDAD	MDS anterior
101114	PD	ND	69	NO	SI	SI	HOMBRE	72	SI
101121	PD	ND	43	NO	ND	SI	HOMBRE	78	NO
101122	PD	ND	44	NO	ND	SI	MUJER	80	NO

ND = no determinado; WT = tipo salvaje; CR = respuesta completa; PR = respuesta parcial; HI = mejora hematológica, SD = enfermedad estable, PD = enfermedad progresiva, OS = supervivencia global.

Identificación de genes predictivos de la cohorte de AML recién diagnosticada

5 El siguiente objetivo fue identificar genes predictivos de respuesta a tipifarnib en la población de AML recién diagnosticada. Con este fin, se realizaron experimentos de descubrimiento en los 13 respondedores (9 CR y 4 HI) y 13
 10 pacientes con enfermedad progresiva. Los pacientes con enfermedad estable no se usaron en este análisis, ya que estos pacientes no pueden definirse claramente como ya sea respondedores o no respondedores. Usando el mismo enfoque que se usó para identificar los marcadores para la AML reincidente y refractaria (20070048782), identificamos
 15 45 conjuntos de sondas (correspondientes a 38 genes únicos) que fueron predictivas de respuesta (Tabla 3). Los criterios de selección apuntaron a identificar genes que predecirían los respondedores con una alta sensibilidad (que se aproxima al 100%) con un corte de especificidad del 40% y una diferencia de expresión génica media de al menos dos veces. Los genes se clasificaron en función del área bajo la curva (AUC) definida a partir de un análisis de característica operativa del receptor (ROC) del conjunto de entrenamiento. Este valor representa el valor predictivo general del gen con un AUC de 1.0 que indica una clasificación perfecta. Cada gen se probó primero en el conjunto de entrenamiento usando un método LOOCV. El gen superior, la proteína liberadora de guanilo de RAS 1 (RASGRP 1), mostró un AUC de 0.95.

Tabla 3. 45 conjuntos de sondas predictivos de respuesta a tipifarnib en AML recién diagnosticada

ID conjunto de sondas	Símbolo del gen	Título del gen	valor p	Espec.	t-estad	FC	AUC
205590_at	RASGRP1	Proteína Ras liberadora de guanilo 1	2.64E-06	0.54	6.40	4.01	0.95
217028_at	CXCR4	receptor de la quimioquina (motivo C-X-C) 4	4.41E-05	0.69	5.08	2.35	0.92
206687_s_at	PTPN6	Proteína tirosina fosfatasa, no-receptor tipo 6	8.23E-05	0.77	-4.75	-2.15	0.91
210439_at	ICOS	co-estimulador de células T inducibles	1.27E-04	0.77	4.56	3.81	0.91
206641_at	TNFRSF17	Superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 17	3.79E-02	0.62	2.24	2.55	0.91
213539_at	CD3D	Molécula CD3d, delta (complejo CD3-TCR)	1.75E-04	0.69	4.63	2.82	0.91
208018_s_at	HCK	Quinasa de células hemopoyéticas	2.62E-04	0.62	-4.28	-3.14	0.90
203063_at	PPM1F	proteína fosfatasa 1F (que contiene el dominio PP2C)	3.66E-04	0.85	-4.17	-2.31	0.90
208130_s_at	TBXAS1	tromboxano A sintasa 1	2.70E-04	0.46	-4.26	-2.51	0.89
216834_at	RGS1	Regulador de la señalización de la proteína G 1	3.90E-04	0.62	4.16	3.48	0.87
213388_at	PDE4DIP	proteína que interacciona fosfodiesterasa 4D (miomegalina)	1.47E-03	0.54	-3.64	-2.01	0.86

ES 2 705 719 T3

ID conjunto de sondas	Símbolo del gen	Título del gen	valor p	Espec.	t-estad	FC	AUC
38487_at	STAB1	estabilina 1	7.95E-04	0.54	-3.87	-2.45	0.86
210982_s_at	HLA-DRA	complejo mayor de histocompatibilidad, clase II, DR alfa	4.23E-03	0.69	-3.25	-3.07	0.85
210321_at	GZMH	granzima H (catepsina G-tipo 2, proteína h-CCPX)	1.64E-03	0.54	3.55	2.83	0.85
217147_s_at	TRAT1	Adaptador transmembrana asociado al receptor de células T 1	1.19E-03	0.54	3.72	2.82	0.85
206298_at	ARHGAP22	Proteína activadora de Rho GTPasa 22	7.89E-04	0.62	-3.88	-2.19	0.85
202990_at	PYGL	fosforilasa, glucógeno; hígado	1.95E-03	0.46	-3.50	-2.01	0.85
221671_x_at	IGKC	inmunoglobulina kappa constante	1.62E-03	0.46	3.56	3.10	0.85
221651_x_at	IGKC	inmunoglobulina kappa constante	1.65E-03	0.46	3.57	2.92	0.85
207651_at	GPR171	Receptor acoplado a proteína G 171	1.13E-03	0.62	3.70	3.01	0.85
202988_s_at	RGS1	regulador de la señalización de la proteína G 1	1.48E-03	0.54	3.59	2.95	0.84
213418_at	HSPA6	proteína de choque térmico 70kDa 6	1.63E-02	0.62	-2.61	-2.34	0.83
209901_x_at	AIF1	factor inflamatorio de aloinjerto 1	3.52E-03	0.54	-3.24	-2.48	0.83
205488_at	GZMA	granzima A	4.43E-03	0.46	3.18	2.75	0.83
217022_s_at	IGHA1	inmunoglobulina pesada alfa constante 1	3.43E-03	0.69	3.36	2.56	0.83
207339_s_at	LTB	linfotoxina beta (superfamilia de TNF, miembro 3)	1.34E-03	0.46	3.65	2.40	0.83
206337_at	CCR7	Receptor de quimioquinas (motivo C-C) 7	1.14E-03	0.54	3.71	2.08	0.83
208894_at	HLA-DRA	complejo mayor de histocompatibilidad, clase II, DR alfa	6.14E-03	0.46	-3.05	-2.58	0.82
39729_at	PRDX2	peroxiredoxina 2	5.81E-03	0.54	3.05	2.13	0.82
209500_x_at	TNFSF13	superfamilia del factor de necrosis tumoral (ligando), miembro 13	1.23E-03	0.46	-3.68	-2.02	0.82
214677_x_at	IGL@	inmunoglobulina lambda locus	4.69E-03	0.46	3.17	2.86	0.82
210314_x_at	TNFSF13	superfamilia del factor de necrosis tumoral (ligando), miembro 13	3.48E-03	0.46	-3.24	-2.05	0.81
209138_x_at	IGL@	inmunoglobulina lambda locus	4.17E-03	0.54	3.17	3.41	0.80
207831_x_at	DHPS	desoxypusina sintasa	1.09E-02	0.62	-2.77	-2.05	0.80
215121_x_at	IGL@	inmunoglobulina lambda locus	1.20E-02	0.46	2.72	4.42	0.79
215946_x_at	CTA-246H3.1	similar a la proteína omega	1.10E-02	0.46	2.76	2.46	0.79

ID conjunto de sondas	Símbolo del gen	Título del gen	valor p	Espec.	t-estad	FC	AUC
204069_at	MEIS1	Meis1, homólogo del sitio 1 de integración viral ecotrópica mieloide	1.01E-02	0.62	-2.89	-2.14	0.78
204698_at	ISG20	gen de la exonucleasa estimulada por interferón 20kDa	6.93E-03	0.46	2.95	2.39	0.78
209906_at	C3AR1	componente complementario receptor 3a 1	1.49E-02	0.54	-2.65	-2.05	0.77
205608_s_at	ANGPT1	angiopoyetina 1	6.40E-03	0.46	-3.11	-2.18	0.76
205927_s_at	CTSE	catepsina E	2.02E-02	0.46	2.55	2.05	0.76
215051_x_at	AIF1	factor inflamatorio de aloinjerto 1	1.54E-02	0.62	-2.62	-2.03	0.76
205609_at	ANGPT1	angiopoyetina 1	4.12E-02	0.54	-2.20	-3.11	0.73
202890_at	MAP7	proteína asociada a los microtúbulos 7	3.30E-02	0.62	-2.30	-2.31	0.73
203485_at	RTN1	reticulon 1	2.60E-02	0.54	-2.40	-2.29	0.72

Espec. = Especificidad, FC = cambio de pliegue, AUC = área bajo la curva del análisis de características del operador del receptor, t-estadístico negativo indica que el gen está abajo en los respondedores.

5 También se examinó si el aumento del número de genes en el clasificador mejoraba su valor predictivo. Usando el enfoque LOOCV y luego representando la sensibilidad, especificidad y tasa de error general de cada clasificador, se encontró que el gen superior solo proporciona el mejor valor predictivo (datos no mostrados). Añadir genes al clasificador de manera lineal no mejoró su valor predictivo. Usando un corte que predispone la sensibilidad alta, la LOOCV demostró que la expresión del gen RASGRP1 permitía un NPV del 88.9% y un PPV del 70.6%, con una precisión predictiva general del 76.9% (figura 1A). Además, el análisis de Kaplan Meier mostró una diferencia significativa en la mediana de supervivencia global de los respondedores (386 días) y en aquellos con enfermedad progresiva (68 días) (figura 1B). La sobreexpresión de este gen único, por lo tanto, pronosticó la respuesta a tipifarnib en la AML recientemente diagnosticada con un alto valor predictivo negativo.

Identificación de un clasificador de par de puntuación superior

15 El valor predictivo de RASGRP1 no mejoró si se añaden genes adicionales al clasificador usando un enfoque lineal. Se usó un algoritmo de selección de genes alternativo para seleccionar genes que mejorarían el valor predictivo de RASGRP1 solo. Para este fin, se usó el algoritmo de par de puntuación máxima (TSP) para identificar el mejor par de genes que proporcionaría la mayor precisión predictiva. Geman et al. (2004). Este enfoque se usó para explotar la mayor diferencia en la expresión entre dos genes y puede ser útil cuando se pretende desarrollar un ensayo de diagnóstico basado en qPCR. El TSP del conjunto de entrenamiento fue RASGRP1 y aprataxina (APTX). RASGRP1 y APTX fueron sobre y subexpresados en los respondedores, respectivamente. Una LOOCV robusta mostró que este par de puntuación máxima (TSP) proporcionó un 85.7% de NPV y un 91.7% de PPV en el conjunto de muestras de entrenamiento con una tasa de error general de solo el 8% (figura 2A). La diferencia en la supervivencia global entre los respondedores pronosticados y los no respondedores fue de 357 días (figura 2B). Estos datos demuestran que el algoritmo de construcción de modelos tiene una tasa de error de predicción asociada baja.

Validación del clasificador RASGRP1: APTX en un conjunto independiente de AML reincidente o refractaria

25 La validación externa del clasificador de TSP se realizó en un conjunto de datos de micromatrices independientes que comprende 54 muestras de pacientes con AML reincidente y refractaria. Un ensayo de diagnóstico que predice una posible respuesta a una terapia contra el cáncer debe tener una alta sensibilidad (y un valor predictivo negativo), ya que es importante capturar la mayor cantidad posible de respondedores posibles. Por lo tanto, para definir un corte apropiado para probar el clasificador TSP, se consideró la necesidad de obtener una alta sensibilidad para predecir los respondedores mientras se mantenía un nivel aceptable de especificidad. En el conjunto de entrenamiento, el nivel de especificidad que podría alcanzarse osciló entre aproximadamente 30% y 100% cuando la sensibilidad se estableció en 100% a 80%, respectivamente. Para asegurar que el clasificador predeciría la mayor cantidad posible de respondedores, se probó un corte conservador que proporcionaba una especificidad de aproximadamente el 60% en el conjunto de entrenamiento. Cuando este valor de corte se aplicó al conjunto de pruebas independientes de AML

reincidente/refractaria, el clasificador de genes RASGRP1: APTX estratificó a los respondedores con 92% de NPV y 27.6% de PPV (en comparación con el 18.5% de prevalencia) (figura 3C). La proporción de probabilidades asociada para ser un respondedor fue de 4.38. Si bien esto fue similar a la precisión predictiva de RASGRP1 solo, la aplicación del clasificador TSP demostró un mejor NPV y una mejor diferencia en la supervivencia global de 98 días entre los respondedores pronosticados y pronosticadores (figura 3A), en comparación con solo 56 días para RASGRP1 (Fig 4).

Validación QPCR de la proporción de expresión RASGRP1: APTX

Una proporción de expresión de dos genes permite el uso de un sistema de detección de qPCR más relevante clínicamente. Treinta muestras (20 PD, 6 CR, 3 HI y 1 PR) proporcionaron suficiente ARN total para la qPCR. Por lo tanto, la proporción de expresión del gen RASGRP1: APTX se evaluó como un pronosticador de la respuesta al tipifarnib usando la qPCR TaqMan® en estas 30 muestras (10 respondedores, 20 enfermedades progresivas) del estudio clínico de AML recientemente diagnosticado. Nueve de estas muestras se habían analizado en la plataforma de micromatrices, sin embargo, 21 no se habían usado en el conjunto de descubrimiento debido a un ARN de mala calidad. Por lo tanto, dos tercios de este conjunto de prueba estaba compuesto por muestras completamente independientes.

La evaluación de las 9 muestras indicó que había una buena correlación ($r = 0.74$) de la proporción de expresión RASGRP1: APTX entre las dos plataformas (figura 6). Usando un punto de corte de 0, el clasificador de dos genes pronosticó correctamente el resultado del tratamiento en 20 de los 30 pacientes con PPV y NPV del 50% y 81%, respectivamente (figura 3B). La supervivencia global media de los pacientes resistentes pronosticados fue de 82 días, mientras que los clasificados como respondedores tuvieron una media de valor de 295 días (figura 3C).

El clasificador RASGRP1: APTX no tiene utilidad de pronóstico independiente del tratamiento con FTI

La proporción de expresión de dos genes se probó en un conjunto de datos de micromatrices independientes de 116 pacientes con AML tratados con regímenes quimioterapéuticos. Cuando se aplicó el clasificador RASGRP1: APTX a este conjunto de pacientes, usando un valor de corte similar al de la población tratada con tipifarnib, no se observó una separación significativa en la supervivencia global (figura 5). Tampoco se observaron diferencias significativas en la supervivencia cuando se usó un intervalo de otros puntos de corte (Tabla 4). Esto indicó que el clasificador RASGRP1: APTX específicamente estratifica a los pacientes que han sido tratados con tipifarnib y no es relevante para los no-FTI. Por otro lado, cuando se aplicó la firma de pronóstico a nuestro conjunto de pacientes con AML refractaria y reincidente, hubo una clara estratificación en términos de supervivencia global.

Tabla 4

corte	valor p	Mediana respondedores OS	Mediana progresores OS	No. Respondedores	No. Progresores
0.5	0.956	336	414	13	103
0.6	0.342	672	374	24	92
0.7	0.266	511	335	34	82
0.8	0.269	511	326	47	69
0.9	0.101	540	316	57	59
1	0.215	483	326	64	52
2	0.795	374	570	94	22
3	0.209	346	909	104	12

OS = supervivencia global

Ejemplo 2

Este ejemplo describe un ensayo de RT-PCR mejorado apropiado para aplicar el ensayo de dos genes a la terapia de combinación con FTI. Durante el desarrollo del ensayo analítico, los ensayos Taqman para 3 marcadores: RASGRP1 (factor de intercambio de nucleótidos de guanina que activa RAS), APTX (aprataxina implicada en la reparación de la escisión del ADN) y HMBS (usado como control interno) fueron diseñados. El HMBS se podría usar como control en una realización o prescindir en otras realizaciones. Las secuencias de los conjuntos de sondas de cebadores Taqman y sus

amplicones se enumeran más arriba en la sección de resumen y en la sección secuencias de esta divulgación. A saber, para APTX - SEQ # 3-4 y 2, el conjunto de sondas de cebador RASGRP1 SEQ # 56 y 1; y HMBS - SEQ # 7-9.

5 Los ensayos cuantitativos de RT-PCR se desarrollaron y optimizaron usando la plataforma ABI-7500 para evaluar el rendimiento de la proporción de 2 genes con RASGRP1 marcada con FAM, Gold 540-APTX y Cy5-HMBS en un formato triple de tubo único. Se usaron ARN celular JY y ARN universal (Stratagene) como normalización externa.

$$\text{Proporción } RASGRP1:APTX = 2^{-(A-B)-(C-D)}$$

Dónde

A: Valor Ct de muestra RASGRP1

B: Valor Ct de ARN JY (o Universal) (+) RasGRP1

10 C: Valor Ct de muestra APTX

D: Valor Ct de ARN JY (o Universal) (+) APTX

15 Se podrían sustituir otras fuentes de ARN celular siempre que los parámetros de ensayo, en particular, el umbral, se vuelvan a calcular para el ARN celular particular empleado para la normalización externa. El ARN de referencia usado para la normalización externa es preferiblemente de una línea celular que crece en condiciones definidas y que es relativamente poco sensible a los FTI. Sin estar limitado por la teoría, un ARN de referencia apropiado se puede derivarse de una línea celular que es neutral en su respuesta a la FTI. Dicha línea celular de referencia se puede desarrollar a partir de pacientes que realizan pruebas en la región del umbral en función del ensayo de dos genes, pero que en realidad no responden al tratamiento con FTI. De este modo, sin limitarse a la teoría, tales pacientes son una fuente probable para desarrollar un ARN de referencia mejorado para la prueba de proporción de dos genes. Un posible método para desarrollar y evaluar una línea celular puede ser seleccionar una línea celular que, cuando se usa como control externo en el ensayo de dos genes, tiende a aumentar el umbral. Este criterio es razonable porque dicha (s) línea (s) celular (es) amortiguará (n) (debido a una posible correlación en su respuesta de dos genes y la que se mide) la proporción medida de dos genes como mínimo. Alternativamente, el control externo se puede seleccionar usando una combinación definida de ARN de APTX y RASGRP1 para permitir la cuantificación absoluta o usar el AUC para maximizar la discriminación entre los respondedores y los no respondedores. La elección del control externo no es la única fuente de variabilidad en el umbral empleado en el ensayo de dos genes.

20

25

Se desarrollaron dos formatos de RT-PCR y se evaluó su rendimiento usando un análisis de curva estándar. Ambos formatos son demostrablemente equivalentes en rendimiento con una alta correlación de Pearson que usa tanto Ct sin procesar de 3 marcadores como los valores de proporción de 2 genes derivados ($R^2 = 1 - 0.93$, $P < 0.000$; Tabla 5).

30 Tabla 5. Correlación de Pearson entre los ensayos RT-PCR RUO y GMP

Formato RT-PCR RUO vs GMP	
RasGRP1, media de Ct	0.97
APTX, media de Ct	0.99
HMBS, media de Ct	1.00
Proporción normalizada a ARN JY control	0.93

El formato RUO usa un kit de RT-PCR en una sola etapa de ARN a Ct disponible en el mercado, distribuido por INVITROGEN® (Catálogo No.4392938). Este formato tiene un volumen de reacción de 20 µl con 50 ng de entrada de ARN total según las instrucciones del fabricante.

35 El formato GMP se basa en los componentes del kit VERIDEX® BLN RT-PCR (kit de prueba GeneSearch® Breast Lymph Node (BLN), IVD, Catálogo No. 2900004) con Mezcla de enzima de BLN GeneSearch®, IVD, P/N 7700040 y Mezcla maestra base de BLN, P/N 7700031, usada para la preparación de la mezcla maestra de RT-PCR. El formato GMP tiene una reacción de 25 µl con 50 ng de entrada de ARN usando una etapa de RT optimizada que se describe a continuación.

Protocolo multiplexado de RT-PCR en un formato GMP

Se usaron 50 ng de ARN total como entrada diana en un qRT-PCR triple que se llevó a cabo en un sistema de detección de secuencias Prism 7500 de Applied Biosystems en una reacción de 25 μ L. Las muestras de ARN (incluidos los ARN de control de normalización) se descongelaron en hielo y se diluyeron a 10 ng/ μ L. La qRT-PCR se llevó a cabo usando reactivos del kit VERIDEX® BLN RT-PCR (kit de prueba GeneSearch® para el ganglio linfático de la mama (BLN), IVD, Catálogo No. 2900004): Mezcla de enzimas de BLN GeneSearch®, IVD, P/N 7700040 y Mezcla maestra base de BLN, P/N 7700031.

Se preparó una mezcla maestra 25X de sonda-cebador que comprendía: 400 nM de SEQ No. 1 y 2, respectivamente, y RasGRP1 marcada con FAM 200 nM (SEQ No. 10); SEQ No. 3 y 4 400 nM, y Gold 540-APTX 200 nM (SEQ No. 11), y 400 nM de SEQ No. 8 y 9 y Cy5-HMBS 200 nM (SEQ No. 12) como se resume en la tabla 6.

Tabla 6. Mezcla 25X Sonda/Cebador

3plex-1 (25X)	Secuencia	Stock para añadir/rxn	500	Conc. final
Marcador				en 25 μ L
RASGRP1	RASGRP1 SEQ No. 1	0.10	50.00	0.04 μ M
	RASGRP1 SEQ No. 2	0.10	50.00	0.04 μ M
	RASGRP1 (Fam) SEQ No. 10	0.05	25.00	0.2 μ M
APTX	APTX SEQ No. 3	0.10	50.00	0.04 μ M
	APTX SEQ No. 4	0.10	50.00	0.04 μ M
	APTX SEQ No. 11 (Gold)	0.05	25.00	0.2 μ M
HMBS	HMBS SEQ No. 8	0.10	50.00	0.04 μ M
	HMBS SEQ No. 9	0.10	50.00	0.04 μ M
	HMBS SEQ No. 12	0.05	25.00	0.2 μ M
	idTe	0.25	125.00	
	Total	1.00	500.00	

Cada reacción consistió en 9 μ L de mezcla maestra base de BLN, 10 μ L de 2.5X mezcla de enzimas de BLN y 1 μ L de mezcla de 25X cebador/sonda. La mezcla de cebador/sonda tenía una concentración final de 400 nM de cebadores hacia adelante e inversos y 200 nM de sondas fluorescentes para cada marcador. Se añadieron 5 μ L de ARN total de muestras de pacientes o controles de normalización (ARN Universal o JY) a 20 μ L de la mezcla maestra de RT-PCR.

Se determinó un umbral/corte de 5.2 basado en el ARN celular JY usado como control de normalización externo.

Los ensayos de qRT-PCR se llevaron a cabo usando los siguientes parámetros de ciclado: 1 min a 95°C para la etapa de desnaturalización; 30 minutos a 58 °C (reacción RT); Rampa del 5% a 70 °C e incubación durante 2 minutos, seguida de 40 ciclos a 95 °C, durante 15 segundos (desnaturalización) y 60 °C, durante 1 minuto (hibridación/extensión). Esta optimización de las concentraciones de sonda-cebador del formato GMP RT-PCR en una configuración multiplexada de un solo tubo logró una detección robusta y sensible de dianas de ARN de muestras tanto de la médula ósea como de sangre periférica a un nivel de 0.6 ng con valores de Ct alrededor de 31, esto es, en un intervalo bajo de variabilidad y alta reproducibilidad de Ct (figura 3). Este formato de reacción es apropiado para la comercialización de la prueba, ya que se basa en los reactivos de grado GMP formulados y fabricados para el kit BLN aprobado por la FDA, tal como la polimerasa Tth (mezcla de enzimas) y la mezcla maestra de base. Algunos detalles para el protocolo basado en mezcla maestra se proporcionan en la tabla 7.

Tabla 7. Protocolo basado en mezcla maestra.

Reactivos	
Mezcla de enzimas de BLN, mezcla maestra de BLN	
Preparar mezcla maestra de RT-PCR a granel	
Mezcla maestra	
RT-PCR	1 rxn. (µL)
Mezcla maestra base de BLN	9
2.5X Mezcla de enzima de BLN	10
25X Mezcla de cebador/sonda	1
Total	20
Preparar la mezcla de RT-PCR a granel multiplicando los volúmenes de reactivo en la tabla por el número de	
muestras más extra 10%.	
Añadir 20 µL de la mezcla maestra en cada pocillo de una placa de 96 pocillos	
Añadir 5 µL de muestra de ARN diluido al pocillo apropiado	
Añadir 5 µL de ARN Universal (control externo) y (agua Nf -Sin control diana)	
Sellar la placa. Vortex brevemente y centrifugar a 1500 rpm durante 1 min.	
Colocar en ABI 7500(1)	

Análisis de los datos

1. Criterios de inclusión

5 Los valores de umbral de ciclo (Ct) obtenidos de los archivos de salida de datos AB17500 se usaron para el análisis de datos. Los cortes de Ct para "Sin prueba" para cada marcador se seleccionaron de la siguiente manera:

HMBS (marcador de control interno) Ct no debe ser mayor que 30;

RASGRP1 Ct- no mayor que 35 y

APTX Ct - no mayor que 35.

10 Si una muestra tenía uno cualquiera de los dos marcadores, RASGRP1 o APTX, por encima del nivel de corte de Ct, se consideró "Sin prueba" (excluida del análisis de datos). Los resultados presentados en la tabla 8 demuestran la equivalencia entre los formatos singlex y triplex (de un solo tubo) de la configuración de RT-PCR cuando se comparan los valores de pendiente y la eficiencia de la PCR. La tabla 9 presenta mejoras adicionales al extender el paso de RT a 30 minutos.

Tabla 8. Rendimiento de los formatos de RT-PCR Singlex vs. Triplex

	PCR QC	RASGRP1-Fam	APTX-Gold	HMBS-Cy5
RT-PCR Triplex	Pendiente	-3.6	-3.6	-3.6
	Intercepto Y	29.5	29.6	29.5
	Eficiencia	91%	90%	91%

RT-PCR singlex en 3 canales	Pendiente	-3.5	-3.6	-3.6
	Intercepto Y	30.0	29.8	29.6
	Eficiencia	92%	89%	89%

Tabla 9. Optimización del rendimiento RT-PCR Triplex				
RT 30 min, Cebadores-400nM, Sondas 200nM				
Entrada ng de diana	Marcador	Ct promedio	Eficiencia PCR	
100	RasGRP1-Fam	24.0	Pendiente	-3.4
50		25.1	Intercepto	30.8
25		25.9	Eficiencia	95%
12.5		26.9		
6.25		28.2		
ADNg(8ng)		No determinado		
NTC		No determinado		
100		APTX-Gold	23.7	Pendiente
50	24.7		Intercepto	30.2
25	25.6		Eficiencia	102%
12.5	26.5			
6.25	27.7			
ADNg(8ng)	No determinado			
NTC	No determinado			
100	HMBS-Cy5		22.6	Pendiente
50		23.5	Intercepto	29.1
25		24.4	Eficiencia	100%
12.5		25.4		
6.25		26.7		
ADNg(8ng)		35.8		
NTC		No determinado		

5 Usando el formato RT-PCR de GMP, se ejecutaron los controles de ARN universal (de AGILENT™) y ARN JY (de la línea celular cultivada internamente) en RT-PCR con 37 muestras de pacientes del estudio de fase 2 T + E. Este análisis se repitió posteriormente con 40 muestras de pacientes. Ambos análisis, basados en el resultado del análisis de la curva ROC, se presentan en la tabla 10, para mostrar que el rendimiento del ensayo es equivalente cuando se usan los controles de ARN universal o JY para la normalización de C_t sin procesar con un ajuste en el umbral.

ES 2 705 719 T3

El uso de ARN universal como control externo dio como resultado un umbral de 7.3 en comparación con un umbral de 5.2 cuando se usó ARN JY como control externo. En estas determinaciones de umbrales, los cálculos de CR tratado como el criterio de respuesta, con todos los demás tipos de respuesta se trataron como no sensibles.

Tabla 10. Análisis de la curva ROC: CR vs. NR para el formato RT-PCR TthPol GMP

Control de normalización	AUC	SE	95% CI	Corte por análisis ROC	Sensibilidad	95% CI	Especificidad	95% CI	Número de muestra
ARN JY (análisis de 37 pacientes)	0.8	0.97	0.629 a 0.908	>5.2	66.67	30.1 a 92.1	92.86	76.5 a 98.9	CR=9 NR=28
ARN Universal (análisis de 37 pacientes)	0.8	0.97	0.629 a 0.908	>5.2	66.67	30.1 a 92.1	92.86	76.5 a 98.9	CR=9 NR=28
ARN JY (análisis de 40 pacientes)	0.8	0.0881	0.636 a 0.904	>5.2	63.64	30.9 a 88.8	93.1	77.2 a 99.0	CR=11 NR=29
ARN Universal (análisis de 40 pacientes)	0.8	0.0881	0.636 a 0.904	>7.3	63.64	30.9 a 88.8	93.1	77.2 a 99.0	CR=11 NR=29

Aunque el umbral en el ensayo de 2 genes no tiene dimensiones (siendo la proporción de RASGRP1 y APTX), sin estar vinculado por la teoría, se cree que el valor de umbral puede depender de las condiciones estándar y los reactivos usados. Por lo tanto, es preferible especificar el umbral relativo a un criterio basado en el rendimiento, tal como un criterio basado en la curva ROC. De este modo, el umbral/corte se puede ajustar para cumplir con otros requisitos, como mantener el valor AUC constante con un cambio en el control externo. En este caso, el uso del ARN universal en lugar del ARN JY como control externo dio como resultado un umbral/corte más alto de 7.3 con el AUC sin cambios.

Ejemplo 3

Este ejemplo muestra que el ensayo de dos genes es eficaz en pacientes con AML recientemente diagnosticados. El ensayo predictivo de respuesta de 2 genes se probó primero en blastos leucémicos de un subconjunto de 84 pacientes con AML recién diagnosticados inscritos en el estudio de dosificación de Fase 1 de tipifarnib y etopósido usando el protocolo técnico RT-PCR descrito en Blood 2008, 111: 2589. El plan clínico del ensayo de Fase 1 se describe en Blood 2009, 113: 4841.

En resumen, se analizaron cincuenta y una (51) muestras de pacientes evaluables no publicadas de este estudio para una evaluación preliminar del rendimiento del ensayo de 2 genes. La tabla 11 resume los resultados usando un umbral de 5 con RR permanente para la tasa de respuesta con respondedores que muestran CR o PR, PPV para el valor predictivo positivo y NPV para el valor predictivo negativo. 13 de los 51 pacientes respondieron por un RR de aproximadamente 0.25. Entre los que superaron el umbral de 5 del ensayo de dos genes, la mitad (9 de 18) respondió dando como resultado un PPV de aproximadamente 0.5. De los pacientes que no excedieron el umbral, 29 de 33 no respondieron, lo que llevó a un NPV de 0.88.

Tabla 11. Resultados del ensayo de dos genes en 51 pacientes

	CR/PR	Resto	Total	Medida	Valor medido
>5	9	9	18	RR	0.25
5<	4	29	33	PPV	0.5
Total	13	38	51	NPV	0.88

Comparar los formatos RUO y GMP RT-PCR

Usando los formatos RUO y GMP RT-PCR optimizados, se analizaron los perfiles de expresión génica de 33 muestras de médula ósea de pacientes con AML recién diagnosticados evaluables para la respuesta clínica. Una muestra de paciente (HI) del conjunto de datos RUO RT-PCR no cumplió con los criterios de inclusión del análisis, por lo que se excluyó de ambos conjuntos de datos. Las anotaciones de los pacientes por la mejor respuesta se presentan en la tabla 12.

Tabla 12 Desglose de respondedores y no respondedores

Mejor respuesta	Número de pacientes
PD	17
SD	3
CR	7
PR	4
HI	1
Total de pacientes evaluables	32

En una fecha posterior correspondiente, los 33 pacientes se analizaron de nuevo y se encontró que tenían 7 remisiones completas (CR), 4 HI, 3 PR, 7 PD y 11 casos de SD (Tabla 13). Cuando se usó CR como criterio de respuesta, 7 pacientes se clasificaron como respondedores y 25 como no respondedores, mientras que al usar CR/PR/HI como criterio de respuesta, 12 pacientes se clasificaron como respondedores y 20 como no respondedores.

Mejor respuesta	Número de pacientes
PD	7
SD	11
CR	7
PR	3
HI	4
Total de pacientes evaluables	32

5 Se llevó a cabo un análisis estadístico preliminar para evaluar un posible valor de corte que separa los resultados de la prueba "normal" (Respondedores, R) de "anormal" (No-Respondedores, NR), siendo los respondedores pacientes que presentan CR, PR o HI. Un análisis de la curva ROC para ambos formatos de RT-PCR indicó un rendimiento de ensayo casi equivalente con un valor de AUC de la proporción de 2 genes igual a 71% (Tabla 14). Cuando se usa ARN JY como control de normalización, el corte de 4.7 se determinó para el protocolo RUO y 5.2 para el formato GMP basado en el algoritmo de análisis de curva ROC. Sin estar limitado por la teoría, se cree que la diferencia en los umbrales y otros parámetros basados en el formato empleado es, en parte, debido a la especificidad o eficiencia del procedimiento de RT-PCR y las fluctuaciones estadísticas.

10 Tabla 14. Comparación de formatos RUO y GMP

FORMATO RT-PCR	Corte de proporción de 2 genes	Sensibilidad	95% CI	Especificidad	95% CI	AUC	NPV	PPV
ABI, RUO	4.7	50%	21.2 -78.8	90%	68.3 a 98.5	0.71	74%	67%
VRX, GMP	5.2	50%	21.2 -78.8	95%	75.1 a 99.2	0.71	76%	86%

15 Como en el caso de los datos presentados en las tablas 12 y 13, en el análisis de la fecha posterior, que trató a los respondedores como pacientes que presentaban pacientes con remisión completa (CR) PR solamente y HI se incluyeron en el grupo de no respondedores, condujo a los resultados en la tabla 15, que llevaron a umbrales de 5.1 correspondientes al protocolo RUO y 5.2 - correspondientes al formato GMP basado en el algoritmo de análisis de curva ROC.

Formato RT-PCR	Corte de proporción de 2 genes	Sensibilidad, %	95% CI	Especificidad, %	95% CI	AUC	NPV, %	PPV, %
ABI, RUO	5.1	85.7	42.2- 97.6	80	59.3- 93.1	0.83	95	55
VRX, GMP	5.2	71.4	29.3- 95.5	92	73.9- 98.8	0.83	92	71

5 Cuando se usa un valor de corte de 5.2 para el conjunto de datos de GMP RT-PCR, la tasa de respuesta global (para
 10 pacientes que presentan CR o PR o HI) aumentó desde 38% (ORR) a 86% (PPV) con un valor predictivo negativo del
 76% (Tabla 16) usando ARN JY. En otras palabras, el 86% de los pacientes clasificados como respondedores por el
 ensayo de dos genes respondió realmente, lo cual es una mejora. Este resultado es comparable al 70% de respuesta
 esperado de la terapia de inducción en pacientes más jóvenes. En otras palabras, el 86% (6 de siete pacientes) de los
 que presentaron un valor de proporción de 2 genes de más de 5.2 en el ensayo de formato GMP RT-PCR respondieron
 al tratamiento con una combinación de tipifarnib y etopósido (que corresponde a un PPV del 86%). En contraste, el 24%
 (seis de veinticinco pacientes) con un valor de proporción de 2 genes menor o igual a 5.2 respondió al tratamiento con
 una combinación de tipifarnib y etopósido, pero no se detectaron con la prueba de 2 genes. Se debe tener en cuenta
 que el umbral/corte se puede ajustar para cumplir con otros requisitos, tal como mantener el valor AUC constante con
 un cambio en el control externo. En este caso, el uso de ARN universal en lugar de ARN JY como control externo dio
 como resultado un umbral/corte más alto de aproximadamente 8 (de aproximadamente 5).

Un análisis posterior que trató a los respondedores como solo presentando una recuperación completa condujo a

Tabla 17. Resultados usando el formato GMP con los respondedores definidos por CR/PR/HI

Corte de proporción de 2 genes	Respondedor R	No-Respondedor NR	Total	PPV	NPV	ORR	Sens	Espec
>5.2	5	2	7	71%				
≤ 5.2	2	23	25		92%			
	7	25	32			22%	71.4%	92%

15 los resultados en la tabla 17 muestran un NPV superior y una mayor sensibilidad con una especificidad comparable.

El análisis de la curva de Kaplan-Meier con una proporción de riesgo (HR) de 2.3 indicó una tendencia positiva a favor
 de la utilidad de un ensayo de proporción de 2 genes para predecir la respuesta entre R y NR a la combinación de
 tipifarnib y etopósido en pacientes de edad avanzada con AML recién diagnosticados (Figuras 8 y 13, las dos difieren en
 las definiciones usadas para identificar los respondedores). Sobre la base de la equivalencia de las características de
 20 rendimiento del ensayo, se siguió el formato GMP para un mayor desarrollo como un ensayo de diagnóstico
 complementario.

Tabla 16. Resultados usando el formato GMP con respondedores definidos por CR/PR/HI

Corte de proporción de 2 genes	Respondedor R	No-Respondedor NR	Total	PPV	NPV	ORR	Espec	Sens
>5.2	6	1	7	86%				
≤ 5.2	6	19	25		76%			
	12	20	32			38%	95%	50%

Otras pruebas del formato RT-PCR GMP

25 Tras mejoras adicionales, el ensayo de RT-PCR multiplexado en un solo tubo en el formato GMP se probó en 37
 pacientes añadiendo 4 muestras de sangre entera evaluables al conjunto existente de 33 muestras de médula ósea.
 Debido a que las muestras de médula ósea y de sangre entera generaron valores de Ct sin procesar equivalentes para
 los tres marcadores, se combinaron en un único conjunto de datos, que se resume en la tabla 18. El análisis de
 característica operativa del receptor (ROC) indicó un valor discriminativo de proporción de 2 genes del 80% (AUC =
 0.80) para predecir la respuesta general en un grupo de pacientes con remisión completa (CR) usados como criterios de
 30 respuesta correspondientes a una respuesta global ORR (24%) calculada como CR (9)/total de pacientes n (37). Esto se
 ilustra en las figuras 9 y 14. En el corte de la proporción de 2 genes de 5.2, la sensibilidad del ensayo fue del 67% y la
 especificidad fue del 93%.

La tabla 18 combina los datos con resultados de muestras de sangre entera y médula ósea

Mejor respuesta	Clasificación de pacientes (J07901, referencia)	
NR	19	NR
SD	3	NR
CR	9	R
PR	4	NR
HI	2	NR
Total de pacientes evaluables	37	28 NR vs. 9 R

Con la definición de respondedores en la tabla 18, para el conjunto de pacientes expandido usado en la tabla 18, el rendimiento general del ensayo se describe en la tabla 19.

Ejemplo 4

5 Este ejemplo muestra, de acuerdo con los ejemplos anteriores, que el ensayo de dos genes es específico para tratamientos que comprenden un FTI. La presencia sinérgica de otro agente no reduce apreciablemente el requisito de un FTI para que el ensayo de dos genes sea eficaz.

10 Si bien es evidente que en un subconjunto identificable de pacientes que padecen AML, que se identifica mediante el ensayo de 2 genes, es posible tratar efectivamente a dichos pacientes con terapias combinadas que comprenden un FTI, como Zarnestra, se ha esperado que en ausencia de un FTI en la terapia de combinación, el ensayo de 2 genes no será útil.

Para evaluar empíricamente la especificidad del ensayo de 2 genes, se probó en 41 muestras de pacientes con AML no tratados con la FTI, Zarnestra para ver si la respuesta se correlacionaba con los resultados del ensayo de 2 genes. Estos pacientes con AML fueron tratados con

Tabla 19 Rendimiento de formato GMP con CR el único criterio de respuesta

Corte de proporción de 2 genes	Respondedor R	Non-Respondedor NR	Total	PPV	NPV	ORR	Espec	Sens
>5.2	6	2	8	75%				
≤ 5.2	3	26	29		90%			
	9	28	37			24%	93%	67%

15 regímenes quimioterapéuticos tradicionales que consisten en ara-C, antraciclinas y VP16 (AcDVP16, n = 23) y FLAM (n = 18). La figura 10 muestra que no hubo asociación significativa entre la proporción de 2 genes y la respuesta clínica o la supervivencia global. De este modo, estos resultados confirmaron además que el ensayo de proporción de 2 genes no predice la respuesta al tratamiento en pacientes con AML no tratados con FTI. Se determinó que el AUC de ROC era 20 0.5, lo que no demuestra un valor significativo para predecir la respuesta clínica a los regímenes quimioterapéuticos que no incluyen un FTI.

25 Además, cuando los sujetos se clasificaron como proporciones altas o bajas en función de la mediana de la proporción de 2 genes (0.959), cuantil 25 (0.561), cuantil 75 (1.248), no hubo beneficio demostrado en la supervivencia global. Se realizaron los siguientes análisis de supervivencia: 1) todos los pacientes, 2) solo VP16 y 3) solo FLAM. Los resultados (figuras 10 y 15, todos los pacientes) mostraron que no hubo diferencias significativas en la supervivencia global (días) entre los dos grupos estratificados por la proporción mediana, así como en 2 subgrupos estratificados por el régimen de tratamiento. También se encontró que este era el caso cuando se usaban puntos de corte en el cuantil 25 y 75 (datos no mostrados).

Ejemplo 5

Este ejemplo ilustra que no todas las técnicas de recolección de muestras son equivalentes. La degradación excesiva del ARN y otras fuentes de variabilidad que dependen del protocolo de recolección de muestras pueden influir en el ensayo de dos genes.

5 El protocolo de recolección de muestras requiere por lo general el uso de muestras de médula ósea en implementaciones anteriores del ensayo de dos genes. Esto no solo es bastante intrusivo, sino que también es doloroso para los pacientes que padecen AML. El nuevo protocolo permite el uso de sangre entera como se describe en este ejemplo.

10 Para identificar un protocolo de recolección de muestras preferido (tipo de muestra) para el ensayo de equivalencia, se realizó un estudio entre los dos tipos de muestras (médula ósea frente a sangre entera) usando tres (3) protocolos de recolección (sistema Paxgene versus un proceso de recolección estándar en tubos de heparina y EDTA seguido de un método de centrifugación Ficoll-Paque), respectivamente. 11 pacientes con AML proporcionados por the Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center at Johns Hopkins University fueron examinados.

15 Se extrajeron aproximadamente 11 mL de sangre y se aspiraron 8-10 mL de médula ósea de cada paciente usando 3 métodos de recolección para cada uno de los 2 tipos de muestra según el flujo de trabajo representado en la figura 11. Los siguientes seis protocolos se probaron según este diseño del estudio como se muestra en la figura 11:

Protocolo 1: Sistema de médula ósea PAXgene™ Catálogo No. 764114 (PreAnalytix, A QIAGEN/BD COMPANY). Se recogió un volumen de 2 mL de BMA en tubos de médula ósea PAXgene™ y se envió a VRX dentro de las 24 horas a temperatura ambiente en compresas refrigeradas. El ARN se aisló al recibir las muestras usando el kit de ARN de médula ósea PAXgene (Catálogo No. 764133).

20 Protocolo 2: la recolección de BMA se realizó en tubos de heparina sódica (volumen de muestra de 2 mL) y se envió a VRX dentro de las 24 horas a temperatura ambiente en compresas refrigeradas. La etapa de centrifugación con gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque con congelación directa de las pellas celulares a -80 °C y la extracción de ARN usando el kit Midi de sangre Qiagen se realizó en Veridex.

25 Protocolo 3: la recolección de BMA se realizó en tubos EDTA (volumen de muestra de 2 mL) y se envió a VRX dentro de las 24 horas a temperatura ambiente en compresas refrigeradas. La etapa de centrifugación con gradiente de densidad Ficoll-Hypaque con congelación directa de las pellas celulares a -80 °C y la extracción de ARN usando el kit Qiagen® Blood Midi se realizó en VERIDEX®.

30 Protocolo 4: Sistema de sangre PAXgene™. Se recogieron 2.5 mL de sangre en tubos de sangre PAXgene™ (Catálogo No. 762165, PreAnalytix, A QIAGEN/BD COMPANY) y se enviaron a VRX dentro de las 24 horas a temperatura ambiente en compresas refrigeradas. El ARN se aisló en Veridex al recibir las muestras usando el kit de ARN de sangre PAXgene (Catálogo No. 762164)

35 Protocolo 5: La sangre entera recogida en tubos de heparina sódica (4 mL de sangre) se envió a VRX dentro de las 24 horas a temperatura ambiente en compresas refrigeradas. La transferencia de 3 mL de sangre a tubo CPT de 4 mL con la posterior separación con Ficoll de células mononucleares y la congelación directa de las pellas celulares a -80 °C se realizó en Veridex. La extracción de ARN se realizó usando el kit Midi de sangre Qiagen.

Protocolo 6: La sangre entera recogida en tubos de EDTA (4 mL de sangre) se envió a VRX dentro de las 24 horas a temperatura ambiente en compresas refrigeradas. La transferencia de 3 mL de sangre a tubo CPT de 4 mL con la posterior separación con Ficoll de células mononucleares y la congelación directa de las pellas celulares a -80 °C se realizó en Veridex. La extracción de ARN se realizó usando el kit Midi de sangre Qiagen.

40 Según los resultados de Agilent BioAnalyzer QC, el uso del sistema PAXGene dio como resultado dianas de ARN de buena calidad tanto para muestras de médula ósea como de sangre para los once pacientes en comparación con los protocolos de heparina y EDTA, más comúnmente usados en entornos de laboratorio clínico.

45 Un método directo de evaluación de la integridad del ARN (ARN QC) es ejecutar el ARN en Agilent BioAnalyzer y calcular los valores de RIN (Número de integridad del ARN). Según lo recomendado por Qiagen con el sistema PAXgene, el ARN con RIN 7 y superior (hasta 10) se considera una diana de buena calidad. Consultar los datos adicionales en la tabla 17 con los valores de RIN para el estudio de estabilidad de la muestra con 11 muestras de pacientes. Los valores de RIN resaltados en amarillo corresponden a muestras de ARN de mala calidad (de tubos de heparina y EDTA). El sistema PAXgene en comparación con los otros 2 tipos de tubos de recolección generó solo ARN de buena calidad basado en las muestras evaluables por rendimiento. En la tabla 20, NE representa no evaluado; NA representa no disponible; un valor de RIN de aproximadamente 2 a 5 indica ARN degradado; y un valor de RIN de aproximadamente 5 a 7 indica ARN marginal.

Tabla 20 Correlación por valores de RIN entre los protocolos de recolección/procesamiento de muestras

ID muestra	Perfil de Agilent (RIN)					
	Sangre			Médula		
	Heparina	EDTA	Paxgene	Heparina	EDTA	Paxgene
1	10.0	10.0	8.7	9.7	9.6	9.0
2	9.0	9.2	8.9	6.6	7.2	8.9
3	NE	NE	9.4	NE	2.1	8.9
4	9.6	9.6	NE	7.9	9.3	NE
5	9.3	8.3	8.0	7.3	7.3	8.4
6	5.7	6.7	9.1	3.2	3.6	9.1
7	NE	NE	9.8	NE	NE	NE
8	3.4	2.9	9.1	2.6	2.4	9.6
9	4.9	3.9	9.4	8.6	8.4	8.1
10	9.3	9.2	9.9	9.6	8.9	9.8
11	7.7	NA	9.2	6.6	5.8	9.5

Las muestras marcadas con NE no se analizaron debido a los rendimientos de muestra insuficientes después de la etapa de preparación de la muestra.

5 La figura 12 (paneles A y B) muestra que las muestras de médula ósea número 3 y 6 demostraron una degradación sustancial del ARN en tubos de heparina, cuya degradación elevó los valores de las proporciones de 2 genes. Los Ct sin procesar se correlacionan inversamente con los valores de RIN: para los valores de RIN más bajos, los Ct más altos se generan en los 3 canales en el caso de los protocolos de heparina y EDTA.

10 Como se ve en las figuras 12A y 12B, ninguna de las muestras supera el umbral de 5 para el ensayo de dos genes. La dispersión en la proporción de dos genes medida debido al protocolo de recolección varía significativamente como lo muestra la figura 12B. Los pacientes 3 y 6 parecen tener la mayor dispersión con los protocolos de recolección de médula ósea de heparina y paxgene que definen los dos límites extremos para estos pacientes. Un examen de los datos en la tabla 20 muestra que los protocolos de recolección de sangre entera se correlacionan bien entre sí, mientras que no se puede decir lo mismo de los protocolos de recolección de médula ósea. De hecho, en base a la tabla 20 y las figuras 12A y 12B, se puede argumentar que el ensayo de dos genes se debe realizar preferiblemente con sangre entera. Para asegurar la consistencia, se prefiere el protocolo PAXgene PB. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que la degradación del ARN podría producirse más rápidamente en muestras de médula ósea que en sangre entera, de este modo se demuestra un menor nivel de correlación entre los tubos de EDTA (heparina) y el sistema PAXgene.

20 Además, la recolección de muestras de médula ósea en tubos de heparina parece ser menos confiable que otros métodos, un detalle que debería mejorar los procedimientos de recolección de muestras en general para otros análisis distintos al análisis de dos genes descrito en este documento.

25 Los coeficientes de correlación de Pearson (R^2) y los valores de p para la médula ósea (BM) y las muestras de sangre (PB) con los seis (6) protocolos de recolección/procesamiento de la figura 11 se presentan en la tabla 21. Se observa una buena correlación entre proporciones de dos genes para muestras de ARN obtenidas de tubos de heparina, EDTA y PAXGene en el caso de muestras de sangre (valores resaltados en rojo). Sin embargo, se observa una correlación deficiente entre las muestras de médula ósea PAXGene y otros procedimientos de recolección. Esta observación es consistente con la falta de estabilización en los tubos de heparina que resulta en la inestabilidad de las plantillas de ARN cuando las muestras de médula ósea se almacenan (envían) en condiciones ambientales dentro de las 24 horas antes del procesamiento. Estas observaciones también apoyan que el sistema de sangre entera PAXGene es uno de los protocolos de recolección/procesamiento preferidos de esta divulgación en vista de la integridad del ARN observada y la confiabilidad de los valores de proporción de 2 genes en tales muestras.

Tabla 21 Correlación de Pearson entre los protocolos de recolección/procesamiento de muestras					
	Heparina PB	Heparina BM	EDTA PB	EDTA BM	Paxgene PB
Heparina BM	0.936				
valor p	0				
EDTA BM	0.933	0.913			
valor p	0	0			
EDTA PB	0.714	0.683	0.784		
valor p	0.014	0.02	0.004		
Paxgene PB	0.816	0.839	0.917	0.717	
valor p	0.002	0.001	0	0.013	
Paxgene BM	0.323	0.329	0.383	0.635	0.453
valor p	0.333	0.323	0.246	0.036	0.162

Ejemplo 6

Este ejemplo, basado en parte en los pacientes descritos anteriormente como parte del ejemplo 3, ilustra el ajuste de la dosis de tipifarnib para equilibrar la toxicidad con un tratamiento eficaz de los pacientes con la ayuda del ensayo de dos genes para dirigir la terapia de combinación de FTI. Este análisis posterior, realizado en el contexto de la determinación de mejores estrategias de dosificación para tipifarnib y etopósido, también modificó el análisis relacionado con los formatos RUO y GMP RT-PCR al tratar a CR como respondedores, siendo el resto no respondedores. Los resultados de este análisis posterior se han presentado en los ejemplos descritos anteriormente.

Discusión

La estratificación de las poblaciones de pacientes para predecir la respuesta terapéutica es cada vez más valiosa en el manejo clínico de los pacientes con cáncer. Por ejemplo, se requieren diagnósticos complementarios para la estratificación de pacientes que son candidatos para terapias dirigidas tal como trastuzumab (Herceptin, Genentech) en el cáncer de mama metastásico y cetuximab (Erbix, Merck) en el cáncer colorrectal para proporcionar atención de calidad. También se están usando biomarcadores predictivos para imatinib (Gleevec, Novartis) en tumores del estroma gastrointestinal, y para erlotinib (Tarceva, OSI Pharmaceuticals) y gefitinib (Iressa, Astra-Zeneca) en el cáncer de pulmón. Actualmente no hay un método disponible para predecir la respuesta a una terapia de combinación que incluya un FTI.

Se identificó RASGRP1 como el marcador de expresión génica predictivo único más robusto con una precisión predictiva global del 77% en el conjunto de entrenamiento de validación cruzada para el tratamiento con solo un FTI. RASGRP1 es un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) que activa específicamente RAS. La expresión de RASGRP1 se ha encontrado en el cerebro, las células T, las células de linaje monocítico y los precursores hematopoyéticos primitivos.

Esta divulgación proporciona la proporción de expresión de RASGRP1 y APTX como un predictor robusto de respuesta a la terapia de combinación con FTI. Este clasificador de dos genes mostró una utilidad predictiva en el conjunto de descubrimiento de AML recién diagnosticada.

El ensayo de diagnóstico basado en qPCR simple descrito tiene una utilidad más amplia en la clínica que las micromatrices de expresión génica debido a su capacidad para analizar muestras clínicas de baja calidad que pueden no ser perfiladas por las tecnologías actuales de micromatrices. Adicionalmente, el ensayo puede detectar una señal en muestras de sangre entera en lugar de requerir células de la médula ósea. La metodología para seleccionar un control externo para el ensayo, un cálculo más simple de la proporción basada en la muestra, el control externo y solo RASGRP1 y APTX hace posible ofrecer a los pacientes, particularmente pacientes de edad avanzada, el ensayo de dos genes para determinar si una terapia combinada de FTI los ayudará a combatir la AML.

El análisis retrospectivo descrito de los aspirados de médula ósea recolectados en el contexto del ensayo de tipifarnib + etopósido actual valida la firma de 2 genes como un predictor reproducible de la respuesta al tipifarnib. El análisis también sugiere que es posible discriminar prospectivamente a aquellos pacientes con AML que probablemente respondan al tipifarnib en comparación con aquellos que no lo son. Los datos confirman la noción de que la firma de 2 genes es relativamente específica para tipifarnib (o un inhibidor de la farnesiltransferasa), ya que no parece haber una relación predictiva entre la proporción de ARNm RASGRP1: APTX y dos regímenes de quimioterapia de investigación intensiva, cada uno de los cuales incluía ara-C y una antraciclina con un tercer agente (flavopiridol o etopósido). Aunque el valor predictivo positivo de la prueba en el contexto del ensayo de fase II de tipifarnib + etopósido fue del 78%, el valor predictivo negativo (NPV) de la prueba fue ligeramente inferior (87%) al del NPV informado para los estudios de monoterapia con tipifarnib, que han estado en el intervalo de -95%. Esta aparente discrepancia en el NPV entre las terapias individuales y combinadas podría relacionarse, en parte, con la respuesta al etopósido.

Secuencias

Amplicón RASGRP1 SEQ No. 1

ctggacgatctcattgacagctgcattcaatcttttgatgcagatggaaacctgtgtcgaagtaaccaactgttgcaag

15 Amplicón APTX SEQ No. 2

cgcttccgattgggctaccacgccattccgagatgagccatgtacatcttcattgtgatcagccaggattttgattct

Cebador superior APTX SEQ No. 3

cgcttccgattgggctac

Cebador inferior APTX SEQ No.4

20 agaatacaaaatcctggctgatc

Cebador superior RASGRP1 SEQ No. 5

ctggacgatctcattgacagctgcattcaatcttttgatgcagatggaaacctgtgtcgaagtaaccaactgttgcaag

Cebador inferior RASGRP1 SEQ No.6

cttgcaacagttggttacttcg,

25 Amplicón HMBS SEQ No. 7

cctgcccactgtgcttctccctgcttcacatcggagccatctgcaagcgggaaaacctcatgat

Cebador superior HMBS SEQ No. 8

cctgcccactgtgcttct

Cebador inferior HMBS SEQ No.9

30 atcatgagggtttccgct

Sonda RASGRP1 TAQMAN SEQ No. 10

FAM-cattcaatcttttgatgcagatggaaacctg-BHQ1

Sonda APTX TAQMAN SEQ No. 11

Gold 540-cacgccattccgagatgagccatgtac-BHQ2

35 Sonda HMBS TaqMan, SEQ No. 12

Cy5-gcttcaccatcggagccatctgca-BHQ1,

Bibliografía

Ahel et al. (2006) The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates Nature 443:713-716

- Baylin et al. in Nature Clinical Practice (2005) 2:S1-S3
- Bivona et al. (2003) Phospholipase Cgamma activates Ras on the Golgi apparatus by means of RasGRP1 Nature 424:694-698
- Bos (1989) ras oncogenes in human cancer: a review Cancer Res 49:4682-4689
- 5 Bullinger et al. (2004) Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia N Engl J Med 350:1605-1616
- Burger et al. (2005) Activating mutations in c-KIT and PDGFRalpha are exclusively found in gastrointestinal stromal tumors and not in other tumors overexpressing these imatinib mesylate target genes Cancer Biol Ther 4:1270-1274
- 10 Chang et al. (2003) Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer Lancet 362:362-369
- Chen et al. (2005) FLT3/ITD mutation signaling includes suppression of SHP-1 J Biol Chem 280:5361-5369
- Cox et al (2002) Farnesyltransferase inhibitors: promises and realities Curr Opin Pharmacol 2:388-393
- Ebinu et al. (1998) RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs Science 280:1082-1086
- 15 Ehmann et al. (2006) Detection of N-RAS and K-RAS in their active GTP-bound form in acute myeloid leukemia without activating RAS mutations Leuk Lymphoma 47:1387-1391
- End et al. (2001) Characterization of the antitumor effects of the selective farnesyl protein transferase inhibitor R115777 in vivo and in vitro Cancer Res 61:131-137
- 20 Feldkamp et al. (2001) Isotype-specific RasGTP-levels predict the efficacy of farnesyl transferase inhibitors against human astrocytomas regardless of Ras mutational status Cancer Res 61:4425-4431
- Geman et al. (2004) Classifying gene expression profiles from pairwise mRNA comparisons Stat Appl Genet Mol Biol 3:30
- Holleman et al. (2004) Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment N Engl J Med 351:533-542
- 25 Illmer et al. (2005) Activation of the RAS pathway is predictive for a chemosensitive phenotype of acute myelogenous leukemia blasts Clin Cancer Res 11:3217-3222
- Jansen et al. (2005) Molecular classification of tamoxifen-resistant breast carcinomas by gene expression profiling J Clin Oncol 23:732-740
- 30 Karp et al. (2001) Clinical and biologic activity of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in adults with refractory and relapsed acute leukemias: a phase 1 clinical-laboratory correlative trial Blood 97:3361-3369
- Karp, Karen Flatten, Eric J. Feldman, Jacqueline M. Greer et al. Active oral regimen for elderly adults with newly diagnosed acute myelogenousleukemia: a preclinical and phase 1 trial of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib (R115777, Zarnestra) combined with etoposide. Blood 2009, 113:4841-4852.
- 35 Kawasaki et al. (1998) A Rap guanine nucleotide exchange factor enriched highly in the basal ganglia Proc Natl Acad Sci 95:13278-13283
- Lancet et al. (2006) A phase II study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in poor-risk and elderly patients with previously untreated acute myelogenous leukemia Blood 2:2
- 40 Leith et al. Acute Myeloid Leukemia in the Elderly: Assessment of Multidrug Resistance (MDR1) and Cytogenetics Distinguishes Biologic Subgroups With Remarkably Distinct Responses to Standard Chemotherapy. A Southwest Oncology Group Study. Blood, Vol. 89, 1997: pp. 3323-3329.
- Lossos et al. (2004) Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes N Engl J Med 350:1828-1837
- Lubet et al. (2006) Effects of the farnesyl transferase inhibitor R115777 (Zarnestra) on mammary carcinogenesis: prevention, therapy, and role of HaRas mutations Mol Cancer Ther 5:1073-1078

- Lynch et al. (2004) Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of nonsmall-cell lung cancer to gefitinib *N Engl J Med* 350:2129-2139
- Ma et al. (2004) A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen *Cancer Cell* 5:607-616
- 5 Mesa et al (2006) Tipifarnib: farnesyl transferase inhibition at a crossroads *Expert Rev Anticancer Ther* 6:313-319
- Moroni et al. (2005) Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study *Lancet Oncol* 6:279-286
- Perez de Castro et al. (2004) A Ras activation in Jurkat T cells following low-grade stimulation of the T-cell receptor is specific to N-Ras and occurs only on the Golgi apparatus *Mol Cell Biol* 24:3485-3496
- 10 Potti et al. (2006) Genomic signatures to guide the use of chemotherapeutics *Nat Med* 12:1294-1300
- Raponi M, Wang Y, and Hongtao F. WO2008112749 A1. Methods of determining acute myeloid leukemia response to treatment with farnesyltransferase.
- Raponi M, Harousseau JL, Lancet JE, et al. Identification of molecular predictors of response in a study of tipifarnib treatment in relapsed and refractory acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res.* 2007;13: 2254-2260.
- 15 Raponi, Jeffrey E. Lancet, Hongtao Fan, Lesley Dossey, Grace Lee, Ivana Gojo, Eric J. Feldman, Jason Gotlib, Lawrence E. Morris, Peter L. Greenberg, John J. Wright, Jean-Luc Harousseau, Bob Lowenberg, Richard M. Stone, Peter De Porre, Yixin Wang, and Judith E. Karp. A 2-gene classifier for predicting response to the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in acute myeloid leukemia. *Blood* 2008, 111: 2589-2596.
- 20 Rao et al. (2004) Phase III Double-Blind Placebo-Controlled Study of Farnesyl Transferase Inhibitor R115777 in Patients With Refractory Advanced Colorectal Cancer *J Clin Oncol* 22:3950-3957
- Reuter et al. (2000) Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies? *Blood* 96:1655-1669
- Reuther et al. (2001) Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor, a Dbl family protein found mutated in leukemia, causes transformation by activation of RhoA *J Biol Chem* 276:27145-27151
- 25 Reuther et al. (2002) RasGRP4 is a novel Ras activator isolated from acute myeloid leukemia *J Biol Chem* 277:30508-30514
- Rosenwald et al. (2002) The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-Bcell lymphoma *N Engl J Med* 346:1937-1947
- 30 Rowinsky et al (1999) Ras protein farnesyltransferase: A strategic target for anticancer therapeutic development *J Clin Oncol* 17:3631-3652
- Sahai et al. (2002) RHO-GTPases and cancer *Nat Rev Cancer* 2:133-142
- Seidman et al. (2001) Weekly trastuzumab and paclitaxel therapy for metastatic breast cancer with analysis of efficacy by HER2 immunophenotype and gene amplification *J Clin Oncol* 19:2587-2595
- 35 Ship et al. (2002) Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning *Nat Med* 8:68-74
- Solit et al. (2006) BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition *Nature* 439:358-362
- Sterpetti et al. (1999) Activation of the Lbc Rho exchange factor proto-oncogene by truncation of an extended C terminus that regulates transformation and targeting *Mol Cell Biol* 19:1334-1345
- Stone (2006) Regulation of Ras in lymphocytes: get a GRP *Biochem Soc Trans* 34:858-861
- 40 Tognon et al. (1998) Regulation of RasGRP via a phorbol ester-responsive C1 domain *Mol Cell Biol* 18:6995-7008
- Tsao et al. (2005) Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome *N Engl J Med* 353:133-144
- Van Cutsem et al. (2004) Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer *J Clin Oncol* 22:1430-1438

Waters et al. (2006) Developing gene expression signatures of pathway deregulation in tumors Mol Cancer Ther 5:2444-2449

Weinstein et al. (2006) Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy Nat Clin Pract Oncol 3:448-457

5 White et al. (1997) K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors J Biol Chem 272:14459-14464

Yeoh et al. (2002) Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling Cancer Cell 1:133-143

Lista de secuencias

10 <110> Veridex, LLC
 <120> MÉTODO PARA DETERMINAR LA RESPUESTA DE LA LEUCEMIA MELOIDE AGUDA AL TRATAMIENTO CON INHIBIDORES DE FARNESILTRANSFERASA

<130> VDX5142WOPCT

<150> 61/368453

15 <151> 2010-07-28

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 79

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> RASGRP1 Amplicón

<400> 1

ctggacgac tcattgacag ctgcattcaa tcttttgatg cagatggaaa cctgtgtcga 60

25 agtaaccaac tgttgcaag 79

<210> 2

<211> 79

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Amplicón APTX

<400> 2

cgcttccgat tgggctacca cgccattccg agtatgagcc atgtacatct tcattgtgat 60

cagccaggat tttgattct 79

<210> 3
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador superior APTX
 <400> 3
 cgcttccgat tgggctac 18
 <210> 4
 10 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inferior APTX
 15 <400> 4
 agaatcaaaa tcttgctga tc 22
 <210> 5
 <211> 79
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador superior RASGRP1
 <400> 5
 ctggacgatc tcattgacag ctgcattcaa tcttttgatg cagatggaaa cctgtgtcga 60
 agtaaccaac tgttgcaag 79
 25 <210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Cebador inferior RASGRP1
 <400> 6
 cttgcaacag ttggtactt cg 22

ES 2 705 719 T3

<210> 7
<211> 69
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5 <220>
<223> Amplicón HMBS
<400> 7

ccttgcccac tgtgcttcct ccctggcttc accatcggag ccatctgcaa gcgggaaaac 60
cctcatgat 69

<210> 8
10 <211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador superior HMBS
15 <400> 8
cctgcccact gtgcttcct 19
<210> 9
<211> 20
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador inferior HMBS
<400> 9
atcatgaggg tttcccgct 20
25 <210> 10
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
30 <223> Sonda RASGRP1 TAQMAN
<400> 10
cattcaatct ttgatgcag atggaaacct g 31

<210> 11

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Sonda APTX TAQMAN

<400> 11

cagccattc cgagtatgag ccatgtac 28

<210> 12

10 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

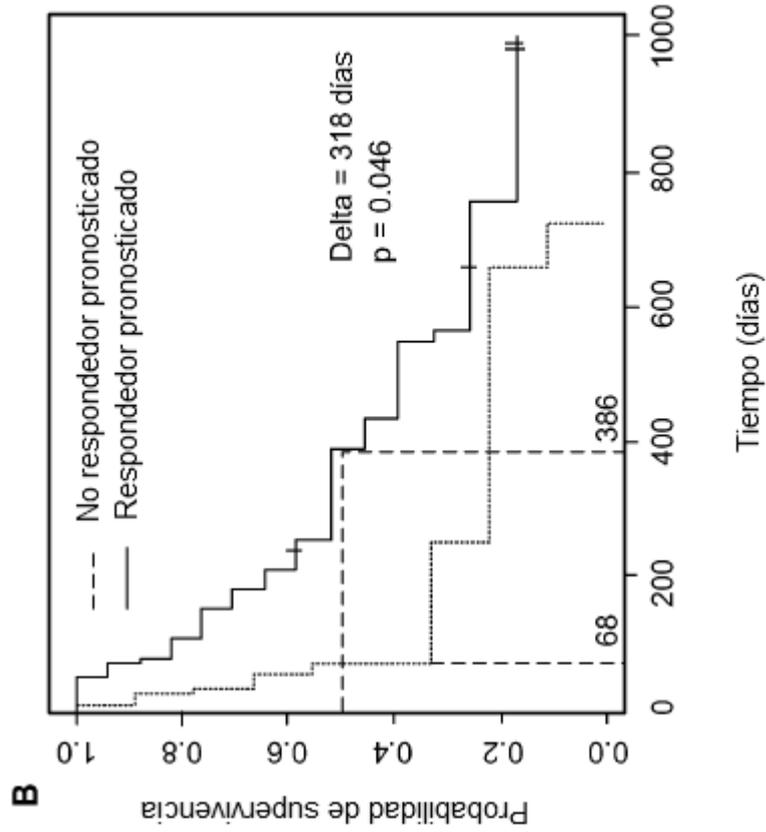
<223> Sonda HMBS TAQMAN

15 <400> 12

gcttcacat cggagccatc tgca 24

REIVINDICACIONES

1. Combinación de tipifarnib y etopósido para su uso en el tratamiento de un paciente diagnosticado con un trastorno hematológico, en la que el uso comprende:
- 5 determinar si una proporción de expresión de RASGRP1 y APTX, cada nivel computado usando el método $\Delta\Delta Ct$, supera un umbral de $\Delta\Delta Ct$ correspondiente a una sensibilidad o especificidad especificada o una suma maximizada de sensibilidad y especificidad en un análisis ROC en una población de prueba; y
- administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de tipifarnib y una cantidad terapéuticamente eficaz de etopósido si la proporción supera el umbral de $\Delta\Delta Ct$.
- 10 2. La combinación para el uso de la reivindicación 1, en la que la proporción de expresión de RASGRP1 y APTX se determina usando al menos un cebador del grupo que consiste en
- (i) 5'-CGCTTCCGATTGGGCTAC-3'
- (ii) 5'-AGAATCAAATCCTGGCTGATC-3'
- (iii) 5'-CTGGACGATCTCATTGACAGC-3' y
- (iv) 5'-CTTGCAACAGTTGGTTACTTCG-3',
- 15 comprendiendo opcionalmente además la determinación de una proporción de niveles de expresión de RASGRP1 en relación con APTX usando un control externo, en la que el control externo se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en una o más líneas celulares de referencia, ARN JY, ARN Universal, una referencia de ARN estandarizada y una muestra de referencia del paciente.
3. La combinación para el uso de la reivindicación 1, en la que el umbral de $\Delta\Delta Ct$ es aproximadamente 5.2.
- 20 4. La combinación para el uso de la reivindicación 1, en la que el umbral de $\Delta\Delta Ct$ corresponde a un área bajo la curva de aproximadamente el 70% o más.
5. La combinación para el uso de la reivindicación 1, en la que la determinación de la proporción de expresión de RASGRP1 y APTX se realiza en un solo tubo en un formato múltiple.
6. La combinación para el uso de la reivindicación 1, en la que una muestra comprende al menos uno de
- 25 (i) una muestra de médula ósea, y
- (ii) una muestra de sangre.
7. La combinación para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el trastorno es leucemia mielógena aguda.



A

	PD	R	
Falso	8	1	9
Verdadero	5	12	17
	13	13	26

Sensibilidad = 92.3%
 Especificidad = 61.5%
 NPV = 88.9%
 PPV = 70.6%
 Prevalencia = 50%

FIG. 1

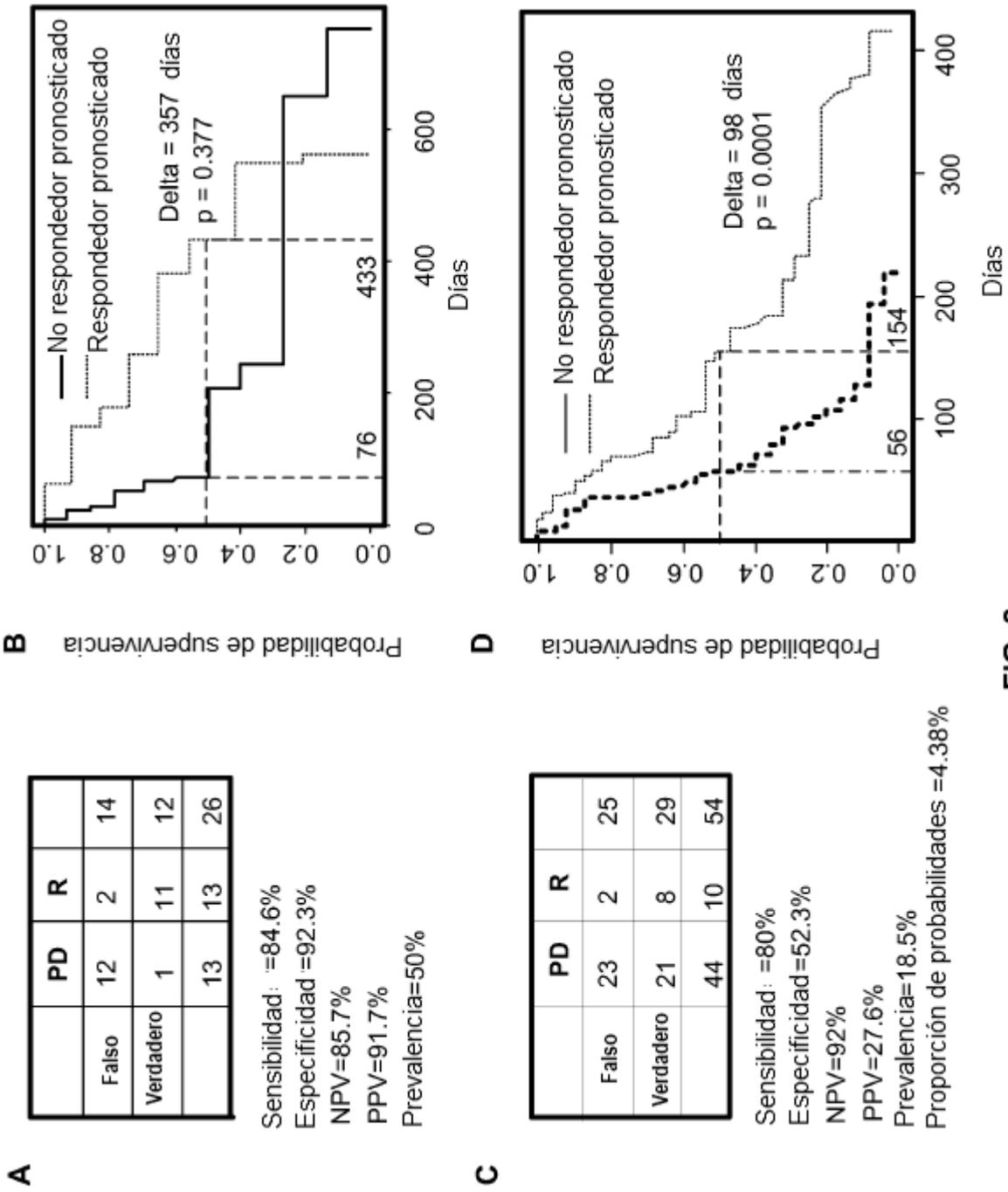


FIG. 2

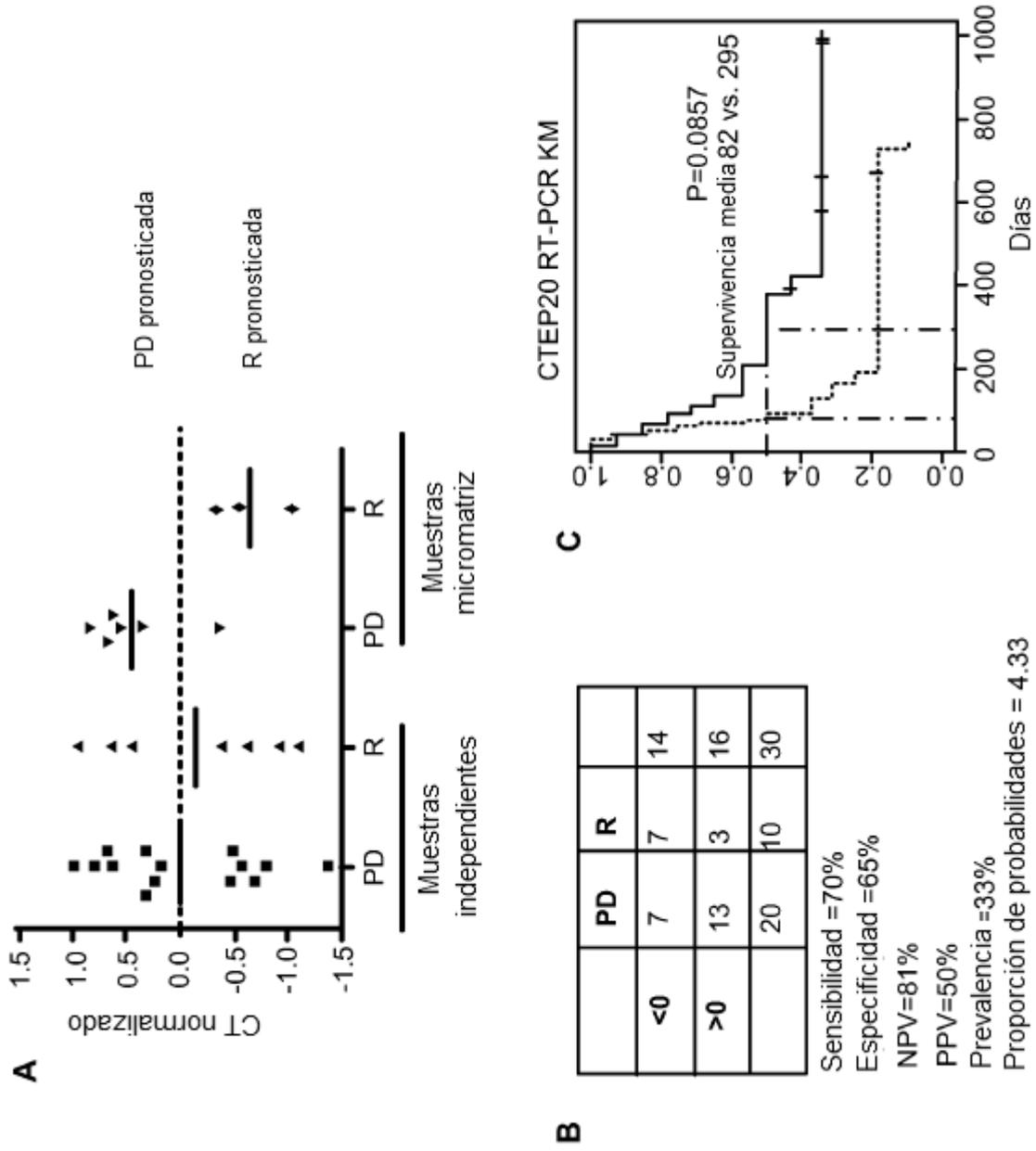
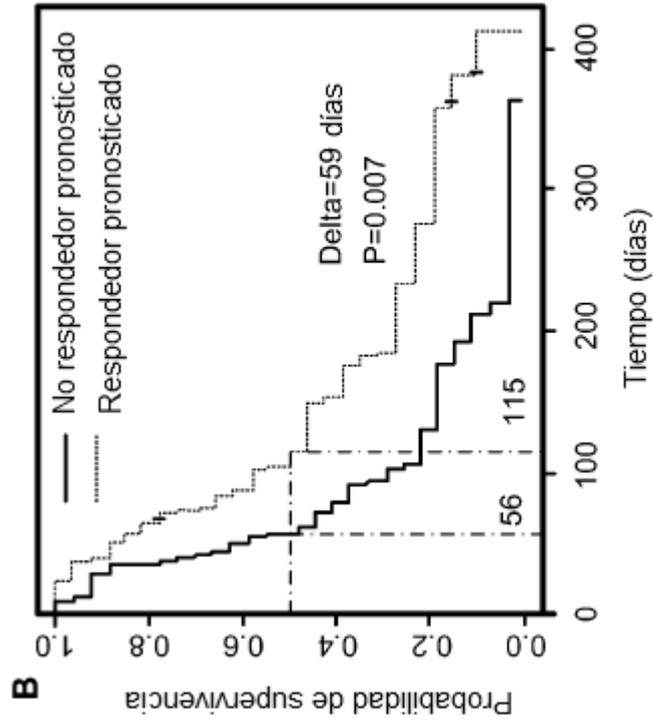


FIG. 3



A

	PD	R	
Falso	24	3	27
Verdadero	20	7	27
	44	10	54

Sensibilidad = 70%
 Especificidad = 54.5%
 NPV=88.9%
 PPV=25.9%
 Prevalencia = 18.5%

FIG. 4

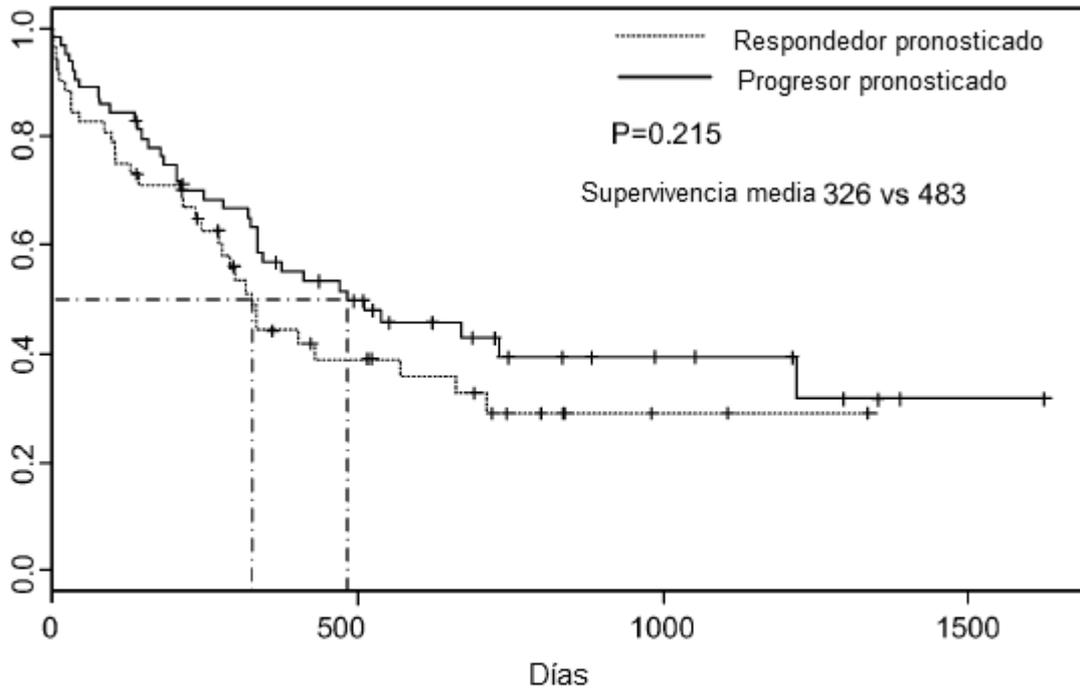


FIG. 5

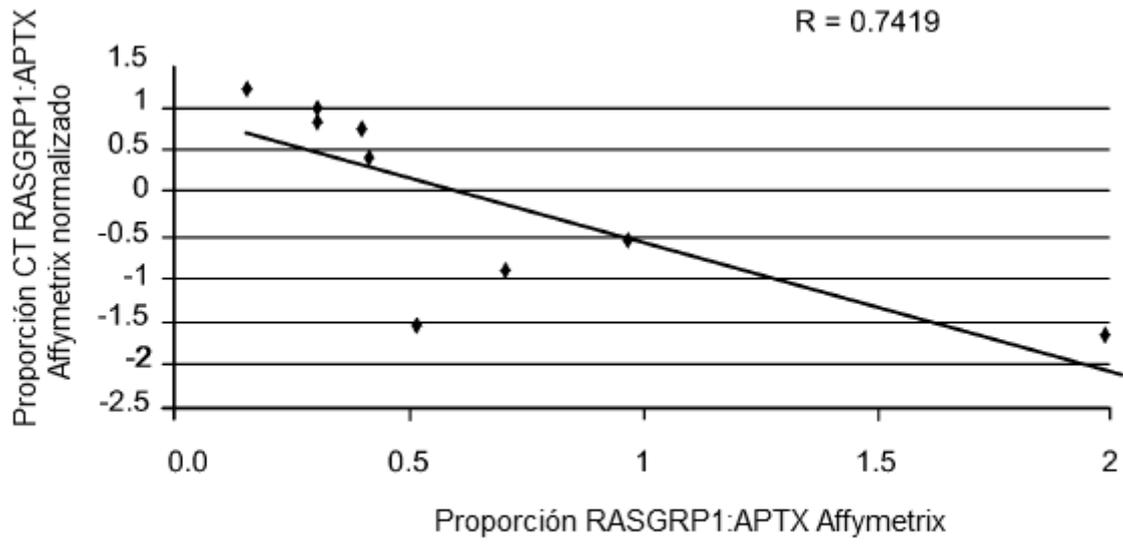


FIG. 6

Curvas de titulación en formato RT-PCR triplex:
Valores Ct sobre entrada ARN Log en ng

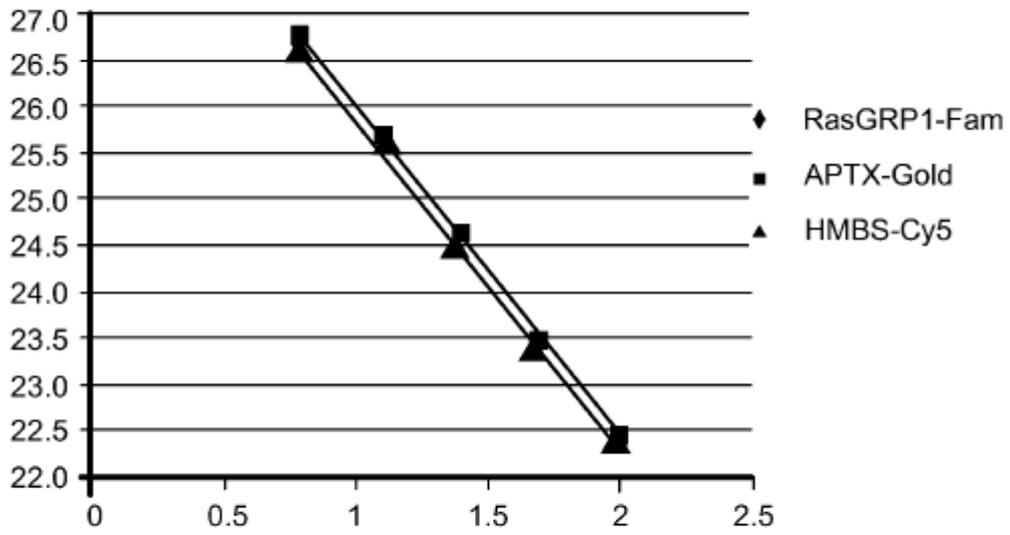


FIG. 7

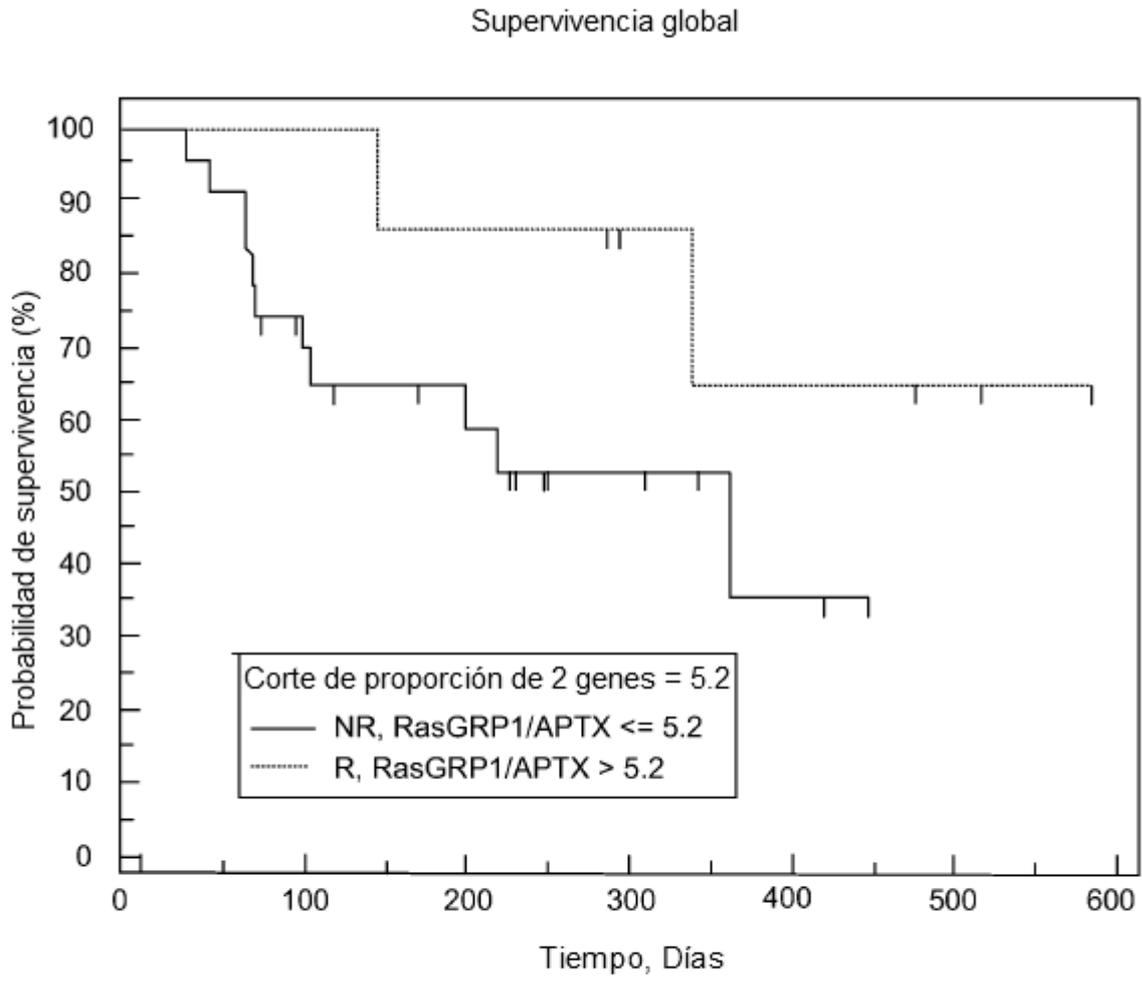


FIG. 8

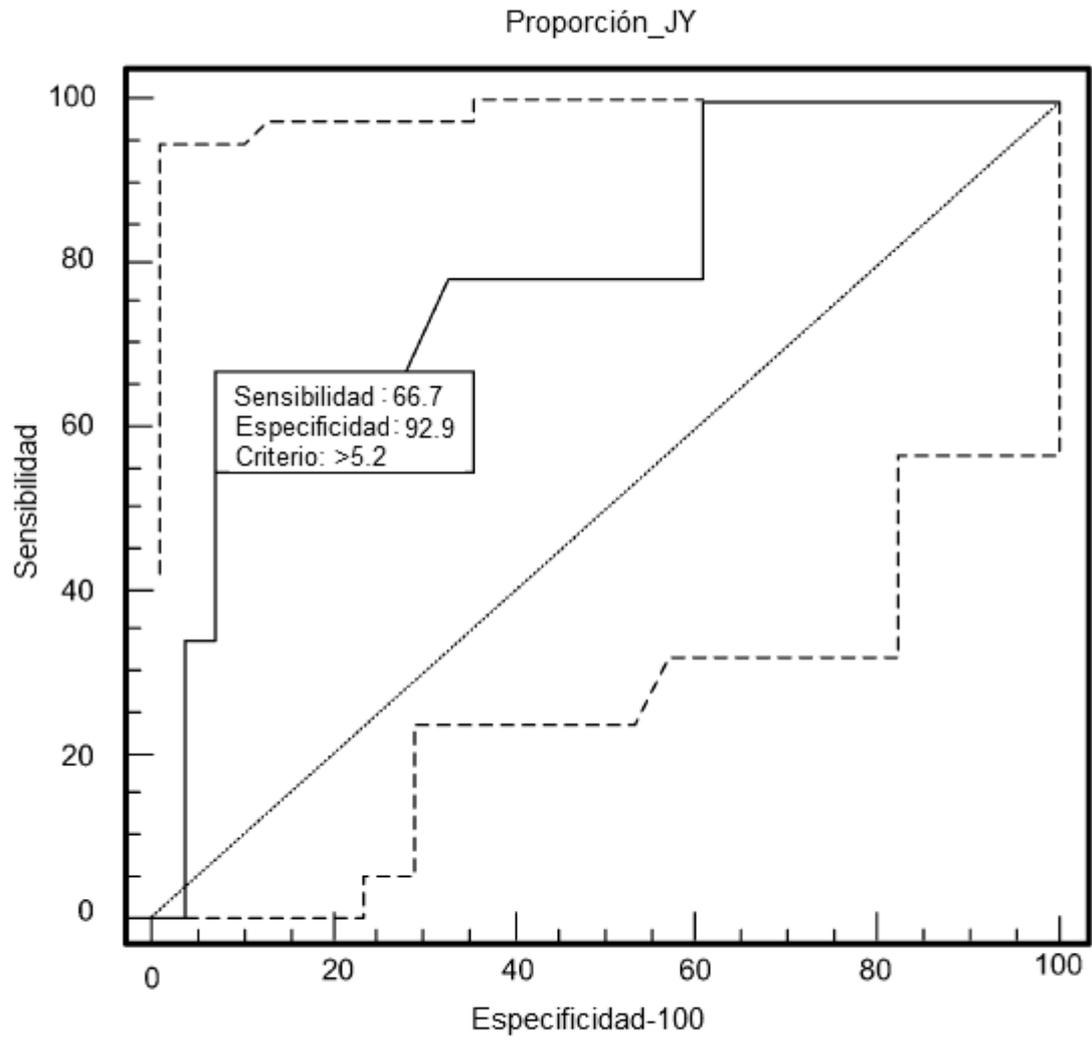


FIG. 9

FIG. 10

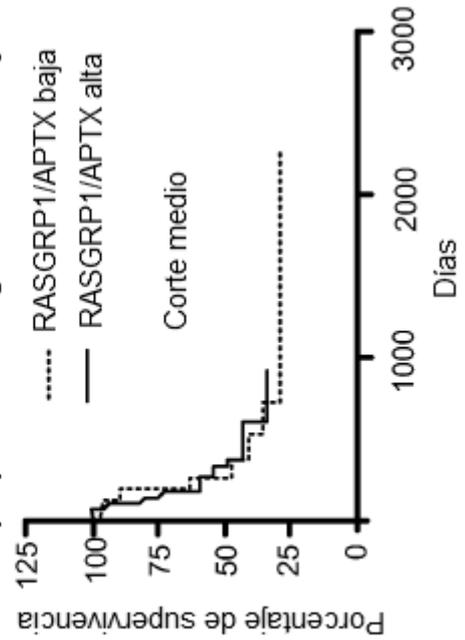
Ensayo de qPCR de 2 genes no predijo la respuesta en AML no tratada con FTI

23 Acdvp16 (edad media=39, 23-66), 61 % CR
 18 FLAM (edad media=64, 42-71), 61 % CR

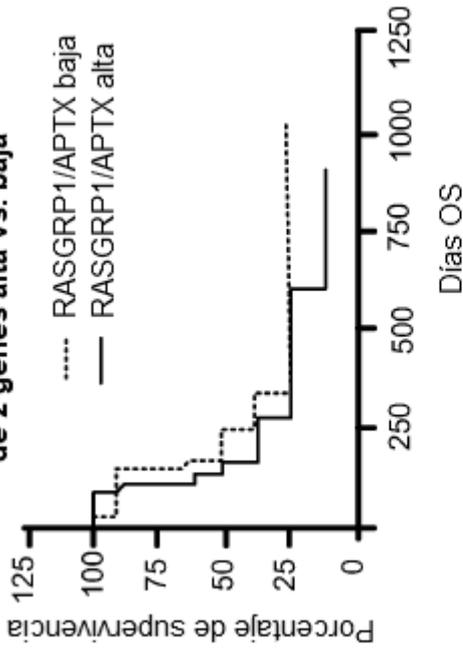
Solo muestras de médula ósea, ensayo qPCR
 Judy Karp

ROC AUC= 0.54, sin valor predictivo para los respondedores enriquecidos

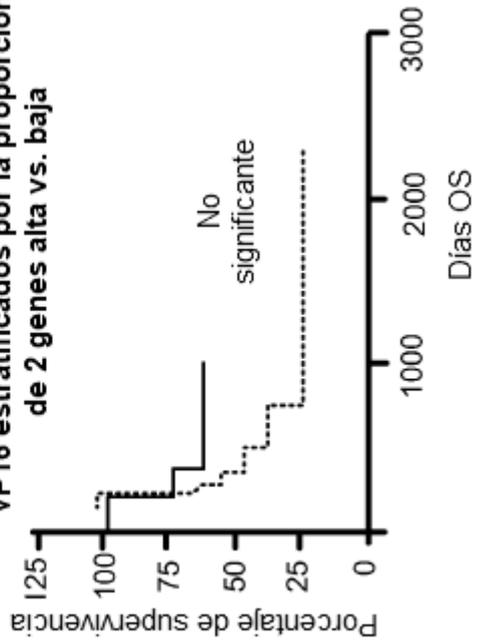
OS de pacientes con AML tratados con FLAM o VP16 estratificados por la proporción de 2 genes alta vs. baja



OS de pacientes con AML tratados con FLAM estratificados por la proporción de 2 genes alta vs. baja



OS de pacientes con AML tratados con VP16 estratificados por la proporción de 2 genes alta vs. baja



Protocolo de estudio de estabilidad comparando muestras de BMA vs PBMC de sangre

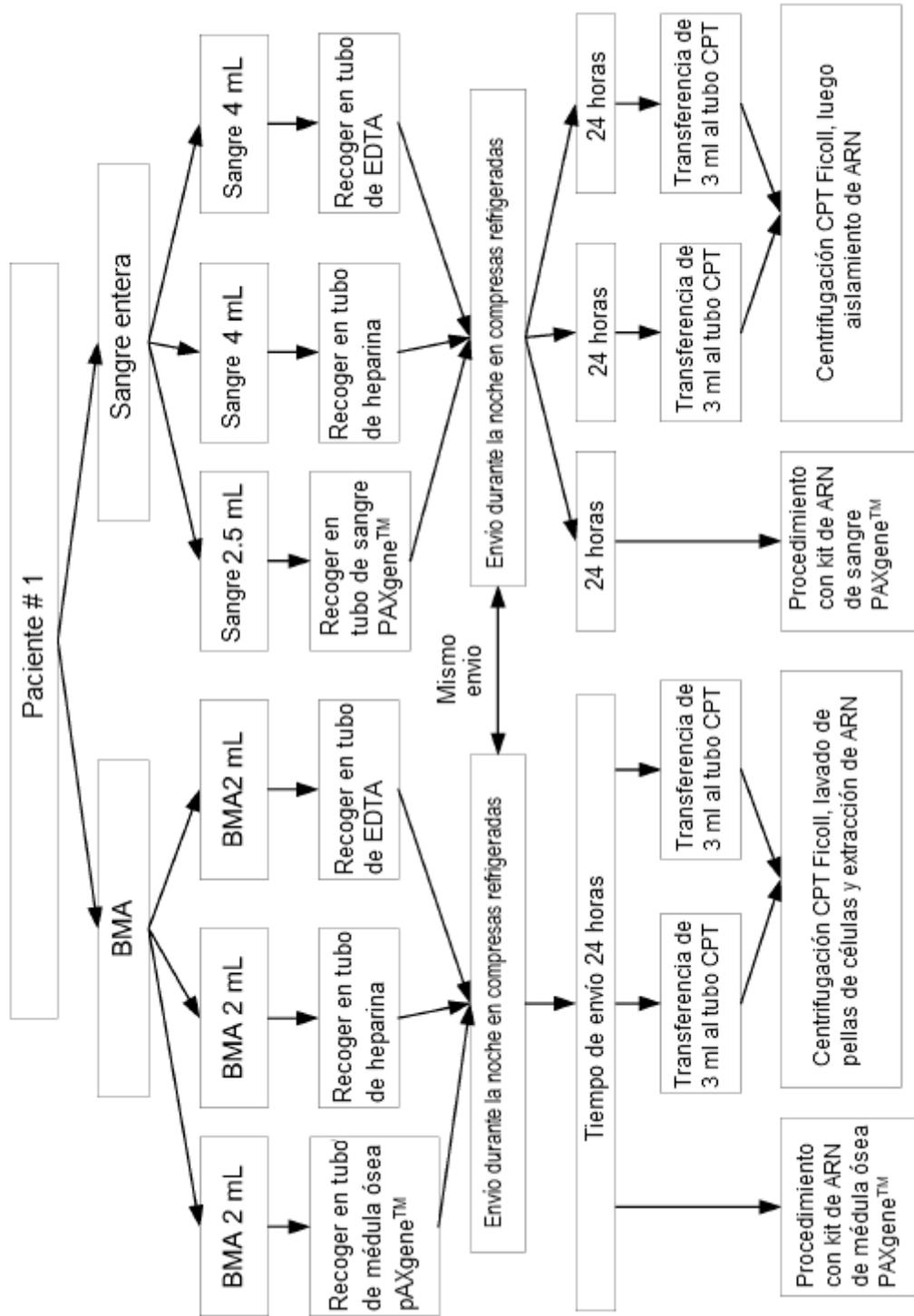


FIG. 11

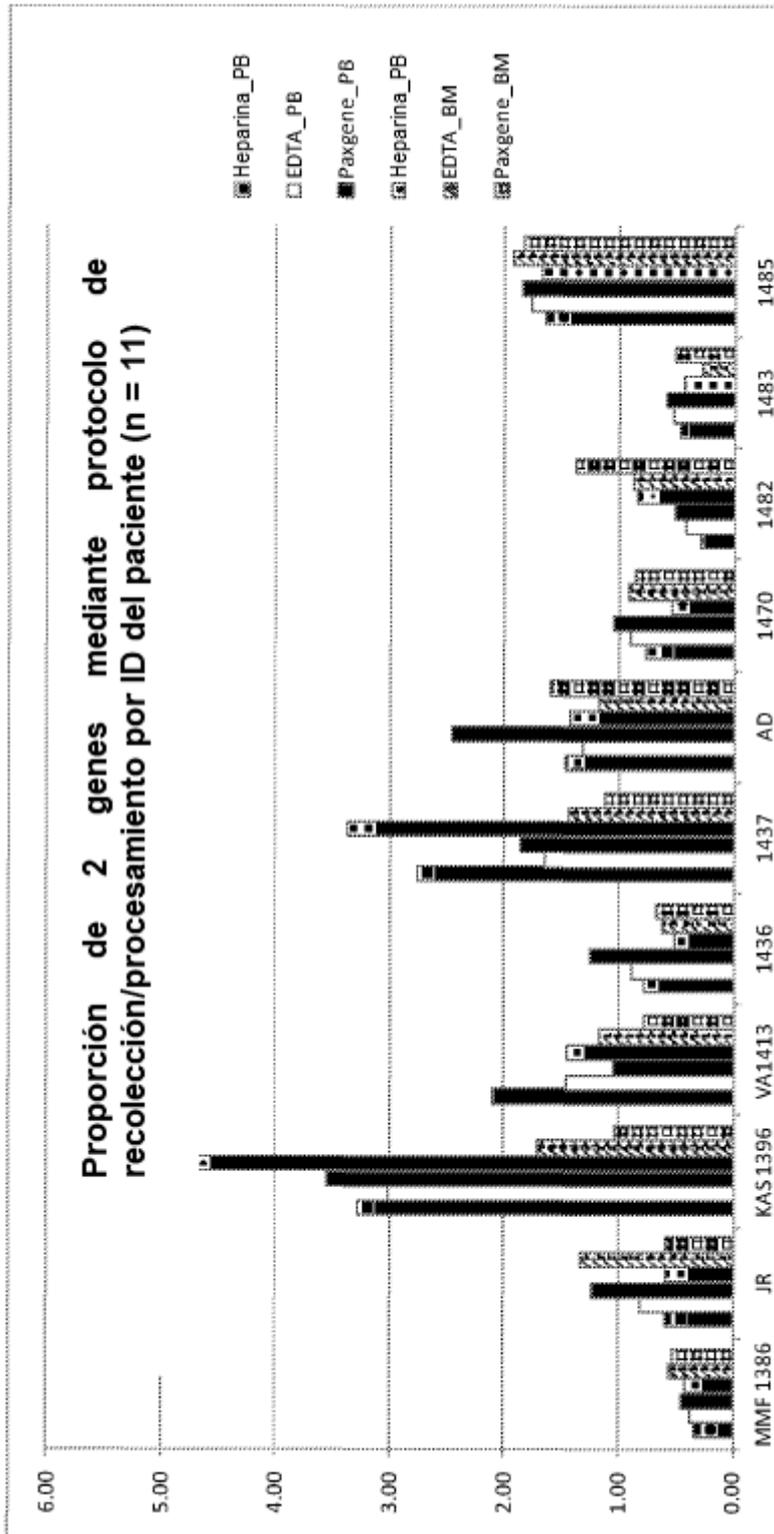


FIG. 12A

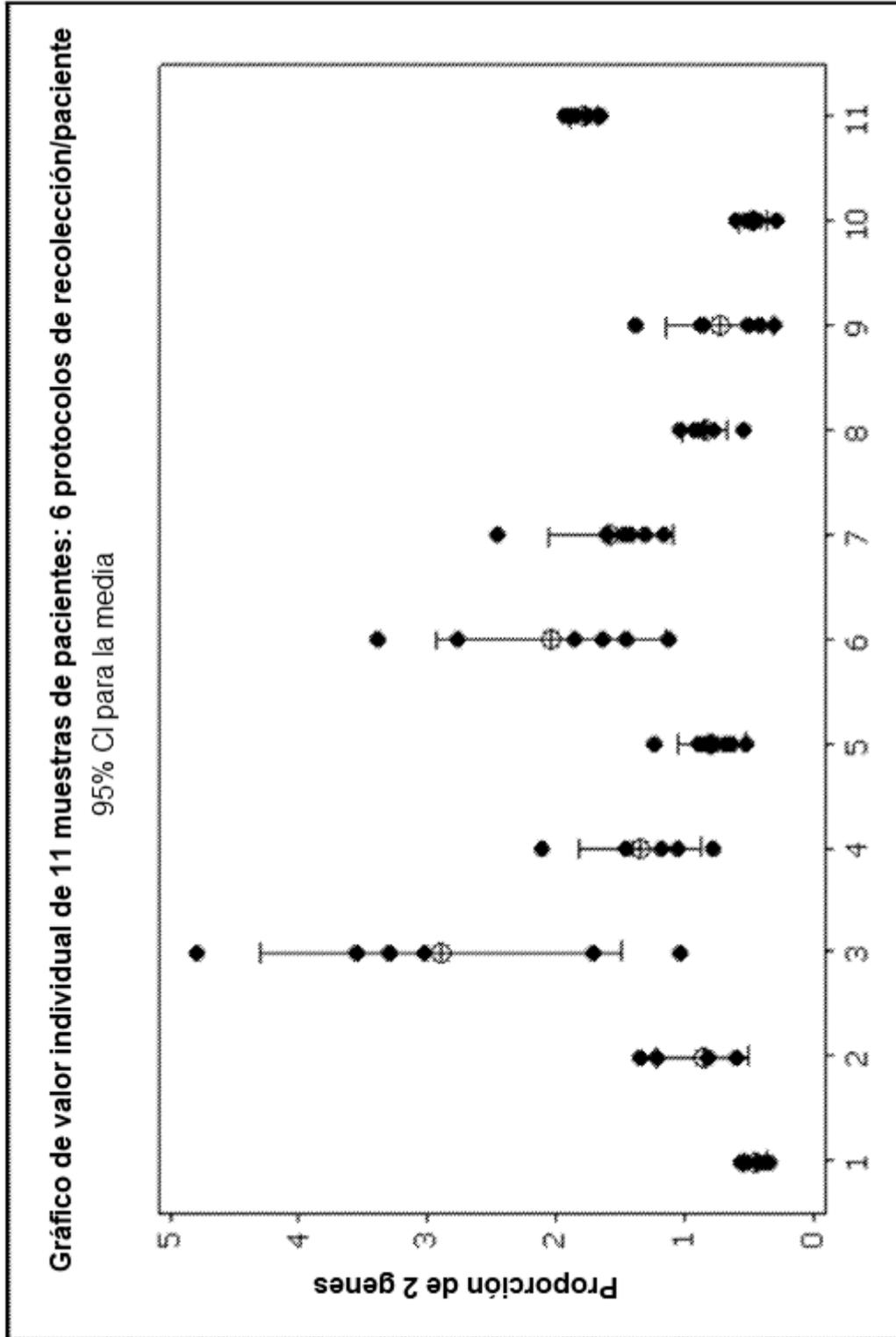


FIG. 12B

Corte de proporción de 2 genes	Respondedor CR	No Respondedor NR	Total	PPV	NPV	ORR	Espe	Sens
>5.2	7	2	9	78%				
≤5.2	4	27	31		87%			
	11	29	40			28%	93%	64%

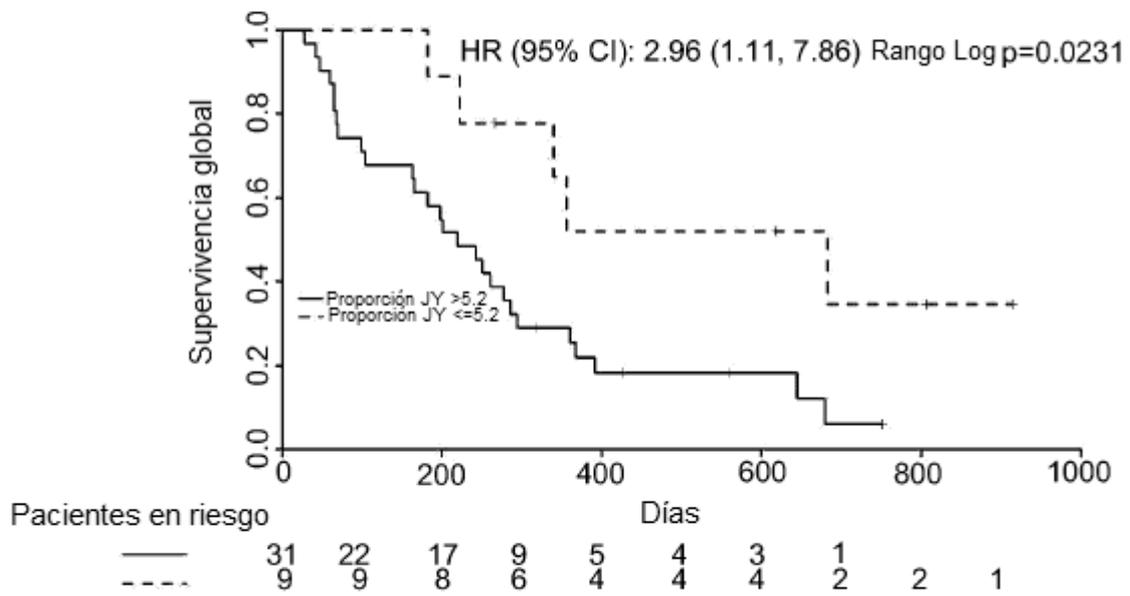


FIG. 13

A

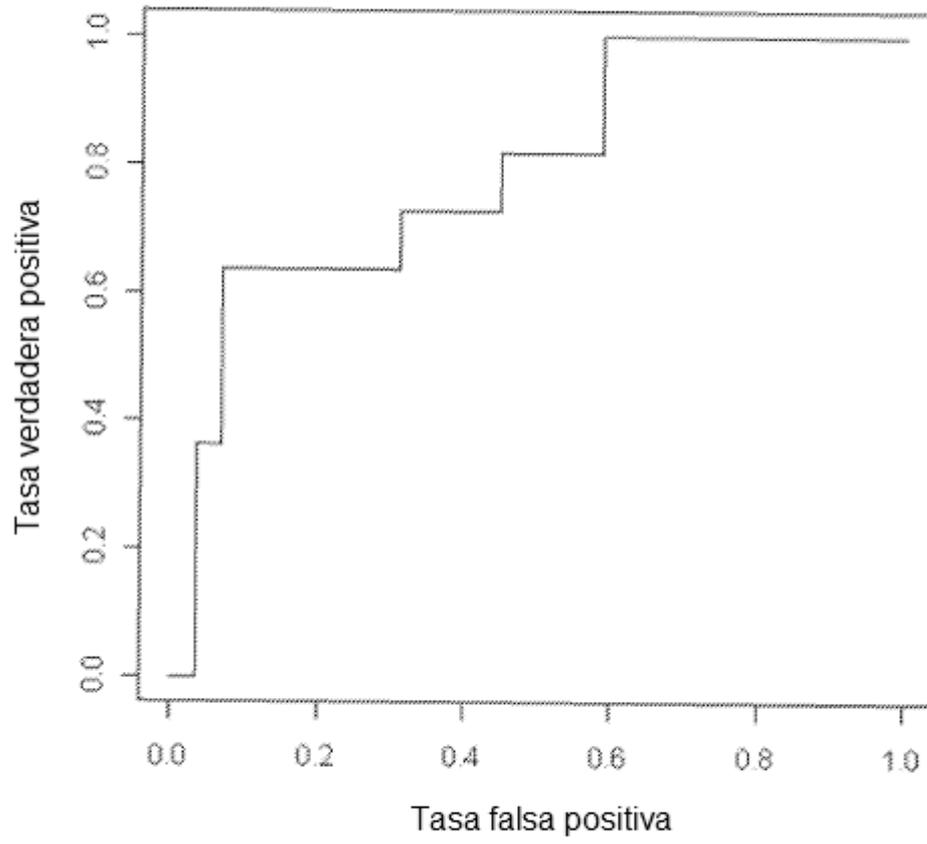


FIG. 14

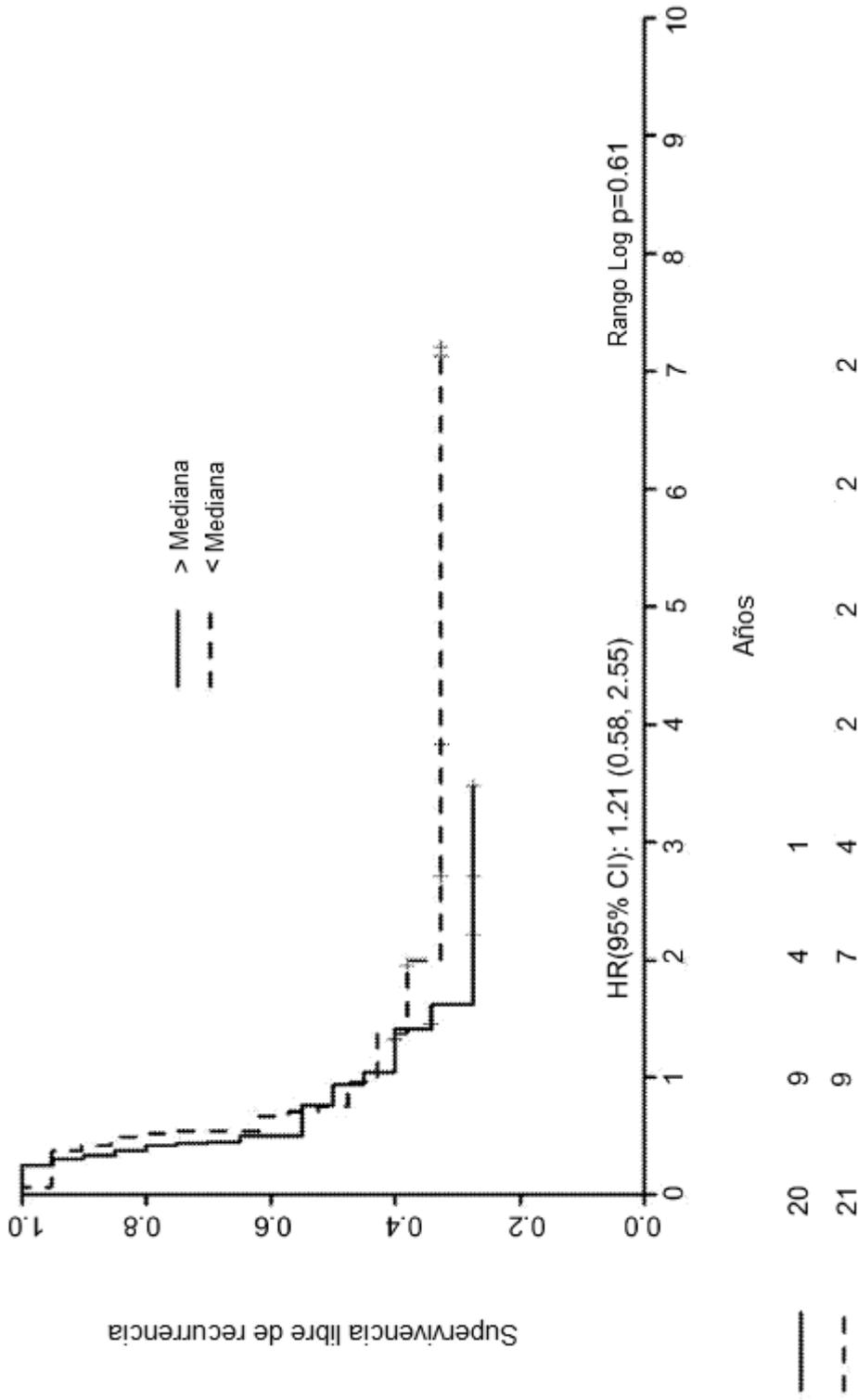


FIG. 15