(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 791 830**

(51) Int. CI.:

A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2012 PCT/US2012/062241**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **02.05.2013 WO13063482**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2012 E 12842939 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020 EP 2809338**

(54) Título: **Mutaciones de FLT3 asociadas a resistencia a fármacos en pacientes con aml que tienen mutaciones activadoras en FLT3**

(30) Prioridad:

28.10.2011 US 201161553090 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.11.2020

(73) Titular/es:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607, US

(72) Inventor/es:

SHAH, NEIL PRAVIN y
SMITH, CATHERINE CHOY

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

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

Mutaciones de FLT3 asociadas a resistencia a fármacos en pacientes con aml que tienen mutaciones activadoras en FLT3

Antecedentes de la invención

Los esfuerzos para desarrollar terapias dirigidas contra el cáncer altamente eficaces implican distinguir mutaciones "conductoras" asociadas a enfermedad, que desempeñan papeles causales críticos en la patogénesis de malignidad, de mutaciones "pasajeras" que son prescindibles para el inicio y/o mantenimiento del cáncer. Los estudios traduccionales de la terapéutica dirigida clínicamente activa pueden distinguir las lesiones "conductoras" de las "pasajeras" y proporcionar información valiosa sobre la biología de las enfermedades humanas. Las mutaciones que se activan por duplicación en tándem (ITD) en FLT3 (FLT3-ITD) se detectan en aproximadamente el 30 % de los pacientes con leucemia mieloide aguda (AML) y están asociadas con un mal pronóstico[1]. Las evidencias científicas[2,3] y clínicas[1,4,5] abundantes sugieren que las mutaciones FLT3-ITD probablemente representan lesiones "pasajeras".

C. C. Smith describió la mutagénesis de saturación de FLT3-ITD y describió que las mutaciones del dominio de quinasa que proporcionan resistencia a AC220 están limitadas a un número limitado de restos y son resistentes a sorafenib *in vitro* (Abstract 4737, 6 Abril 2011, URL:http://cancerres.aacrjournals.org/content/71/8_Supplement/4737; 22 agosto 2011, URL:http://www.ambitbio.com/pdf/AACRSmithPresentationFinal.pdf). C. C. Smith et al (2011, Blood, 118(21):347) describieron que PLX3397 es un inhibidor selectivo de FLT3 en investigación que retiene la actividad contra la mutación "guardián" de FLT3-ITD/F691L clínicamente relevante *in vitro.* C. C. Smith *et al.* describieron un análisis de actividad *in vitro* del inhibidor de ABL/FLT3 clínicamente activo ponatinib (AP24534) contra mutantes FLT3-ITD resistentes a AC220 (13 diciembre 2011, URL:https://ash.confex.com/ash/2011/webprogram/Paper42526.html).

En estudios clínicos previos, numerosos TKI de FLT3 en investigación no lograron remisiones completas cuando se emplearon como monoterapia (0 de 134 remisiones completas en pacientes con AML en estudios de Fase II, colectivamente)[6-8], aunque la medida en que estos agentes lograron una inhibición de FLT3 bioquímicamente potente y/o sostenida *in vivo* no se conoce. Quizá los datos más convincentes para sugerir que FLT3 activado podría representar una mutación "conductora" en AML fue la identificación de una mutación en el dominio de quinasa FLT3 que confiere resistencia moderada al inhibidor multiquinasa PKC412 en un solo paciente que recayó después de lograr una reducción ≥ 50 % en blastocitos de sangre periférica y/o médula ósea en el tratamiento con PKC412, aunque cinco pacientes adicionales evaluados en ese estudio no tenían mutaciones resistentes[9]. Aunque recientemente se ha informado que el inhibidor multiquinasa de amplio espectro sorafenib logra remisiones en pacientes con AML con FLT3-ITD+ en un pequeño estudio de uso humanitario[10], no está claro si su mecanismo de acción implica la inhibición de FLT3 o una quinasa distinta. De hecho, dos pacientes que recayeron con sorafenib después de responder inicialmente no tenían mutaciones detectables en el dominio de quinasa FLT3[11].

AC220 (quizartinib) es un inhibidor en investigación clínicamente activo con selectividad hacia FLT3, KIT, PDGFR y RET[12]. Un estudio multinacional de monoterapia de fase II de AC220 está actualmente en curso. Un análisis provisional reciente de 53 pacientes evaluables para eficacia documentó una tasa de remisión completa compuesta (porcentaje <5 de blastos de médula ósea) del 45 por ciento en pacientes con AML con FLT3-ITD+ recidivante/refractaria[13].

Se han implicado múltiples factores como posibles causas subyacentes de resistencia a los inhibidores de FLT3. De hecho, a diferencia del caso de los inhibidores de ABL, estudios de perfiles de resistencia de tres inhibidores de FLT3, PKC412, SU5614 y sorafenib mostraron mecanismos de resistencia no superpuestos para los tres inhibidores (von Bubnoff et al, Cancer Res. 69:3032-3041, 1009).

Por tanto, es necesario comprender los mecanismos que subyacen a la resistencia que puede surgir después del tratamiento de un paciente con AML con el inhibidor FLT3 AC220.

Breve sumario de la invención

Esta invención se basa, en parte, en la identificación de mutaciones en los restos dentro del dominio de quinasa FLT3-ITD que proporcionan resistencia al fármaco quimioterapéutico AC220 (quizartinib), el primer inhibidor de FLT3 en investigación que demuestra una actividad clínica convincente en AML con FLT3-ITD+. Estos hallazgos demuestran que FLT3-ITD es una lesión "conductora" en una proporción sustancial de pacientes con AML y, por lo tanto, representa un objetivo terapéutico válido en la AML humana. Además, los mutantes clínicamente relevantes del dominio de quinasa FLT3-ITD resistente a AC220 representan dianas terapéuticas de alto valor para futuros esfuerzos de desarrollo de inhibidores de FLT3.

En un aspecto, por tanto, la invención proporciona un método para identificar a un paciente con AML sometido a tratamiento con AC220 que tiene mayor probabilidad de recaída, en donde el paciente tiene una mutación activadora inicial en un gen FLT3, comprendiendo el método detectar la presencia de al menos una segunda mutación *(es decir,* una mutación de resistencia) en el gen FLT3 en una muestra celular AML del paciente, en donde la segunda mutación da como resultado una sustitución de aminoácido en la posición F691, D835, o Y842 de FLT3. En algunas

realizaciones, la segunda mutación activa FLT3. En algunas realizaciones, la mutación activadora inicial es una mutación de duplicación en tándem (ITD). En algunas realizaciones, la mutación activadora inicial es una sustitución en Y842. En algunas realizaciones, por ejemplo, cuando la mutación activadora inicial está en Y842, la mutación de resistencia es una sustitución en F691 o D835. En algunas realizaciones, el método comprende determinar la presencia de la segunda mutación en un gen FLT3 en un codón que codifica F691, D835 o Y842. En algunas realizaciones, un método de la invención comprende secuenciar un ácido nucleico amplificado de la región del gen FLT3 que comprende el codón. En algunas realizaciones, la segunda mutación está en D835. En algunas realizaciones, la segunda mutación es D835Y, D835V o D835F. En algunas realizaciones, la segunda mutación está en F691. En algunas realizaciones, la segunda mutación es F691L. En algunas realizaciones, la mutación es F691I. En algunas realizaciones, el paciente tiene una sustitución de aminoácidos en la posición F691 y una sustitución de aminoácidos en la posición D835. En algunas realizaciones, la segunda mutación está en la posición Y842. En algunas realizaciones, la mutación es Y842C o Y842H. En algunos aspectos, la segunda mutación es una mutación en la posición A848, N841 o D839. En algunos aspectos, la segunda mutación es A848P, N841K o D839V. En algunas realizaciones, la muestra celular de AML se obtiene de sangre. En algunas realizaciones, la muestra celular de AML se obtiene de médula ósea. En algunas realizaciones, la muestra celular de AML se obtiene de un sitio metastásico, por ejemplo, del sistema nervioso central, por ejemplo, la médula espinal o cerebro.

En algunas realizaciones, la mutación se detecta usando secuenciación de molécula única (por ejemplo, la plataforma de secuenciación True Single Molecule Sequencing (tSMS™) (Helicos BioSciences Corporation); o la plataforma de secuenciación Real Time Single Molecule Sequencing (SMRT™) (Pacific Biosciences Incorporated).

En algunos aspectos, un método de la divulgación comprende identificar una mutación de resistencia a AC220 en una muestra celular de AML de un paciente, por ejemplo, una sustitución de aminoácidos en la posición F691, D835, o Y842, por ejemplo, D835Y, D835V, D835F, o F691L, y administrar un agente terapéutico que no sea AC220 al paciente. En algunos aspectos, el agente terapéutico alternativo es un fármaco activo contra la mutación de resistencia. En algunos aspectos, el agente terapéutico es ponatinib (Ariad Pharmaceuticals), PLX3397 (Plexxikon, Inc), G749 (Genosco, Cambridge, MA), o crenolanib (AROG Pharmaceuticals). En algunos aspectos, el paciente tiene una mutación de resistencia en la posición A848, N841 o D839. En algunos aspectos, la mutación de resistencia es A848P, N841K, F691I, Y842H, Y842C o D839V.

En un aspecto adicional, la divulgación también proporciona un método para monitorizar la progresión de AML en un paciente que tiene una mutación activadora inicial en un gen FLT3 y sometido a terapia con AC220, comprendiendo el método detectar un cambio en el número de células que comprenden una segunda mutación en FLT3, en donde la segunda mutación está en un codón que codifica F691, D835, o Y842, donde el cambio en el número de células que tienen la segunda mutación es indicativo de la respuesta del paciente a la terapia con AC220. En algunos aspectos, la mutación es D835Y, D835V, D835F o F691L. En algunos aspectos, la mutación es A848P, N841K, F691I, Y842H, Y842C o D839V.

En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos para identificar moléculas que inhiben la proteína FLT3 mutante. En algunos aspectos, dicho método comprende una etapa de identificar un compuesto que se une específicamente a la proteína FLT3 mutante que tiene una mutación de resistencia como se describió anteriormente en este documento.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para inhibir crecimiento y/o proliferación de células AML, comprendiendo el método administrar un agente terapéutico adicional que inhibe la tirosina quinasa FLT3 a un paciente tratado con AC220 que tiene una mutación activadora inicial en un gen FLT3, por ejemplo, una mutación ITD, y se determina que tiene una segunda mutación en un codón que codifica F691, D835 o Y842. En algunos aspectos, la mutación es D835Y, D835V, D835F o F691L. En algunos aspectos, la mutación está en la posición A848, N841 o D839. En algunos aspectos, la mutación es A848P, N841K, F691I, Y842H, Y842C o D839V. En algunos aspectos, el inhibidor es ponatinib (Ariad Pharmaceuticals), PLX3397 (Plexxikon, Inc), G749 (Genosco, Cambridge, MA), o crenolanib (AROG Pharmaceuticals). En algunos aspectos, un paciente tratado con PLX3397 tiene una mutación de resistencia F691L.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. La identificación de mutación de FLT3-ITD desvela mutaciones del dominio de quinasa secundaria que causan diversos grados de resistencia a AC220. (A) Números de subpoblaciones independientes Ba/F3/FLT3-ITD resistentes a AC220 con sustitución de aminoácidos en el resto indicado obtenido de un ensayo de mutagénesis de saturación (n = 97 clones analizados). (B) Viabilidad celular normalizada de poblaciones Ba/F3 que expresan de manera estable isoformas mutantes FLT3-ITD después de 48 horas en diversas concentraciones de AC220. (C) Análisis de transferencia de Western usando anticuerpo anti-fosfo-FLT3 o anti-FLT3 realizado en lisados preparados a partir de poblaciones Ba/F3 independientes de IL-3 infectadas con retrovirus que expresan las isoformas mutantes FLT3 indicadas. Las células se expusieron a las concentraciones de AC220 indicadas durante 90 minutos.

Figura 2: Modelado de interacciones FLT3-AC220. (A) Modelo de acoplamiento informático del dominio de quinasa FLT3 unida a AC220. AC220 (azul) se presenta tanto en modo de barra como en modo de superficie. La proteína

se muestra en una presentación animada. Los restos de aminoácidos que proporcionan resistencia a AC220 cuando mutan (F691, D835, Y842) se representan en barras naranjas y el motivo DFG se muestra en barras blancas. El modelo se generó utilizando AutoDock [37véanse materiales y métodos] y la ilustración se realizó en PyMol (Delano Scientific). (B) Presentación de superficie y barra de AC220 y los restos que interactúan con AC220 en FLT3. El oxígeno carbonílico de C694 forma un enlace de hidrógeno con un grupo amido de AC220. F691, F830 y AC220 forman interacciones estrechas de apilamiento *π-π*. (C) Estructura del bucle de activación plegado. Los restos D835 e Y842 se representan en barras naranja y sus restos que interactúan en FLT3 se muestran en barras blancas.

Figura 3: La mutación D835F confiere resistencia a ACC220 *in vitro*. (A) Viabilidad celular normalizada de poblaciones de Ba/F3 que expresan de manera estable FLT3-ITD o FLT3-ITD/D835F después de 48 horas en diversas concentraciones de AC220. (B) Análisis de transferencia de Western usando un anticuerpo anti-fosfo-FLT3 y anti-FLT3 realizado en lisados preparados a partir de poblaciones de Ba/F3 independientes de IL-3 infectadas con retrovirus que expresan FLT3-ITD y FLT3-ITD/D835F. Las células se expusieron a las concentraciones de AC220 indicadas durante 90 minutos.

Figura 4: Las isoformas de mutantes FLT3-ITD resistentes a AC220 proporcionan resistencia cruzada a Sorafenib *in vitro*. (A) Viabilidad celular normalizada de poblaciones de Ba/F3 que expresan de manera estable isoformas de mutantes FLT3-ITD resistentes a AC220 después de 48 horas en diversas concentraciones de sorafenib. (B) Análisis de transferencia de Western usando anticuerpo anti-fosfo-FLT3 o anti-FLT3 realizado en lisados preparados a partir de poblaciones Ba/F3 independientes de IL-3 infectadas con retrovirus que expresan las isoformas mutantes FLT3 indicadas. Las células se expusieron a las concentraciones de sorafenib indicadas durante 90 minutos. (C) Valores calculados de CI50 para proliferación de células Ba/F3 que expresan isoformas mutantes FLT3 cultivadas en presencia de AC220 y sorafenib.

Figura 5: Ejemplo de distribución de longitud de regiones ITD en una muestra de paciente. Dos picos distintos identifican sublecturas de ITD-/ITD+ sin ambigüedad.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

El término "FLT3" se refiere a un receptor de tirosina quinasa que desempeña un papel en la regulación de la hematopoyesis. "FLT3" también se conoce como CD135, tirosina quinasa 1 de células madre (STK1), o quinasa 2 hepática fetal (FLK2). FLT3 es un miembro de la familia de receptores de tirosina quinasa tipo III que incluye KIT, FMS, y receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR). El receptor tiene un dominio extracelular que incluye cinco dominios de tipo inmunoglobulina, un dominio transmembrana y un dominio intracelular que incluye un dominio de quinasa. Un receptor FLT3 se activa mediante la unión del ligando de tirosina quinasa 3 relacionado con FMS al dominio extracelular, que induce la formación de homodímeros en la membrana plasmática conduciendo a autofosforilación del receptor. La quinasa receptora activada posteriormente fosforila y activa múltiples moléculas efectoras citoplasmáticas en vías involucradas en apoptosis, proliferación, y diferenciación de células hematopoyéticas en médula ósea. Las mutaciones que provocan la activación constitutiva de este receptor provocan leucemia, por ejemplo, leucemia mieloide aguda y leucemia linfoblástica aguda. El término "FLT3", como se usa en este documento, incluye variantes polimórficas de ácido nucleico y polipéptido, alelos, mutantes, y fragmentos. Las secuencias de FLT3 se conocen bien en la técnica. La secuencia de la proteína FLT3 humana tiene el número de acceso UniProtKB P36888. Un ejemplo de secuencias de polipéptidos FLT3 humanos está disponible con las secuencias de referencia NP_004110.2 en la base de datos de secuencias de polipéptidos de NCBI. El ejemplo de una secuencia de polinucleótidos FLT3 representativa está disponible en la base de datos de NCBI con el número de acceso NM_004119.2. La secuencia de polinucleótidos mostrada con el número de acceso NM_004119.2 se proporciona como SEQ ID NO: 1 como una secuencia de nucleótidos ilustrativa. En SEQ ID NO: 2 se muestra una secuencia ilustrativa de polipéptidos del número de acceso NP_004110.2. Como se entiende en la técnica, el término "FLT3" incluye variantes, como variantes polimórficas, codificadas por un gen FLT3 localizado en la banda citogenética génica Entrez humano 13q12 (banda citogenética Ensembl: 13q12.2; banda citogenética de HGNC: 13q12) y corresponde a las posiciones de 28,58 Mb-28,67 Mb del UCSC Genome Browser en Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly. Por ejemplo, la base de datos de SNP muestra que se han identificado polimorfismos de un solo nucleótido en genes *FLT3.*

Una "mutación activadora" de FLT3 en el contexto de esta invención se refiere a una mutación que conduce a la actividad constitutiva del dominio de quinasa. Como se usa en este documento, una mutación de "resistencia" se refiere a una mutación que conduce a resistencia a fármacos. En la presente invención, el fármaco es AC220. En el contexto de esta invención "detectar una mutación de resistencia en un codón que codifica F691, D835, o Y842"; o "detectar una mutación de resistencia en F691, D835, o Y842" significa que un paciente con AML que está recibiendo terapia con AC220 y está siendo evaluado según los métodos de la invención tiene una mutación FLT3 activadora inicial, típicamente una mutación ITD. La mutación de resistencia también puede considerarse como una "segunda" mutación, respecto a la mutación "inicial". En algunas realizaciones, la mutación "segunda" o de "resistencia" detectada según la invención es una mutación en F691, D835 o Y842. En algunas realizaciones, la mutación "segunda" o de

"resistencia" es D835Y, D835V, D835F o F691L. En algunos aspectos, la mutación "segunda" o de "resistencia" está en la posición A848, N841 o D839. En algunos aspectos, la mutación "segunda" o de "resistencia" es A848P, N841K, F691I, Y842H, Y842C o D839V. En algunas realizaciones, la mutación de resistencia también puede activar FLT3, por ejemplo, una mutación en D835 o Y842. En algunas realizaciones, el paciente puede tener más de una mutación de resistencia, por ejemplo, una mutación en D835 y una mutación en F691.

La expresión "leucemia mieloide aguda" ("AML"), también conocida como "leucemia mielógena aguda", se refiere a un cáncer de la línea mieloide de células sanguíneas, caracterizado por el rápido crecimiento de glóbulos blancos anómalos que se acumulan en la médula ósea e interfieren con la producción de células sanguíneas normales. AML puede clasificarse utilizando la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD (2002). "The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms". Blood 100 (7): 2292-302); o la clasificación FAB (Bennett J, Catovsky D, Daniel M, Flandrin G, Galton D, Gralnick H, Sultan C (1976). "Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group". Br J Haematol 33 (4): 451-8.) En el contexto de esta invención, un "paciente con AML" se refiere a un ser humano.

Los términos "tumor" o "cáncer" en un animal se refieren a la presencia de células que poseen características como crecimiento atípico o morfología, incluyendo proliferación incontrolada, inmortalidad, potencial metastásico, crecimiento rápido y tasa de proliferación, y ciertos rasgos morfológicos característicos. "Cáncer" incluye neoplasias benignas y malignas. El término "neoplásico" se refiere al crecimiento atípico benigno y maligno.

"Muestra biológica", como se usa en este documento, se refiere a una muestra que comprende células AML obtenidas de un paciente que tiene AML. La muestra puede ser una biopsia, que se refiere a cualquier tipo de biopsia, como biopsia con aguja, biopsia con aguja fina, biopsia quirúrgica, etc., por ejemplo, de médula ósea. En algunas realizaciones, la muestra biológica se obtiene de sangre.

"Proporcionar una muestra biológica" significa obtener una muestra biológica para usar en los métodos descritos en esta invención. Con mucha frecuencia, esto se hará mediante la extracción de una muestra celular AML de un paciente, pero también puede lograrse mediante el uso de células previamente aisladas (por ejemplo, aisladas por otra persona, en otro momento y/o para otra finalidad).

Los términos "aislado", "purificado/a" o "biológicamente puro" se refieren a material que está sustancialmente o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan como se encuentra en su estado nativo. La pureza y la homogeneidad se suelen determinar usando técnicas de química analítica, tales como la electroforesis en gel de poliacrilamida o la cromatografía líquida de alto rendimiento. Una proteína o ácido nucleico que es la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificada. En particular, un ácido nucleico aislado se separa de algunos marcos de lectura abiertos que flanquean naturalmente el gen y codifican proteínas distintas de la proteína codificada por el gen. El término "purificado" en algunas realizaciones indica que un ácido nucleico o proteína da lugar esencialmente a una banda en un gel electroforético. Preferentemente, significa que el ácido nucleico o la proteína es al menos 85 % puro, más preferentemente al menos 95 % puro, y lo más preferentemente al menos 99 % puro. "Purificar" o "purificación" en otras realizaciones significa eliminar al menos un contaminante de la composición a purificar. En este sentido, la purificación no requiere que el compuesto purificado sea homogéneo, por ejemplo, 100 % puro.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a los polímeros de aminoácidos en donde uno o más restos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido correspondiente de origen natural, así como a polímeros de aminoácidos naturales, aquellos que contienen restos modificados y polímeros de aminoácidos no naturales.

El término "aminoácidos" se refiere a aminoácidos naturales o sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados mediante el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, **y**- carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se refiere a los compuestos que tienen la misma estructura química básica que la de un aminoácido de origen natural, por ejemplo, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, metionina metil sulfonio. Tales análogos pueden tener grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o cadenas principales peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Aminoácidos miméticos se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de manera similar a un aminoácido de origen natural.

Los aminoácidos se pueden citar en el presente documento bien por sus símbolos habitualmente conocidos de tres letras, o mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura bioquímica de la IUPAC-IUB. Los nucleótidos, asimismo, se pueden mencionar por sus códigos de una letra habitualmente aceptados.

"Variantes modificadas de forma conservativa" se aplica a secuencias tanto de aminoácidos como de ácido nucleico.

Con respecto a secuencias de ácidos nucleico concretas, las variantes conservativamente modificadas se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos que son idénticas o comparten propiedades químicas similares al aminoácido nativo, o donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, esencialmente secuencias idénticas o asociadas, por ejemplo, naturalmente contiguas. A causa de la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican la mayoría de las proteínas. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican, todos ellos, el aminoácido alanina. Por tanto, en cada posición donde una alanina se especifica mediante un codón, el codón puede alterarse a otro de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácido nucleico se denominan "variaciones silenciosas", que son un tipo de variaciones modificadas de forma conservativa. Cada secuencia de ácidos nucleicos en este documento que codifica un polipéptido también describe variaciones silenciosas del ácido nucleico. Un experto reconocerá que, en ciertos contextos, cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que normalmente es el único codón para metionina, y TGG, que es normalmente el único codón del triptófano) se puede modificar con el fin de conseguir una molécula funcionalmente idéntica. Por tanto, a menudo las variaciones silenciosas de un ácido nucleico que codifica un polipéptido están implícitas en una secuencia descrita con respecto al producto de expresión, pero no con respecto a secuencias de sonda reales.

Como secuencias de aminoácidos, un experto reconocerá que sustituciones, deleciones o adiciones individuales a una secuencia de ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos o proteínas que altera, añade o elimina un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos de la secuencia codificada es una "variante modificada de manera conservativa" donde la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Dichas variantes modificadas conservativamente son adicionales, y no excluyen, las variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos de la invención, sustituciones típicamente conservadoras entre sí: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparragina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) *(véase,* por ejemplo, Creighton, Proteins (1984)).

"Ácido nucleico" u "oligonucleótido" o "polinucleótido" o los equivalentes gramaticales utilizados en el presente documento significan al menos dos nucleótidos unidos covalentemente entre sí. Los oligonucleótidos tienen típicamente una longitud de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 25, 30, 40, 50 o más nucleótidos, hasta aproximadamente 100 nucleótidos de longitud. Ácidos nucleicos y polinucleótidos son polímeros de cualquier longitud, incluyendo longitudes más largas, por ejemplo, 200, 300, 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 7000, 10.000, etc. Un ácido nucleico de esta invención generalmente contendrá enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, se incluyen análogos de ácido nucleico que pueden tener cadenas principales alternativas, que comprenden, por ejemplo, enlaces fosforamidato, fosforotioato, fosforoditioato u O-metilfosforoamidita (véase Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press); y cadenas principales y enlaces de ácido nucleico peptídico. Otros ácidos nucleicos análogos incluyen los que tienen cadenas principales positivas; cadenas principales no iónicas y cadenas principales sin ribosa, incluyendo las que se describen en las patentes de Estados Unidos con números 5.235.033 y 5.034.506, y en los Capítulos 6 y 7, ASC Symposium Series 580, *Carbohydrate Modifications in Antisense Research,* Sanghui y Cook, eds. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos también están incluidos dentro de una definición de ácidos nucleicos. Se pueden llevar a cabo modificaciones de la cadena principal de ribosa-fosfato por una serie de razones, por ejemplo, para aumentar la estabilidad y la semivida de dichas moléculas en entornos fisiológicos o como sondas en un biochip. Las mezclas de ácidos nucleicos de origen natural y sus análogos se pueden realizar; como alternativa, se pueden preparar mezclas de diferentes análogos de ácidos nucleicos, y mezclas de ácidos nucleicos naturales y análogos.

Una variedad de referencias describen tales análogos de ácido nucleico, incluyendo, por ejemplo, fosforamidato (Beaucage et al., Tetrahedron 49(10):1925 (1993) y referencias en este; Letsinger, J. Org. Chem. 35:3800 (1970); Sprinzl et al., Eur. J. Biochem. 81:579 (1977); Letsinger et al., Nucl. Acids Res. 14:3487 (1986); Sawai et al, Chem. Lett. 805 (1984), Letsinger et al., J. Am. Chem. Soc. 110:4470 (1988); y Pauwels et al., Chemica Scripta 26:141 91986)), fosforotioato (Mag et al., Nucleic Acids Res. 19:1437 (1991); y Patente de Estados Unidos N.º 5.644.048), fosforoditioato (Briu et al., J. Am. Chem. Soc. 111:2321 (1989), enlaces de O-metilfosforoamidita (véase Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press), y cadenas principales y enlaces de ácido nucleico peptídico (véase Egholm, J. Am. Chem. Soc. 114:1895 (1992); Meier et al., Chem. Int. Ed. Engl. 31:1008 (1992); Nielsen, Nature, 365:566 (1993); Carlsson et al., Nature 380:207 (1996)). Otros ácidos nucleicos análogos incluyen aquellos con cadenas principales positivas (Denpcy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6097 (1995); cadenas principales no iónicas (Patentes de los Estados Unidos N.^{os} 5.386.023, 5.637.684, 5.602.240, 5.216.141 y 4.469.863; Kiedrowshi et al., Angew. Chem. Intl. Ed. English 30:423 (1991); Letsinger et al., J. Am. Chem. Soc. 110:4470 (1988); Letsinger et al., Nucleoside & Nucleotide 13:1597 (1994); Capítulos 2 y 3, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y.S. Sanghui y P. Dan Cook; Mesmaeker et al., Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. 4:395 (1994); Jeffs et al., J. Biomolecular NMR 34:17 (1994); Tetrahedron Lett. 37:743 (1996)) y cadenas principales sin ribosa, incluyendo las que se describen en las patentes de Estados Unidos con números 5.235.033 y 5.034.506, y en los Capítulos 6 y 7, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y.S. Sanghui y P. Dan Cook. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos también se incluyen dentro de una definición de ácidos nucleicos (véase Jenkins et al., Chem. Soc. Rev. (1995) pp 169-176). Varios análogos de ácido nucleico se describen en Rawls, C & E News 2 de junio de 1997 página 35.

Otros análogos incluyen ácidos nucleicos peptídicos (PNA) que son análogos de ácido nucleico peptídico. Estas cadenas principales son sustancialmente no iónicas en condiciones neutras, A diferencia de la cadena principal de fosfodiéster altamente cargado de ácidos nucleicos naturales. Esto da como resultado dos ventajas. Primero, la cadena principal de PNA exhibe mejor cinética de hibridación. Los PNA tienen cambios más grandes en la temperatura de fusión (T_m) para pares de bases mal emparejados respecto a perfectamente emparejados. El ADN y el ARN exhiben típicamente una disminución de 2-4 °C en T_m por un desajuste interno. Con la cadena principal de PNA no iónico, la disminución está más cerca de 7-9 °C. Igualmente, debido a su naturaleza no iónica, la hibridación de las bases unidas a estas cadenas principales es relativamente insensible a la concentración salina. Además, los PNA no son degradados por enzimas celulares y, por tanto, pueden ser más estables.

Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, como se especifica, o contienen partes de la secuencia bicatenaria o monocatenaria. Como observarán los expertos en la materia, la representación de una cadena sencilla también define la secuencia de la cadena complementaria; así, las secuencias descritas en este documento también proporcionan el complemento de la secuencia. A menos que se indique lo contrario, una secuencia particular del ácido nucleico también abarca implícitamente variantes modificadas conservativamente de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. El ácido nucleico puede ser ADN, tanto genómico como ADNc, ARN o un híbrido, donde el ácido nucleico puede contener combinaciones de desoxirribo- y ribo-nucleótidos, y combinaciones de bases, incluyendo uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina hipoxantina, isocitosina, isoguanina, etc. "Transcripción" típicamente se refiere a un ARN natural, por ejemplo, un pre-ARNm, ARNhn, o ARNm. Como se usa en este documento, el término "nucleósido" incluye nucleótidos y análogos de nucleósidos y nucleótidos, y nucleósidos modificados como nucleósidos modificados con amino. Además, "nucleósido" incluye estructuras análogas no naturales. Por tanto, por ejemplo, las unidades individuales de un ácido nucleico peptídico, conteniendo cada uno una base, en este documento se denominan nucleósidos.

Una "marca" o un "resto detectable" es una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, químicos u otros medios físicos. Por ejemplo, marcas útiles incluyen ^{32}P, colorantes fluorescentes, reactivos de densidad electrónica, enzimas (por ejemplo, como se usa comúnmente en un ELISA), biotina, digoxigenina, o haptenos y proteínas u otras entidades que se pueden volver detectables, por ejemplo, incorporando un radiomarcador en el péptido o usado para detectar anticuerpos específicamente reactivos con el péptido. Los marcadores pueden incorporarse en los ácidos nucleicos KIT, proteínas y anticuerpos en cualquier posición. Se puede usar cualquier método conocido en la técnica para conjugar el anticuerpo a la marca, por ejemplo, usando los métodos descritos en Hermanson, Bioconjugate Techniques 1996, Academic Press, Inc., San Diego.

Una "sonda de ácido nucleico u oligonucleótido marcado" es una que se une, bien covalentemente, a través de un conector o un enlace químico, o bien no covalentemente, a través de enlaces iónicos, van der Waals, electrostáticos, o de hidrógeno a una marca de modo que la presencia de la sonda puede detectarse detectando la presencia de la marca unida a la sonda. Como alternativa, el método que utiliza interacciones de alta afinidad puede lograr los mismos resultados cuando uno de un par de socios de unión se une al otro, por ejemplo, biotina, estreptavidina.

Como se usa en este documento, una "sonda de ácido nucleico u oligonucleótido" se define como un ácido nucleico capaz de unirse a un ácido nucleico diana de secuencia complementaria a través de uno o más tipos de enlaces químicos, generalmente a través del emparejamiento de bases complementarias, generalmente a través de formación de enlaces de hidrógeno. Como se usa en este documento, una sonda puede incluir bases naturales (es decir, A, G, C o T) o modificadas (7-desazaguanosina, inosina, etc.). Además, las bases en una sonda pueden estar unidas por un enlace que no sea un enlace fosfodiéster, siempre y cuando no interfiera funcionalmente con la hibridación. Por tanto, por ejemplo, las sondas pueden ser ácidos nucleicos peptídicos en donde las bases constituyentes están unidas por enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster. Un experto en la materia entenderá que las sondas pueden unirse a secuencias diana que carecen de complementariedad completa con la secuencia de la sonda, dependiendo de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Las sondas están preferentemente marcadas directamente como con isótopos, cromóforos, lumíforos, cromógenos, o marcadas indirectamente, como con biotina, a las cuales puede unirse posteriormente un complejo de estreptavidina. Al analizar la presencia o ausencia de la sonda, puede detectarse la presencia o ausencia de la secuencia o subsecuencia seleccionada. El diagnóstico o pronóstico puede basarse en el nivel genómico, o en el nivel de expresión de ARN o proteína.

El término "recombinante" cuando se utiliza en referencia, por ejemplo, a una célula, o un ácido nucleico, proteína, o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, se ha modificado mediante la introducción de un ácido nucleico o proteína heterólogo o la alteración de un ácido nucleico o proteína natural, o que la célula se ha derivado de una célula modificada de esta forma. Por tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma natural (no recombinante) de la célula o expresan genes naturales que de otra forma se expresarían de forma anómala, expresados en baja cantidad, o no expresados en absoluto. Por el término "ácido nucleico recombinante" en este documento se entiende ácido nucleico, originalmente formado *in vitro,* en general, mediante la manipulación del ácido nucleico, por ejemplo, utilizando polimerasas y endonucleasas, en una forma que normalmente no se encuentra en la naturaleza. Igualmente, una "proteína recombinante" es una proteína preparada usando técnicas recombinantes, es decir, a través de la expresión de un ácido nucleico recombinante como se

representó anteriormente.

La expresión "hibrida selectivamente (o específicamente) con" se refiere a la unión, duplicación, o hibridación de una molécula a una secuencia de nucleótidos particular en condiciones de hibridación rigurosas cuando esa secuencia está presente en una mezcla (por ejemplo, ADN o ARN celular o de biblioteca total, una reacción de amplificación), tal que la unión de la molécula a la secuencia de nucleótidos particular es determinante de la presencia de la secuencia de nucleótidos es la mezcla.

La expresión "condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a condiciones bajo las cuales una sonda hibridará con su subsecuencia diana, típicamente en una mezcla compleja de ácidos nucleicos, pero a ninguna otra secuencia. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán distintas en circunstancias distintas. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más altas. Se encuentra una guía extensa para la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5-10 °C más bajas que el punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a un pH de fuerza iónica definido. La T_m es la temperatura (bajo fuerza iónica definida, pH y concentración nucleica) a la que el 50 % de las sondas complementarias a la diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio (ya que las secuencias diana están presentes en exceso, en T_m, el 50 % de las sondas están ocupadas en equilibrio). Las condiciones estrictas serán aquellas en que la concentración salina sea inferior a aproximadamente 1,0 M de iones sodio, típicamente una concentración de iones sodio de 0,01 a 1,0 M (u otras sales) a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30 °C para sondas cortas (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60 °C para sondas largas (por ejemplo, más de 50 nucleótidos). También pueden lograrse condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida. Para hibridación selectiva o específica, una señal positiva es al menos dos veces el fondo, preferentemente 10 veces la hibridación de fondo. Las condiciones ilustrativas de hibridación estrictas pueden ser las siguientes: formamida al 50 %, 5x SSC, y SDS al 1 %, incubación a 42 °C, o, 5x SSC, SDS al 1 %, incubación a 65 °C, con lavado en 0,2x SSC, y 0,1 % SDS a 65 °C. Para PCR, una temperatura de aproximadamente 36 °C es típica para amplificación de baja rigurosidad, aunque las temperaturas de hibridación pueden variar entre aproximadamente 32 °C y 48 °C dependiendo de la longitud del cebador. Para amplificación por PCR de alta rigurosidad, una temperatura de aproximadamente 62 °C es típica, aunque las altas temperaturas de hibridación de rigurosidad pueden variar de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 65 °C, dependiendo de la longitud y la especificidad del cebador. Las condiciones de ciclado típicas para amplificaciones de alta y baja rigurosidad incluyen una fase de desnaturalización de 90 °C - 95 °C durante 30 segundos - 2 min., una fase de irrigación que dura 30 segundos. - 2 min., y una fase de extensión de aproximadamente 72 °C durante 1 - 2 min. Se proporcionan protocolos y pautas para las reacciones de amplificación de baja y alta rigurosidad, por ejemplo, en Innis et al. (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. N.Y.).

Los ácidos nucleicos que no hibridan entre sí en condiciones de rigurosidad aún son sustancialmente idénticos si los polipéptidos que codifican son sustancialmente idénticos. Esto sucede, por ejemplo, cuando se crea una copia de un ácido nucleico usando la máxima degeneración de codones permitida por el código genético. En tales casos, los ácidos nucleicos típicamente hibridan en condiciones de hibridación moderadamente estrictas. Las "condiciones de hibridación moderadamente estrictas" ilustrativas incluyen una hibridación en un tampón de formamida al 40 %, NaCl 1 M, SDS al 1 % a 37 °C, y un lavado en 1X SSC a 45 °C. Una hibridación positiva es al menos dos veces el fondo. Los expertos en la materia reconocerán fácilmente que pueden utilizarse condiciones de hibridación y lavado alternativas para proporcionar condiciones de rigurosidad similares. Se proporcionan pautas adicionales para determinar los parámetros de hibridación en numerosas referencias, por ejemplo, en Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel, *et al.*

El "porcentaje de identidad" puede determinarse usando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, el algoritmo BLAST establecido en los parámetros predeterminados. Una indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico es inmunológicamente reactivo con los anticuerpos generados contra el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe a continuación. Por tanto, típicamente un polipéptido es sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, donde los dos péptidos difieren solo por sustituciones conservativas. Otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus complementos se hibridan entre sí en condiciones estrictas, como se describe a continuación. Otra indicación más de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que pueden usarse los mismos cebadores para amplificar las secuencias.

La expresión "efectos funcionales" en el contexto de ensayos para probar compuestos que inhiben la actividad de una proteína FLT3 incluye la determinación de un parámetro que está indirectamente o directamente bajo la influencia de la proteína FLT3 o ácido nucleico, por ejemplo, un efecto funcional, físico o químico, como la capacidad de disminuir la actividad de la quinasa FLT3, disminuir la proliferación celular; disminuir la transformación celular; disminuir la dependencia de factor de crecimiento o suero; alterar los niveles de marcadores de superficie celular, disminuir los niveles de ARNm o proteína FLT3, o medir la actividad FLT3. Los "efectos funcionales" incluyen actividades *in vitro, in vivo,* y *ex vivo*.

Como se usa en este documento, "inhibidores" o "antagonistas" de FLT3 se refieren a moléculas moduladoras o compuestos que, por ejemplo, se unen a, bloquean parcial o totalmente la actividad, disminuyen, previenen, retrasan la activación, inactivan, desensibilizan, o disminuyen la actividad o expresión de FLT3. Los inhibidores pueden incluir ARNsi o ARN antisentido, por ejemplo, ARNsi o ARN antisentido para dirigirse a ácidos nucleicos de FLT3 o versiones genéticamente modificadas de la proteína FLT3, por ejemplo, versiones con actividad alterada, así como antagonistas naturales y sintéticos de FLT3, anticuerpos, pequeñas moléculas químicas y similares. Los inhibidores de tirosina quinasa FLT3 son conocidos e incluyen inhibidores como AC220 y midostaurina. En la técnica se conocen inhibidores para uso en la divulgación.

En algunas realizaciones, las muestras o ensayos que comprenden proteínas FLT3 que se tratan con un inhibidor potencial se comparan con las muestras de control sin el inhibidor, para examinar el efecto sobre la actividad. Por ejemplo, típicamente, a las muestras de control, por ejemplo, células AML, que tienen una mutación activadora inicial y una mutación de resistencia FLT3 como se describe en este documento y que no se tratan con inhibidores se les asigna un valor de actividad proteica relativa del 100 %. La inhibición de FLT3 se logra cuando el valor de la actividad en relación con el control cambia al menos un 20 %, preferentemente el 50 %, más preferentemente 75-100 %, o más.

Como se usa en este documento, "anticuerpo" incluye referencia a una molécula de inmunoglobulina inmunológicamente reactiva con un antígeno particular, e incluye anticuerpos policlonales y monoclonales. El término también incluye formas genéticamente modificadas, tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados) y anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos). El término "anticuerpo" también incluye formas de unión a antígeno de anticuerpos, incluyendo fragmentos con capacidad de unión a antígeno (por ejemplo, Fab', $F(ab')_2$, Fab, Fv y rIgG. Véase también, *Pierce Catalog and Handbook*, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Véase también, por ejemplo, Kuby, J., *Immunology*, 3ª ed., W.H. Freeman & Co., Nueva York (1998). El término también se refiere a fragmentos Fv monocatenarios recombinantes (scFv). El término anticuerpo también incluye moléculas bivalentes o biespecíficas, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos.

Un anticuerpo inmunológicamente reactivo con un antígeno particular puede generarse mediante métodos recombinantes tales como la selección de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores similares, véase, por ejemplo, Huse et al., Science 246:1275-1281 (1989); Ward et al., Nature 341:544-546 (1989); y Vaughan et al., Nature Biotech. 14:309-314 (1996), o inmunizando a un animal con el antígeno o con el ADN que codifica el antígeno.

Típicamente, una inmunoglobulina tiene una cadena pesada y ligera. Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable, (las regiones también se conocen como "dominios"). Las regiones variables de cadena ligera y pesada contienen cuatro regiones "marco" interrumpidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR).

La expresión "anticuerpo completamente humano" se refiere a una inmunoglobulina que comprende regiones hipervariables humanas además del marco humano y regiones constantes. Tales anticuerpos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica.

Introducción

La presente divulgación proporciona métodos, reactivos y kits, para detectar células AML para usos de diagnóstico y pronóstico, y para tratar pacientes con AML. La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que los pacientes que tienen una mutación activadora de FLT3 inicial, por ejemplo, una mutación ITD, y tratados con AC220 pueden desarrollar una segunda mutación que conduce a resistencia a AC220 y por tanto, recaída. La mutación de resistencia ocurre típicamente en las posiciones F691, D835 o Y842. En algunos aspectos, la mutación de resistencia puede estar en la posición A848, N841 o D839. En algunas realizaciones, el paciente puede tener mutaciones de resistencia en dos de las posiciones F691, D835 o Y842. En algunas realizaciones, la mutación activadora de FLT3 inicial puede estar en Y842 (sin una mutación ITD) y la segunda mutación que conduce a resistencia está en F691 o D835. La detección de una mutación de resistencia puede utilizarse para identificar pacientes que pueden recaer, para monitorizar la progresión de AML en el paciente o la eficacia de un tratamiento de AML, y/o identificar pacientes que son candidatos para tratamiento con una alternativa terapéutica a AC220.

Métodos recombinantes generales

Esta invención se basa en parte en técnicas rutinarias en el campo de la genética recombinante, por ejemplo, métodos utilizados para detectar mutaciones en FLT3, o para preparar polipéptidos FLT3 y ácidos nucleicos. Los textos básicos que describen los métodos generales de uso en esta invención incluyen Sambrook y Russell, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3ª Ed, 2001); y Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, 1994-2009, incluyendo actualizaciones complementarias hasta abril de 2010).

Pacientes con AML

En la presente invención, la presencia de una mutación de resistencia se analiza en una muestra celular AML de un paciente que ha sido tratado con AC220. El paciente tiene una primera mutación activadora en un gen FLT3, por ejemplo, una mutación activadora por duplicación en tándem (ITD) en FLT3.

En la técnica se conoce mutaciones ITD. Esto ocurre típicamente dentro del dominio yuxtamembrana (véase, por ejemplo, Weisberg et al., Oncogene 29:5120-5134, 2010 y referencias citadas en este) y son la mutación de FLT3 más común en AML. Las mutaciones ITD son un indicador pronóstico asociado con el resultado adverso de la enfermedad (véase, por ejemplo, Thiede et al., Blood 99, 4326-4335, 2002). Las mutaciones FLT3-ITD están asociadas con la activación de AKT, el efector cadena abajo de PI3 quinasa. En casos típicos, las mutaciones de inserción ITD son de longitud variable, por ejemplo, pueden tener entre 3-400 pb (en marco) en la región de yuxtamembrana, pero típicamente hay una duplicación de los restos de aminoácidos Y591-Y597, que codifica las regiones de interruptor y cremallera de la yuxtamembrana de FLT3.

En algunas realizaciones, el paciente tiene una mutación inicial en Y842 y una mutación de resistencia en D835 o F691.

Otra mutación puntual se ha identificado en FLT3. También se han identificado mutaciones puntuales de activación adicionales en un tramo de 16 aminoácidos del dominio yuxtamembrana FLT3 y en el dominio de tirosina quinasa.

En la presente invención, el paciente con AML que tiene una mutación activadora de FLT3 inicial, por ejemplo, una mutación ITD, se trató con AC220. AC220 (diclorhidrato de N-(5-*terc*-butil-isoxazol-3-il)-N'-{4-[7-(2-morfolin-4-il-etoxi)imidazo[2,1-b][1,3]benzotiazol-2-il]fenil}urea; también conocido como diclorhidrato de quizartinib, Ambit Biosciences, CAS N.º 950769-58-1 (base libre) y CAS N.º 1132827-21-4 (2HCl)) es un inhibidor de molécula pequeña que se optimizó expresamente como un inhibidor de FLT3 para el tratamiento de AML (véase, por ejemplo, Chao et al., J. Med. Chem 52:7808-7816, 2009; Zarrinkar, et al., Blood 114:2984-2992, 2009). La presente invención proporciona métodos para identificar a un paciente que tiene una mutación de resistencia a fármacos AC220 en FLT3, donde la presencia de la mutación de resistencia es indicativa de una mayor probabilidad de recaída en comparación con un paciente tratado con AC220 que no tiene dicha mutación FLT3 y/o una mayor probabilidad de progresión de AML.

Detección de mutaciones

En la presente invención, la mutación de resistencia es una sustitución de aminoácidos que ocurre en F691, D835, o Y842, por ejemplo, D835Y, D835V, D835F o F691L. En algunas realizaciones, el paciente tiene una sustitución en más de una posición, por ejemplo, posición F691 y posición D835. En algunos aspectos, la mutación de resistencia es una sustitución de aminoácidos que ocurre en A848, N841 o D839. En algunos aspectos, la mutación de resistencia es A848P, N841K, F691I, D835Y, D839V, Y842C o Y842H.

En realizaciones típicas, los ácidos nucleicos de las células AML presentes en una muestra biológica del paciente se analizan para detectar la presencia de una mutación secuencial en F691, D835 o Y842. En algunos aspectos, la muestra se analiza para detectar la presencia de una mutación secuencial en A848, N841 o D839. Los métodos de evaluación de la secuencia de un gen particular son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen, entre otros, ensayos basados en hibridación y amplificación.

En aspectos típicos, los ensayos basados en amplificación se emplean en métodos para detectar mutaciones en un codón que codifica F691, D835 o Y842 de FLT3; o un codón que codifica A848L N841 o D839 de FLT3. En dicho ensayo, la secuencia de ácidos nucleicos de FLT3 diana se amplifica específicamente en una reacción de amplificación (por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa o PCR). Los ejemplos de ensayos basados en amplificación incluyen métodos de RT-PCR bien conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Ausubel *et al., supra).* Se conocen protocolos detallados para PCR de ADN y ARN, incluyendo métodos de amplificación cuantitativa *(*véase*,* por ejemplo, Innis et al. (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. N.Y.; y Ausubel y Russell & Sambrook, *ambos supra).* Las secuencias de ácidos nucleicos conocidas para FLT3 son suficientes para permitir que un experto seleccione rutinariamente cebadores para amplificar específicamente cualquier parte del gen para dirigirse a la región deseada de FLT3. Los cebadores adecuados para amplificación de secuencias específicas pueden diseñarse utilizando principios bien conocidos en la técnica *(*véase*,* por ejemplo, Dieffenfach y Dveksler, PCR Primer: A Laboratory Manual (1995)).

Otros métodos de amplificación adecuados incluyen, pero no se limitan a, reacción en cadena de ligasa (LCR) *(*véase*,* Wu y Wallace (1989) Genomics 4: 560, Landegren et al. (1988) Science 241:1077, y Barringer et al. (1990) Gene 89: 117), amplificación de transcripción (Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173), de aplicación de secuencia autosostenida (Guatelli et al. (1990) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87: 1874), PCR puntual, y PCR de adaptador a conector, etc.

En algunas realizaciones, la presencia de una mutación de resistencia en el alelo F691, D835 o Y842 puede determinarse convenientemente usando secuenciación de ADN, incluyendo secuenciación por métodos de síntesis, secuenciación por ligamiento y secuenciación por metodologías de expansión. Las tecnologías incluyen

pirosecuenciación, secuenciación de semiconductores iónicos, secuenciación de nanoporos, secuencia de molécula única, por ejemplo, tecnología de secuenciación de moléculas individuales en tiempo real u otros métodos de secuenciación. En algunas realizaciones, se emplea la secuenciación de molécula única (por ejemplo, la plataforma de secuenciación True Single Molecule Sequencing (tSMS™) (Helicos BioSciences Corporation); o la plataforma de secuenciación Real Time Single Molecule Sequencing (SMRT™) (Pacific Biosciences Incorporated).

En algunos aspectos, una mutación de resistencia en un codón que codifica F691, D835, o Y842; o que codifica A848, N841, o D839, se determina por hibridación de una muestra de ADN o ARN con una sonda que hibrida específicamente con una secuencia FLT3. Las sondas utilizadas en tales aplicaciones hibridan específicamente con la región de la secuencia FLT3 que alberga la mutación. Las sondas preferentes son suficientemente largas, por ejemplo, de aproximadamente 10, 15 o 20 nucleótidos a aproximadamente 50 o más nucleótidos, para hibridarse específicamente con el ácido o ácidos nucleicos diana en condiciones rigurosas.

Cualquiera de los numerosos ensayos basados en hibridación también pueden usarse para detectar una mutación de secuencia en un codón que codifica F691, D835, o Y842; o A848, N841, o D839 en ácidos nucleicos obtenidos de una muestra celular AML. En algunas realizaciones, el ADN o ARN obtenido de la muestra celular AML puede evaluarse utilizando técnicas conocidas como hibridación de oligonucleótidos específicos de alelo, que se basa en distinguir una posición mutante en un ácido nucleico de una posición normal en una secuencia de ácidos nucleicos usando un oligonucleótido que hibrida específicamente con la secuencia de ácidos nucleicos mutante o normal. Este método emplea típicamente oligonucleótidos cortos, por ejemplo, 15-20 nucleótidos, de longitud, que están diseñados para hibridarse diferencialmente con el alelo normal o mutante. La orientación para diseñar tales sondas está disponible en la técnica. La presencia de un alelo mutante se determina midiendo la cantidad de oligonucleótido específico de alelo que se hibrida con la muestra.

En otras realizaciones, la presencia de un ácido nucleico FLT3 normal o mutante puede detectarse utilizando métodos de amplificación o extensión de cebador específicos de alelo. Estas reacciones típicamente implican el uso de cebadores que están diseñados para dirigirse específicamente a un alelo normal o mutante a través de una falta de coincidencia en el extremo 3' de un cebador. La presencia de una falta de coincidencia afecta la capacidad de una polimerasa para extender un cebador cuando la polimerasa carece de actividad de corrección de errores. La cantidad de producto amplificado puede determinarse usando una sonda o midiendo directamente la cantidad de ADN presente en la reacción.

La detección de niveles de ácidos nucleicos en una muestra celular AML que tienen una mutación en un codón que codifica F691, D835, o Y842, o A848, N841 o D839 también puede realizarse utilizando un ensayo cuantitativo, como una actividad 5'-nucleasa (también denominado ensayo "TaqMan®"), por ejemplo, como se describe en las patentes de Estados Unidos N.os 5.210.015; 5.487.972; y 5.804.375; y Holland et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7276-7280. En dicho ensayo, Las sondas de detección marcadas que hibridan dentro de la región amplificada se añaden durante la reacción de amplificación. En algunas realizaciones, la sonda de hibridación puede ser una sonda específica de alelo que discrimina un alelo normal o mutante. Como alternativa, el método puede realizarse usando un cebador específico de alelo y una sonda marcada que se une al producto amplificado.

Otros métodos de detección incluyen análisis conformacional monocatenario, análisis de fusión de amplicones, o métodos basados en espectrometría de masas. La espectrometría de masas aprovecha la masa única de cada uno de los cuatro nucleótidos del ADN. El alelo puede ser genotipado inequívocamente por espectrometría de masas midiendo las diferencias en la masa de ácidos nucleicos que tienen alelos FLT3 alternativos. La tecnología de espectrometría de masas MALDI-TOF (ionización por desorción láser asistida por matriz - Tiempo de vuelo) es preferente para determinaciones extremadamente precisas de masa molecular, como mutaciones de un solo nucleótido. Los métodos precedentes basados en espectrometría de masas de ensayos de mutación de un solo nucleótido incluyen ensayos de extensión del cebador, que también pueden utilizarse en combinación con otros enfoques, como formatos tradicionales basados en gel y micromatrices.

Detección de secuencias de polipéptidos que comprenden una mutación de resistencia asociada con el tratamiento con AC220

Las mutaciones de FLT3 también pueden detectarse por detección de proteína mutante. Por ejemplo, se puede usar detección de proteínas FLT3 que tienen una mutación en F691, D835 o Y842 con fines de diagnóstico o en ensayos de detección. En algunas realizaciones, la presencia de un polipéptido FLT3 mutante en una muestra se determina convenientemente mediante ensayos inmunológicos con reactivos, por ejemplo, un anticuerpo, que detecta específicamente mutaciones mutantes de FLT3. La detección y/o cuantificación de proteínas FLT3 que tienen mutaciones en F691, D835 o Y842 pueden lograrse usando cualquiera de varios ensayos de unión inmunológica bien reconocidos. Una descripción general de la tecnología aplicable se puede encontrar en Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (1988) y Harlow y Lane, Using Antibodies (1999). Véanse también otros recursos incluidos en Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology, volumen 37 (Asai, ed. 1993); Basic and Clinical Immunology (Stites y Terr, eds., 7ª ed. 1991, y Current Protocols in Immunology (Coligan, et al. Eds, John C. Wiley, 1999- presente). Los ensayos de unión inmunológica pueden usar anticuerpos policlonales o monoclonales. En algunas realizaciones, pueden emplearse anticuerpos que detecten específicamente moléculas mutantes de FLT3.

Los ensayos utilizados comúnmente incluyen ensayos no competitivos (por ejemplo, ensayos de tipo sándwich) y ensayos competitivos. Los formatos de ensayo comúnmente utilizados incluyen inmunotransferencias, que se utilizan para detectar y cuantificar la presencia de proteínas en una muestra. Otros formatos de ensayo incluyen inmunoensayos de liposomas (LIA), que usan liposomas diseñados para unir moléculas específicas (por ejemplo, anticuerpos) y liberar reactivos o marcadores encapsulados, que luego se detectan según técnicas estándar (véase Monroe et al., Amer. Clin. Prod. Rev. 5:34-41 (1986)).

FLT3, o un fragmento del mismo, por ejemplo, la parte del péptido que contiene la mutación de secuencia activadora, puede usarse para producir anticuerpos específicamente reactivos con FLT3 usando técnicas conocidas en la técnica *(véase,* por ejemplo, Coligan; Harlow y Lane, ambos *supra).* Dichas técnicas incluyen preparación de anticuerpos mediante selección de anticuerpos de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores similares, así como preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales inmunizando conejos o ratones (véase, por ejemplo, Huse et al., Science 246:1275-1281 (1989); Ward et al., Nature 341:544-546 (1989)). Dichos anticuerpos pueden usarse para aplicaciones de diagnóstico o pronóstico.

En algunos aspectos, un anticuerpo FLT3 puede usarse para aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, en algunos aspectos, dicho anticuerpo puede usarse para reducir o eliminar una función biológica de un FLT3 que tiene una mutación activadora en F691, D835 o Y842. Típicamente, los anticuerpos para uso terapéutico son anticuerpos humanizados o humanos. Tales anticuerpos pueden obtenerse usando técnicas conocidas.

Como aprecia un experto en la materia, la actividad FLT3 puede detectarse para evaluar los niveles de expresión de proteínas FLT3 que tienen una mutación activadora en F691, D835, o Y842 o para identificar inhibidores de actividad. La actividad puede evaluarse utilizando una variedad de ensayos *in vitro* e *in vivo*, incluyendo actividad de proteína quinasa. En algunos aspectos, la actividad FLT3 puede evaluarse utilizando puntos finales adicionales, como los asociados con la actividad de PI3 quinasa, o transformación.

Usos en diagnóstico/pronóstico

Las secuencias de ácidos nucleicos y polipéptiddos de FLT3 pueden evaluarse para diagnóstico o pronóstico de AML en un paciente tratado con ACC que tiene una mutación activadora de FLT 3 inicial, por ejemplo, una mutación ITD. Por ejemplo, como se describió anteriormente, la secuencia de FLT3 puede determinarse en una muestra celular AML de un paciente, en donde una mutación en un codón que codifica F691, D835, o Y842 indica la presencia o la probabilidad de que el paciente tenga una recaída. En algunos aspectos, el paciente tratado con ACC tiene una mutación activadora de FLT3 inicial en Y842. Como un ejemplo adicional, la secuencia de FLT3 en una muestra celular AML del paciente puede determinarse en donde una mutación en un codón que codifica F691 o D835 indica la presencia o la probabilidad de que el paciente tenga una recaída.

Los métodos de esta invención pueden usarse para determinar el curso óptimo de tratamiento en un paciente con cáncer. Por ejemplo, la presencia de una mutación de resistencia en un codón que codifica F691, D835, o Y842, o en un codón que codifica A848, N841, o D839, puede indicar que una terapia alternativa a AC220, como una terapia dirigida a una vía cadena abajo regulada por FLT3 será beneficiosa para esos pacientes. Además, una correlación puede establecerse fácilmente entre el número de células AML que tienen la mutación de resistencia y la eficacia relativa de AC220 al correlacionar el número de células AML que tienen la mutación con la eficacia del tratamiento.

Dichos métodos pueden usarse junto con métodos de diagnóstico adicionales, por ejemplo, detección de otros indicadores de recaída de AML.

Cualquier muestra biológica de células AML puede evaluarse para determinar la presencia de una mutación de resistencia en F691, D835, o Y842, o en A848, N841 o D839. Típicamente, se evalúa una muestra de sangre o médula ósea, pero una muestra obtenida de un sitio metastásico, por ejemplo, de médula espinal o cerebro, también puede emplearse para analizar el FLT en las células AML para determinar si hay una segunda mutación activadora.

En algunos aspectos, los métodos de la divulgación implican registrar la presencia o ausencia de una mutación de resistencia en F691, D835, o Y842, o en A848, N841, o D839, en células AML en pacientes que han sido tratados con AC220. Esta información puede almacenarse en un formato legible por ordenador. Dicho sistema informático normalmente comprende los subsistemas principales, tales como un procesador central, una memoria de sistema (generalmente RAM), un controlador de entrada/salida (E/S), un dispositivo externo tal como una pantalla de visualización a través de un adaptador de pantalla, puertos serie, un teclado, una unidad de disco fija mediante una interfaz de almacenamiento y similares. Se pueden conectar muchos otros dispositivos, tal como una interfaz de red conectada a través de un puerto serie.

El sistema informático también puede unirse a una red, que comprenda una pluralidad de dispositivos informáticos vinculados a través de un enlace de datos, tal como un cable Ethernet (coaxial o 10BaseT), línea telefónica, línea ISDN, red inalámbrica, fibra óptica u otro medio de transmisión de señales adecuado, mediante lo cual al menos un dispositivo de red (por ejemplo, ordenador, conjunto de discos, etc.) comprende un patrón de dominios magnéticos

(por ejemplo, disco magnético) y/o dominios de carga (por ejemplo, una matriz de celdas DRAM) que componen un patrón de bits que codifican datos adquiridos a partir de un ensayo de la invención.

Inhibidores o moduladores de FLT3

En otro aspecto, esta divulgación incluye métodos para inhibir la proliferación de células AML de pacientes tratados con ACC220 que tienen una mutación activadora inicial, por ejemplo, mutaciones ITD y una segunda mutación FLT3 que conduce a resistencia (una sustitución en la posición F691, D835 o Y842) donde el método comprende administrar un inhibidor adicional de FLT3 al paciente que tiene la mutación de resistencia. Los inhibidores pueden incluir inhibidores de efectores FLT3 cadena abajo, por ejemplo, inhibidores de PI3 quinasa u otros agentes. En algunos aspectos, el inhibidor puede ser un inhibidor alternativo de tirosina quinasa, por ejemplo, PLX3397 (Plexxikon Inc, Berkeley, CA), ponatinib (Ariad Pharmaceuticals), G749 (Genosco, Cambridge, MA), o crenolanib (AROG Pharmaceuticals). En algunos aspectos, por ejemplo, cuando la mutación está en F691, el inhibidor puede ser ponatinib.

Otros inhibidores incluyen anticuerpos, péptidos, ácidos nucleicos, *por ejemplo,* ARNsi, y similares. Como se usa en este documento, un inhibidor de FLT3 puede ser una molécula que modula la expresión de ácido nucleico de FLT3 y/o la actividad de proteína FLT3, o en algunos aspectos, rutas cadena abajo reguladas por FLT3. En algunos aspectos, un inhibidor de FLT3 es una molécula inhibitoria de ARN que se dirige a secuencias de ácidos nucleicos de *FLT3*.

La capacidad de inhibir FLT3 puede evaluarse utilizando ensayos apropiados, por ejemplo, por ensayo de actividad, por ejemplo, actividad de quinasa y comparando la cantidad de actividad con los controles no tratados con el inhibidor.

En otro aspecto, los niveles de expresión de ARNm y/o proteína pueden medirse para evaluar los efectos de un compuesto de ensayo en los niveles de expresión de FLT3. Una célula hospedadora que expresa FLT3 se pone en contacto con un compuesto de ensayo durante un tiempo suficiente para efectuar cualquier interacción, y luego se mide el nivel de ARNm o proteína. El periodo de tiempo para efectuar tales interacciones puede determinarse empíricamente, tal como ejecutando un curso de tiempo y midiendo el nivel de expresión en función del tiempo. La cantidad de expresión puede medirse usando cualquier método adecuado conocido por los expertos en la materia.

La cantidad de expresión se compara luego con la cantidad de expresión en ausencia del compuesto de ensayo. Una célula sustancialmente idéntica puede obtenerse a partir de las mismas células a partir de las cuales se preparó la célula recombinante pero que no se había modificado mediante introducción de ADN heterólogo. Una diferencia en la cantidad de expresión indica que el compuesto de ensayo ha alterado de alguna manera los niveles de FLT3.

En algunos ensayos para identificar inhibidores de FLT3, las muestras que se tratan con un inhibidor potencial se comparan con las muestras de control para determinar el grado de modulación. A las muestras de control sin la mutación y sin tratar con inhibidores candidatos se les asigna un valor de actividad relativa de 100. La inhibición de FLT3 se logra cuando el valor de la actividad en relación con el control es de aproximadamente el 80 %, opcionalmente 50 %, opcionalmente 25-0 %.

Los inhibidores de FLT3 pueden ser cualquier compuesto químico pequeño o una entidad biológica, por ejemplo, una macromolécula como una proteína, azúcar, ácido nucleico o lípido.

En algunos aspectos, los inhibidores de FLT3 que se evalúan para tratar la AML refractaria al AC220 son moléculas pequeñas que tienen un peso molecular inferior a 1.500 daltons y, en algunos casos, inferior a 1.000, 800, 600, 500 o 400 daltons. El tamaño relativamente pequeño de los agentes puede ser deseable porque las moléculas más pequeñas tienen una mayor probabilidad de tener propiedades fisicoquímicas compatibles con buenas características farmacocinéticas, incluyendo la absorción oral que los agentes con mayor peso molecular. Por ejemplo, Lipinski *et al.* describieron agentes con menos probabilidades de tener éxito como fármacos basados en permeabilidad y solubilidad como sigue: tener más de 5 dadores de enlaces H (expresados como la suma de OH y NH); tener un peso molecular superior a 500; tener un LogP superior a 5 (o MLogP superior a 4,15); y/o tener más de 10 aceptores de enlaces H (expresados como la suma de N y O). Véase, por ejemplo, Lipinski et al. Adv Drug Delivery Res 23:3-25 (1997). Las clases compuestas que son sustratos para transportadores biológicos son típicamente excepciones a la regla.

En algunos aspectos, los inhibidores de ácido nucleico pueden usarse para inhibir FLT3 en un paciente que tiene células AML con una mutación activadora de FLT3 inicial, por ejemplo, una mutación ITD, que se identifica como con una segunda mutación en un codón que codifica D835Y, F691 o Y842. Por ejemplo, puede usarse una secuencia de nucleótidos tal como un ARNsi y/o oligonucleótidos antisentido para bloquear la transcripción o traducción del ARNm de FLT3, ya sea induciendo la degradación del ARNm con un ARNsi o enmascarando el ARNm con un ácido nucleico antisentido.

Un "ARNsi" o "ARNi" se refiere a un ácido nucleico que forma un ARN bicatenario, ARN bicatenario que tiene la capacidad de reducir o inhibir la expresión de un gen o gen diana cuando el ARNsi expresado en la misma célula que el gen o gen diana. "ARNsi" se refiere por tanto al ARN bicatenario formado por las hebras complementarias. Las

partes complementarias del ARNsi que se hibridan para formar la molécula bicatenaria tienen típicamente una identidad sustancial o completa. La secuencia del ARNsi puede corresponder al gen diana de longitud completa, o una subsecuencia del mismo. Típicamente, el ARNsi tiene al menos aproximadamente 15-50 nucleótidos de longitud (por ejemplo, cada secuencia complementaria del ARNsi bicatenario tiene 15-50 nucleótidos de longitud, y el ARNsi bicatenario tiene una longitud de aproximadamente 15-50 pares de bases, preferentemente aproximadamente nucleótidos de 20-30 bases, preferentemente una longitud de aproximadamente 20-25 nucleótidos, por ejemplo, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleótidos de longitud.

"Silenciamiento" o "regulación negativa" se refiere a una disminución detectable de la transcripción y/o traducción de una secuencia diana, es decir, la secuencia dirigida por el ARNsi, o una disminución en la cantidad o actividad de la secuencia o proteína diana en comparación con el nivel normal que se detecta en ausencia del ARN de interferencia u otra secuencia de ácidos nucleicos. Una disminución detectable puede ser tan pequeña como 5 % o 10 %, o tan grande como 80 %, 90 % o 100 %. Más normalmente, una disminución detectable varía del 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o 70 %.

Una molécula de ADN que transcribe ARNds o ARNsi (por ejemplo, como un dúplex horquillado) también proporciona ARNi. Por ejemplo, pueden usarse terapéuticamente oligonucleótidos de ARNds que hibridan específicamente a una secuencia de ácidos nucleicos de *FLT3*.

Los oligonucleótidos antisentido que se hibridan específicamente con secuencias de ácidos nucleicos de FLT3 también pueden usarse para silenciar la transcripción y/o traducción de FLT3 y tratar así la AML. Los métodos para diseñar ácidos nucleicos antisentido (moléculas de ADN o ARN) se conocen biens en la técnica. Los ácidos nucleicos antisentido pueden comprender nucleótidos naturales o nucleótidos modificados tales como, por ejemplo, nucleótidos modificados en la cadena principal, fosforotioato, metilfosfonato, y azúcar-fosfato anomérico.

La capacidad de un inhibidor para modular la expresión de FLT3 puede evaluarse utilizando métodos conocidos. Dichos métodos generalmente implican realizar ensayos basados en células en donde los compuestos de ensayo se ponen en contacto con una o más células que expresan FLT3 y luego detectan una disminución en la expresión (transcripción o producto de traducción).

Tratamiento y administración de composiciones farmacéuticas

Los inhibidores de FLT3 pueden administrarse a un paciente para el tratamiento de una AML que tiene una mutación FLT3 activadora inicial y una mutación de resistencia en la posición F691, D835, o Y842; y es refractario al tratamiento con AC220. Los inhibidores se administran de cualquier manera adecuada, opcionalmente con vehículos farmacéuticamente aceptables. Se conocen protocolos para administración de inhibidores y pueden optimizarse aún más para pacientes con AML según los principios conocidos en las técnicas farmacológicas (véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª Edición, Filadelfia, PA. Lippincott Williams y Wilkins, 2005).

Un inhibidor de FLT3 puede administrarse a un paciente a una dosis terapéuticamente eficaz para prevenir, tratar o controlar la AML. Los compuestos se administran a un paciente en una cantidad suficiente para provocar una respuesta terapéutica eficaz en el paciente. Una respuesta terapéutica eficaz es una respuesta que al menos detiene o ralentiza parcialmente los síntomas o complicaciones de la AML. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "dosis terapéuticamente eficaz". La dosis estará determinada por la eficacia del inhibidor de FLT3 particular empleado y la condición del sujeto, así como el peso corporal o el área superficial de la zona a tratar. El tamaño de la dosis se determinará también según la existencia, naturaleza y extensión de cualquier efecto adverso que acompañe a la administración de un compuesto particular en un sujeto particular.

Los inhibidores de ácidos nucleicos de FLT3, por ejemplo, ARNsi, pueden administrarse al sujeto utilizando cualquier medio conocido en la técnica, incluso por inyección del ARNsi. Además, los inhibidores de polinucleótidos pueden administrarse usando un vector de expresión recombinante (por ejemplo, un vector viral basado en un adenovirus, un virus del herpes, un virus vaccinia, o un retrovirus;) o un sistema de dispersión coloidal (por ejemplo, liposomas).

Un tratamiento que se dirige a FLT3 se puede administrar con otras terapias de AML, simultáneamente o antes o después del tratamiento con otro agente terapéutico de AML.

Kits para uso en aplicaciones de diagnóstico y/o pronóstico

La divulgación también proporciona kits para aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas. Para aplicaciones de diagnóstico/pronóstico, dichos kits pueden incluir cualquiera o todos los siguientes: reactivos de ensayo, tampones, sondas de FLT3, cebadores, anticuerpos, o similares que pueden usarse para identificar la presencia de una mutación en el codón para D835, F691 o Y842. En algunos aspectos, las sondas, cebadores u otros reactivos pueden detectar una mutación D835Y, D835V o D835F. En algunos aspectos, las sondas o cebadores pueden detectar una mutación F691L. En algunos aspectos, las sondas, los cebadores u otros reactivos pueden detectar una mutación en el codón para A848, N841 o D839. En algunos aspectos, las sondas, los cebadores u otros reactivos pueden detectar una mutación A848P, N841K, F691I, D839V, Y842C o Y842H.

Además, los kits pueden incluir materiales de instrucción que contienen instrucciones (es decir, protocolos) para la práctica de los métodos de esta invención. Aunque los materiales de instrucciones generalmente comprenden materiales escritos o impresos, no se limitan a ellos. Esta divulgación contempla cualquier medio capaz de almacenar tales instrucciones y comunicarlas a un usuario final. Dichos medios incluyen, pero no se limitan a. medios de almacenamiento electrónico (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (por ejemplo, CD ROM), y similares. Dichos medios pueden incluir direcciones de sitios de Internet que proporcionan dichos materiales de instrucciones.

Los siguientes ejemplos se proporcionan solo como ilustración y no como limitación. Los expertos en la materia reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que podrían cambiarse o modificarse para producir resultados esencialmente similares.

Ejemplos

En estos ejemplos, se busca, en parte, utilizar la actividad clínica de AC220 como una herramienta para definir adecuadamente FLT3-ITD como una mutación "conductora" o "pasajera" en la LMA humana. Usando un ensayo de mutagénesis de saturación *in vitro* validado previamente[14], se identifican mutaciones que proporcionan resistencia a AC220 en cuatro estos en FLT3-ITD (Fig. 1a). Estas mutaciones, cuando se recrean y se introducen en células Ba/F3, proporcionan independencia del factor de crecimiento, sugiriendo retención de actividad de quinasa patológicamente activada. Las mutaciones en tres de estas posiciones de aminoácidos produjeron isoformas de FLT3-ITD con altos grados de resistencia a AC220 *in vitro* (Fig. 1b). Estos restos consisten en el resto "guardián" (F691) y dos restos dentro del bucle de activación (D835, Y842). Aunque las mutaciones E608K se aislaron repetidamente en nuestra identificación, por razones no claras, esta sustitución no pudo conferir resistencia significativa cuando se reintrodujo en células Ba/F3 y, por tanto, no se caracterizó más. Mutaciones en F691, D835 e Y842 demostraron una clara evidencia de resistencia bioquímica a AC220 en relación con FLT3-ITD en un ensayo basado en células (Fig. 1c).

A continuación, se evaluó la presencia de mutaciones del dominio de quinasa FLT3-ITD resistente a fármacos en muestras pretratadas y de recaída obtenidas de nueve pacientes con AML de FLT3-ITD+ que inicialmente lograron un aclaramiento morfológico de los blastos de la médula ósea a menos del 5 % con AC220 en la parte exploratoria del estudio en fase II en curso, pero posteriormente recayeron a pesar de continuar con la terapia. En todos los casos, la subclonación y secuenciación de alelos FLT3-ITD individuales como se describió previamente[15] reveló la presencia de mutaciones producidas en uno o más de los tres restos críticos identificados en la identificación *in vitro* en el momento de la recaída (Tabla 1). Ninguna de estas mutaciones se detectó en las muestras de pretratamiento de estos pacientes (datos no mostrados). La mutación del bucle de activación D835Y se detectó en cuatro de estos nueve casos, D835V en dos, y F691L de mutación guardián se identificó en tres. Una muestra de paciente (1011-007) parecía haber desarrollado resistencia policlonal, con mutaciones F691L y D835V detectadas en secuencias FLT3-ITD separadas. Además, una nueva mutación, D835F, se identificó en un solo paciente. Esta mutación proporciona resistencia *in vitro* a AC220 y resistencia cruzada a sorafenib (Figura 3), y probablemente no se recuperó en la identificación de mutagénesis de saturación porque representa una sustitución de dos nucleótidos. Colectivamente, estos hallazgos sugieren que la respuesta clínica y la recaída en cada uno de estos nueve pacientes involucraron mecánicamente la actividad de quinasa FLT3, y además identificaron los alelos FLT3-ITD como mutaciones "conductoras" y dianas terapéuticas varias en la LMA humana.

También se evaluaron dos pacientes adicionales que tuvieron una respuesta profunda a AC220 y tenían mutaciones ITD iniciales. Estos dos pacientes también tenían mutaciones que proporcionaban resistencia en el momento de la recaída. Uno de los pacientes tenía una mutación D835V y el otro paciente tenía una mutación D835Y.

Para evaluar con mayor precisión las mutaciones que proporcionan resistencia en la recaída, se usa una plataforma de secuenciación en tiempo real de molécula única (SMRT™; Pacific Biosciences, Menlo Park, CA) descrita recientemente, que puede proporcionar lecturas de longitud suficiente para permitir la interrogación focalizada del dominio de quinasa de los alelos FLT3-ITD[16'17]. Con este ensayo, se obtuvieron de manera confiable cientos de lecturas (rango 380-3532) de más de 1 kb. La atención se centró en los restos de aminoácido identificados en la identificación *in vitro* de mutaciones que proporcionan resistencia a AC220. El análisis de una muestra de control normal reveló la presencia de sustituciones de bases en estos restos a una frecuencia inferior al dos por ciento. Los análisis de las muestras de pretratamiento y recaída de cuatro pacientes con AML confirmaron la presencia de mutaciones del dominio de quinasa FLT3-ITD que proporcionan resistencia en la recaída (Tabla 2). Según los resultados descritos anteriormente, no se detectaron mutaciones en E608 e Y842. La frecuencia de representación de la mutación en la recaída varió de 3,6 % (D835V en el paciente 1009-003) a 55,7 % (D835Y en el paciente 1011-007). La presencia de resistencia policlonal se confirmó en el paciente 1011-007, y también se observó en un segundo de estos cuatro casos (1009-003). La evolución de la resistencia policlonal debido a mutaciones en el dominio de quinasa FLT3-ITD sugiere además una dependencia central de la señalización de FLT3-ITD en el clon leucémico en un subconjunto de pacientes con AML.

La recaída ocurrió relativamente rápido en algunos pacientes; no obstante, la mayoría de las mutaciones no fueron detectables de manera convincente antes del tratamiento cuando se evaluaron mediante secuenciación SMRT™.

Las cinco sustituciones que proporcionan un alto grado de resistencia a AC220 *in vitro* se evaluaron para sensibilidad al sorafenib. Aunque se ha informado previamente que FLT3-ITD/D835V retiene la sensibilidad al sorafenib *in vitro*[18], se descubrió que todas las mutaciones resistentes a AC220 proporcionar una resistencia cruzada sustancial a sorafenib en el crecimiento basado en células (Figura 4A) y ensayos bioquímicos (Figura 4B). De hecho, El grado de resistencia al sorafenib de estas mutaciones en relación con FLT3-ITD solo estuvo en general de acuerdo con el grado de resistencia conferido a AC220 (Figura 4C).

El modelado de las interacciones FLT3-AC220 se realizó para obtener información sobre las secuelas estructurales de las mutaciones que proporcionan resistencia a AC220 identificadas en nuestros estudios (Fig. 2a). La estructura cristalina del dominio de quinasa FLT3 se determinó previamente en una conformación[19] inactiva que se parece mucho a las conformaciones inactivas de c-ABL[20], c-KIT[21], y tirosina quinasa receptor de insulina[22]. En esta estructura cristalina, el bucle de activación se vuelve a plegar sobre la hendidura de unión a ATP (conformación de bucle) y bloquea la entrada de ATP y la carga del sustrato. Además, el motivo Asp-Phe-Gly (DFG) adopta la conformación DFG-exterior que no es capaz de coordinar la unión de magnesio, hierro y ATP. La activación de FLT3 requeriría rodear el motivo DFG y desplegar el bucle de activación, como se observa en c-Abl[23] y quinasa receptora de insulina[24]. El estudio de acoplamiento molecular sugirió fuertemente que AC220 se dirige específicamente a DFG-exterior, conformación de FLT3 inactiva, y proporciona una base estructural potencial para mutaciones que proporcionan resistencia a AC220 en D835, Y842 y F691. En la estructura compleja AC220-FLT3 acoplada, un resto de anillo de fenol AC220 forma un contacto de apilamiento *π-π* en forma de T cercano con F830 en el motivo DFG (Fig. 2b). Esta interacción no sería posible en DFG-interior, conformación activa de la quinasa. El resto guardián F691 forma un contacto de apilamiento π-π paralelo con el resto benzo-imidazoltiazol AC220, estabilizando aún más el complejo. Las sustituciones en F691 con restos no aromáticos como leucina disminuirán probablemente la afinidad de unión entre AC220 y FLT3. Los restos D835 e Y842 estabilizan el circuito de activación plegado formando enlaces de hidrógeno con una cadena principal de amida y D811, respectivamente (Fig. 2c). Se predice que las mutaciones en cualquiera de los restos desestabilizan el bucle de activación plegado y facilitan la transición de conformación del estado inactivo al estado activo. Este efecto probablemente dificultará la función inhibitoria de AC220, ya que el medicamento se dirige específicamente a la conformación inactiva de la quinasa. La capacidad de retener la actividad inhibitoria contra sustituciones del bucle de activación en las posiciones D835 e Y842 requerirá probablemente un inhibidor de la quinasa FLT3 que sea capaz de unirse efectivamente a la conformación activa, DFG-interior de la quinasa.

Sustituciones en restos "guardián" (BCR-ABL/T315I[15], EGFR/T790M[25], KIT/T670I[26], EML4- ALK/I1196M[27]) como FLT3-ITD/F691 identificado aquí, son causas bien documentadas de resistencia a inhibidores de quinasas. Los análogos de la mutación del bucle de activación FLT3-ITD/D835V han demostrado ser problemáticos para varios inhibidores de la quinasa: KIT/D816V, una mutación activadora que está altamente asociada con la mastocitosis sistémica y ocasionalmente con tumores del estroma gastrointestinal y AML, confiere un alto grado de resistencia al imatinib y otros inhibidores de KIT[28]. Nuestros datos, aunque derivados de una pequeña cohorte de pacientes que deberán validarse en estudios más amplios, sugieren que las sustituciones en F691 y D835 en FLT3-ITD plantearán barreras sustanciales para el control de la enfermedad a largo plazo en pacientes con AML tratados con AC220 o sorafenib. Las mutaciones del guardián y del bucle de activación en FLT3-ITD identificadas en este documento representan dianas de alto valor para nuevas estrategias de desarrollo de inhibidores de FLT3.

Los datos convincentes sugieren que las mutaciones activadoras de FLT3 se adquieren relativamente tarde durante la leucemogénesis en un clon preestablecido[1,4,5], y solas son insuficientes para causar leucemia aguda en modelos preclínicos[2,3]. La evidencia reciente sugiere que la heterogeneidad molecular de las leucemias individuales puede ser sustancial y puede ocurrir tanto en la moda ramificada como en la lineal a principios de la leucemogénesis, incluso a nivel de células iniciadoras de leucemia o "células madre leucémicas"[29,30]. A la vista de estas observaciones y la experiencia clínica acumulada con inhibidores previos de FLT3, es inesperado que la remisión completa en AML FLT3-ITD+ pueda lograrse comúnmente mediante la inhibición de FLT3. Sin embargo, nuestra demostración de que la resistencia adquirida a la terapia con inhibidores de FLT3 clínicamente eficaces se asocia frecuentemente con la restauración de la actividad de FLT3-ITD mediante la adquisición de mutaciones del dominio de quinasa resistente a fármacos en FLT3-ITD valida FLT3-ITD como una diana terapéutica en la LMA humana. Colectivamente, nuestros datos son consistentes con la adquisición de FLT3-ITD y mutaciones del dominio quinasa FLT3 resistente a fármacos en una población celular iniciadora de leucemia, aunque se necesitan estudios formales de trasplante en ratones para abordar definitivamente este problema.

Nuestros hallazgos sugieren que FLT3-ITD es capaz de conferir un estado de "adicción al oncogén", De modo que las vías de supervivencia celular asociadas con células normales o precancerosas pueden ser secuestradas, llevando a un estado de exquisita dependencia de moléculas de señalización clave que pueden aprovecharse con terapias dirigidas. Este trabajo apoya la exploración de estrategias terapéuticas dirigidas a mutaciones activadoras seleccionadas en otras moléculas de señalización que se cree que se adquieren relativamente tarde en la evolución de la enfermedad, tales como mutaciones en *JAK2*[31] o *RAS,* con agentes capaces de lograr una inhibición diana clínicamente significativa. Se requerirán más estudios para identificar los mecanismos de resistencia a fármacos que puedan eludir la dependencia del FLT3 activado mediante la activación de las vías cadena abajo, como se ha descrito con otros TKI[32,33]. Para ese fin, estudios traduccionales que emplean análisis moleculares detallados de la variación genética en muestras primarias, obtenidos de pacientes con AML tratados con terapias dirigidas clínicamente eficaces,

prometen informar más sobre los mecanismos de resistencia a fármacos, estrategias para el desarrollo futuro de fármacos y modelos de evolución de la enfermedad.

Experimentos adicionales usando la metodología descrita en este documento identificaron mutaciones de resistencia adicionales en la posición D835 y F691 y mutaciones en las posiciones A848, N841 y D839. Estas mutaciones de resistencia incluyen A848P, N841K, F691I, D835Y y D839V.

MATERIALES Y MÉTODOS

Constructos de ADN, Mutagénesis e Identificación de resistencia. ADNc de FLT3-ITD clonado de la línea celular MV4; línea celular 11 (ITD: restos 591-601) en el sitio *Hpal* del vector retroviral puro pMSCV (Clontech) fue el amable regalo de Ambit Biosciences y se utilizó como molde para mutagénesis. Se usó una estrategia modificada para mutagénesis aleatoria previamente descrita por otros[14]. Brevemente, se usó 1 µg de MSCV FLT3-ITD para transformar la cepa XL-1 Roja de *Escherichia coli* deficiente en reparación de ADN (Stratagene) y se sembró en 20 placas bacterianas de ampicilina-agar. Después de incubación durante 36 h, las colonias se recogieron por raspado, y el ADN plasmídico se purificó usando un kit plasmídico MAXI (Qiagen). Posteriormente, la reserva plasmídicaestade FLT3 ITD mutagenizado y el plásmido de empaquetamiento Ecopack se cotransfectaron en células 293T cultivadas en DMEM (Invitrogen) que contenía FCS al 10 % (Omega Scientific) usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) según el protocolo del fabricante. Se recogieron sobrenadantes virales a las 48 h, se purificaron usando un filtro de vacío de 0,44 µm, y se usaron para infectar células Ba/F3 a una dilución 1:100 a 1:300 de sobrenadante viral a RPMI 1640 (Invitrogen) fresco suplementado con FCS al 10 %. Como alternativa, se tomaron alícuotas del sobrenadante viral y se congelaron. El sobrenadante descongelado se usó para infectar células Ba/F3 a una dilución 1:50. El sobrenadante viral se diluyó para minimizar la multiplicidad de infección. Para infección, 1-2 x 10^6 células Ba/F3 se resuspendieron en 3 ml de la reserva viral diluida suplementada con IL-3 de ratón recombinante (Invitrogen) y 4 µg/ml de polybren, sembradas en cada pocillo de una placa de cultivo tisular de 12 pocillos y se centrifugó a 1.500 RCF en una centrífuga Beckman Coulter Allegra 6KR con un vehículo de microplacas durante 90 minutos a 34 °C. Las células centrifugadas se transfirieron posteriormente a una incubadora a 37 °C durante la noche. Las células Ba/F3 infectadas se lavaron dos veces con medio para eliminar IL-3 y se colocaron en placas en 3 ml de medio RPMI 1640 a 5 x 10^5 células por pocillo de una placa de seis pocillos complementadto con FCS al 20 % y Bacto-agar al 1,2 % con AC220 20 nM (obsequio amable de Ambit Biosciences). Después de 10-21 días, las colonias visibles se extrajeron del agar y se expandieron en presencia de fármaco (AC220 20 nM).

Secuenciación y alineamientos. Las colonias expandidas se cosecharon 7-14 días después del aislamiento del agar, y el ADN genómico completo se aisló usando el kit QIAamp (Qiagen). El dominio de quinasa FLT3 se amplificó por PCR a partir de ADN genómico completo usando ADN polimerasa TopTaq (Qiagen). Los cebadores TK1F (5'-TGCTGTGCATACAATTCCCTTGGC- 3') y TK2R (5'-TCTCTGCTGAAAGGTCGCCTGTTT-3') se usaron para la amplificación del dominio de quinasa y la secuenciación bidireccional posterior se realizó usando estos cebadores además de TK1R (5'-AGTCCTCCTCTTCTTC- CAGCCTTT-3') y TK2F (5' GAGAGGCACTCATGTCAGAACTCA-3'). Los alineamientos con la secuencia FLT3-ITD de tipo silvestre se realizaron usando el software Sequencher (Gene Codes Corporation).

Generación de mutantes. Los mutantes aislados en la identificación se manipularon en pMSCV puro FLT3-ITD usando el kit de mutagénesis QuikChange (Stratagene). En todos los casos, los mutantes puntuales individuales se confirmaron por análisis de secuencia.

Ensayo de viabilidad celular. Se generaron líneas estables de Ba/F3 usando espinfección retroviral con el plásmido mutado apropiado como se describió anteriormente, con la excepción de la exclusión de polybren. A las 48 h post-infección, se añadió puromicina a las células infectadas a una concentración de 4 µg/ml. Las células se seleccionaron en presencia de puromicina durante 7-10 días y posteriormente IL-3 se lavó dos veces de las células con medio y las células se seleccionaron en medio RPMI 1640 + FCS al 10 % en ausencia de IL-3. Las células Ba/F3 en crecimiento exponencial (5 x 10^4) se colocaron en cada pocillo de una placa de 24 pocillos con 1 ml de RPMI 1 640 + FCS al 10 % que contenía la concentración apropiada de fármaco como se indica por triplicado. Se permitió que las células se expandieran durante 2 días y se contaron usando un analizador de viabilidad celular automatizado Vi-cell XR (Beckman Coulter). El número medio de células viables a concentraciones variables de fármaco se normalizó al número medio de células viables en la muestra sin fármaco para cada mutante. Las barras de error representan la desviación estándar. Los valores numéricos de CI_{50} se generaron usando análisis de regresión no lineal de mejor ajuste usando el software Prism 5 (GraphPad).

Inmunotransferencia. Las células Ba/F3 en crecimiento exponencial que expresan de manera estable cada mutante junto con un control FLT3-ITD WT se sembraron en placa en medio RPMI 1640 + FCS al 10 % suplementado con inhibidor de quinasa a la concentración indicada. Después de una incubación de 90 minutos, las células se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se hizo lisis en tampón de extracción celular (Invitrogen) suplementado con inhibidores de proteasa y fosfatasa. El lisado se aclaró por centrifugación y se cuantificó por ensayo BCA (Thermo Scientific). La proteína se sometió a electroforesis de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico y se transfirió a membranas de nitrocelulosa. La inmunotransferencia se realizó usando anti-fosfo-FLT3 (señalización celular) y anticuerpo anti-FLT3 S18 (Santa Cruz Biotechnology).

Pacientes y análisis de secuenciación del dominio de quinasa FLT3. Se analizaron nueve casos de resistencia adquirida a AC220. Los pacientes se inscribieron en el ensayo clínico de fase II de AC220 en LMA recidivante o refractaria en UCSF, Universidad de Pensilvania, Johns Hopkins o MD Anderson Cancer Center. Los detalles de los ensayos clínicos y los resultados se informan en otras partes[13]. Todos los pacientes fueron positivos para FLT3-ITD al momento de la inscripción. Se recogieron muestras antes del tratamiento y en el momento de la progresión de la enfermedad. En este análisis solo se incluyen los pacientes que han logrado un aclaramiento morfológico de los blastos de la médula ósea en menos del 5 % con la mejor respuesta. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado según la Declaración de Helsinki para participar tanto en los ensayos clínicos como para la recolección de muestras.

Para secuenciación, las células mononucleares purificadas con Ficoll congeladas obtenidas de sangre o médula ósea se lisaron en Trizol (Invitrogen) y el ARN se aisló según el protocolo del fabricante. El ADNc se sintetizó utilizando Superscript II (Invitrogen) según el protocolo del fabricante. El dominio de quinasa *FLT3* y el dominio de yuxtamembrana adyacente se amplificaron por PCR a partir de ADNc usando el cebador TK1F y TK2R como anteriormente. Los productos de PCR se clonaron usando la clonación TOPO TA (Invitrogen) y se transformaron en E. coli competente. Las colonias individuales se puntearon, se expandieron en cultivo líquido durante la noche y el ADN plasmídico se aisló para secuenciación usando el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Cada colonia se consideró representativa de un solo ARNm. Para minimizar la contaminación por artefacto de PCR, se secuencian al menos 10 y hasta 24 clones que contienen FLT3-ITD de cada muestra y se requiere encontrar mutaciones en >15 % de los clones. Los cebadores TK1F, TK2R, TK2F y TK2R se usaron para secuencia bidireccional como anteriormente. Los alineamientos de la secuencia FLT3 de tipo silvestre se realizaron usando el software Sequencher (Gene Codes Corporation).

Preparación de muestras y secuenciación

El producto de PCR que contiene el dominio de quinasa *FLT3* se generó a partir del ADNc del paciente como se describió anteriormente usando ADN polimerasa de alta fidelidad. Se prepararon productos de PCR para secuenciación de Pacific Biosciences[17] utilizando kits comerciales y reactivos estándar como se muestra en el sitio web de Pacific Biosciences siguiendo las instrucciones del fabricante. Las cantidades de entrada de productos de PCR oscilaron entre 0,3 y 3 microgramos, y se prepararon bibliotecas[16] SMRTBell en los productos completos de PCR sin ninguna fragmentación. Se secuenciarán todas las muestras en un instrumento RS de Pacific Biosciences y la secuencia se registró durante 45 minutos.

Análisis informático de mutaciones FLT3

Se obtuvo una muestra de un individuo sano sin antecedentes de cáncer, se aisló ARN, se preparó ADNc, se amplificó KD de *FLT3*, y se secuenciósiguiendo un protocolo idéntico al utilizado en las muestras de AML, excepto porque se registró la secuencia durante dos horas completas. Luego la secuencia de este individuo sano se usó como control para todas las etapas del proceso entre la adquisición de la muestra y la secuencia. Primero se identificó la secuencia ITD individual para cada muestra identificando cada sublectura[16]. Después de la identificación de todas las sublecturas, las sublecturas se agruparon mediante alineamientos de secuencias múltiples y la secuencia de consenso generada para cada grupo. Para identificar la secuencia ITD se utilizó Tandem Repeats Finder (TRF)[34]. Se descubrió que cada muestra tenía solo un ITD principal como se esperaba. Para determinar inequívocamente si una lectura era ITD- o ITD+, se usaron solo las sublecturas que incluían al menos la región desde la secuencia de 50 pb en el extremo 5' cadena arriba hasta la secuencia de 50 pb en el extremo 3' cadena abajo de la región ITD en el análisis. Esto permitió determinar el número de secuencias que contienen el ITD con mayor precisión a pesar del posible error de inserción y eliminación de la secuenciación de una sola molécula. Un ejemplo de la distribución de longitud de las regiones ITD se muestra en la Figura 5. Dos picos distintos permitieron identificar sublecturas de ITD-/ITD+ sin ambigüedades. Luego la población ITD+ de sublecturas se pasó a la siguiente etapa para análisis de mutación de codones. Un listado del número total de sublecturas identificadas se enumera en la Tabla complementaria 2. Se identificaron ~1000-10.000 sublecturas que abarcan toda la región entre la región ITD y el codón de interés más alejado (Y842) para análisis de codones por muestra.

Para análisis de mutación de codones, nuestro análisis se limitó a los codones 608, 691, 835 y 842 de la secuencia de referencia NM_004119 (tirosina quinasa 3 relacionada con fms del Homo sapiens (FLT3), ARNm) y luego se tomó la frecuencia de las secuencias obtenidas para cada uno de estos codones en la PCR amplicón del control sano y lo comparó con la frecuencia de secuencias en cada muestra de paciente con AML. Se utilizó un filtro de calidad local que requería la coincidencia exacta de los codones antes y después del codón de interés para filtrar las llamadas de codones de baja calidad que podrían deberse a un error de secuenciación. Las frecuencias observadas de la muestra de control se usaron para calcular la importancia de la mutación observada en las muestras de pacientes con AML. El valor p se calculó utilizando una aproximación de Poisson considerando la frecuencia observada en la muestra de control y la muestra de paciente con AML.[35],[36] Debido al posible sesgo estadístico que podría surgir si el número de mutaciones observadas fuera pequeño en algunos casos, o si las frecuencias de error de secuenciación difieren entre las secuencias de codones mutantes y de referencia, solo se informaron las mutaciones usando un umbral de significación conservador de $p < 1x10^{-7}$.

Para refinar aún más la búsqueda de mutaciones subyacentes a la recaída en estos pacientes, se consideraron solo aquellas mutaciones que estaban en *cis* para un ITD, como se define al estar en la misma secuencia de molécula de ADN única leída. Estas mutaciones tanto al inicio como a la recaída se enumeran en la Tabla 2. Finalmente, solo se consideraron mutaciones con una frecuencia superior al umbral del 2 % como candidatos a la recaída, ya que la frecuencia de mutaciones en el control normal fue inferior al 2 % en todos los codones examinados.

Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular se realizó utilizando el paquete Autodock 4.2[37]. La estructura FLT-ITD (resto 587-947) se preparó a partir de la entrada del banco de datos de proteínas 1RJB[19]. Todas las aguas unidas se eliminaron de la proteína. Luego se añadió la estructura para hidrógenos, y se asignaron cargas atómicas parciales usando AutoDockTools[37]. Los restos K644, F830, F691 y E661 se seleccionaron como restos flexibles. Las coordenadas de AC220 se generaron utilizando el servidor Dundee PROGRD2[38], y la energía de su conformación inicial se minimizó mediante el campo de fuerza GROMACS. Las cargas de Gasteiger se asignaron entonces al ligando usando ADT. Durante el procedimiento de acoplamiento se definieron siete enlaces de torsión giratorios. El ligando se colocó en el bolsillo de unión de ATP quinasa y se alineó manualmente para evitar choques atómicos. Una caja de cuadrícula tridimensional (dimensiones: 60x30x60, espaciado de la cuadrícula: 0,375A, centrada en el ligando) que define el espacio de búsqueda se creó con AutoGrid4.2[37]. Se realizaron doscientas ejecuciones del algoritmo genético de Larmarckian para optimizar las interacciones ligando-proteína. Las soluciones se agruparon según los valores de la desviación estándar media raíz y se clasificaron por la energía libre de unión. Solo se analizó la solución de menor energía. La constante de inhibición de AC220 se calcula en 19,25 nM (energía libre de unión: -10,51 kcal/mol), que está de acuerdo con los datos experimentales.

Referencias

1. Thiede, C., et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. Blood 99, 4326-4335 (2002).

2. Kelly, L.M., et al. FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. Blood 99, 310-318 (2002).

3. Lee, B.H., et al. FLT3 internal tandem duplication mutations induce myeloproliferative or lymphoid disease in a transgenic mouse model. Oncogene 24, 7882-7892 (2005).

4. Shih, L.Y., et al. Acquisition of FLT3 or N-ras mutations is frequently associated with progression of myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. Leukemia 18, 466-475 (2004).

5. McCormick, S.R., et al. FLT3 mutations at diagnosis and relapse in acute myeloid leukemia: cytogenetic and pathologic correlations, including cuplike blast morphology. Arch Pathol Lab Med 134, 1143-1151 (2010).

6. Knapper, S., et al. A phase 2 trial of the FLT3 inhibitor lestaurtinib (CEP701) as first-line treatment for older patients with acute myeloid leukemia not considered fit for intensive chemotherapy. Blood 108, 3262-3270 (2006).

7. Fischer, T., et al. Phase IIB trial of oral Midostaurin (PKC412), the FMS-like tyrosine kinase 3 receptor (FLT3) and multi-targeted kinase inhibitor, in patients with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome with either wild-type or mutated FLT3. J Clin Oncol 28, 4339-4345 (2010).

8. De Angelo, D.J., et al. Phase II Evaluation of the Tyrosine Kinase Inhibitor MLN518 in Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML) Bearing a FLT3 Internal Tandem Duplication (ITD) Mutation. ASH Annual Meeting Abstracts 104, 1792- (2004).

9. Heidel, F., et al. Clinical resistance to the kinase inhibitor PKC412 in acute myeloid leukemia by mutation of Asn-676 in the FLT3 tyrosine kinase domain. Blood 107, 293-300 (2006).

10. Metzelder, S., et al. Compassionate use of sorafenib in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia: sustained regression before and after allogeneic stem cell transplantation. Blood 113, 6567-6571 (2009).

11. Scholl, S., et al. Secondary resistance to sorafenib in two patients with acute myeloid leukemia (AML) harboring FLT3-ITD mutations. Ann Hematol.

12. Zarrinkar, P.P., et al. AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML). Blood 114, 2984-2992 (2009).

13. Cortes, J., et al. A Phase II Open-Label, AC220 Monotherapy Efficacy (ACE) Study In Patients With Acute Myeloid Leukemia (AML) WITH FLT3-ITD Activating Mutations: Interim Results. in 16th Congress of the European Hematology Association (London, Inglaterra, 2011).

14. Azam, M., Latek, R. R. y Daley, G.Q. Mechanisms of autoinhibition and STI-571/imatinib resistance revealed by mutagenesis of BCR-ABL. Cell 112, 831-843 (2003).

15. Shah, N.P., et al. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. Cancer Cell 2, 117-125 (2002).

16. Travers, K.J., Chin, C.S., Rank, D.R., Eid, J. S. y Turner, S.W. A flexible and efficient template format for circular consensus sequencing and SNP detection. Nucleic Acids Res 38, e159.

17. Eid, J., et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. Science 323, 133-138 (2009).

18. von Bubnoff, N., et al. FMS-like tyrosine kinase 3-internal tandem duplication tyrosine kinase inhibitors display a nonoverlapping profile of resistance mutations *in vitro*. Cancer Res 69, 3032-3041 (2009).

19. Griffith, J., et al. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. Mol Cell 13, 169-178 (2004).

20. Levinson, N.M., et al. A Src-like inactive conformation in the abl tyrosine kinase domain. PLoS Biol 4, e144 (2006).

21. Mol, C.D., et al. Structural basis for the autoinhibition and STI-571 inhibition of c-Kit tyrosine kinase. J Biol Chem 279, 31655-31663 (2004).

22. Hubbard, S.R., Wei, L., Ellis, L. y Hendrickson, W.A. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. Nature 372, 746-754 (1994).

23. Mol, C.D., et al. Structure of a c-kit product complex reveals the basis for kinase transactivation. J Biol Chem 278, 31461-31464 (2003).

24. Hubbard, S.R. Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. EMBO J 16, 5572-5581 (1997).

25. Pao, W., et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. PLoS Med 2, e73 (2005).

26. Tamborini, E., et al. A new mutation in the KIT ATP pocket causes acquired resistance to imatinib in a gastrointestinal stromal tumor patient. Gastroenterology 127, 294-299 (2004).

27. Choi, Y.L., et al. EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. N Engl J Med 363, 1734-1739 (2010).

28. Barbie, D.A. y Deangelo, D.J. Systemic mastocytosis: current classification and novel therapeutic options. Clin Adv Hematol Oncol 4, 768-775 (2006).

29. Notta, F., et al. Evolution of human BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia-initiating cells. Nature 469, 362-367 (2011).

30. Anderson, K., et al. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. Nature 469, 356-361 (2011).

31. Kralovics, R., et al. Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. Blood 108, 1377-1380 (2006).

32. Nazarian, R., et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. Nature 468, 973-977 (2010).

33. Johannessen, C.M., et al. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. Nature 468, 968-972 (2010).

34. Benson, G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. Nucleic Acids Res 27, 573-580 (1999).

35. Traut, H. A method for determining the statistical significance of mutation frequencies. Biometrical Journal 22, 73-78 (1980).

36. Zar, J.H. Statistical Significance of Mutation Frequencies, and the Power of Statistical Testing, Using the Poisson Distribution. Biometrical Journal 26, 83-88 (1984).

37. Morris, G.M., et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. J Comput Chem 30, 2785-2791 (2009).

38. Schuttelkopf, A.W. y van Aalten, D. M. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 60, 1355-1363 (2004).

Tabla 1

Número de sujeto	Sexo	Edad (años)	Terapia anterior	Cariotipo en inscripción	Cariotipo en recaída	Porcentaje de Blastos en recaída Muestra	Nueva Mutación en Recaída	Clones ITD+ con Mutación	Semanas en Estudio
1009-003	F	75	7+3	45-54,XX, +3,+6,+7,+8,+13,+14,+21,+22 [cp15]/46,XX[5]	52,XX, +3,+6,+7,+8,+10,+12,+13 [cp7]/46,XX[14]	90 %	D835F	6/15	12
1009-007	F	64	7+3, HDAC	Normal	ND	75 %	D835Y	5/10	10
1011-006	M	70	7+3, dosis baja de citarabina	Normal	ND	10 %	D835Y	4/15	7
1011-007	F	56	7+3, HAM	Normal	46,XX,del(11) (p?13p?15) [12]/46,XX[9]	80 %	F691L D835V	4/24 5/24	8
1005-004	F	60	citarabina y mitoxantrona	Normal	Normal	92 %	F691L	9/22	19
1005-006	M	43	trasplante alogénico de células madre	6,XY,t(1; 15) (p22;q15)	ND	59 %	D835Y	8/17	6
1005-007	F	59	7+3, HDAC	Normal	ND	39 %	D835V	9/21	23
1005-009	M	68	citarabina y mitoxantrona	Normal	ND	58 %	D835Y	8/14	18
1005-010	M	52	7+3, HDAC, mitoxantrona y etopósido	46,XY,t(4; 12) (q26;p11 2),t(8; 14) (q13;q11.2)	ND	22 %	F691L	6/18	19

7 + 3 = dosis baja de citarabina x 7 días + 3 días de antraciclina
HAM = dosis alta de citarabina + mitoxantrona
HDAC = dosis alta de citarabina
ND = no realizado

ES 2 791 830 T3

Tabla 2

Número de sujeto	Mutación	Codón Nativo	Codón Alternativo	Frecuencia Codónica alternativa Observada Pre-tratamiento	Número total de secuencias ITD+ muestreadas	Frecuencia Codónica alternativa Observada en Recaída	Número total de secuencias de ITD muestreadas	Frecuencia Codónica alternativa Observada en Control Normal
1009-003	F691L	TTT	TTG	4,7 %	1434	5,7 %	1306	1,2 %
	D835Y	GAT	TAT	<2 %	1736	9,8 %	1382	1,2 %
	D835V	GAT	GTT	<2 %	1736	3,6 %	1382	0,7 %
	D835F	GAT	TTT	<2 %	1736	16,9 %	1382	0,1 %
1009-007	F691L	TTT	TTG	6,4 %	1462	4,0 %	1079	1,2 %
	D835Y	GAT	TAT	<2 %	2071	55,7 %	1229	1,2 %
1011-006	F691L	TTT	TTG	5,3 %	603	4,7 %	493	1,2 %
	D835Y	GAT	TAT	<2 %	700	38,4 %	380	1,2 %
1011-007	F691L	TTT	TTG	5,8 %	1367	12,8 %	2748	1,2 %
	F691L	TTT	CTT	<2 %	1367	3,7 %	2748	0,7 %
	D835Y	GAT	TAT	<2 %	1478	5,2 %	3532	1,2 %
	D835V	GAT	GTT	<2 %	1478	28,2 %	3532	0,7 %

Todos los valores $p < 1x10^{-7}$ para frecuencias codónicas alternativas >2 %

ES 2 791 830 T3

Tabla complementaria 1

Número de sujeto	Nueva mutación en Recaída	Pre-tratamiento de Clones ITD-con mutación
1009-003	D835F	0/13
1009-007	D835Y	0/14
1011-006	D835Y	0/12
1011-007	F691L	0/11
	D835V	0/11
1005-004	F691L	0/22
1005-006	D835Y	0/15
1005-007	D835V	0/11
1005-009	D835Y	0/11
1005-010	F691L	0/24

Tabla complementaria 2

Muestra	Sublecturas Alineadas Totales	Longitud media Sublectura Alineada	ITD+/-	Número de Sublecturas alineadas con la Región de ITD y de Flanqueo (pb 1750 a 2156)	Longitud promedio de Sublecturas alineadas con Región de ITD y de Flanqueo	Número de Sublecturas que abarcan ITD e Y842 (pb 1750 a 2612)	Longitud promedio de Sublecturas que abarcan ITD e Y842	Identidad de alineación promedio (%)
1009-003	38332	660,17	ITD	7267	849,46	2838	1358,95	87,8
Pre-Tratamiento			ITD+	10813	864 72	4092	1389,97	86,1
1009-003	39656	628,13	ITD-	5180	851,31	1980	1358,85	86,5
Recaída			ITD+	10696	863,22	3924	1392,12	84,3
1009-007	37522	683,97	ITD~	4479	870,75	1832	1340,34	87,5
Pre-Tratamiento			JTD+	12994	890,79	5209	1385,82	84,8
1009-007	48299	662,84	ITD-	12548	862,51	5132	1354,49	86,1
Recaída			ITD+	9641	888,05	3882	1400,95	83,2
1011-006	30400	625,58	ITD-	7464	841,88	2798	1365,41	88,3
Pre-Tratamiento			ITD+	4245	894,28	1562.	1447,35	83,6
1011-006	10878	715,37	ITD-	3337	892,2	1419	1366,56	89,6
Recaída			ITD+	2109	840,18	854	1442,22	84,7
1011-007	33206	643,36	ITD-	3011	843,76	1266	1363,92	85,8
Pre-Tratamiento			ITD+	12209	861,62	5109	1391,96	84,1
1011-007	48863	693,74	IT'D-	1921	867,62	866	1328,25	86,9
Recaída			ITD+	23313	880,31	10219	1370,91	86,3
Control normal n.° 1	6532	617,84	ITD-	866	1249,86	643	1400,63	86,9

SEQ ID NO: 1 Ejemplo de una secuencia de ADNc del polinucleótido FLT3 (número de acceso NM 004119.2) CDS: 83..3064 (el ATC de inicio se indica en negrita)

```
   1 acctgcagcg cgaggcgcgc cgctccaggc ggcatcgcag ggctgggccg gcgcggcctg
  61 gggaccccgg gctccggagg ccatgccggc gttggcgcgc gacggcggcc agctgccgct
 121 gctcgttgtt ttttctgcaa tgatatttgg gactattaca aatcaagatc tgcctgtgat
 181 caagtgtgtt ttaatcaatc ataagaacaa tgattcatca gtggggaagt catcatcata
 241 tcccatggta tcagaatccc cggaagacct cgggtgtgcg ttgagacccc agagctcagg
 301 gacagtgtac gaagctgccg ctgtggaagt ggatgtatct gcttccatca cactgcaagt
 361 gctggtcgac gccccaggga acatttcctg tctctgggtc tttaagcaca gctccctgaa
 421 ttgccagcca cattttgatt tacaaaacag aggagttgtt tccatggtca ttttgaaaat
 481 gacagaaacc caagctggag aatacctact ttttattcag agtgaagcta ccaattacac
 541 aatattgttt acagtgagta taagaaatac cctgctttac acattaagaa gaccttactt
 601 tagaaaaatg gaaaaccagg acgccctggt ctgcatatct gagagcgttc cagagccgat
 661 cgtggaatgg gtgctttgcg attcacaggg ggaaagctgt aaagaagaaa gtccagctgt
 721 tgttaaaaag gaggaaaaag tgcttcatga attatttggg acggacataa ggtgctgtgc
 781 cagaaatgaa ctgggcaggg aatgcaccag gctgttcaca atagatctaa atcaaactcc
 841 tcagaccaca ttgccacaat tatttcttaa agtaggggaa cccttatgga taaggtgcaa
 901 agctgttcat gtgaaccatg gattcgggct cacctgggaa ttagaaaaca aagcactcga
 961 ggagggcaac tactttgaga tgagtacctа ttcaacaaac agaactatga tacggattct
1021 gtttgctttt gtatcatcag tggcaagaaa cgacaccgga tactacactt gttcctcttc
1081 aaagcatccc agtcaatcag ctttggttac catcgtagaa aagggattta taaatgctac
1141 caattcaagt gaagattatg aaattgacca atatgaagag ttttgttttt ctgtcaggtt
1201 taaagcctac ccacaaatca gatgtacgtg gaccttctct cgaaaatcat ttccttgtga
1261 gcaaaagggt cttgataacg gatacagcat atccaagttt tgcaatcata agcaccagcc
1321 aggagaatat atattccatg cagaaaatga tgatgcccaa tttaccaaaa tgttcacgct
1381 gaatataaga aggaaacctc aagtgctcgc agaagcatcg gcaagtcagg cgtcctgttt
1441 ctcggatgga tacccattac catcttggac ctggaagaag tgttcagaca agtctcccaa
1501 ctgcacagaa gagatcacag aaggagtctg gaatagaaag gctaacagaa aagtgtttgg
1561 acagtgggtg tcgagcagta ctctaaacat gagtgaagcc ataaaagggt tcctggtcaa
1621 gtgctgtgca tacaattccc ttggcacatc ttgtgagacg atcctttaa actctccagg
1681 ccccttcccc ttcatccaag acaacatctc attctatgca acaattggtg tttgtctcct
1741 cttcattgtc gttttaaccc tgctaatttg tcacaagtac aaaaagcaat ttaggtatga
1801 aagccagcta cagatggtac aggtgaccgg ctcctcagat aatgagtact tctacgttga
```

1861 tttcagagaa tatgaatatg atctcaaatg ggagtttcca agagaaaatt tagagtttgg

1921 gaaggtacta ggatcaggtg cttttggaaa agtgatgaac gcaacagctt atggaattag

1981 caaaacagga gtctcaatcc aggttgccgt caaaatgctg aaagaaaaag cagacagctc

2041 tgaaagagag gcactcatgt cagaactcaa gatgatgacc cagctgggaa gccacgagaa

2101 tattgtgaac ctgctggggg cgtgcacact gtcaggacca atttacttga tttttgaata

2161 ctgttgctat ggtgatcttc tcaactatct aagaagtaaa agagaaaaat ttcacaggac

2221 ttggacagag attttcaagg aacacaattt cagtttttac cccactttcc aatcacatcc

2281 aaattccagc atgcctggtt caagagaagt tcagatacac ccggactcgg atcaaatctc

2341 agggcttcat gggaattcat ttcactctga agatgaaatt gaatatgaaa accaaaaaag

2401 gctggaagaa gaggaggact tgaatgtgct tacatttgaa gatcttcttt gctttgcata

2461 tcaagttgcc aaaggaatgg aatttctgga atttaagtcg tgtgttcaca gagacctggc

2521 cgccaggaac gtgcttgtca cccacgggaa agtggtgaag atatgtgact ttggattggc

2581 tcgagatatc atgagtgatt ccaactatgt tgtcaggggc aatgcccgtc tgcctgtaaa

2641 atggatggcc cccgaaagcc tgtttgaagg catctacacc attaagagtg atgtctggtc

2701 atatggaata ttactgtggg aaatcttctc acttggtgtg aatccttacc ctggcattcc

2761 ggttgatgct aacttctaca aactgattca aaatggattt aaaatggatc agccatttta

2821 tgctacagaa gaaatataca ttataatgca atcctgctgg gcttttgact caaggaaacg

2881 gccatccttc cctaatttga cttcgttttt aggatgtcag ctggcagatg cagaagaagc

2941 gatgtatcag aatgtggatg gccgtgtttc ggaatgtcct cacacctacc aaaacaggcg

3001 acctttcagc agagagatgg atttggggct actctctccg caggctcagg tcgaagattc

3061 gtagaggaac aatttagttt taaggacttc atccctccac ctatccctaa caggctgtag

3121 attaccaaaa caagattaat ttcatcacta aaagaaaatc tattatcaac tgctgcttca

3181 ccagactttt ctctagaagc tgtctgcgtt tactcttgtt ttcaaaggga cttttgtaaa

3241 atcaaatcat cctgtcacaa ggcaggagga gctgataatg aactttattg gagcattgat

3301 ctgcatccaa ggccttctca ggctggcttg agtgaattgt gtacctgaag tacagtatat

3361 tcttgtaaat acataaaaca aaagcatttt gctaaggaga agctaatatg attttttaag

3421 tctatgtttt aaaataatat gtaaattttt cagctattta gtgatatatt ttatgggtgg

3481 gaataaaatt tctactacag aattgcccat tattgaatta tttacatggt ataattaggg

3541 caagtcttaa ctggagttca cgaacccccc gaaattgtgc acccatagcc acctacacat

3601 tccttccaga gcacgtgtgc ttttacccca agatacaagg aatgtgtagg cagctatggt

3661 tgtcacagcc taagatttct gcaacaacag gggttgtatt gggggaagtt tataatgaat

3721 aggtgttcta ccataaagag taatacatca cctagacact ttggcggcct tcccagactc

3781 agggccagtc agaagtaaca tggaggatta gtattttcaa taaagttact cttgtccccа

3841 caaaaaaa

SEQ ID NO: 2 Ejemplo de una secuencia de polipéptidos FLT3; número de acceso

NP 004110.2

```
   1 mpalardggq lpllvvfsam ifgtitnqdl pvikcvlinh knndssvgks ssypmvsesp
  61 edlgcalrpq ssgtvyeaaa vevdvsasit lqvlvdapgn isclwvfkhs slncqphfdl
 121 qnrgvvsmvi lkmtetqage yllfiqseat nytilftvsi rntllytlrr pyfrkmenqd
 181 alvcisesvp epivewvlcd sqgesckees pavvkkeekv lhelfgtdir ccarnelgre
 241 ctrlftidln qtpqttlpql flkvgeplwi rckavhvnhg fgltwelenk aleegnyfem
 301 stystnrtmi rilfafvssv arndtgyytc ssskhpsqsa lvtivekgfi natnssedye
 361 idqyeefcfs vrfkaypqir ctwtfsrksf pceqkgldng ysiskfcnhk hqpgeyifha
 421 enddaqftkm ftlnirrkpq vlaeasasqa scfsdgyplp swtwkkcsdk spnqteeite
 481 gvwnrkanrk vfgqwvssst lnmseaikgf lvkccaynsl gtscetilln spgpfpfiqd
 541 nisfyatigv cllfivvltl lichkykkqf ryesqlqmvq vtgssdneyf yvdfreyeyd
 601 lkwefprenl efgkvlgsga fgkvmnatay gisktgvsiq vavkmlkeka dsserealms
 661 elkmmtqlgs henivnllga ctlsgpiyli feyccygdll nylrskrekf hrtwteifke
 721 hnfsfyptfq shpnssmpgs revqihpdsd qisglhgnsf hsedeieyen qkrleeeedl
 781 nvltfedllc fayqvakgme flefkscvhr dlaarnvlvt hgkvvkicdf glardimsds
 841 nyvvrgnarl pvkwmapesi fegiytiksd vwsygillwe ifslgvnpyp gipvdanfyk
 901 liqngfkmdq pfyateeiyi imqscwafds rkrpsfpnlt sflgcqlada eeamyqnvdg
 961 rvsecphtyq nrrpfsremd lgllspqaqv eds
```

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar un paciente con AML sometido a tratamiento con AC220 que tiene mayor probabilidad de recaída, en donde el paciente tiene una mutación activadora inicial en un gen FLT3, comprendiendo el método detectar la presencia de al menos una segunda mutación en el gen FLT3 en una muestra celular AML del paciente, en donde la segunda mutación da como resultado una sustitución de aminoácido en la posición F691, D835, o Y842 de FLT3.

2. El método de la reivindicación 1, en donde la sustitución está en F691 o D835.

3. El método de la reivindicación 1, en donde la mutación activadora inicial es una mutación de duplicación en tándem (ITD).

4. El método de la reivindicación 1, en donde el método comprende determinar una mutación en un gen FLT3 en un codón que codifica F691, D835 o Y842.

5. El método de la reivindicación 4, en donde el método comprende secuenciar un ácido nucleico FLT3 amplificado a partir de la muestra celular AML de la región del gen FLT3 que comprende el codón.

6. El método de la reivindicación 1, en donde la mutación está en D835.

7. El método de la reivindicación 6, en donde la mutación es D835Y, D835V o D835F.

8. El método de la reivindicación 6, en donde la mutación es D835F.

9. El método de la reivindicación 1, en donde la mutación está en F691.

10. El método de la reivindicación 9, en donde la mutación es F691L

11. El método de la reivindicación 1, en donde las células AML comprenden una mutación en la posición F691 y una mutación en la posición D835.

12. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra celular AML es de sangre.

13. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra celular AML es de médula ósea.

Figura 1

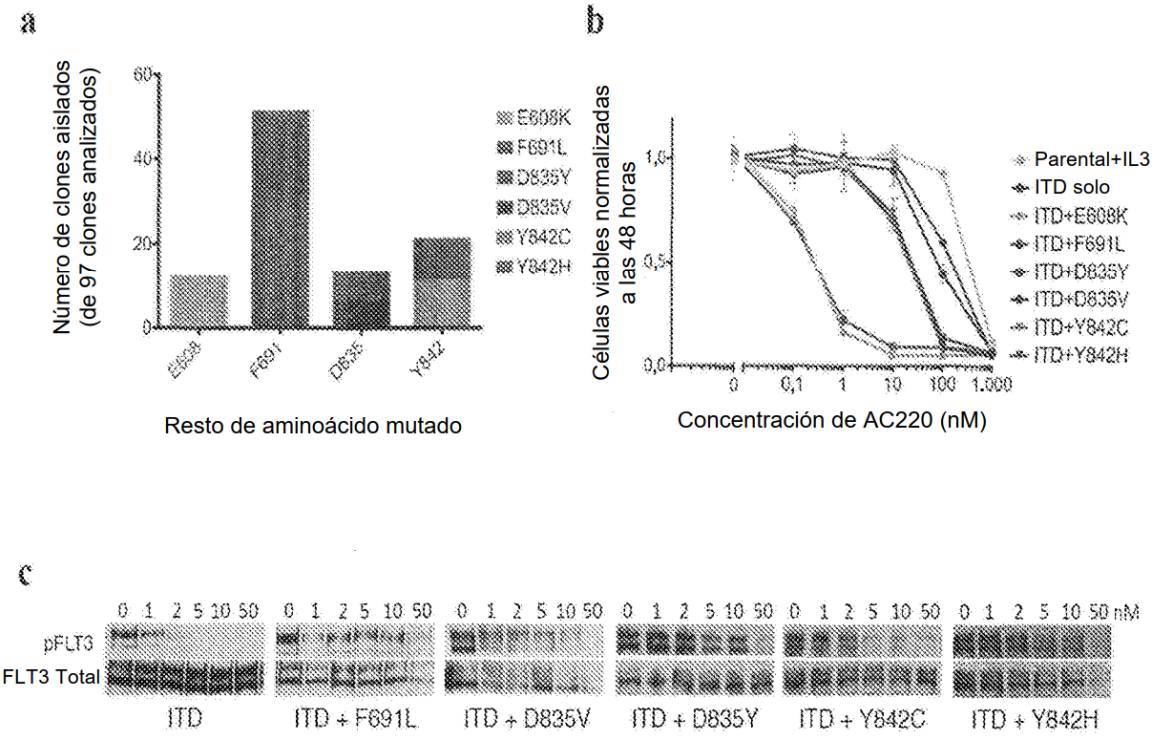

a
Número de clones aislados (de 97 clones analizados)
60
40
20
0
E608K
F691L
D835Y
D835V
Y842C
Y842H
E608
F691
D835
Y842
Resto de aminoácido mutado
b
Células viables normalizadas a las 48 horas
1,0
0,5
0,0
0
0,1
1
10
100
1.000
Concentración de AC220 (nM)
Parental+IL3
ITD solo
ITD+E608K
ITD+F691L
ITD+D835Y
ITD+D835V
ITD+Y842C
ITD+Y842H
c
0 1 2 5 10 50 nM
pFLT3
FLT3 Total
ITD
ITD + F691L
ITD + D835V
ITD + D835Y
ITD + Y842C
ITD + Y842H

Figura 2

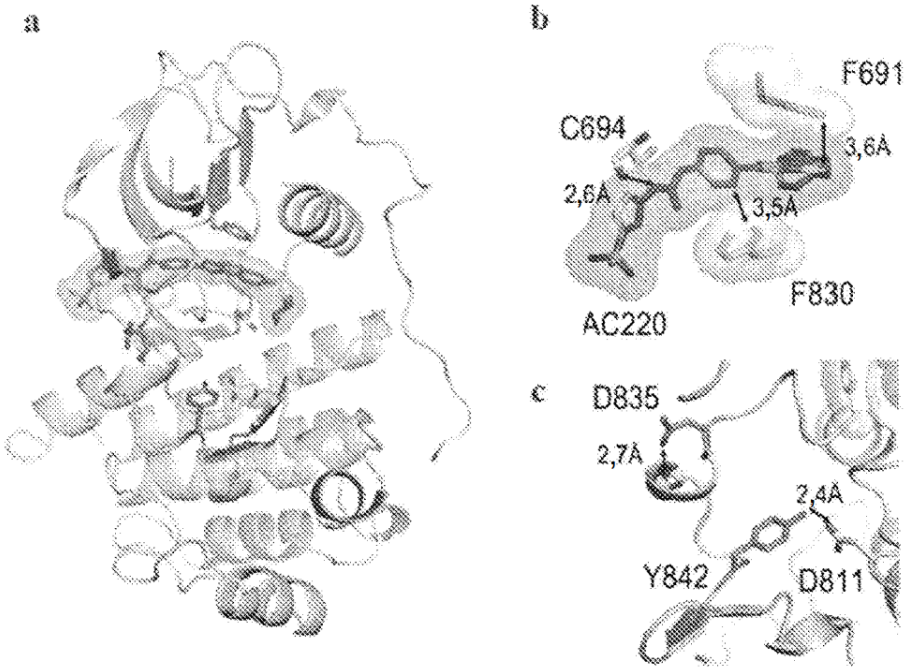


Figura 3

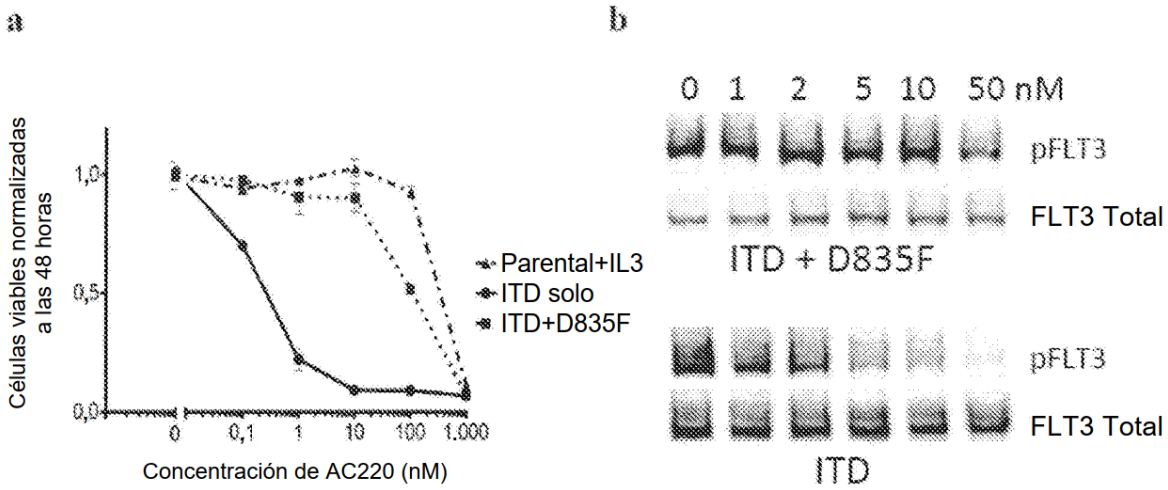
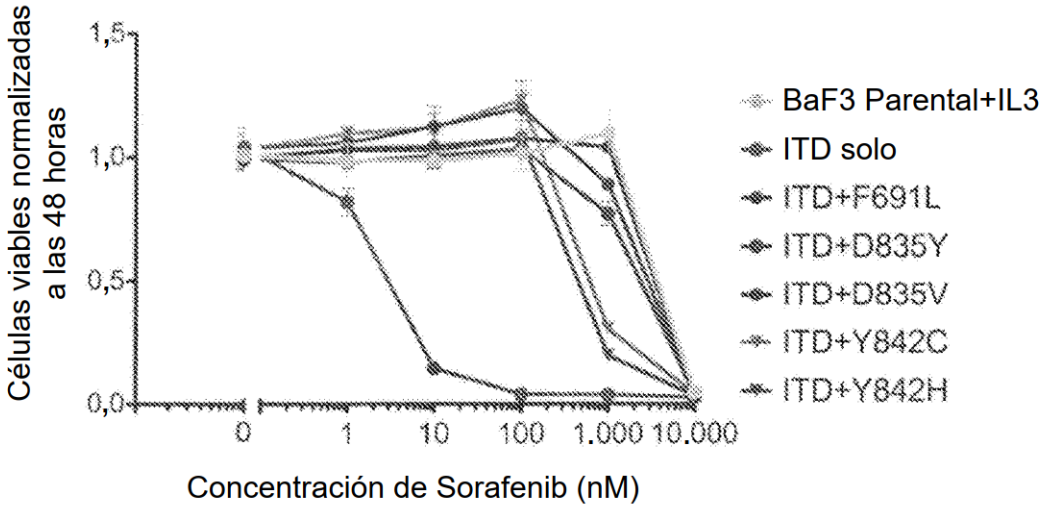
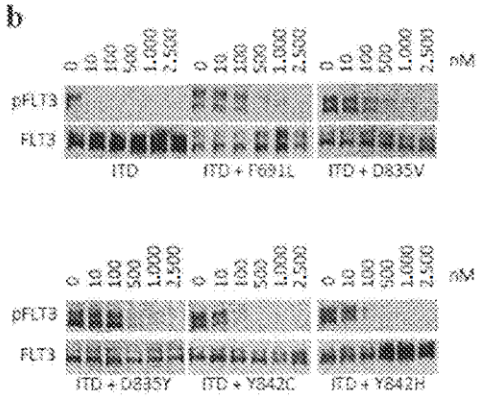

a
Células viables normalizadas a las 48 horas
1,0
0,5
0,0
0
0,1
1
10
100
1.000
Concentración de AC220 (nM)
Parental+IL3
ITD solo
ITD+D835F
b
0 1 2 5 10 50 nM
pFLT3
FLT3 Total
ITD + D835F
pFLT3
FLT3 Total
ITD

Figura 4

a



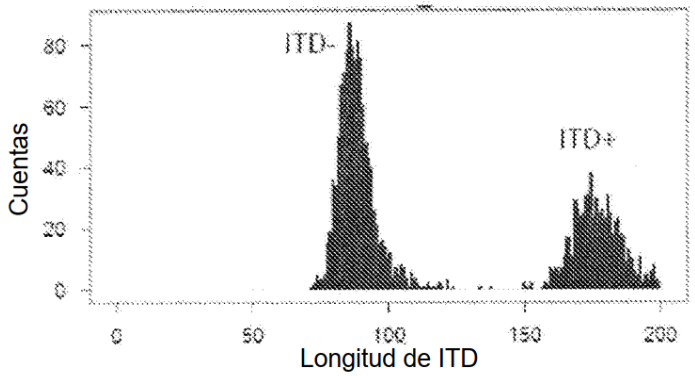
b



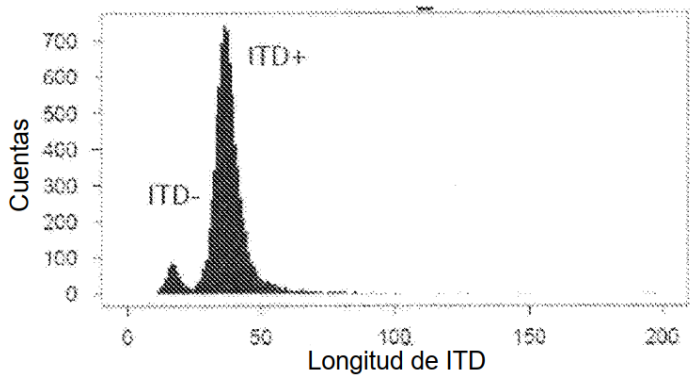
c

Mutación	CI_{50} (nM) AC220	Sorafenib
ITD	0,17	2,9
ITD + F691L	169	>1.000
ITD + D835V	91	>1.000
ITD + D835Y	22	>1.000
ITD + Y842C	19	941
ITD + Y842H	23	508

Figura 5



ITD Larga



ITD Corta