



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 337 301**

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **07007462 .0**

(96) Fecha de presentación : **08.03.2004**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1806416**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **11.07.2007**

(54) Título: **Método normalizado y optimizado de reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa cuantitativa en tiempo real para la detección de MRD en leucemia.**

(30) Prioridad: **07.03.2003 EP 03290572**

(73) Titular/es: **Université de la Méditerranée
58, boulevard Charles Livon
13284 Marseille Cédex 07, FR**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.04.2010

(72) Inventor/es: **Gabert, Jean;
Beillard, Emmanuel;
Bi, Wanli y
Van Dongen, Jacques**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.04.2010

(74) Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 337 301 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método normalizado y optimizado de reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa cuantitativa en tiempo real para la detección de MRD en leucemia.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método de PCR cuantitativa en tiempo real (RQ-PCR) para la detección de enfermedad residual mínima en pacientes leucémicos a través de la amplificación de un transcrito de gen de fusión.

Antecedentes de la invención

Los protocolos de tratamiento actuales para la leucemia linfoblástica aguda (ALL), la leucemia mieloide aguda (AML) y la leucemia mieloide crónica (CML) se basan en factores de pronóstico, que contribuyen a la estratificación de la terapia.(1-3). Los factores de pronóstico clave identificados en la leucemia a lo largo de los años incluyen características antes del tratamiento tales como edad, recuento de glóbulos blancos, perfiles inmunofenotípicos, anomalías cromosómicas específicas, genes de fusión aberrantes y mutaciones, tales como alteraciones del gen FLT3 en la AML. La respuesta a la terapia inicial proporciona un marcador de pronóstico adicional bien conocido; en particular, la presencia o ausencia de blastocitos en la médula ósea tras la terapia de inducción en ALL y AML, o la respuesta citogenética en pacientes con CML.

Sin embargo, es importante hacer hincapié en que el desenlace del paciente no puede predecirse de manera fiable partiendo de la base de tales parámetros clásicos, subrayando así la posible importancia de las pruebas de enfermedad residual mínima (MRD). A lo largo de los últimos diez años, los desarrollos tecnológicos han permitido la detección de células leucémicas más allá del umbral de la citomorfología o la cariotipificación (4).

Actualmente se usan tres técnicas diferentes con una sensibilidad de al menos una célula leucémica en un fondo de 10^3 células normales: 1. inmunofenotipificación, 2. reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando ADN genómico para la detección de redistribuciones de clones de inmunoglobulina (Ig) y genes del receptor de células T (TCR) en ALL, y 3. transcriptasa inversa-PCR (RT-PCR) para la detección de redistribuciones de genes, principalmente transcritos de FG que resultan de translocaciones cromosómicas. Aunque los dos primeros miden directamente la carga tumoral, el último método mide la expresión génica.

La información de MRD en pacientes con leucemia se ha establecido claramente como un factor de pronóstico independiente en tres situaciones patológicas: 1) ALL en la infancia, en particular tras la terapia de inducción; 2) detección de BCR-ABL en pacientes con CML tras trasplante alogénico de células madre, permitiendo la dirección de la infusiones de leucocitos del donante y 3) detección de PML-RARA en pacientes con leucemia promielocítica aguda (APL) tras la terapia de consolidación, confiriendo beneficio a la terapia preventiva en el punto de la recidiva molecular en comparación con la recidiva manifiesta. Estos datos han conducido a la introducción de la monitorización molecular en la estrategia de estratificación en algunos ensayos terapéuticos multicéntricos actuales.

Sin embargo, el impacto clínico de la detección de MRD en otros tipos de leucemias sigue teniendo que demostrarse en grandes series de pacientes.

Con el fin de abordar el problema de la falta de metodología de diagnóstico normalizada, hace ocho años laboratorios europeos realizaron un programa de colaboración a través de una acción concertada BIOMED-1.

Esta acción concertada condujo al desarrollo de ensayos de RT-PCR anidada normalizados que lograron sensibilidades de al menos 10^{-4} (ARN diluido en ARN) adecuadas para la detección de MRD así como para la detección diagnóstica (5).

Sin embargo, los análisis de PCR de “punto final” no permiten la cuantificación precisa de los niveles de MRD. Esta limitación se destacó por el hallazgo de bajos niveles de transcritos de AML1-ETO, CBFB-MYH11 o PML-RARA,(1) en pacientes en remisión clínica a largo plazo y por la detección de ARNm de BCR-ABL a niveles muy bajos en individuos sanos. Se ha logrado un análisis de PCR cuantitativa mediante PCR competitiva. Laboratorios expertos mostraron que esta técnica permite la predicción precisa de la recidiva, lo que sugiere que podría usarse un análisis de este tipo para adaptar el tratamiento en la CML positiva para BCR-ABL o en los pacientes con AML con transcritos de CBFB-MYH11 o AML1-ETO.

Sin embargo, esta PCR competitiva requiere mucho trabajo y lleva mucho tiempo, lo que impide tanto la normalización como el análisis multicéntrico a gran escala.

Más recientemente, se ha introducido la PCR cuantitativa en tiempo real (RQ-PCR) (6). Ha habido numerosos manuscritos de laboratorios individuales que demostraban la fiabilidad de esta tecnología y su posible valor clínico para los estudios de MRD usando transcritos de FG como dianas de PCR tales como BCR-ABL en CML, o ALL, PML-RARA, AML1-ETO y CBFB-MYH11 en AML y TEL-AML1 en pacientes con ALL.

Sin embargo, los procedimientos de RQ-PCR normalizados todavía están justificados con el fin de aplicar esta tecnología innovadora para estudios de MRD a gran escala en ensayos terapéuticos multicéntricos.

Los presentes inventores diseñaron un proyecto conjunto de protección de la salud y el consumidor de la Comisión Europea (SANCO) mediante el programa “Europe Against Cancer” (Europa contra el cáncer) (EAC) con el fin de desarrollar la normalización y el análisis de control de calidad para la RQ-PCR, basándose en la plataforma ABI 7700 (Applied Biosystems, Foster City - EE.UU.) ya que fue la primera tecnología de este tipo disponible. El objetivo principal era establecer un protocolo normalizado que permitiera la comparación de los datos de MRD con el fin de evaluar la eficacia relativa de cada estrategia terapéutica para la leucemia que lleva un marcador molecular apropiado. Se seleccionaron los transcritos de genes de fusión que se producían más frecuentemente en la leucemia, cubriendo hasta del 30 al 40% de la ALL y la AML en niños y adultos y más del 95% de los pacientes con CML.

Tal como se mencionó anteriormente en el presente documento, en comparación con la RT-PCR convencional, la RQ-PCR permite la cuantificación precisa de la expresión génica. Una característica atractiva de esta técnica es que pueden evaluarse parámetros cruciales tales como la calidad y la cantidad del ARN. Esto se lleva a cabo mediante la amplificación paralela del gen diana y uno o más genes control (CG), también denominados genes de referencia endógenos o constitutivos.

Un CG adecuado en algunas aplicaciones del análisis de RQ-PCR puede definirse como un gen con una expresión estable en todas las células nucleadas entre diferentes muestras analizadas que no resulta afectado por ningún tratamiento experimental. La amplificación alterada de los CG debe ir acompañada por una reducción correspondiente de la cantidad de transcritos del gen diana, lo que refleja variaciones en la calidad y la cantidad del ARN y en la eficacia de síntesis del ADNc. Por tanto, la cuantificación de la expresión del CG podría usarse para detectar muestras de mala calidad, basándose en valores de referencia observados en un gran número de muestras recientes. Además, la RQ-PCR permitiría evaluar una sensibilidad experimental por muestra, lo que es particularmente importante para las muestras de seguimiento negativas para la PCR.

Aunque la bibliografía sobre los ensayos de RQ-PCR está ampliándose rápidamente, hasta ahora no se ha publicado un esfuerzo concertado relacionado con la selección de CG apropiados.

La elección de un CG sigue siendo un tema crucial y todavía tiene que encontrarse un consenso. Hasta la fecha, todavía se usan numerosos CG para la detección de MRD mediante RQ-PCR: ABL, ACTB, B2M, GAPDH, PBGD, TBP y ARNr 18s. La inclusión del análisis de CG debe mejorar significativamente la fiabilidad de la detección de MRD en pacientes leucémicos.

Sin embargo, esto depende de manera crítica de la optimización y la normalización de los ensayos de CG y FG.

Sumario de la invención

Por estos motivos, los inventores de la presente solicitud se han centrado más particularmente en el diseño, la optimización y la normalización del análisis de RQ-PCR de FG con referencia especial a la selección y validación de CG adecuados para el análisis de RQ-PCR en un gran panel de muestras normales y leucémicas.

Por consiguiente, un objetivo de la presente invención es proporcionar una mejora significativa en un método de reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa cuantitativa (RQ-PCR) para la detección de enfermedad residual mínima en pacientes leucémicos a través de la amplificación de un transcrito de gen de fusión.

La invención proporciona un conjunto de ácidos nucleicos BCR-ABL para RQ-PCR que comprende una sonda nucleotídica que tiene la secuencia SEQ ID N° 21 y cebadores directo e inverso que tienen las secuencias SEQ ID N° 20 y SEQ ID N° 22 cuando el gen de fusión es BCR-ABL m-bcr.

La invención proporciona además un conjunto de ácidos nucleicos BCR-ABL para RQ-PCR que comprende una sonda nucleotídica que tiene la secuencia SEQ ID N° 21 y cebadores directo e inverso que tienen las secuencias SEQ ID N° 23 y SEQ ID N° 22 cuando el gen de fusión es BCR-ABL M-bcr.

La invención proporciona además el uso de los conjuntos de ácidos nucleicos en un método de RQ-PCR para la detección de enfermedad residual mínima en pacientes leucémicos, en el que dicho método de RQ-PCR comprende: (i) seleccionar muestras amplificables y cualificadas de pacientes para el análisis posterior; (ii) definir las condiciones óptimas para realizar la reacción de RT; (iii) definir las condiciones óptimas para el protocolo de RQ-PCR; y (iv) establecer un procedimiento normalizado para el análisis de los datos, en el que se amplifica un transcrito de gen de control apropiado en paralelo al transcrito de gen de fusión.

La presente invención podría proporcionar ventajosamente la base para una referencia internacional de estudios de MRD usando el análisis de RQ-PCR de transcritos de FG.

En el método de la invención, debe amplificarse un transcrito de gen de control apropiado en paralelo al transcrito de gen de fusión.

ES 2 337 301 T3

La inclusión de genes de control para corregir variaciones de la muestra hace que el método de la invención pueda aplicarse para la detección de transcritos de genes, creando así una plataforma para estudios futuros, en la que los ensayos de RQ-PCR deben ser cruciales para evaluar la eficacia terapéutica, particularmente para fármacos innovadores como los inhibidores para proteínas de tirosina cinasa, fosfatidil-inositol-3-cinasa o farnesil-transferasa.

Las estrategias terapéuticas se adaptarán según tales evaluaciones de MRD normalizadas. Una gran mejora será la ayuda de tales datos biológicos en la toma de una decisión terapéutica, tal como en el trasplante alogénico no relacionado, la infusión de linfocitos de donante o básicamente la elección de la estrategia terapéutica más eficaz.

Además, el método normalizado definido para marcadores en la leucemia aguda y crónica según la presente invención podría ser un modelo para otros marcadores biológicos en oncohematología y más ampliamente, en el campo de la oncología.

Los programas de normalización y control de calidad para tecnologías novedosas tales como la detección semiautomática de MRD en la actualidad, pero también las tecnologías de chip ADN de alto rendimiento en el futuro, son obligatorios para garantizar que los avances logrados a través de las metodologías genómicas innovadoras produzcan el máximo beneficio en la mejora del desenlace de pacientes con leucemia.

El gen de control que va a usarse en el método de la invención se selecciona del grupo que consiste en *ABL*, *B2M* y *GUS*.

Preferiblemente, las secuencias de cebador directo, sonda y cebador inverso para *ABL*, *B2M* y *GUS* son respectivamente tal como sigue:

SEQ ID N° 1 (ENF1003), SEQ ID N° 2 (ENPr1043) y SEQ ID N° 3 (ENR1063); y

SEQ ID N° 7 (ENF1102), SEQ ID N° 8 (ENPr1142) y SEQ ID N° 9 (ENR1162).

Las secuencias y la ubicación de estos tres genes de control preferidos se facilitan en la tabla 37.

Lo más preferiblemente, el gen de control seleccionado que va a usarse en el método de la invención es *ABL*.

En un aspecto preferido de esta realización, todas las muestras con un valor de *ABL* dentro de un intervalo de referencia, respectivamente desde $1,3 \times 10^3$ hasta $1,3 \times 10^5$ copias o Ct desde 21,9 hasta 29,3, se consideran como una muestra amplificable y están cualificadas para el análisis posterior.

En el método de la invención pueden usarse conjuntos adicionales de cebadores y sondas específicos para transcritos de genes de fusión adicionales, tal como sigue:

- cuando el gen de fusión es *E2A-PBX1*, las secuencias correspondientes de cebador directo, sonda y cebador inverso del mismo son respectivamente tal como sigue:

SEQ ID N° 10 (ENF101), SEQ ID N° 11 (ENP141) y SEQ ID N° 12 (ENR161).

- cuando el gen de fusión es *MLL-AF4*, las secuencias correspondientes de cebadores directos, sonda y cebador inverso del mismo son respectivamente tal como sigue:

SEQ ID N° 13 (ENF207), SEQ ID N° 14 (ENF208), SEQ ID N° 15 (ENP242) y SEQ ID N° 16 (ENR262).

- cuando el gen de fusión es *TEL-AML1*, las secuencias correspondientes de cebador directo, sonda y cebador inverso del mismo son respectivamente tal como sigue:

SEQ ID N° 17 (ENF301), SEQ ID N° 18 (ENPr341) y SEQ ID N° 19 (ENR361)

SEQ ID N° 20 (ENF402), SEQ ID N° 21 (ENP541) y SEQ ID N° 22 (ENR561).

- cuando el gen de fusión es *BCR-ABL M-bcr*, las secuencias correspondientes de cebador directo, sonda y cebador inverso del mismo son respectivamente tal como sigue:

SEQ ID N° 23 (ENF501), SEQ ID N° 21 (ENP541) y SEQ ID N° 22 (ENR561).

- cuando el gen de fusión es *SIL-TAL1*, las secuencias correspondientes de cebador directo, sonda y cebador inverso del mismo son respectivamente tal como sigue:

SEQ ID N° 26 (ENF601), SEQ ID N° 27 (ENP641) y SEQ ID N° 28 (ENR664).

ES 2 337 301 T3

- cuando el gen de fusión es *PML-RARA*, las secuencias correspondientes de cebadores directos, sonda y cebador inverso del mismo son respectivamente tal como sigue:

SEQ ID N° 29 (ENF903), SEQ ID N° 30 (ENF906), SEQ ID N° 31 (ENF905), SEQ ID N° 32 (ENP942) y SEQ ID N° 33 (ENR962).

- cuando el gen de fusión es *CBFB-MYH11*, las secuencias correspondientes de cebador directo, sonda y cebadores inversos del mismo son respectivamente tal como sigue:

SEQ ID N° 34 (ENF803), SEQ ID N° 35 (ENPr843), SEQ ID N° 36 (ENR862), SEQ ID N° 37 (ENR863) y SEQ ID N° 38 (ENR865).

- cuando el gen de fusión es *AML-ETO*, las secuencias correspondientes de cebador directo, sonda y cebador inverso del mismo son respectivamente tal como sigue:

SEQ ID N° 39 (ENF701), SEQ ID N° 40 (ENP747) y SEQ ID N° 41 (ENR761).

Las secuencias y las posiciones de estos cebadores y sondas se facilitan en las tablas 5, 8, 11, 14, 17, 21, 24, 27 y 30.

En la realización más preferida del método de la presente invención, la etapa (ii) de dicho método es tal como sigue:

añadir 1 μ g de ARN total en 10 μ l de H₂O;

incubar a 70°C durante 10 min.;

enfriar en hielo y añadir los siguientes reactivos hasta un volumen final de 20 μ l:

Transcriptasa inversa (o bien de MMLV o Superscript I o II): 100 U

Tampón RT (según la RTasa usada)

DNTP: 1 Mm

DTT: 10 Mm

Hexámeros aleatorios: 25 μ M

Inhibidor de ARNasa: 20 U

Incubar posteriormente a:

Temperatura ambiente durante 10 min.;

42°C durante 45 min.; y

99°C durante 3 min.

Colocar la muestra a 4°C tras la etapa de RT; y

diluir el ADNc final con 30 μ l de H₂O.

La etapa (iii) del método de la invención puede ser tal como sigue:

volumen final: 25 μ l;

5 μ l de ADNc final (100 ng de equivalente de ARN); cebadores: 300 nM cada uno;

sonda: 200 nM excepto para la sonda de AML1-ETO (100 nM);

mezcla maestra: 12,5 μ l (1X)

ES 2 337 301 T3

Incubar la muestra:

a 50°C durante 2 min.; y

5 a 95°C durante 10 min.;

seguido por 50 ciclos:

10 95°C durante 15 s; y

60°C durante 1 min.

15 Ventajosamente, la etapa (iv) del método de la invención continúa tal como sigue:

fijar un umbral común a 0,1 excepto para PML-RARA (0,05); y

20 fijar una línea base común entre el ciclo 3 y el 15, excepto para B2M (3-10).

La presente invención se describirá ahora en más detalle con referencia a las siguientes tablas y a los dibujos adjuntos en los que:

25 la figura 1 ilustra el principio de detección mediante RQ PCR usando una sonda de hidrólisis (TaqMan™). a) La sonda bifluorescente (R: indicador, Q: extintor) hibrida en la secuencia de nucleótidos complementaria del molde durante la reacción de PCR. b) La sonda se degrada durante la fase de extensión mediante la enzima ADN polimerasa dando como resultado una fluorescencia creciente detectada por la máquina en el tubo de PCR;

30 la figura 2 ilustra la amplificación del plásmido MLL (ex 10)-AF4 (ex 4) usando los conjuntos de cebador y sonda de EAC. a) Gráficas de la amplificación (escala de $\log_{10}$) de cinco diluciones de plásmido de ADN (de 10^6 a 10 moléculas), b) curva patrón obtenida con las cinco diluciones de plásmido;

35 la figura 3 es un diagrama esquemático del transcrito de gen de fusión E2A-PBX1 cubierto por el conjunto de cebador y sonda de RQ-PCR (ENF101 - ENP141 - ENR161). El número bajo los cebadores y la sonda se refiere a sus posiciones de nucleótido en 5' en el transcrito de gen normal (véase la tabla 5);

40 la figura 4 ilustra las gráficas de amplificación de diluciones de 10^{-1} , 10^{-3} y 10^{-4} de una muestra de ARN positiva para E2A-PBX1 en una muestra de ARN negativa;

45 la figura 5 ilustra la comparación de la expresión del transcrito de gen de fusión E2A-PBX1 entre BM (médula ósea) y PB (sangre periférica) en el diagnóstico usando o bien ABL, B2M o bien GUS como gen de control. La razón (NCN) se define como la razón entre el número de copias de E2A-PBX1 por una copia del gen ABL o GUS y 100 copias del gen B2M. La mediana de los valores corresponde a la línea en negrita. El recuadro se refiere al intervalo definido por los percentiles 25° y 75°. Todas las diferencias entre BM y PB por gen de control no son significativas en muestras apareadas ($n = 10$, prueba de Wilcoxon). n: número de muestras de pacientes;

50 la figura 6 es un diagrama esquemático del transcrito de gen de fusión MLL-AF4 cubierto por el conjunto de cebador y sonda de RQ-PCR. Se dispone de dos conjuntos de RQ-PCR con una sonda común y un cebador inverso común en el exón 5 de AF4 (ENR262 - ENP242). El primer cebador usa un cebador directo en el exón 9 de MLL (ENF207) y el segundo conjunto usa un cebador directo en el exón 10 de MLL (ENF208). Los transcritos de FG MLL-AF4 que carecen del exón 5 de AF4 no pueden amplificarse mediante los conjuntos de EAC. Tomados juntos, los conjuntos cubren aproximadamente el 75% de las variantes de MLL-AF4 o bien en pacientes lactantes o bien en no lactantes (véase la frecuencia relativa en el lado derecho del diagrama). El número bajo los cebadores y la sonda se refiere a sus posiciones de nucleótido en 5' en el transcrito de gen normal (véase la tabla 8);

55 la figura 7 ilustra las gráficas de amplificación de diluciones de 10^{-1} , 10^{-3} y 10^{-4} de un ARN de la línea celular RS4;11 en una muestra de ARN de PBMNC negativa;

60 la figura 8 ilustra la comparación de la expresión del transcrito de gen de fusión MLL-AF4 entre BM y PB en el diagnóstico usando o bien ABL, B2M o bien GUS como gen de control. La razón (NCN) se define como la razón entre el número de copias de MLL-AF4 por una copia del gen ABL o GUS y 100 copias del gen B2M. La mediana de los valores corresponde a la línea en negrita. El recuadro se refiere al intervalo definido por los percentiles 25° y 75°. n: número de muestras de pacientes;

65 la figura 9 es un diagrama esquemático del transcrito de gen de fusión TEL-AML1 cubierto por el conjunto de cebador y sonda de RQ-PCR (ENF301 - ENPr341 - ENR361). El número bajo los cebadores y la sonda se refiere a sus posiciones de nucleótido en 5' en el transcrito de gen normal (véase la tabla 11);

ES 2 337 301 T3

la figura 10 ilustra las gráficas de amplificación de diluciones de 10^{-1} , 10^{-3} y 10^{-4} de una muestra de ARN positiva para TEL-AML1 en una muestra de ARN negativa;

la figura 11 ilustra la comparación de la expresión del transcrito de gen de fusión TEL-AML1 entre BM y PB en el diagnóstico usando o bien ABL, B2M o bien GUS como gen de control. La razón (NCN) se define como la razón entre el número de copias de TEL-AML1 por una copia del gen ABL o GUS y 100 copias del gen B2M. La mediana de los valores corresponde a la línea en negrita. El recuadro se refiere al intervalo definido por los percentiles 25° y 75°. Todas las diferencias entre BM y PB por gen de control no son significativas en muestras apareadas ($n = 23$, prueba de Wilcoxon). n: número de muestras de pacientes;

la figura 12 es un diagrama esquemático del transcrito de gen de fusión BCR-ABL cubierto por el conjunto de cebador y sonda de RQ-PCR. Para m-bcr, el conjunto: ENF402 - ENP541 - ENR561 y para M-bcr, el conjunto: ENF501 - ENP541 - ENR561. El número bajo los cebadores y la sonda se refiere a sus posiciones de nucleótido en 5' en el transcrito de gen normal (véase la tablas 14 y 17). La frecuencia relativa se refiere a la proporción del transcrito e1-a2 entre las variantes de m-bcr y la proporción de los transcritos b3-a2 y b2-a2 entre las variantes de M-bcr;

la figura 13 ilustra las gráficas de amplificación de diluciones de 10^{-1} , 10^{-3} y 10^{-4} de una muestra de ARN positiva para BCR-ABL m-bcr en una muestra de ARN negativa;

la figura 14 ilustra la comparación de la expresión del transcrito de gen de fusión BCR-ABL m-bcr entre BM y PB en el diagnóstico usando o bien ABL, B2M o bien GUS como gen de control. La razón (NCN) se define como la razón entre el número de copias de BCR-ABL m-bcr por una copia del gen ABL o GUS y 100 copias del gen B2M. La mediana de los valores corresponde a la línea en negrita. El recuadro se refiere al intervalo definido por los percentiles 25° y 75°. n: número de muestras de pacientes;

la figura 15 ilustra las gráficas de amplificación de diluciones de 10^{-1} , 10^{-3} y 10^{-4} de una muestra de ARN positiva para BCR-ABL M-bcr en una muestra de ARN negativa;

la figura 16 ilustra la comparación de la expresión del transcrito de gen de fusión BCR-ABL M-bcr entre BM y PB usando o bien ABL, B2M o bien GUS como gen de control. a) En muestras de CML, b) en muestras de ALL. La razón (NCN) se define como la razón entre el número de copias de BCR-ABL M-bcr por una copia del gen ABL o GUS y 100 copias del gen B2M. La mediana de los valores corresponde a la línea en negrita. El recuadro se refiere al intervalo definido por los percentiles 25° y 75°. n: número de muestras de pacientes;

la figura 17 ilustra la comparación de la expresión del transcrito de gen de fusión BCR-ABL entre m-bcr ALL, M-bcr ALL y M-bcr CML en el diagnóstico usando o bien ABL, B2M o bien GUS como gen de control. PB y BM se reunieron según cada grupo para comparar la expresión del gen de fusión BCR-ABL entre m-bcr ALL, M-bcr ALL y M-bcr CML. No se observó ninguna diferencia significativa entre m-bcr y M-bcr ALL con el gen de control o bien B2M o bien GUS (prueba de Mann-Whitney). Se encontró una diferencia altamente significativa entre muestras de ALL ($n = 41$) y CML ($n = 29$) positivas para BCR-ABL con el gen de control o bien B2M o bien GUS (prueba de Mann-Whitney). n: número de muestras de pacientes;

la figura 18 es un diagrama esquemático del transcrito de gen de fusión SIL-TAL1 cubierto por el conjunto de cebador y sonda de RQ-PCR (ENF601 - ENP641 - ENR664). El número bajo los cebadores y la sonda se refiere a sus posiciones de nucleótido en 5' en el transcrito de gen normal (véase la tabla 21);

la figura 19 ilustra las gráficas de amplificación de diluciones de 10^{-1} , 10^{-3} y 10^{-4} de una muestra de ARN positiva para SIL-TAL1 en una muestra de ARN negativa;

la figura 20 ilustra la comparación de la expresión del transcrito de gen de fusión SIL-TAL1 entre BM y PB en el diagnóstico usando o bien ABL, B2M o bien GUS como gen de control. La razón (NCN) se define como la razón entre el número de copias de SIL-TAL1 por una copia del gen ABL o GUS y 100 copias del gen B2M. La mediana de los valores corresponde a la línea en negrita. El recuadro se refiere al intervalo definido por los percentiles 25° y 75°. Todas las diferencias entre BM y PB por gen de control no son significativas en muestras apareadas ($n = 5$, prueba de Wilcoxon). n: número de muestras de pacientes;

la figura 21 es un diagrama esquemático del transcrito de gen de fusión PML-RARA cubierto por el conjunto de cebador y sonda de RQ-PCR. Se dispone de tres conjuntos para cubrir todas las variantes del transcrito PML-RARA. Se usan una sonda común (ENP942) y un cebador inverso común (ENR962) en el exón 3 del gen RARA. Las variantes BCR1, BCR2 y BCR3 se amplifican respectivamente con los cebadores directos ENF903, ENF906 y ENF905. La frecuencia relativa de cada transcrito particular aparece en el lado derecho del diagrama. El número bajo los cebadores y la sonda se refiere a sus posiciones de nucleótido en 5' en el transcrito de gen normal (véase la tabla 24);

la figura 22 ilustra las gráficas de amplificación de diluciones de 10^{-1} , 10^{-3} y 10^{-4} de una muestra de ARN positiva para PML-RARA BCR1 en una muestra de ARN negativa;

la figura 23 ilustra la comparación de la expresión del transcrito de gen de fusión PML-RARA entre BM y PB en el diagnóstico usando o bien ABL, B2M o bien GUS como gen de control. La razón (NCN) se define como la razón entre el número de copias de PML-RARA por una copia del gen ABL o GUS y 100 copias del gen B2M. La mediana de los valores corresponde a la línea en negrita. El recuadro se refiere al intervalo definido por los percentiles 25° y 75°. Todas las diferencias entre BM y PB por gen de control no son significativas en muestras apareadas (n = 6, prueba de Wilcoxon) excepto para NCN de B2M (p=0,03). n: número de muestras de pacientes;

la figura 24 es un diagrama esquemático de los transcritos de gen de fusión CBFB-MYH11 cubiertos por el conjunto de cebador y sonda de RQ-PCR. a) Tipo A: conjunto ENF803 - ENPr843 - ENR862, b) Tipo D: conjunto ENF803 - ENPr843 - ENR863, c) Tipo E: conjunto ENF803 - ENPr843 - ENR865. La frecuencia relativa de cada transcrito particular aparece en el lado derecho del diagrama. El número bajo los cebadores y la sonda se refiere a sus posiciones de nucleótido en 5' en el transcrito de gen normal (véase la tabla 27);

la figura 25 ilustra las gráficas de amplificación de diluciones de 10^{-1} , 10^{-3} y 10^{-4} de una muestra de ARN positiva para CBFB-MYH11 en una muestra de ARN negativa: a) fijar el tipo A en la línea celular ME-1, b) fijar el tipo D en la muestra del paciente, c) fijar el tipo E en la muestra del paciente;

la figura 26 ilustra la comparación de la expresión del transcrito de gen de fusión CBFB-MYH11 entre BM y PB en el diagnóstico usando o bien ABL, B2M o bien GUS como gen de control. Las muestras se reunieron según su origen (BM o PB), independientemente del tipo de transcrito. La razón (NCN) se define como la razón entre el número de copias de CBFB-MYH11 por una copia del gen ABL o GUS y 100 copias del gen B2M. La mediana de los valores corresponde a la línea en negrita. El recuadro se refiere al intervalo definido por los percentiles 25° y 75°. n: número de muestras de pacientes;

la figura 27 es un diagrama esquemático del transcrito de gen de fusión AML1-ETO cubierto por el conjunto de cebador y sonda de RQ-PCR. Códigos de EAC (ENF701, ENP747, ENR761). El número bajo los cebadores y la sonda se refiere a sus posiciones de nucleótido en 5' en el transcrito de gen normal (véase la tabla 30). La sonda se ubica en el punto de rotura;

la figura 28 ilustra las gráficas de amplificación de diluciones de 10^{-1} , 10^{-3} y 10^{-4} de una muestra de ARN positiva para AML1-ETO en una muestra de ARN negativa. a) Gráfica de amplificación clásica. b) Fenómeno de curva de aumento gradual ("creeping curve") observado en muestras de NAC;

la figura 29 ilustra la comparación de la expresión del transcrito de gen de fusión AML1-ETO entre BM y PB en el diagnóstico usando o bien ABL, B2M o bien GUS como gen de control. La razón (NCN) se define como la razón entre el número de copias de AML1-ETO por una copia del gen ABL o GUS y 100 copias del gen B2M. La mediana de los valores corresponde a la línea en negrita. El recuadro se refiere al intervalo definido por los percentiles 25° y 75°. Todas las diferencias entre BM y PB por gen de control no son significativas en muestras apareadas (n = 10, prueba de Wilcoxon). Sin embargo, no se recomienda el uso del gen GUS debido al gran intervalo de valores observados para la razón AML1-ETO/GUS. n: número de muestras de pacientes;

la figura 30 ilustra la influencia de las etapas de pre-PCR en la cuantificación del transcrito del gen ABL de cuatro muestras codificadas sometidas a prueba en 11 laboratorios asignados aleatoriamente durante el ensayo aleatorizado equilibrado (fase IIIb, red de PML-RARA). a) No hay diferencia significativa entre las muestras codificadas usando un modelo lineal global, b) diferencia altamente significativa entre laboratorios para las mismas muestras. Líder de red que envía las muestras codificadas a otros laboratorios. La dilución de 10^{-1} se excluyó del análisis porque no podía considerarse idéntica a las otras cuatro. Las muestras diluidas 10^{-3} y 10^{-4} también aparecen en las figuras 31 y 32;

la figura 31 ilustra los resultados por laboratorio de la amplificación del transcrito de gen de fusión PML-RARA en tres muestras codificadas durante el ensayo aleatorizado equilibrado (fase IIIb). a) Valor de Ct del transcrito de FG. b) NCN de ABL del transcrito de FG de las 3 muestras codificadas. Las diluciones fueron dilución 10^{-1} (■), 10^{-3} (▲) y 10^{-4} (●) de ARN de NB-4 en una muestra de ARN negativa. El CG mejoró enormemente la linealidad de los resultados (véase también la figura 32). Las muestras diluidas 10^{-3} y 10^{-4} también aparecen en la figura 30.

La figura 32 es un diagrama esquemático de los resultados obtenidos durante el ensayo aleatorizado equilibrado (fase IIIb) dentro de la red de PML-RARA. Se analizaron tres muestras positivas para PML-RARA codificadas: 10^{-1} (eje Y = 4), 10^{-3} (eje Y = 2) y 10^{-4} (eje Y = 1) en 11 laboratorios diferentes. Resultados mostrados en el eje X: a) el valor de Ct o b) la razón PML-RARA/ABL de cada muestra codificada según la dilución. Estas muestras son idénticas a las que aparecen en las figuras 30 y 31. El coeficiente de correlación r y la curva de regresión calculados a partir de estas muestras aparecen en la figura. Con el fin de comparar ambas figuras, se usó una escala idéntica para el eje X. Se ha realizado el mismo análisis para cada red de FG durante la fase IIIb para los valores de Ct y delta Ct y CN y NCN. Los resultados aparecen en la tabla 33;

la figura 33 ilustra la comparación de la expresión del transcrito de FG en muestras leucémicas en el diagnóstico. a) Usando ABL como gen de control, b) usando B2M como gen de control, c) usando GUS como gen de control. La razón (NCN) se define como la razón entre el número de copias del transcrito de FG por una copia del transcrito del gen ABL o GUS o 100 copias del transcrito del gen B2M. La mediana de los valores corresponde a la línea en negrita.

ES 2 337 301 T3

El recuadro se refiere al intervalo definido por los percentiles 25° y 75°. Se reunieron las muestras de BM y PB por transcrito. n: número de muestras de pacientes para cada transcrito particular;

la figura 34 ilustra un diagrama esquemático de los tres transcritos de CG seleccionados cubiertos por los conjuntos de RQ-PCR de EAC. Conjunto de EAC de ABL: ENF1003, ENPr1043, ENR1063, conjunto de EAC de B2M: conjunto de ENF1302, ENPr1342, ENR1362 y conjunto de EAC de GUS: ENF1102, ENPr1142, ENR1162. El número bajo los cebadores y las sondas se refiere a sus posiciones de nucleótido en 5' en el transcrito de gen (véase la tabla 37). ENF = cebador directo, ENPr = sonda inversa TaqMan, ENR = cebador inverso;

la figura 35 ilustra la optimización de la reacción del ADNc para RQ-PCR. a) Efecto de la concentración de transcriptasa inversa (RT) sobre la RT-RQ-PCR. Se sometieron a transcripción inversa siete alícuotas de ARN de la línea celular K562 para dar ADNc usando cebador aleatorio 25 mM y diluciones de dos veces de 0,5-32 U de RT de MMLV por microlitro de reacción de ADNc. Se llevó a cabo la PCR TaqMan usando conjuntos de cebadores para B2M, GAPDH, ABL y BCR-ABL en cada ADNc y se representaron los valores promedio de Ct de los cuatro genes diana en cada ADNc frente a la concentración de RT. b) Comparación de diferentes tipos de cebador de ADNc en ARN de K562: Mezcla de cebadores específicos del gen diana (1 mM cada uno), cebadores de hexámeros aleatorios (25 mM), un cebador de oligo(dT) (5 mM) y sin cebador. c) Efecto de la concentración de cebador sobre el rendimiento de ADNc. Se sometieron a transcripción inversa alícuotas de ARN de las líneas celulares K562 y REH usando 5 U de RT de MMLV por microlitro de reacción de ADNc y cebador de hexámeros aleatorios 1-125 mM. Se monitorizaron los rendimientos de ADNc mediante PCR TaqMan usando B2M, GAPDH y ABL. Se representaron los Ct promedio de los tres genes diana en cada ADNc frente a la concentración de cebador;

la figura 36 ilustra la reproducibilidad entre laboratorios de la síntesis del ADNc evaluada mediante la amplificación del transcrito del gen B2M. Se prepararon centralmente (laboratorio n.º1) diluciones de diez veces de ARN de la línea celular RS4;11 en ARN de *E. coli* y se distribuyeron las alícuotas en nieve carbónica a los laboratorios miembros del grupo de CG. Cada laboratorio realizó la síntesis del ADNc y el análisis de TaqMan. Se observaron resultados similares para los transcritos de los genes ABL y GUS;

la figura 37 ilustra la variación en la expresión de CG en muestras de PB normales. Se analizaron PBMNC (células mononucleares de sangre periférica) de 30 donantes normales con los conjuntos de RQ-PCR específicos de los genes CYC, GUS, TBP, ABL y B2M. Cada línea representa los datos de una muestra;

la figura 38 ilustra la comparación de la expresión de los tres transcritos de CG en 310 muestras recientes normales y leucémicas: a) ABL, b) B2M y c) GUS. Para muestras normales, el análisis se realizó según el tejido (BM, PB o PBSC); se encontraron niveles de expresión comparables entre PB y PBSC para el transcrito del gen B2M y entre BM y PBSC para el transcrito del gen GUS tras el análisis de comparaciones múltiples *a posteriori*. En la esquina superior derecha, el resultado del modelo lineal global realizado según el tipo de muestra (normal, ALL, AML o CML) y el tejido. La línea en negrita corresponde a la mediana de los valores. El recuadro se refiere al intervalo definido por los percentiles 25° y 75°. Se realizó un análisis similar con muestras leucémicas archivadas (véanse los resultados);

la figura 39 ilustra la comparación de la expresión de los tres transcritos de CG en muestras leucémicas archivadas en el diagnóstico según el FG. a) ABL, b) B2M, c) GUS. Se combinaron los datos de las muestras de BM y PB por transcrito de FG. En la esquina superior derecha, el resultado del modelo lineal global según el transcrito de FG. La línea en negrita corresponde a la mediana de los valores. El recuadro se refiere al intervalo definido por los percentiles 25° y 75°. En la red de TEL-AML1, sólo se sometieron a prueba 30 de 57 muestras para determinar la expresión del transcrito de GUS;

la figura 40 ilustra la correlación entre los tres CG seleccionados de EAC. a) En muestras recientes normales, b) en muestras de leucemia. Los resultados aparecen globalmente más extendidos en las muestras de leucemia en comparación con las muestras normales. Esta observación podría estar relacionada con el aumento del número de muestras (184 frente a 126) y laboratorios (14 frente a 6) incluidos, y a una heterogeneidad eficaz de la expresión de CG; y

la figura 41 ilustra la monitorización longitudinal de MRD de un paciente positivo para MLL-AF4 usando los conjuntos de RQ-PCR ABL y MLL-AF4 de EAC. El tiempo 0 era el diagnóstico, el tiempo 12 era la recidiva citológica. En valor en el diagnóstico es 1 (100%) y los resultados positivos de FG posteriores se expresan con respecto a la muestra de diagnóstico. Cuatro meses tras el diagnóstico, la muestra de PB se degradó claramente (valor de Ct de ABL: 32,3, CN de ABL: 257). Aunque el resultado aparece en la figura, debe tenerse cuidado en la interpretación de este resultado negativo. El cálculo se realizó según los métodos de $\Delta\Delta Ct$ y NCN encontrados en la tabla 40. Ambos métodos de cálculo conducen a resultados similares tanto para el valor de MRD como para la sensibilidad, por consiguiente sólo se muestra un gráfico.

ES 2 337 301 T3

TABLA 1

Optimización de la detección de los principales transcritos de gen de fusión en leucemias

Aberración cromosómica	Diana de PCR	Controles positivos	
		Líneas celulares ^a	Pacientes ^b
t(1;19) (q23;p13)	E2A-PBY1	697	+
t(4;11) (q21;q23)	MLL-AF4	RS4;11, MV4-1'1, ALL-PO	+
T(12;21) (p13;q22)	TEL-AML1	REH	+
t(9;22) (q34;q11)	BCR-ABL m-bcr	TOM-1	+
t(9;22) (q34;q11)	BCR-ABL M-bcr	K-562	+
del(1) (p32p32)	SIL-TAL1	CEM, RPMI8402 ^a	+
T(15;17) (q22;q21)	PML-RARA	NB-4	+ ^c
inv(16) (p13q22)	CBFB-MYH11	ME-1	+ ^c
t(8;21) (q22;q22)	AML1-ETO	KASUMI-1	+
-	Genes de control	HL-60, RS4;11	+
^a Se enumeran las líneas celulares usadas durante la fase I a IVa; para la diana SIL-TAL, se han sometido a prueba otras cuatro líneas celulares durante la fase IVb únicamente (tabla 2), ^b muestras de diagnóstico analizadas durante la fase IVb, ^c para PML-RARA bcr2, bcr3 y CBFB-MYH11 tipo D y tipo E, también se han analizado muestras de pacientes en las fases anteriores.			

TABLA 2

Fases con tareas de trabajo

Periodo	Tarea(s) de trabajo	Material distribuido
Fase I	Entrenamiento	Diluciones de ARN
Fase II	Optimización	Diluciones de plásmido, diluciones de ARN
Fase IIa	Validación final	Diluciones de plásmido, diluciones de ARN y ADNc
	QC1	3 muestras de ARN codificadas (negativa, 10 ⁻³ , 10 ⁻⁴)
Fase IIIb	Ensayo aleatorizado	Diluciones de plásmido
	QC2	5 muestras de ARN codificadas (2 negativas, 10 ⁻¹ , 10 ⁻³ , 10 ⁻⁴)
Fase IVa	Experimentos con E. coli	Diluciones de plásmido
	QC3	5 muestras de ARN codificadas (2 negativas, pura, 10 ⁻⁴ , aleatoria)
Fase IVb	Pruebas en pacientes	Diluciones de plásmido

ES 2 337 301 T3

TABLA 3

Protocolos de RQ-PCR y RT de EAC normalizados

1. Reacción de RT ^a	
■	1 µg de ARN total en 10 µl de H ₂ O
■	Incubar a 70°C durante 10 min.
■	enfriar en hielo y añadir otros reactivos hasta un volumen final de 20 µl de transcriptasa inversa (o bien de MMLV o bien Superscript I o II): 100 U
	tampón RT (según la RTasa usada)
	dNTP: 1 mM
	DTT: 10 mM
	Hexámeros aleatorios: 25 µM
	Inhibidor de ARNasa: 20 U
■	Incubar posteriormente a: temperatura ambiente durante 10 min. 42°C durante 45 min. 99°C durante 3 min.
■	Colocar la muestra a 4°C tras la etapa de RT
■	Diluir el ADNc final con 30 µl de H ₂ O
2. Reacción de RQ-PCR ^a	
■	Volumen final: 25 µl
■	5 µl de ADNc final (100 ng de equivalente de ARN)
■	Cebadores: 300 nM cada uno
	Sonda: 200 nM excepto para la sonda de <i>AML1-ETO</i> (100 nM)
■	Mezcla maestra: 12,5 µl (IX)
	Incubar la muestra: A 50°C durante 2 min. A 95°C durante 10 min. Seguido por 50 ciclos: 95°C durante 15 s. 60°C durante 1 min.
3. Procedimiento normalizado para el análisis de los datos	
■	Fijar el umbral a 0,1 excepto para <i>PML-RARA</i> (0,05)
■	Fijar la línea base entre el ciclo 3 y el 15 excepto para <i>B2M</i> (3-10).
^a Todas las concentraciones mencionadas son para el volumen final de la reacción	

ES 2 337 301 T3

TABLA 4

Resultados observados para los conjuntos de cebador y sonda de EAC seleccionados

Dianas de gen de fusión (n = 15)	Dilución de ARN (log)	Dilución de plásmido (número de copias)
Sensibilidad	-4 / -5	10 moléculas
Reproducibilidad	-3 / -4 CV(Ct) < 6%	10 moléculas ^a CV(Ct) < 4% ^b
Robustez, Pendiente de ΔRn	>1 3,45 $\pm$ 0,3	>1 3,3 $\pm$ 0,3
Los criterios del EAC se definen en la sección de Material y métodos. ^a 100 moléculas sólo para las variantes de FR (sometidas a prueba únicamente durante la fase IIIa): <i>PML-RARA</i> bcr2 y bcr3, <i>CBFB-MYH11</i> tipo D y E, ^b CV de las 10 copias de plásmido. El CV fue inferior al 2,5% para las otras diluciones.		

TABLA 5

Secuencias y posiciones de los cebadores y la sonda de *E2A-PBX1*

Código de EAC ^a	Ubicación del cebador/sonda	Posición de 5'-3' (tamaño)	Secuencia 5'-3'
ENF101	<i>E2A</i>	1436-1454 (19)	CCAGCCTCATGCACAACCA
ENP141	<i>E2A</i>	1481-1502 (22)	<u>CCCTCCCTGACCTGTCTCGGCC</u>
ENR161	<i>PBX1</i>	409-389 (21)	GGGCTCCTCGGATACTCAAAA

^a ENF = cebador directo, ENP = sonda TaqMan, la secuencia subrayada se usó como sonda MGB, ENR = cebador inverso, ^b posiciones según los números de registro M31222 (*E2A*) y M86546 (*PBX1*).

ES 2 337 301 T3

TABLA 6

Valores de expresión del transcrito de FG E2A-PBX1 en la línea celular 697 y en pacientes en el diagnóstico (fase IV)

Muestras	Valores de Ct				NCN de E24-PBX1		
	E2A-PBX1	ABL	B2M	GUS	por ABL	por 100 B2M	por GUS
Línea celular							
697	20,6	24,3	19,4	25,4	5,0	33,9	9,0
Pacientes	20,7	24,4	20,2 ^a	24,9	7,6	44,6 ^a	8,9
BM	[18,4-	[22,6-	[16,7-	[22,3-	[2,1-	[10,5-	[1,6-
(n = 14)	22,6]	28,2]	22,5]	27,7]	19,5]	101,0]	17,8]
PB	21,0	25,2	19,5	25,8	9,4	42,7	13,6
(n = 13)	[18,0-	[22,9-	[16,1-	[22,8-	[3,8-	[2,2-	[2,5-
	22,6]	28,5]	22,6]	26,3]	72,4]	115,9]	67,6]
Coef. de Corr.					0,83	0,62	0,66

^a un valor no estuvo disponible en una muestra de BM de las 14 para B2M. Para las muestras de los pacientes y las líneas celulares, se indica la mediana de los valores [intervalo del 95%].

TABLA 7

Resultados de las rondas de QC para la detección del transcrito de FG E2A-PBX1 (fases III y IV)

Fase de QC	Falsa negatividad		Falsa positividad	
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	Control neg. de FG	NAC / NTC
IIIa	0% (0/8)	0% (0/8)	0% (0/8)	0%(0/16)
IIIb	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/20)	0% (0/20) ^b
IVa	ND	0% (0/8) ^a	0% (0/16)	0%(0/16)
Todas las fases	0% (0/18)	0% (0/26)	0% (0/44)	0%(0/52)

Los resultados son proporciones de muestras falsas positivas o negativas. 10⁻³ y 10⁻⁴ son diluciones de ARN del ARN de la línea celular ACC42 en ARN de HL60. ^a 23 de 24 pocillos fueron positivos, ^b 57 de 60 pocillos fueron negativos.

ES 2 337 301 T3

TABLA 8

Secuencias y posiciones de los cebadores y la sonda de MLL-AF4

Código de EAC ^a	Ubicación del cebador/sonda ^b	Posición de 5'-3' (tamaño)	Secuencia 5'-3'
ENF207	MLL	4050-4074 (25)	CCCAAGTATCCCTGTAAAACAAAAA
ENF208	MLL	4186-4208 (23)	GATGGAGTCCACAGGATCAGAGT
ENP242	AF4	1517-1538 (22)	<u>CATGGCCGCCTCCTTTGACAGC</u>
ENR262	AF4	1581-1560 (22)	GAAAGGAACTTGGATGGCTCA

^a ENF = cebador directo, ENP = sonda TaqMan, la secuencia subrayada se usó como sonda MGB, ENR = cebador inverso, ^b posiciones según los números de registro L04284 (MLL) y L13773 (AF4).

TABLA 9

Valores de expresión del transcrito de FG MLL-AF4 en líneas celulares y en pacientes en el diagnóstico (fase IV)

Muestras	Valores de Ct				Valores de NCN de MLL-AF4		
	MLL-AF4	ABL	B2M	GUS	por ABL	por 100 B2M	por GUS
Líneas celulares							
RS4;11	24,4	23,1	19,5	22,8	0,35	4,4	0,29
MV4-11	25,4	23,9	20,6	24,2	0,56	9,3	0,63
ALL-PO	24,7	23,1	19,7	23,0	0,62	9,3	0,59
Pacientes							
BM	[24,7-	[23,1-	[17,2-	[21,3-	[0,09-	[0,07-	[0,04-
(n = 14)	29,6]	26,1]	22,0]	25,7]	0,98]	8,3]	0,65]
Pacientes							
PB	[23,8-	[22,9-	[18,9-	[21,6-	[0,16-	[0,32-	[0,09-
(n = 8)	31,0]	29,4]	22,6]	27,9]	0,91]	2,9]	0,58]
Coef. de Corr.					0,79	0,67	0,76

Para las muestras de los pacientes y las líneas celulares, se indica la mediana de los valores [intervalo del 95%].

ES 2 337 301 T3

TABLA 10

Resultados de las rondas de QC para la detección del transcrito de FG MLL-AF4 (fases III y IV)

Fase de QC	Falsa negatividad		Falsa positividad	
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	Control neg. de FG	NAC / NTC
IIIa	5% (1/21)	10% (2/21)	0% (0/21)	5% (2/42) ^b
IIIb ^a	9% (1/11)	9% (1/11)	0% (0/22)	0% (0/22)
IVa	0% (0/23)	9% (2/23)	2% (1/46)	9% (2/23) ^b
Todas las fases	3,6% (2/55)	9% (5/55)	1,1% (1/89)	4,6% (4/87)

Los resultados son proporciones de muestras falsas positivas o negativas. 10⁻³ y 10⁻⁴ son las diluciones de ARN de un ARN de la línea celular positiva para MLL-AF4 en un ARN negativo (PBMNC). ^a Sólo RS4; se sometieron a prueba 11 durante la fase IIIb, ^b para las muestras de NAC y NTC, sólo un pocillo de 2 fue positivo en cada caso.

TABLA 11

Secuencias y posiciones de los cebadores y la sonda de TEL-AML1

Código de EAC ^a	Ubicación del cebador/sonda ^b	Posición de 5'-3' (tamaño)	Secuencia 5'-3'
ENF301	TEL	984-1002 (19)	CTCTGTCTCCCCGCCTGAA
ENPr341	TEL	1024-1005 (20)	<u>TCCCAATGGGCATGGCGTGC</u>
ENR361	AML1	557-542 (16)	CGGCTCGTGCTGGCAT

^a ENF = cebador directo, ENPr = sonda inversa TaqMan (con el fin de seleccionar la hebra rica en C), la secuencia subrayada se usó como sonda MGB, ENR = cebador inverso, ^b posiciones según los números de registro U11732 (TEL) y D43969 (AML1).

ES 2 337 301 T3

TABLA 12

Valores de expresión del transcrito de FG TEL-AML1 en la línea celular y en pacientes en el diagnóstico (fase IV)

Muestras	Valores de Ct				NCN de <u>TEL-AML1</u> ^a		
	<u>TEL-AML1</u>	<u>ABL</u>	<u>B2M</u>	<u>GUS</u> ^b	por <u>ABL</u>	por 100 <u>B2M</u>	por <u>GUS</u> ^b
Línea celular							
REH	21,7	23,4	18,7	23,5	3,2	27	2,5
Pacientes	22,6	25,5	19,2	25,2	4,45	23	3,19
BM	[20,0-	[23,5-	[18,0-	[23,7-	[0,46-	[0,63-	[0,27-
(n = 30)	27,9]	27,7]	23,0]	27,3]	32,7]	132]	10,3]
PB	23,9	25,4	19,1	25,2	4,71	12	2,63
(n = 27)	[21,6-	[24,4-	[17,9-	[24,5-	[0,20-	[0,39-	[0,50-
	27,9]	28,3]	22,7]	26,3]	15,2]	99]	9,0]
Coef. de Corr.					0,66	0,42	0,66

^a Corregido según el porcentaje de blastocitos en la muestra, ^b sólo se sometieron a prueba 13 muestras de sangre periférica y 17 de médula ósea para GUS. Para las muestras de los pacientes y las líneas celulares, se indica la mediana de los valores [intervalo del 95%].

TABLA 13

Resultados de las rondas de QC para la detección del transcrito de FG TEL-AML1 (fases III y IV)

Fase	Falsa negatividad			Falsa positividad	
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	5.10 ⁻⁵	Control neg. de FG	NAC / NTC
IIIa	0% (0/7)	0% (0/7)	ND	0% (0/14)	0% (0/14)
IIIb	0% (0/11)	0% (0/11)	ND	9% (2/22)	0% (0/22)
IVa	ND	0% (0/7)	0% (0/7)	7% (1/14)	0% (0/7)
Todas las fases	0% (0/18)	0% (0/25)	0% (0/7)	6% (3/50)	0% (0/43)

Los resultados son proporciones de muestras falsas positivas o negativas. 10⁻³, 10⁻⁴ y 5.10⁻⁵ son las diluciones de ARN del ARN de la línea celular REH en un ARN negativo.

ES 2 337 301 T3

TABLA 14

Secuencias y posiciones de los cebadores y la sonda de BCR-ABL m-bcr

Código de EAC^a	Ubicación del cebador/sonda^b	Posición de 5'-3' (tamaño)	Secuencia 5'-3'
ENF402	BCR	1727-1744 (18)	CTGGCCCAACGATGGCGA
ENP541	ABL	230-254 (25)	CCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGA
ENR561	ABL	277-257 (21)	CACTCAGACCCTGAGGCTCAA

^a ENF = cebador directo, ENP = sonda TaqMan, la secuencia subrayada se usó como sonda MGB, ENR = cebador inverso, ^b posiciones según los números de registro X02596 (BCR) y X16416 (ABL).

TABLA 15

Valores de expresión del transcrito de FG BCR-ABL m-bcr en la línea celular y en los pacientes con ALL en el diagnóstico (fase IV)

Valores de Ct					Valores de NCN de BCR-ABL		
Muestras	BCR-ABL m-bcr	ABL^a	B2M	GUS	por ABL^a	por 100 B2M	por GUS
Línea celular							
TOM-1	22,8	21,8	18,1	23,8	0,44	4,69	1,59
Pacientes							
BM	[21,3-	[21,7-	[16,6-	[22,1-	[0,35-	[0,58-	[0,24-
(n = 17)	27,1]	27,1]	22,1]	28,9]	1,38]	26,3]	16,6]
PB	23,6	22,7	18,2	24,5	0,68	3,36	1,63
(n = 7)	[21,1-	[21,0-	[15,3-	[21,5-	[0,39-	[0,03-	[0,18-
	29,1]	27,0]	19,5]	25,5]	1,81]	13,75]	9,34]
Coef. de Corr.					0,96	0,82	0,80

^a El conjunto de RQ-PCR para ABL de EAC puede amplificar tanto transcritos de BCR-ABL como de ABL. Por tanto, los valores resultan afectados por la presencia del FG. Para las muestras de los pacientes y las líneas celulares, se indica la mediana de los valores [intervalo del 95%].

ES 2 337 301 T3

TABLA 16

Resultados de las rondas de QC para la detección del transcrito de FG BCR-ABL m-bcr (fases III y IV)

Fase de QC	Falsa negatividad		Falsa positividad	
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	Control neg. de FG	NAC / NTC
IIIa	0% (0/24)	0% (0/24)	13% (3/24)	8% (5/64)
IIIb	0% (0/30)	0% (0/30)	5% (3/60)	5% (2/42)
IVa	ND	14% (3/21)	0% (0/42)	0% (0/14)
Todas las fases	0% (0/54)	4% (3/75)	4,8% (6/126)	5,8% (7/120)

Los resultados son proporciones de muestras falsas positivas o negativas.
10⁻³ y 10⁻⁴ son las diluciones de ARN de la línea celular TOM-1 positiva para BCR-ABL m-bcr en ARN de HL-60.

TABLA 17

Secuencias y posiciones de los cebadores y la sonda de BCR-ABL M-bcr

Código de EAC ^a	Ubicación del cebador/sonda ^b	Posición de 5'-3' (tamaño)	Secuencia 5'-3' ^c
ENF501	BCR	3173-3193 (21)	TCCGCTGACCATCAAYAAGGA
ENP541	ABL	230-254 (25)	CCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGA
ENR561	ABL	277-257 (21)	CACTCAGACCCTGAGGCTCAA

^a ENF = cebador directo, ENP = sonda TaqMan, la secuencia subrayada se usó como sonda MGB, ENR = cebador inverso, ^b posiciones según los números de registro X02596 (BCR) y X16416 (ABL).
^c Y (citidina o timidina) aparece en el cebador de BCR según el polimorfismo descrito recientemente en el gen BCR. ⁵²

ES 2 337 301 T3

TABLA 18

Valores de expresión del transcrito de FG *BCR-ABL M-bcr* en la línea celular y en los pacientes con CML en el diagnóstico (fase IV)

Muestras	Valores de Ct				NCN de <i>BCR-ABL</i>		
	<i>BCR-ABL M-bcr</i>	<i>ABL</i> ^a	<i>B2M</i>	<i>GUS</i>	por <i>ABL</i> ^a	por 100 <i>B2M</i>	por <i>GUS</i>
Línea celular K-562							
	20,5	20,7 ^b	20,6	21,5	1,0	155 ^b	0,79
Pacientes	25,1	25,2	18,1	22,4	0,86	0,95	0,12
BM	[21,5-	[20,7-	[15,9-	[21,6-	[0,44-	[0,43-	[0,04-
(n = 15)	27,0]	26,8]	21,5]	27,9]	3,0]	5,3]	0,87]
PB	23,1	23,7	17,6	21,7	1,17	2,8	0,22
(n = 14)	[21,9-	[22,6-	[16,8-	[20,7-	[0,48-	[0,56-	[0,08-
	25,8]	26,7]	21-5]	24,8]	4,4]	6,2]	0,41]
Coef. de Corr.					0,81	0,63	0,76

^a El conjunto de RQ-PCR para *ABL* de EAC puede amplificar tanto transcritos de *BCR-ABL* como de *ABL*. Por tanto, los valores resultan afectados por la presencia del FG. Se encontraron valores de hasta 3,0 en las muestras de BM y de hasta 4,4 en las muestras de PB de pacientes con CML en el diagnóstico. Estos resultados inesperados se obtuvieron con una curva patrón de plásmido y sin curva patrón. ^b La línea celular K-562 se sometió a prueba en dos cultivos independientes para confirmar los resultados. Para las muestras de los pacientes y las líneas celulares, se indica la mediana de los valores [intervalo del 95%].

TABLA 19

Valores de expresión del transcrito de FG *BCR-ABL M-bcr* en los pacientes con ALL en el diagnóstico (fase IV)

Muestras	Valores de Ct				NCN de <i>BCR-ABL</i>		
	<i>BCR-ABL M-bcr</i>	<i>ABL</i> ^a	<i>B2M</i>	<i>GUS</i>	por <i>ABL</i> ^a	por 100 <i>B2M</i>	por <i>GUS</i>
Pacientes	24,1	24,0	19,0	24,8	0,71	4,90	1,15
BM y PB^a	[21,5-	[21,6-	[16,3-	[20,9-	[0,13-	[0,14-	[0,03-
(n = 17)	29,9]	26,4]	20,5]	27,1]	1,93]	19,5]	3,89]
Coef. de Corr.					0,90	0,56	0,60

^a El conjunto de RQ-PCR para *ABL* de EAC puede amplificar tanto transcritos de *BCR-ABL* como de *ABL*. Por tanto, los valores resultan afectados por la presencia del FG. Para las muestras de los pacientes, se indica la mediana de los valores [intervalo del 95%].

ES 2 337 301 T3

TABLA 20

Resultados de las rondas de QC para la detección del transcrito de FG BCR-ABL M-bcr (fases III y IV)

Fase de QC	Falsa negatividad		Falsa positividad	
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	Control neg. de FG	NAC / NTC
IIIa	0% (0/11)	9% (1/11)	9% (1/11)	4% (5/120)
IIIb	0% (0/11)	9% (1/11)	5,5% (1/22)	5% (7/132) ^a
IVa	0% (0/11)	0% (0/11)	18% (4/22)	2% (2/88)
Todas las fases	0% (0/33)	6,1% (2/33)	10,9% (6/55)	4,1% (14/340)

Los resultados son proporciones de muestras falsas positivas o negativas. 10⁻³ y 10⁻⁴ son las diluciones de ARN del ARN de la línea celular K-562 en un ARN negativo. ^a Un laboratorio tuvo todos sus NAC+NTC contaminados, contribuyendo así al 50% de resultados falsos positivos.

TABLA 21

Secuencias y posiciones de los cebadores y la sonda de SIL-TAL1

Código de EAC ^a	Ubicación del cebador/sonda ^b	Posición de 5'-3' (tamaño)	Secuencia 5'-3'
ENF601	SIL	85-103 (19)	CGCTCCTACCCTGCAAACA
ENP641	SIL	105-126 (22)	ACCTCAGCTCCGCGGAAGTTGC
ENR664	TAL1	148-130 (19)	CCGAGGAAGAGGATGCACA

^a ENF = cebador directo, ENP = sonda TaqMan, la secuencia subrayada se usó como sonda MGB, ENR = cebador inverso, ^b posiciones según los números de registro M74558 (SIL) y S53245 (TAL1).

ES 2 337 301 T3

TABLA 22

Valores de expresión del transcrito de FG SIL-TAL1 en líneas celulares y en pacientes en el diagnóstico (fase IV)

Muestras	Valores de Ct				NCN de <u>SIL-TAL1</u> ^a		
	<u>SIL-TAL1</u>	<u>ABL</u>	<u>B2M</u>	<u>GUS</u>	por <u>ABL</u>	por 100 <u>B2M</u>	por <u>GUS</u>
Líneas celulares ^b							
CEM	26,1	23,3	20,6	22,9	0,12	1,38	0,07
ALL1	25,4	21,4	16,9	21,2	0,11	0,79	0,09
Molt-15	28,3	24,2	18,0	23,2	0,10	0,27	0,06
Molt-16	26,0	21,7	16,6	22,1	0,08	0,45	0,11
HSB-2	25,5	24,4	19,5	24,2	0,41	3,47	0,44
PF382	26,1	21,5	16,7	22,2	0,07	0,47	0,11
Pacientes	27,1	24,3	19,7	24,5	0,12	1,24	0,15
BM	[25,2-	[22,2-	[17,4-	[22,9-	[0,02-	[0,03-	[0,02-
(n = 10)	29,4]	25,0]	21,1]	25,3]	0,23]	4,86]	0,44]
PB	28,4	24,3	19,3	24,7	0,09	0,86	0,12
(n = 10)	[26,5-	[23,6-	[17,1-	[23,8-	[0,02-	[0,05-	[0,01-
	29,4]	25,9]	20,8]	25,2]	0,21]	3,28]	0,26]
Coef. de Corr.					0,68	0,19 ^c	0,57

^a Corregido según el porcentaje de blastocitos en la muestra, ^b la línea celular CEM se analizó por duplicado en 8 laboratorios, mientras que las otras líneas celulares se analizaron por duplicado en laboratorios individuales, ^c sin correlación significativa. Para las muestras de los pacientes y las líneas celulares, se indica la mediana de los valores [intervalo del 95%].

TABLA 23

Resultados de las rondas de QC para la detección del transcrito de FG SIL-TAL1 (fases III y IV)

Fase de QC	Falsa negatividad		Falsa positividad	
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	Control neg. de FG	NAC / NTC
IIIa	14% (1/7) ^a	43% (3/7) ^a	0% (0/8)	0% (0/64)
IIIb	0% (0/10) ^a	0% (0/10) ^a	5% (1/22)	0% (0/66)
IVa	0% (0/8)	0% (0/8)	6% (1/16)	0% (0/32)
Todas las fases	4% (1/25)	12% (3/25)	4,3% (2/46)	0% (0/162)

Los resultados son proporciones de muestras falsas positivas o negativas. 10⁻³ y 10⁻⁴ son las diluciones de ARN de una línea celular positiva para SIL-TAL1 (CEM o Molt-15) en una muestra de ARN negativo (HL-60 o PBMNC). NEG: ARN negativo (ARNm de HL-60, ARNm de U937 o ARN de PBMNC). ^a Se excluyó una muestra debido a valores de Ct de ABL >29.

ES 2 337 301 T3

TABLA 24

Secuencias y posiciones de los cebadores y la sonda de PML-RARA

Código de EAC ^a	Ubicación del cebador/sonda ^b	Posición de 5'-3' (tamaño)	Secuencia 5'-3'
ENF903	PML	1690-1708 (19)	TCTTCCTGCCCAACAGCAA
ENF906	PML	1642-1660 (19)	ACCTGGATGGACCGCCTAG
ENF905	PML	1198-1216 (19)	CCGATGGCTTCGACGAGTT
ENP942	RARA	439-458 (20)	AGTGCCCGAGCCCTCCCTCGC
ENR962	RARA	485-465 (21)	GCTTGTAGATGCGGGGTAGAG

^a ENF = cebador directo, ENP = sonda TaqMan, la secuencia subrayada se usó como sonda MGB, ENR = cebador inverso, ^b Posiciones según los números de registro M73778 (PML) y X06538 (RARA).

TABLA 25

Valores de expresión del transcrito de FG PML-RARA en la línea celular NB-4 y en los pacientes bcr1 en el diagnóstico (fase IV)

Muestras	Valores de Ct				NCN de PML-RARA		
	PML-RARA	ABL	B2M	GUS	por ABL	por 100 B2M	por GUS
Línea celular							
NB-4	24,7	23,7	17,1	22,0	0,2	0,4	0,1
Pacientes							
BM	[23,1-	[21,7-	[16,0-	[20,3-	[0,09-	[0,19-	[0,02-
(n = 14)	27,5]	28,5]	24,9]	26,7]	1,82]	3,18]	0,56]
PB	25,7	24,6	17,9	23,0	0,36	0,26	0,05
(n = 9)	[23,7-	[22,0-	[16,5-	[20,6-	[0,11-	[0,07-	[0,02-
	29,4]	27,4]	20,0]	25,4]	0,78]	0,60]	0,13]
Coef. de Corr.					0,80	0,54	0,73

Para las muestras de los pacientes y las líneas celulares, se indica la mediana de los valores [intervalo del 95%]. La línea celular NB-4 se analizó por triplicado (FG) o por duplicado (CG) en 2 laboratorios.

ES 2 337 301 T3

TABLA 26

Resultados de las rondas de QC para la detección del transcrito de FG *PML-RARA bcr1* (fases III y IV)

Fase de QC	Falsa negatividad		Falsa positividad	
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	Control neg. de FG	NAC / NTC
IIIa	0% (0/7)	0% (0/7)	29% (2/7)	7,1% (2/28)
IIIb	0% (0/11)	0% (0/11)	4,5% (1/22)	0% (0/44)
IVa	0% (0/11)	0% (0/10)	13% (2/16)	11% (3/28)
Todas las fases	0% (0/29)	0% (0/28)	11% (5/45)	5% (5/100)

Los resultados son proporciones de muestras falsas positivas o negativas.
10⁻³ y 10⁻⁴ son las diluciones de ARN de la línea celular NB-4 en un ARN negativo.

TABLA 27

Secuencias y posiciones de los cebadores y la sonda de *CBFB-MYH11*

Código de EAC ^a	Ubicación del cebador/sonda ^b	Posición de 5'-3' (tamaño)	Secuencia 5'-3'
ENF803	CBFB	389-410 (22)	CATTAGCACAAACAGGCCTTTGA
ENPr843	CBFB	434-413 (22)	TCGCGTGTCCTTCTCCGAGCCT
ENR862	MYH11	1952-1936 (17)	AGGGCCCGCTTGGACTT
ENR863	MYH11	1237-1217 (21)	CCTCGTTAAGCATCCCTGTGA
ENR865	MYH11	1038-1016 (23)	CTCTTTCTCCAGCGTCTGCTTAT

^a ENF = cebador directo, ENPr = sonda inversa TaqMan (con el fin de seleccionar la hebra rica en C), la secuencia subrayada se usó como sonda MGB, ENR = cebador inverso, ^b posiciones según los números de registro L20298 (CBFB) y D10667 (MYH11).

ES 2 337 301 T3

TABLA 28

Valores de expresión del transcrito de FG CBFB-MYH11 en la línea celular y en los pacientes en el diagnóstico (fase IV)

Muestras	Valores de Ct				Valores de NCN de CBFB-MYH11		
	CBFB-MYH11	ABL	B2M	GUS	por ABL	por 100 B2M	por GUS
Línea celular							
ME-1	24,7	25,1	19,4	19,4	0,90	4,64	0,40
Pacientes	24,8	25,0	18,8	23,3	1,35	3,98	0,42
Tipo A ^a	[22,2-	[22,5-	[16,3-	[21,6-	[0,13-	[1,45-	[0,07-
(n = 24)	27,8]	27,7]	24,0]	26,8]	14,8]	447]	4,57]
Tipo D ^b	24,4	24,2	19,2	24,2	1,0	4,0	0,32
(n = 3)	[24,0-	[24,2-	[18,6-	[22,4-	[0,78-	[3,0-	[0,25-
	25,7]	26,0]	19,8]	24,6]	1,07]	4,7]	0,55]
Tipo E ^c	26,0	25,6	19,2	24,2	0,88	2,1	0,35
(n = 4)	[25,2-	[23,7-	[18,2-	[23,5-	[0,62-	[0,72-	[0,21-
	28,4]	27,0]	19,5]	25,7]	1,55]	2,57]	0,37]
Coef. de Corr.					0,76	0,65	0,76

^a Conjunto ENF803 - ENR862 - ENP843, ^b ENF803 - ENR863 -ENP843, ^c conjunto ENF803 - ENR865 - ENP843. Debido a las pocas muestras de PB (n = 4), los datos se han analizado según el tipo de transcrito. Para las muestras de los pacientes y las líneas celulares, se indica la mediana de los valores [intervalo del 95%].

TABLA 29

Resultados de las rondas de QC para la detección del transcrito de FG CBFB-MYH11 (fases III y IV)

Fase de QC	Falsa negatividad		Falsa positividad	
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	Control neg. de FG	NAC / NTC
IIIa	0% (0/14)	7% (1/14)	0% (0/7)	0% (0/28)
IIIb	0% (0/11)	18% (2/11)	0% (0/22)	0% (0/44)
IVa	ND	13% (1/8)	6,3% (1/16)	0% (0/32)
Todas las fases	0% (0/25)	12% (4/33)	2,2% (2/45)	0% (0/104)
Los resultados son proporciones de muestras falsas positivas o negativas. 10 ⁻³ y 10 ⁻⁴ son las diluciones de ARN de la línea celular ME-1 en un ARN negativo.				

ES 2 337 301 T3

TABLA 30

Secuencias y posiciones de los cebadores y la sonda de AML1-ETO

Código de EAC ^a	Ubicación del cebador/sonda ^b	Posición de 5'-3' (tamaño)	Secuencia 5'-3'
ENF701	AML1	1005-1026 (22)	CACCTACCACAGAGCCATCAAA
ENP747	AML1	1049-295 (30)	<u>AACCTCGAAATCGTACTGAGA</u> AGCACTCCA ^c
ENR761	ETO	318-297 (22)	ATCCACAGGTGAGTCTGGCATT

^a ENF = cebador directo, ENP = sonda TaqMan, la secuencia subrayada se usó como sonda MGB, ENR = cebador inverso, ^b posiciones según los números de registro D43969 (AML1) y D14289 (ETO), ^c: ubicación del punto de rotura.

TABLA 31

Valores de expresión del transcrito de FG AML1-ETO en la línea celular y en pacientes en el diagnóstico (fase IV)

Muestras	Valores de Ct				NCN de AML1-ETO		
	AML1-ETO	ABL	B2M	GUS	por ABL	por 100 B2M	por GUS
Línea celular							
KASUMI-1	22,2	26,2	23,3	24,1	5,46	80	1,42
Pacientes							
BM	[20,1-	[20,7-	[16,8-	[20,8-	[0,29-	[0,5-	[0,03-
(n = 10)	28,0]	27,7]	21,9]	26,7]	5,3]	38,9]	25,1]
PB	23,9	26,1	19,6	23,6	4,2	12,0	1,1
(n = 12)	[18,6-	[22,5-	[16,5-	[21,4-	[1,1-	[2,5-	[0,01-
	27,6]	28,6]	23,6]	27,4]	20,0]	33,1]	159]
Coef. de Corr.					0,81	0,80	0,44

Para las muestras de los pacientes y las líneas celulares, se indica la mediana de los valores [intervalo del 95%].

ES 2 337 301 T3

TABLA 32

Resultados de las rondas de QC para la detección del transcrito de FG AML1-ETO (fases III y IV)

Fase de QC	Falsa negatividad		Falsa positividad	
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	Control neg. de FG	NAC / NTC
IIIa	0% (0/21)	0% (0/21)	13% (1/8) ^a	8% (3/32)
IIIb	0% (0/11)	0% (0/11)	14% (3/22) ^b	0% (0/44)
IVa	0% (0/24)	0% (0/24)	25% (5/16) ^c	8% (3/32)
Todas las fases	0% (0/56)	0% (0/56)	20% (9/46)	5,6% (6/108)

Los resultados son proporciones de muestras falsas positivas o negativas. 10⁻³ y 10⁻⁴ son las diluciones de ARN de la línea celular KASUMI-1 en el ARN de HL-60. ^a La falsa positividad se debió a 3 duplicados falsos positivos en un único laboratorio. ^b La falsa positividad se debió a 3 únicos pocillos positivos en 3 laboratorios diferentes. ^c Dos laboratorios de doce constituyeron 4/5 muestras falsas positivas, contribuyendo así al 80% de la falsa positividad.

TABLA 33

Coefficientes de correlación obtenidos durante el ensayo aleatorizado equilibrado en muestras diluidas (fase IIIb)

Tipo de transcritos de fusión	E2A-PBX1	MLL-AF4	TEL-AML1	BCR-ABL	BCR-M-bcr	SIL-TAL1	PML-RARA	CBFB-MYH11	AML1-ETO
Ct de FG	-0,99	-0,78	-0,97	-0,98	-0,85	-0,84	-0,91	-0,86	-0,91
CN de FG	0,99	0,72	0,95	0,98	0,80	0,80	0,86	0,82	0,91
Delta Ct	-0,96	-0,74	-0,98	-0,99	-0,92	-0,86	-0,90	-0,88	-0,94
NCN de	0,96	0,91	0,98	0,98	0,98	0,99	0,98	0,97	0,93

ABL

Los coeficientes de correlación se calcularon en tres muestras de ARN positivas para FG diluidas. Los detalles aparecen en las figuras 31 y 32. En negrita, el/los valor(es) absoluto(s) más alto(s) observado(s).

ES 2 337 301 T3

TABLA 34

Resultados globales de las rondas de QC en muestras de ARN codificadas dentro de la red de EAC (fases III y IV)

Fase de QC ^a	Falsa negatividad		Falsa positividad	
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	Control neg. de FG	NAC / NTC
IIIa	1,7% (2/120)	4,6% (6/130)	6,5% (7/108)	4,2% (17/408)
IIIb	0,8% (1/119)	1,7% (2/116)	4,7% (11/234)	2,1% (9/436)
IVa	0% (0/77)	5% (6/120)	7,6% (15/198)	3,7% (10/272)
Todas las fases	1,0% (3/316)	3,8% (14/366)	6,0% (33/546) ^b	3,2% 36/1116)

Los resultados son proporciones de muestras falsas positivas o negativas. ^a

Durante la fase IIIb, las muestras codificadas se sometieron a prueba en laboratorios asignados aleatoriamente. ^b Se observaron resultados falsos positivos en las tres rondas de QC para las redes de BCR-ABL M-bcr, PML-RARA y AML1-ETO.

TABLA 35

Falsa positividad por red de FG durante las rondas de QC (fases III y IV)

Transcrito de fusión	Control neg. de FG	NAC/NTC
E2A-PBX1	0% (0/44)	0% (0/52)
ML1-AF4	1,1% (1/89)	4,6% (4/87)
TEL-AML1	6% (3/50)	0% (0/43)
BCR-ABL, m-bcr	4,8% (6/126)	5,8% (7/120)
BCR-ABL, M-bcr	10,9% (6/55)	4,1% (14/340)
SIL-TAL1	4,3% (2/46)	0% (0/162)
PML-RARA	11% (5/45)	5% (5/100)
CBFB-MYH11	2,2% (1/45)	0% (0/104)
AML1-ETO	20% (9/46)	5,6% (6/108)
Todos los FG	6,0% (33/546) ^a	3,2% (36/1116)

Los resultados son proporciones de muestras falsas negativas. ^a Cuando se excluye la red de AML1-ETO, la proporción disminuye hasta el 4,8% (24/500).

ES 2 337 301 T3

TABLA 36

Lista de los 14 genes constitutivos analizados en la primera ronda

CG candidatos				
Código	Nombre	Cromosoma	Valor de mediana de Ct	Motivo(s) para su exclusión
ARNr 18S ^a	18S Rna	12p12	14,5	Expresión muy alta
ABL ^{b, c}	Abelson	9q34	29,0 ^b 27,7 ^c	
PO ^a	Proteína ribosómica ácida	11p15	22,3	Pseudogenes
B2M ^{a, b}	Beta-2-microglobulina	15q21	20,7 ^a 21,6^b	
ACTB ^a	Beta-actina	7p15	20,5	Pseudogenes
GUS ^a	Beta-glucuronidasa	7q21	25,9	
CYC ^a	Ciclofilina	7p13	27,6	Pseudogenes
GAPDH ^a	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa	12q13	21,1	Pseudogenes
HPRT ^a	Hipoxantina fosforribosiltransferasa	Xq26	26,8	Ch(X)
PGK ^a	Fosfoglicerocinasa	Xq13	24,2	Ch(X)
PBGD ^b	Porfobilinógeno desaminasa	11q23	27,1	
PBGD2 ^b	Porfobilinógeno desaminasa 2	11q23	27,0	sitios de inicio de transcripción alternativo
TBP ^{a, b}	Factor de transcripción IID	6q27	30,0 ^a 25,7 ^b	Expresión baja ^a variable en PBMNC ^b
TFRC ^a	Receptor de transferrina	3q26	26,6	Expresión variable en células hematopoyéticas

^a Placa de control endógeno humano previamente desarrollada de Applied Biosystems (65 muestras sometidas a prueba). ^b Conjunto de cebador / sonda interno sometido a prueba (36 muestras sometidas a prueba). ^c Conjunto de cebador/sonda de EAC sometido a prueba (20 muestras sometidas a prueba). Las muestras se han sometido a prueba antes de tener condiciones optimizadas de RT y RQ-PCR. Por tanto, la mediana de los valores de Ct por CG podría diferir del posterior análisis extenso. En negrita, los genes seleccionados para la validación final.

ES 2 337 301 T3

TABLA 37

Secuencias de los tres conjuntos de RQ-PCR de CG seleccionados finalmente de EAC

Num. de reg. del gen	Código de EAC ^a	Secuencia (5'-3')	Posición en 5' (tamaño)
Abelson	ENF1003	TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGT	589 (31)
(ABL)	ENPr1043	Fam-CCATTTTGGTTTGGGCTTCACAGCATT- Tamra	684 (28)
M14752	ENR1063	GATGTAGTTGCTTGGGACCCA	712 (21)
bets-2-	ENF1302	GAGTATGCCTGCCGTGTG	302 (18)
microglobulina			
(B2M)	ENPr1342	Fam-CCTCCATGATGGTGCTTACATGTCTC- Tamra	388 (26)
NM_004048	ENR1362	AATCCAAATGCGGCATCT	411 (18)
Beta-	ENF1102	GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT	1759 (26)
glucuronidasa			
(GUS)	ENPr1142	Fam-CCAGCACTCTCGTCGGTGAAGTTCA- Tamra	1833 (26)
M15182	ENR1162	CCGAGTGAAGATCCCCCTTTT	1859 (22)
^a ENF = cebador directo, ENPr = sonda inversa TaqMan (con el fin de seleccionar la hebra rica en C), ENR = cebador inverso			

ES 2 337 301 T3

TABLA 38

Origen y tipo de muestras recientes de donantes normales y pacientes con leucemia durante la fase IVb

N.º de referencia del laboratorio	Donante normal				Muestras leucémicas en el diagnóstico						N.º de muestras
	PB	BM	PBSC	AML	AML	ALL	ALL	CML	CML		
				PB	BM	PB	BM	PB	BM		
1	11	5	7	6	9	6	7	8	6	65	
2	11		4		3			1	1	20	
3	11	1	1		3	9	4	5	3	37	
4	11			3	5	2	2			23	
5	18	9								27	
6	11	2	4	2	3	5	3			30	
7		9	9	4	2		2	1	2	29	
8						10	10			20	
9					1			14	4	19	
10					11		1		6	18	
11	1						7			8	
12				1	1		1	3	1	7	
13			1					5	1	7	
14				2	1	1		2		6	
N.º de muestras	74	26	26	18	39	33	37	39	24	316	
Entre las 316 muestras incluidas, se excluyeron seis debido a una escasa amplificación del plásmido de B2M (véase la sección Materiales y métodos).											

ES 2 337 301 T3

TABLA 39

Valores de referencia del nivel de expresión del transcrito en muestras normales y de leucemia para los tres CG seleccionados

Genes	Muestras	n	Mediana de Ct ^a [perc. 3 ^a -97 ^a]	Mediana de CN ^a [perc. 3 ^a -97 ^a]
ABL	Leucemia y Normal^a	310	24,9 [21,9-29,3]	18.000 [1,3x10 ³ -1,3x10 ⁵]
	Leucemia	184	18,7 [15,6-24,9]	550.000 [9,6x10 ⁻³ -4,3x10 ⁶]
B2M	PB y PBSC normales^a	100	17,2 [15,7-20,0]	1.600.000 [2,5x10 ⁵ -6,8x10 ⁶]
	BM normal	26	17,8 [16,7-22,9]	1.100.000 [2,9x10 ⁴ -2,0x10 ⁶]
	Leucemia	184	23,8 [20,8-28,0]	41.000 [2,8x10 ³ -3,2x10 ⁵]
GUS	BM y PBSC normales^a	52	23,0 [21,1-26,3]	66.000 [7,6x10 ⁻³ -2,0x10 ⁵]
	PB normal	74	24,5 [22,6-27,7]	22.000 [2,6x10 ³ -7,1x10 ⁴]
	Leucemia	184	23,8 [20,8-28,0]	41.000 [2,8x10 ³ -3,2x10 ⁵]

^a Los datos se han combinado según los resultados del análisis de comparaciones múltiples a posteriori.

TABLA 40

Fórmula de EAC para el cálculo del valor de MRD y la sensibilidad teórica basándose en conjuntos de RQ-PCR para FG y CG seleccionados de EAC

Parámetros	ΔΔ Método de Ct No se necesita curva patrón	Método de NCN curvas patrón de FG y CG
Valor de MRD (MRDv)	$10^{((\Delta Ct_{FUP} - \Delta Ct_{DX}) / -3,4)}$	$(FG_{CN} / CG_{CN})_{FUP}$ $(FG_{CN} / CG_{CN})_{DX}$
Sensibilidad (SENSv)	$10^{(40 - Ct_{CG, FUP} - \Delta Ct_{DX}) / -3,4}$	$CG_{CN, DX} / CG_{CN, FUP}$ $CG_{CN, FUP} \times FG_{CN, DX}$

DX: diagnóstico; FUP: seguimiento; NCN: número de copias normalizado; Ct_{CG}: Valor de Ct del CG; Ct_{FG}: Valor de Ct del FG; FG_{CN}: número de copias del gen de fusión, CG_{CN}: número de copias del gen de control. ΔCt_{FUP}: (Ct_{FG} - Ct_{CG}) durante el seguimiento, ΔCt_{DX}: (Ct_{FG} - Ct_{CG}) en el diagnóstico. Los valores 40 y -3,4 son, respectivamente, resultados experimentales para el valor de ordenada en el origen y la pendiente media observada en el programa de EAC para curvas patrón de plásmidos.

Descripción detallada de la presente invención

Organización

El objetivo de las fases I y II era la selección inicial de cebadores y sondas además de la formación de los miembros.

Durante la fase IIIa, se compararon diferentes curvas patrón (es decir, generadas usando plásmidos de ARN, ADNc o ADN) y se realizó la validación final de los conjuntos de cebador/sonda seleccionados dentro de redes específicas. En paralelo, los inventores realizaron su primera ronda de control de calidad (QC1).

Durante la fase IIIb, todos los laboratorios implicados emprendieron pruebas de los conjuntos de cebador/sonda para FG seleccionados, en muestras de control de calidad codificadas preparadas centralmente (QC2). Estas pruebas de las dianas del transcrito de FG se realizaron por laboratorios seleccionados aleatoriamente fuera de las redes del transcrito de FG originales.

Durante la fase IVa, se realizó la tercera ronda de control de calidad (QC3) incluyendo muestras de ARN de línea celular no diluidas.

Durante la fase IVb, se determinaron los valores de referencia de los niveles del transcrito de FG normalizados en muestras de pacientes y líneas celulares leucémicas usando el conjunto de cebador/sonda de EAC según el protocolo normalizado de EAC.

Además, se establecieron intervalos de referencia para los genes de control en sangre periférica (PB), médula ósea (BM) y células madre de PB normales en muestras recientes.

Material y métodos

Principio

Las tecnologías de RQ-PCR disponibles en la actualidad permiten la detección de la emisión de fluorescencia durante la reacción de PCR a partir de una (TaqManTM) o dos (Light Cycler) sondas de oligonucleótido internas, o un colorante fluorescente; siendo la fluorescencia detectada proporcional a la cantidad de diana presente en la muestra 7.

Se decidió ejecutar el protocolo de EAC usando la plataforma ABI 7700 con sondas TaqMan puesto que ésta era la primera tecnología de RQ-PCR robusta disponible que permitía el análisis de un gran número de muestras en una única ejecución (formato de placa de 96 pocillos). El ensayo de la nucleasa 5' (tecnología de TaqMan) usa una única sonda de oligonucleótido interna que lleva un fluoróforo indicador en 5' (por ejemplo FAM) y un fluoróforo extintor en 3' (por ejemplo TAMRA). Durante la fase de extensión, la sonda TaqMan se hidroliza mediante la actividad nucleasa de la Taq polimerasa, dando como resultado la separación de los fluorocromos indicador y extintor y en consecuencia un aumento en la fluorescencia (figura 1). En la tecnología TaqMan, el número de ciclos de PCR necesarios para detectar una señal por encima del umbral se denomina umbral de ciclo (Ct) y es directamente proporcional a la cantidad de diana presente al comienzo de la reacción (figura 2a). El ΔR_n corresponde al aumento en la intensidad de fluorescencia cuando se alcanza la fase de meseta. Usando patrones o calibradores con un número de moléculas conocido, puede establecerse una curva patrón y determinarse la cantidad precisa de diana presente en la muestra de prueba (figura 2b). La pendiente teórica de la curva patrón es -3,32 para una reacción de PCR con eficacia máxima. Usando una cantidad conocida de moléculas de ADN para la curva patrón, el punto de ordenada en el origen del eje Y define el número de ciclos teóricamente necesarios para detectar una molécula.

Dianas moleculares

Se diseñaron ensayos para detectar nueve genes de fusión asociados con la leucemia, incluyendo sus variantes de punto de rotura más comunes que dan lugar a 15 dianas de ARN: E2A-PBX1, MLL-AF4 (exón 9 - exón 5, exón 10 - exón 4 y exón 11 - exón 5 variantes), TEL-AML1, BCR-ABL (M-bcr y m-bcr), SIL-TAL1, PML-RARA (bcr1, bcr2 y bcr3), CBFB-MYH11 (tipo A, D y E) y AML1-ETO.

Además, se evaluaron 14 genes constitutivos para determinar su idoneidad para servir como genes de control para las variaciones de calidad de una muestra a otra y la cuantificación de la expresión génica. Finalmente se seleccionaron tres genes de control (ABL, B2M y GUS); los inventores analizaron la expresión del gen ABL durante las fases II-III y los tres genes de control seleccionados (ABL, B2M y GUS) durante fase IV.

Diseño de cebadores y sondas

Se diseñaron cebadores y sondas usando el software Primer Express (Applied Biosystems) basándose en su ubicación en dos exones separados y en la secuencia del amplicón generado por los conjuntos de cebador descritos en el programa BIOMED-1 (5). Se representan en el diagrama esquemático de la estructura de exón/intrón del FG correspondiente (véanse los ejemplos 1-9). Durante los dos primeros encuentros se realizó una selección inicial de cebadores y sondas; se evaluaron conjuntos recién diseñados para cada diana molecular, así como conjuntos "internos" ya dis-

ponibles procedentes de laboratorios experimentados. La selección de los conjuntos se basó en: 1) la ausencia de artefactos de amplificación no específicos; 2) una buena eficacia con una pendiente próxima a -3,32 (eficacia teórica del 100%); 3) una buena sensibilidad (al menos dilución 10^{-4} de ARN o 100 copias para dilución de plásmido); 4) la robustez de la reacción con un valor de $\Delta R_n > 1,0$ en la fase de meseta para las diluciones más altas (tabla 4). Tales resultados tenían que alcanzarse en al menos el 80% de los laboratorios participantes para que se seleccionara un conjunto de cebador/sonda particular. Los posibles conjuntos de cebador/sonda se sometieron a prueba en paralelo en diluciones en serie de líneas celulares y plásmidos, y se seleccionó el conjunto con el mejor perfil de rendimiento, particularmente en lo que se refiere a la sensibilidad. Si ninguno de los conjuntos de cebador/sonda satisfacía los criterios de selección, se diseñaban y evaluaban nuevos conjuntos. Globalmente, partiendo de 47 conjuntos de cebador y de 44 sondas que se sometieron a prueba durante las primeras fases, finalmente se seleccionaron 12 conjuntos de cebador y nueve sondas para las 15 dianas (véanse los diagramas en cada sección de los ejemplos). En cada caso, la sensibilidad del análisis de RQ-PCR basado en TaqMan parecía ser comparable al análisis de RT-PCR anidada previamente normalizado (5). En el gen BCR, aparece Y (citidina o timidina) en el cebador de BCR en la posición 3188, según el polimorfismo recientemente descrito.

En la selección de CG inicial, se usó una placa de control endógeno humano previamente desarrollada (facilitada amablemente por Applied Biosystems) que contenía conjuntos de cebador y sonda para 11 CG, tal como recomendaba el fabricante (tabla 36). Se analizaron seis conjuntos de cebador y sonda para CG adicionales, diseñados por laboratorios de EAC: un conjunto de EAC y uno interno para Abelson (ABL), un conjunto interno para beta-2-microglobulina (B2M), dos conjuntos de EAC para porfobilinógeno desaminasa (PBGD y PBGD2) y un conjunto interno para el factor de transcripción IID (TBP) (tabla 36). Tras la selección, el número de CG se redujo finalmente a tres, que se sometieron a análisis adicional (figura 34 y tabla 37). Se diseñaron cebadores y sondas de oligonucleótidos empleando el programa Primer Express 1.0 (Applied Biosystems) y el programa Oligo 6 (Molecular Biology Insights Inc., Cascade, CO, EE.UU.). Los conjuntos de cebador y sonda también se sometieron a prueba usando 100 ng de ADN genómico por PCR para confirmar que los ensayos eran específicos para ADNc.

ARN y ADNc de muestras de líneas celulares y leucemia en el diagnóstico

Se prepararon muestras de ARN y/o ADNc centralmente por los líderes de la red de FG (tabla 1) y se distribuyeron en nieve carbónica a los miembros de sus redes respectivas durante las fases I a IVa. Se usó comúnmente ARN de línea celular positiva para el transcrito de FG (véase la tabla 1 para comprobar las líneas celulares específicas), excepto para los transcritos de FG poco frecuentes (PML-RARA bcr2 y bcr3 y CBFB-MYH11 tipo D y E) para los que el líder de red facilitó el ARN del paciente. Estas muestras de ARN se diluyeron en ARN de linfocitos de PB (PBL) o ARN de línea celular negativa para el transcrito de FG. Las líneas celulares se adquirieron de DSMZ (Braunschweig, Alemania), ATCC (Manassas, VA, EE.UU.) o se facilitaron directamente por laboratorios académicos (TOM-1, ME-1 y PF382) y se pusieron en cultivo según las instrucciones de proveedor. Durante la fase III, los laboratorios líderes de la red prepararon series de diluciones equivalentes de ADNc. Durante la fase IVb, los ARN de las muestras de los pacientes, positivos para el transcrito de FG relevante, y que se habían almacenado durante menos de 18 meses, se analizaron localmente no diluidos y/o diluidos en una disolución de $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ARNr 16S y 23S de *E. coli* (Roche, Meylan, Francia) por duplicado.

Calibradores de plásmidos

Se amplificaron los productos de PCR de los transcritos de genes ABL, B2M y GUS para la preparación de plásmidos respectivamente con ABL-F (5'-CCT TCA GCG GCG AGT AGC-3') y ABL-R (5'-GGA CAC AGG CCC ATG GTA C-3'), B2M-F (5'-CCT TGA GGC TAT CCA GCG T-3') y B2M-R (5'-CCT GCT CAG ATA CAT CAA ACA TG-3') y GUS-F (5'-CCT GTG ACC TTT GTG AGC AA-3') y GUS-R (5'-GTC TGC CGT GAA CAG TCC A-3'). Se usaron las condiciones de PCR de la acción concertada BIOMED-1.(5) El protocolo para la clonación y preparación de diluciones de plásmido ya se ha dado a conocer. Para los plásmidos de ABL y GUS, se usaron tres diluciones (10^3 , 10^4 y 10^5 copias en $5 \mu\text{l}$) para calcular la curva patrón. Para el plásmido de B2M, se usaron tres diluciones diferentes (10^7 , 10^6 y 10^5 copias en $5 \mu\text{l}$). Los coeficientes de variación correspondientes para los valores de Ct eran inferiores al 4% (ABL), 5% (B2M) o 3% (GUS) para todas las diluciones (datos de todas las fases).

Material biológico y preparación de ARN

A partir de sangre periférica (PB) heparinizada, médula ósea (BM) y células madre de PB (PBSC), se obtuvieron células mononucleares (MNC) mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque. Todas las tomas de muestras de los pacientes se realizaron según los protocolos aprobados por los comités éticos locales de las instituciones dadas y/o las áreas geográficas. La línea celular RS4;11 se hizo crecer en medio RPMI1640 con suero bovino fetal al 10% y se recogió en la fase de crecimiento exponencial. El ARN se extrajo mediante métodos habituales en los laboratorios participantes empleando o bien un reactivo TRIzol (Invitrogen, Cergy, Francia), un reactivo RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania) o un sistema basado en columna (Qiagen, Hilden, Alemania) según las recomendaciones del fabricante. Tras la extracción y el aislamiento, se determinó la concentración de ARN mediante la medición la densidad óptica a 260 nm y el ARN se almacenó a -80°C hasta su uso.

Calibradores de ADN de plásmido que contienen las secuencias de genes diana

Se generaron productos de PCR de los 15 transcritos de FG diferentes a partir de ARN de línea celular o de pacientes mediante RT-PCR usando los cebadores A y B de BIOMED-1, tal como se describió anteriormente. (5) Los productos de PCR se clonaron en vector PCR II TOPO (Invitrogen, Groningen, Países Bajos). Los clones de plásmido seleccionados se secuenciaron para la confirmación de su inserto (Genome Express, Grenoble, Francia). Tras la producción en masa posterior, los plásmidos se extrajeron usando el kit QIAFILTER Plásmido MIDI (Qiagen, Courtaboeuf, Francia) y se cuantificaron mediante espectrofotometría. Se estimó el número de copias para 1 μ g según el peso molecular del vector y el inserto. Entonces se linearizaron 20 μ g de plásmido con las enzimas de restricción BamHI o HindIII durante 1 h a 37°C con agitación. El plásmido digerido se diluyó en serie en una disolución de Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 8, que contenía 20 ng/ μ l de ARNr 16S y 23S de *E. coli* (Roche). Se prepararon cinco diluciones sucesivas (200.000, 20.000, 200, 20 y 2 copias por microlitro). La curva patrón correspondiente generó una pendiente media de -3,45 y una ordenada en el origen de 39,8 $\pm$ 1 Ct. Se obtuvo un valor de Ct medio de 22,51 para la dilución de 20.000 copias/ μ l.

Protocolo de RT-PCR normalizado

Se estableció un protocolo de EAC común para todas las dianas moleculares (transcritos de FG y CG) durante las fases I y II y luego se usaron por cada laboratorio durante la totalidad de las fases III y IV (tabla 4).

Etapas de RT

Esta reacción se adaptó del protocolo de BIOME-1.24 Partiendo de un μ g de ARN total, las principales modificaciones implicaron la alteración de las concentraciones de hexámeros aleatorios (25 μ M) y de la transcriptasa inversa (100 U) o bien de MMLV o bien Superscript (Invitrogen; Roche), lo que mejoró significativamente la sensibilidad del ensayo.

Etapas de RQ-PCR

Todas las reacciones de RQ-PCR se llevaron a cabo en una plataforma 7700 ABI (Applied Biosystems, Foster City, EE.UU.) usando cebadores y sondas TaqMan facilitadas amablemente por Applied Biosystems conjuntamente con la mezcla maestra TaqMan Universal adquirida del mismo fabricante. El número de ciclos de amplificación fue de 50 (el protocolo detallado se describe en la tabla 3).

Optimización del ensayo de RQ-PCR (fase II)

Con el fin de optimizar los resultados y ahorrar costes, la fase II implicaba la evaluación de la influencia de las concentraciones de cebador y sonda (900 y 300 nM para los cebadores y 200 y 100 nM para las sondas) y el volumen de reacción (50 μ l frente a 25 μ l) en la sensibilidad del ensayo.

Tras exhaustivas pruebas dentro de redes de FG usando diluciones en serie de ARN de línea celular positiva para FG en ARN negativo para FG (de 10^{-1} a 10^{-5}) y plásmido (de 10^6 a 10 copias), se obtuvieron resultados óptimos usando un volumen de 25 μ l, con una concentración de 300 nM de cebadores y de 200 de sonda, excepto para AML1-ETO para el que se eligió una sonda 100 nM (véase el ejemplo 9).

Para el análisis de datos comparativos, se seleccionó un conjunto umbral común a 0,1 con el fin de estar en la fase exponencial. Un valor umbral de este tipo normalmente se encuentra por encima de las denominadas “curvas de aumento gradual” que se observaban en raras ocasiones en algunos controles negativos; definiéndose las “curvas de aumento gradual” como la curva de amplificación a partir de una muestra negativa que surge lentamente durante la reacción de PCR. Aunque el mecanismo que subyace a este último fenómeno no está completamente claro, el examen de la vista de “múltiples componentes” revela que no es indicativo de amplificación específica (véase más adelante). Sin embargo, para PML-RARA el umbral se fijó a 0,05 debido a la fase exponencial relativamente corta de la amplificación por PCR (bajo ΔR_n). La línea base se calculó a partir de los ciclos 3 a 15 (para ABL y GUS) excepto para los genes de control de expresión alta en los que se usaron los ciclos 3 a 10 (para B2M). Adicionalmente, los inventores usaron diluciones de ARN positivo (de pacientes o líneas celulares) en PBL normales o un ARN de línea celular negativa para FG (de 10^{-1} a 10^{-6}) durante las fases I a IIIa y series de diluciones idénticas usando ADNc durante la fase IIIa.

Comparación de las curvas patrón (fase IIIa)

Se realizó una comparación entre las curvas patrón de ARN, ADNc y plásmido con el fin de determinar la influencia de la etapa de RT en los resultados (pendiente de la curva patrón, sensibilidad y reproducibilidad) para cada laboratorio. Los líderes de red de FG enviaron a los laboratorios diferentes dentro de su red diana (de 4 a 12 miembros, véase la tabla 1) diluciones en serie preparadas centralmente de ARN de línea celular positiva para el transcrito de FG y los ADNc correspondientes, además de diluciones en serie del plásmido de control de FG correspondiente (200.000, 20.000, 200, 20 y 2 copias por μ l).

*Rondas de control de calidad (QC) en muestras codificadas**Organización general*

- 5 QC1 (fase IIIa) y QC3 (fase IVa) se llevaron a cabo por laboratorios específicos (tabla 1) mientras que QC2 (fase IIIb) implicó a laboratorios elegidos aleatoriamente (véase la sección de ensayo aleatorizado equilibrado).

Muestras de control y definición de (falsa-) positividad y (falsa-) negatividad

- 10 Los controles positivos en todos los experimentos y rondas de QC se referían a muestras de pacientes y líneas celulares bien definidas (tablas 1 y 2). Se usaron dos tipos de controles negativos: 1) muestras de ARN negativas para FG codificadas y 2) controles negativos conocidos para comprobar la contaminación de productos de PCR. Estos últimos controles de contaminación se referían a controles sin amplificación (NAC), que contenían ARN de *E. coli* en lugar de ADNc humano, y controles sin molde (NTC), que contenían agua en lugar de ADNc humano. Particularmente, se consideró que los controles negativos NAC y NTC eran de la mayor importancia para la identificación de contaminación cruzada de productos de PCR, porque este problema se subestima con frecuencia.

- Un pocillo positivo se definió como una amplificación sigmoidea (escala logarítmica) con un valor de Ct inferior al valor de Ct en la ordenada en el origen Y de la curva patrón del plásmido + un Ct. La amplificación en muestras de ARN del FG se realizó por triplicado y por duplicado para la expresión de CG. Se definió una muestra falsa negativa como una muestra de ARN positiva con menos del 50% de pocillos positivos (0/2, 0/3 ó 1/3). Se definió un resultado falso positivo como una muestra negativa, con al menos el 50% de pocillos positivos (1/2, 2/3 ó 3/3).

Sensibilidad y reproducibilidad de los experimentos

- 25 Los criterios para la sensibilidad y la reproducibilidad se definieron durante los experimentos de QC mediante muestras codificadas para cada transcrito de FG (tabla 4). Se supuso que un experimento era reproducible para una dilución particular si más del 80% de los laboratorios detectaban al menos dos pocillos positivos con una diferencia de Ct inferior a 1,5 Ct. La sensibilidad del experimento se definió como la última dilución que mostraba al menos el 50% de pocillos positivos en más del 80% de los laboratorios, cualesquiera que fueran los valores de Ct.

Ensayo aleatorizado equilibrado (fase IIIb)

- 35 Este ensayo se diseñó por el Departamento de Información Médica (Marsella, Francia). El objetivo era evaluar hasta qué punto los resultados de RQ-PCR eran comparables entre los laboratorios para la cuantificación de MRD de transcritos de FG en un entorno clínico según el protocolo de EAC. El estudio se centró en dos puntos principales: 1) comparación de los resultados entre laboratorios para un transcrito de FG particular, lo que es crucial para los estudios multicéntricos y 2) la linealidad de la metodología de RQ-PCR en experimentos de dilución, lo que es importante para evaluar la carga tumoral potencial durante el tratamiento. El ensayo aleatorizado equilibrado parecía ser un estudio estadístico apropiado para evaluar estos dos puntos sin realizar todos los análisis de RQ-PCR (n = 15) en cada laboratorio participante (n = 25).

- 45 Los estadísticos asignaron aleatoriamente los 25 laboratorios participantes a nueve redes. Se sometió a prueba cada uno de los nueve transcritos de FG principales en 11 laboratorios (excepto para la red de CBFB-MYH11, n = 12), incluyendo el líder de red del transcrito de FG implicado, constituyendo un total de 100 experimentos de RQ-PCR. Cada laboratorio sometió a prueba cinco muestras codificadas para cuatro dianas diferentes constituyendo un total de 500 muestras codificadas analizadas en este estudio de QC2 (tabla 2). Los ARN de control positivos para el transcrito de FG se diluyeron (diluciones 10^{-1} , 10^{-3} y 10^{-4}) en una muestra de ARN negativa (HL60 o PBL).

- 50 Se usó un diseño de placa común; el gen de control (ABL), el transcrito de FG y las diluciones de plásmido (ABL n = 3, FG n = 5) se amplificaron por triplicado, mientras que se ejecutaron cuatro controles negativos (NAC y NTC para las dianas de ABL y FG) por duplicado. Los datos sin procesar se recopilaron y se analizaron por cada líder de red de FG. Se diseñaron hojas de cálculo de Excel comunes para recopilar los resultados dentro de cada red de FG y luego se enviaron a Marsella para el posterior análisis estadístico (véase más adelante). El único criterio de exclusión para las muestras de ARN codificadas fue un valor de Ct de ABL fuera del intervalo normal [22-29,3] tal como se define por ensayos realizados dentro de la red de CG durante la fase IIIa.

Recopilación de datos

- 60 Para someter a prueba los 14 CG candidatos (17 conjuntos de cebador y sonda), se obtuvieron datos i) de placa de control endógeno de ABI, ii) conjuntos internos y iii) conjuntos de cebador y sonda de EAC recién diseñados. Para la placa de control endógeno de ABI, cinco laboratorios sometieron a prueba un total de 65 muestras archivadas diferentes: 22 muestras de PBMNC normales, 15 de ALL (4 de PB/11 de BM), 15 de CML (10 de PB/5 de BM) y 13 de AML (5 de PB/8 de BM) obtenidas en el diagnóstico. Este número se redujo a 53 para TFRC (para un laboratorio se perdieron parcialmente los datos) y a 21 para el ARNr 18S (datos disponibles de un laboratorio únicamente). Se esperaba un mínimo de cuatro muestras de PB normales y cuatro muestras leucémicas por laboratorio. Para los conjuntos de cebador y sonda internos para ABL, B2M y TBP, se sometieron a prueba 20 muestras en un laboratorio: se sometieron a prueba 4 muestras de PBMNC normales, 3 de ALL, 7 de AML y 6 de CML. Para cada conjunto de

ES 2 337 301 T3

ABL, PBGD y PBGD2 de EAC, se sometieron a prueba 36 muestras: 4 de PBMNC, 11 de ALL, 7 de AML y 14 de CML en dos laboratorios. Los resultados apareados obtenidos con dos conjuntos de cebador diferentes para el mismo CG (un laboratorio únicamente) estuvieron disponibles para tres CG: ABL ($n = 20$), B2M ($n = 12$) y TBP ($n = 12$). Todos estos experimentos se llevaron a cabo antes de haber optimizado la etapa de RT y antes de establecer un umbral común para el análisis de los datos.

En el estudio prospectivo, se sometieron a prueba muestras recientes normales (de PB, BM o PBSC), de ALL, AML o CML (o bien de PB o bien de BM) en laboratorios individuales para los tres CG seleccionados de EAC (tabla 37). Se aislaron MNC y se lisaron las células (etapa inicial del procedimiento de extracción del ARN) en el mismo día en que se obtuvieron las muestras. Inicialmente, se recogieron 316 muestras (tabla 38). Se excluyeron seis muestras de leucemia porque el análisis de CG resultó imposible debido a una escasa amplificación del plásmido de B2M. Por consiguiente, sólo se analizaron 310 muestras para definir los valores de referencia en el mismo conjunto de muestra. La información sobre la presencia de un supuesto transcrito de FG no estaba disponible.

Para el estudio retrospectivo (fase IVb), se sometieron a prueba 311 muestras archivadas de ALL, AML o CML (o bien de PB o bien de BM) con un transcrito de FG identificado en laboratorios individuales para los tres CG seleccionados de EAC, aunque estos laboratorios no estuvieran incluidos en la red de FG correspondiente. Los resultados se recopilaron y se tabularon por los líderes de red de FG. Sólo se seleccionaron para el análisis las muestras con un valor de Ct de CG dentro del intervalo de referencia definido más adelante. En la red de TEL-AML1, sólo se sometieron a prueba 30 de 57 muestras para determinar la expresión del transcrito de GUS. En la red de E2A-PBX1, no estaban disponibles los datos de la expresión de B2M para una muestra.

Análisis estadístico

Metodología general

Los datos de RQ-PCR de CG y FG se recopilaron y se analizaron por cada líder de red de FG. Se usaron los valores de Ct medio o Δ Ct medio (Ct [FG] medio - Ct [CG] medio) y el valor medio del log10 del número de copias (CN) para cada gen usado. El número de copias normalizado (NCN) se definió como el CN del FG por una copia del transcrito de CG (valor medio de log10 [FG CN] - valor medio de log10 [CG CN]) excepto para la normalización al nivel del transcrito del gen B2M para el que los resultados se expresaron por 100 copias. Puesto que el CN no mostró una distribución normal, se usó el valor logarítmico del CN para el análisis estadístico. Para una comprensión más fácil, los resultados obtenidos en una forma logarítmica se convirtieron posteriormente en valores decimales. El nivel de significación se fijó en $p < 0,05$. En las tablas y en las figuras, cuando el valor de p estaba entre 0,05 y 0,1, aunque no fuera estadísticamente significativo, se anotaron los números. Cuando el valor de p era $> 0,1$, el resultado aparece como no significativo (NS). Las correlaciones entre el nivel de expresión de genes diferentes se midieron mediante el coeficiente de correlación de Pearson (r). Los diagramas de cajas usados para representar los datos muestran la mediana de los valores (línea oscura) dentro de un recuadro que contiene el 50% de las muestras (percentiles 25° a 75°). El análisis estadístico se llevó a cabo en Marsella, Francia, usando el software SPSS 10.1 (SPSS Inc., Chicago, EE.UU.).

Ensayo aleatorizado equilibrado (fase IIIb)

- Detección de diferencias significativas en la cuantificación de transcritos entre laboratorios

Se sometieron a prueba cuatro parámetros por muestra (Ct, Δ Ct, CN y NCN) usando un modelo lineal global. Se fijó el número de laboratorio como un efecto aleatorio y se analizaron los datos. Cuando los resultados no eran comparables entre laboratorios ($p < 0,05$) para el parámetro y el transcrito seleccionados, se usó un análisis de comparaciones múltiples *a posteriori* (método de Tukey) para evaluar el número de laboratorios reproducibles con otros ($p \geq 0,05$) definiendo un subgrupo. Para esto, se escogieron dos criterios para estimar la reproducibilidad de los resultados: el número de subgrupos (S_n) y el número de laboratorios (L_n) reproducibles con al menos otros dos laboratorios tal como se define por una diferencia no significativa entre la media ($p \geq 0,05$) según el método de Tukey. Cuando un laboratorio particular estaba presente en dos o más subgrupos, sólo se contó una vez. El mejor parámetro para comparar los resultados entre laboratorios era el que tenía el mayor valor de L_n y el menor valor de S_n . Idealmente, sólo se esperaba un subgrupo ($S_n = 1$) que contenía todos los laboratorios ($L_n = 11$ ó 12 por red o $L_n = 25$ para el ensayo completo).

- Evaluación de la linealidad

Se eligió el coeficiente de correlación de Pearson para medir la linealidad de la cuantificación de los transcritos de FG usando las tres muestras positivas codificadas. Para cada transcrito de FG, el mejor parámetro ($\Delta\Delta$ Ct o NCN) para evaluar los resultados era el que tenía el mayor coeficiente de correlación.

Valores de referencia en el diagnóstico (fase IVb)

Se excluyeron las muestras de leucemia del análisis si la amplificación del CG no estaba dentro del intervalo normal para muestras recientes definido tal como sigue: Ct de ABL [21,8-29,4], Ct de B2M [15,6-24,9] y Ct de GUS [20,8-28,0]. La comparación entre PB y BM se llevó a cabo con pruebas no paramétricas (prueba de datos apareados de Wilcoxon para al menos cinco muestras apareadas o prueba U de Mann-Whitney para pruebas no apareadas). Al

menos se esperaban cinco muestras apareadas por transcrito de FG. El intervalo de expresión del 95% para NCN se refiere al intervalo entre el percentil 3º y el 97º para el gen seleccionado. Los coeficientes de correlación entre el CN de FG y cada CN de CG se facilitan antes de la normalización por el CG. Para la/las línea(s) celular(es), se muestra la mediana de los valores obtenida en la misma muestra en ocho laboratorios diferentes.

Resultados

Selección de genes de control

Criterios para la selección

El grupo del gen de control comenzó con una selección de CG candidatos en muestras de PB normales y leucémicas en el diagnóstico usando: i) placa de control endógeno previamente desarrollada (ABI) que contenía conjuntos de cebador/sonda para 11 CG usados comúnmente y ii) seis conjuntos de cebador/sonda (tabla 36). De los 17 conjuntos de cebador/sonda que cubren 14 CG, la red tenía como objetivo identificar al menos uno con una mediana de expresión alta (Ct entre 16,4 y 23,0) y al menos uno con una mediana de expresión media (Ct entre 23,0 y 29,6). Estos límites definidos arbitrariamente cubrían un intervalo de dos logaritmos (6,6 Ct). El límite inferior se seleccionó con el fin de obtener un número de registros adecuado para los cálculos de la línea base y el límite superior para lograr sensibilidad suficiente para la evaluación de la muestra.

Los CG seleccionados deben cumplir los siguientes criterios principales: i) ausencia de pseudogenes (conocidos o encontrados durante las pruebas), ii) expresión alta o media, excluyendo la expresión muy alta o baja, iii) expresión de CG no significativamente diferente entre muestras de PB normales y muestras leucémicas y iv) expresión de CG no significativamente diferente entre PB y BM. También se identificaron criterios minoritarios para la exclusión: i) ubicación del cromosoma X con el fin de evitar cualquier posible efecto del sexo en la dosificación, ii) variabilidad dentro de un tipo leucémico (ALM, ALL o CML) en el diagnóstico o PB normal, y iii) expresión dependiente del ciclo celular.

Se excluyeron dos CG según su nivel de expresión: ARNr 18S y TBP se sometieron a prueba con conjuntos de cebador y sonda de ABI (tabla 36). Entre los cuatro CG altamente expresados (PO, ACTB, GAPD y B2M), se sabía que sólo B2M no tenía pseudogenes. Sin embargo, la expresión de B2M analizada por el conjunto de ABI difirió significativamente entre las muestras normales y leucémicas y entre PB y BM ($p < 0,001$ en ambos casos, $n = 65$, prueba de Mann-Whitney). Por tanto, se descartó el conjunto de B2M de ABI. Entre los cinco CG restantes con expresión media en la placa de ABI, se descartaron tres debido a razones minoritarias: HPRT y PGK (ubicación en el cromosoma X) y TFRC (expresión variable en células hematopoyéticas).

Entre los seis conjuntos de cebador y sonda adicionales, que cubrían cuatro CG, el conjunto de RQ-PCR para B2M interno parecía ser adecuado puesto que no se observó diferencia estadísticamente significativa entre PB y BM. La comparación entre muestras normales y leucémicas no fue posible puesto que sólo se sometieron a prueba cuatro muestras normales (véase Material y métodos). Entre los CG con expresión media, el transcrito de TBP amplificado con el conjunto de EAC era de mediana de nivel de expresión adecuada (Ct = 25,7). Los conjuntos para PBGD y PBGD2 mostraron medianas de valores de Ct similares (Ct = 27). Sin embargo, debido a la presencia de sitios de inicio de transcripción alternativos, finalmente se descartaron estos conjuntos para PBGD. Las medianas de los valores de Ct de los dos conjuntos para ABL no eran idénticas (tabla 36) aunque los valores de Ct estaban correlacionados ($r = 0,87$, $n = 20$). Se prefirió el conjunto de EAC para ABL puesto que la mediana del valor de Ct era inferior.

Por tanto, tras el primer proceso de selección, el número de genes se redujo a cinco: ABL, B2M, CYC, GUS y TBP (tabla 36).

Variabilidad de la expresión en PBMNC normales

Estos cinco CG seleccionados inicialmente se sometieron a análisis adicional usando cinco muestras de PB preparadas localmente de donantes normales en cada uno de los seis laboratorios de CG. El análisis de RQ-PCR se llevó a cabo usando protocolos de RT y PCR de EAC optimizados. Las variaciones en los valores de Ct de ABL, B2M, CYC y GUS eran comparables y estuvieron todos dentro de tres valores de Ct (figura 37). Las líneas de conexión de esos cuatro CG eran casi paralelas. Por tanto, las variaciones en los valores de Ct podían atribuirse a diferencias en la eficacia de la síntesis del ADNc y/o a la variación en la cantidad inicial de ARN (véase más adelante). En cambio, el transcrito del gen TBP mostró una variación de cinco valores de Ct (igual a 32 veces) y líneas de muestra no paralelas, lo que indica una variación mayor en la expresión del gen TBP (figura 37). El gen TBP se excluyó por tanto del análisis adicional.

Especificidad de ADNc de conjuntos de cebadores/sonda

Puesto que no se disponía de las secuencias de cebador y sonda usadas para la placa de control endógeno humano, se diseñaron y se sometieron a prueba nuevos conjuntos de cebador y sonda (conjuntos de EAC) para los genes CYC y GUS. Se evaluaron tres conjuntos de cebador/sonda para CYC diferentes en dos laboratorios y se encontró que cada conjunto amplificaba el ADN genómico debido a la presencia de pseudogenes. Por tanto, se excluyó CYC del análisis adicional.

Para evaluar el riesgo de resultados falsos positivos debido a pseudogenes u homologías genómicas fortuitas, se sometieron a prueba conjuntos de cebador/sonda de EAC para ABL, B2M y GUS en cinco laboratorios en 150 muestras de ADN genómico (30 por laboratorio) obtenidas de donantes normales y pacientes leucémicos. Todos los análisis de RQ-PCR para B2M y GUS fueron negativos, mientras que el 7% (10/150) de las muestras fueron positivas en la RQ-PCR para ABL en tres de cinco laboratorios de prueba ($n = 2, 3$ y 5 resultados positivos, respectivamente). Sin embargo, los valores de Ct oscilaron desde 35 hasta 45 (datos no mostrados) y, por tanto, estaban muy alejados de los valores de Ct obtenidos usando muestras de ARN de buena calidad. Por consiguiente, aunque estuviera presente algo de ADN restante en la muestra de ARN, esto no afectaría significativamente a los datos de CG. Por tanto, los inventores decidieron no excluir el conjunto de cebador para ABL basándose en la amplificación de bajo nivel del ADN. En conclusión, se seleccionaron los conjuntos de cebador/sonda para ABL, B2M y GUS mostrados en la tabla 37 para pruebas adicionales como posibles CG candidatos.

Expresión de CG en muestras normales y leucémicas

Tras haber establecido las condiciones óptimas para la síntesis del ADNc y los protocolos de RQ-PCR y haber definido los CG más adecuados en los estudios iniciales, la red de EAC pasó a establecer la variación biológica en la expresión de los CG seleccionados en muestras normales y leucémicas.

Expresión de los CG seleccionados en muestras recientes

Este estudio prospectivo se llevó a cabo en donantes normales ($n = 126$) así como en pacientes leucémicos en el diagnóstico ($n = 184$). Se sometieron a prueba PBSC normales ($n = 26$), puesto que la MRD también puede estudiarse en estas células recogidas particulares. Los laboratorios que contribuían, así como el tipo y los números de muestras, se muestran en la tabla 38.

En las muestras normales, la expresión del gen ABL no difirió significativamente entre PB, BM y PBSC (figura 38a). Por el contrario, la expresión del gen B2M difirió significativamente entre los tres tipos diferentes de muestras (PB, PBSC y BM) si se analizaban usando un modelo lineal global ($p < 0,001$, $n = 126$). Sin embargo, el análisis de comparaciones múltiples *a posteriori* reveló que el nivel de expresión de B2M en muestras de PB o PBSC era comparable (figura 38b). La expresión del gen GUS era significativamente diferente entre los tres tipos de muestras usando un modelo lineal global ($p < 0,001$, $n = 126$). El análisis de comparaciones múltiples *a posteriori* mostró que la expresión de GUS era significativamente inferior en PB, pero no significativamente diferente entre BM y PBSC (figura 38c). En muestras leucémicas, la expresión de CG no fue significativamente diferente entre BM y PB o entre ALL, AML y CML, excepto para la expresión de GUS ($p = 0,03$, $n = 184$) (figuras 38a, b, c).

La comparación entre las muestras normales y leucémicas mostró que sólo la expresión de ABL no difería significativamente ($p = 0,21$, $n = 310$, (figura 38a). En contraposición, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,001$, $n = 310$) para la expresión de B2M y GUS usando un modelo lineal global (figuras 38b y c). Cuando se analizaron los valores de Ct en lugar de CN en las mismas muestras ($n = 310$), se obtuvieron resultados comparables.

Valores de referencia para la expresión de CG en muestras normales y leucémicas recientes

Los inventores decidieron establecer valores de referencia en muestras recientes con el fin de evaluar el intervalo de expresión de CG y posteriormente identificar muestras de mala calidad (véase la sección Material y método). Los valores de referencia se definieron mediante una diana (mediana de los valores) y dos límites (percentiles 3° y 97°). Las muestras (el 6% de las muestras recientes) fuera de este intervalo se consideraron resultados inesperados. Las muestras con un valor de Ct demasiado alto y por consiguiente un CN demasiado bajo eran presumiblemente muestras degradadas o muestras que contenían un inhibidor, mientras que las muestras con un valor de Ct demasiado bajo y, por tanto, un valor de CN demasiado alto podrían estar relacionadas con una cuantificación de ARN sobreestimada. Los valores de referencia, basados en 126 muestras normales y 184 muestras leucémicas en el diagnóstico se muestran en la tabla 39.

En muestras normales ($n = 126$), se encontró una diferencia de aproximadamente 50 veces en la expresión de ABL y GUS y una diferencia de hasta 70 veces en la expresión de B2M (tabla 39). En muestras de leucemia ($n = 184$), se observó una diferencia de aproximadamente 100 veces en la expresión de los genes ABL y GUS y una diferencia de hasta 500 veces en la expresión de B2M (tabla 39). Un enfoque paramétrico usando el valor medio (y no la mediana) y dos desviaciones estándar dieron resultados similares a los de la metodología basada en percentiles (datos no mostrados).

Expresión de CG en muestras archivadas

Se obtuvieron datos sobre muestras leucémicas archivadas en el diagnóstico ($n = 311$) con un transcrito de FG identificado a partir de los grupos de FG. Se seleccionaron muestras no degradadas según los valores de referencia definidos anteriormente, excluyendo así casos con escasa o ninguna amplificación de CG debido a la degradación o a la presencia de inhibidores. ABL fue un CG más restrictivo para incluir muestras en comparación con GUS o B2M (proporción de muestras excluidas, respectivamente, el 11%, 9% y 6%) dando como resultado un número inferior de muestras analizadas para este CG. Dado que en la red de TEL-AML1 sólo se sometieron a prueba 30 de 57 muestras para la expresión del transcrito de GUS, finalmente estuvo disponible el resultado de sólo 257 muestras para este CG.

Se llevó a cabo un análisis similar al anterior realizado en muestras de leucemia recientes (véase anteriormente). Sólo el CN del transcrito del gen ABL no difirió significativamente entre el tipo de tejidos y de leucemia ($p = 0,50$, $n = 277$) o entre los grupos de transcrito de FG, cuando se combinaron muestras de BM y PB ($p = 0,10$, $n = 277$, figura 6a). En contraposición, el CN del transcrito del gen B2M era significativamente diferente entre los tipos de tejidos y de leucemia ($p = 0,03$, $n = 290$) y entre los grupos de transcrito de FG ($p = 0,04$, $n = 290$, figura 39b). Además, la expresión del gen GUS difirió significativamente entre los tipos de tejidos y de leucemia ($p < 0,001$, $n = 257$) y entre los grupos de transcrito de FG ($p < 0,001$, $n = 257$, figura 39c).

Correlación entre genes de control y con los genes de fusión

El nivel de expresión de los tres CG estaba siempre correlacionado ($p < 0,01$), independientemente de los valores de Ct o CN usados. La mayor correlación se encontró entre los valores de Ct de ABL y B2M ($r = 0,73$) o GUS ($r = 0,72$) en muestras normales recientes (figura 40a) y entre los valores de Ct de ABL y GUS ($r = 0,80$) en muestras de leucemia recientes (figura 40b).

En las muestras de leucemia archivadas, la mayor correlación se encontró entre los valores de Ct de los genes B2M y GUS ($r = 0,67$), mientras que la correlación más baja se observó entre los valores de Ct de los genes ABL y GUS en las mismas muestras ($r = 0,54$), lo que sugiere una cinética de degradación diferencial de estos dos genes. Finalmente, la correlación entre la expresión del transcrito de FG y la expresión del transcrito del gen ABL fue superior o idéntica a los otros dos CG seleccionados de EAC.

Elección del gen de control

Previamente se mostró que la expresión del gen ABL no difería significativamente entre las muestras normales y leucémicas en el diagnóstico. Además, de estos tres CG sometidos a prueba ampliamente, la expresión del gen ABL tuvo la mayor correlación con los transcritos de FG en muestras de diagnóstico. En el estudio de los presentes inventores, en un modelo de detección de MRD (fase IIb), la normalización de la expresión de FG con respecto a la de ABL como CG mejoró la reproducibilidad de los resultados del transcrito de FG obtenidos en comparación con los valores de Ct o CN sin procesar (no normalizados). Por tanto, los inventores proponen usar ABL como CG de primera elección para la normalización en muestras de diagnóstico y de seguimiento. Como segunda elección, los inventores recomiendan usar o bien B2M o GUS, dependiendo de su correlación relativa con la expresión del transcrito de FG respectivo y la variabilidad del NCN en el diagnóstico. En la práctica, la identificación de muestras aisladas con un bajo nivel de expresión de CG sugiere la degradación del ARN o la presencia de inhibidores en tales muestras. Por otra parte, la observación de amplificación de CG reducida o ausente para todas las muestras sometidas a prueba es indicativa de un problema con los reactivos durante las reacciones de RT o PCR. Finalmente, el CN del transcrito de CG para cada muestra de ARN de los pacientes permite la normalización de la eficacia de las etapas de pre-PCR.

Comparación de las curvas patrón (fase IIIa)

No se observaron diferencias significativas en los valores de Ct para las diluciones más bajas de ARN, ADNc (10^{-3} y 10^{-4}) y plásmido (10^6 , 10^5 y 10^3 copias), incluso entre muestras de ADN preparadas central y localmente. Para las diluciones más altas, los valores de Ct fueron más reproducibles entre laboratorios para el ADNc (diluciones 10^{-3} y 10^{-4}) y el plásmido (10 y 100 copias) distribuidos centralmente que para las diluciones de ARN. Los CV respectivos eran inferiores al 5% para el ADNc y los plásmidos y al 11% para el ARN a la dilución más alta. En dos redes diana (AML 1-ETO y CBFB-MYH 11 tipo A), esta observación dio incluso como resultado significativamente menos resultados positivos para las muestras para las que se realizó RT localmente en comparación con las muestras de ADNc preparadas centralmente. Las pendientes estabilizadas con diluciones de ADNc o plásmido eran próximas a la pendiente teórica de -3,32 (eficacia del 100%) para la inmensa mayoría de los laboratorios participantes. En contraposición, las pendientes de las diluciones de ARN eran indicativas de la menor eficacia de la reacción debido probablemente a la degradación del ARN durante el transporte. Finalmente, los niveles de sensibilidad de las diluciones de ARN para todas las dianas fueron comparables a las PCR anidadas normalizadas diseñadas en el programa BIOMED-1 24 y fueron incluso mejores para las variantes de bcr2 y bcr3 de PML-RARA. Generalmente, todos los laboratorios podían detectar diez copias de plásmido (véanse las fases IIIa y b).

Ensayo aleatorizado equilibrado (fase IIIb)

Este ensayo se estableció con el fin de detectar diferencias en la cuantificación de los transcritos entre laboratorios. Los laboratorios se escogieron aleatoriamente para amplificar cuatro transcritos de FG diferentes, generalmente fuera de sus redes de FG originales (véase la sección Material y métodos). Esta metodología también es de importancia como ronda de QC para detectar si la falsa negatividad y positividad son proporcionalmente idénticas a otras fases para las que sólo los laboratorios que se centraban en un FG particular estaban realizando los experimentos.

Amplificación de ABL

- En diluciones de plásmido

Los inventores observaron resultados muy similares para las tres diluciones de plásmido de ABL entre los 25 laboratorios. Los inventores encontraron para la dilución de plásmido de ABL de 105 copias: $22,30 \pm 0,38$ (Ct $\pm$

ES 2 337 301 T3

Sd, $n = 296$) y un CV correspondiente del 1,7%. Los inventores encontraron un efecto de laboratorio significativo (fijado como un efecto aleatorio) en la medición de Ct de ABL para las tres diluciones de plásmido de ABL ($p < 0,001$, $n = 296$). Pero la diferencia entre laboratorios opuestos fue de no más de 1,2 Ct. Una diferencia de este tipo bien podría no ser relevante desde un punto de vista clínico. Según los criterios definidos en la sección de Material y métodos, todos los laboratorios tuvieron resultados reproducibles para el valor de Ct de cada dilución de plásmido de ABL.

- En muestras de ARN codificadas

No se encontró ninguna diferencia significativa dentro de las redes entre muestras altamente diluidas (10^{-3} y 10^{-4}) y muestra negativa cuando se comparó la expresión de ABL usando los valores de Ct o CN (resultados de la red de PML-RARA facilitados como ejemplo en la figura 30a), excepto para la red de CBFβ-MYH11 ($p = 0,03$). Por el contrario, los inventores encontraron diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) entre laboratorios dentro de cada red para las mismas muestras (resultados de la red de PML-RARA facilitados como ejemplo en la figura 30b). Por tanto, los valores de Ct y CN eran dependientes del laboratorio de pruebas y no de la muestra. Estos datos sugieren fuertemente que las variaciones se producen durante las etapas de pre-PCR (transporte y eficacia de RT).

Amplificación del transcrito de gen de fusión

Los inventores se centraron en el mejor parámetro (Ct, CN, ΔCt o NCN) para expresar los resultados de la RQ-PCR en un modelo de dilución en serie. Los inventores calcularon los coeficientes de correlación correspondientes en tres muestras diluidas medidas en 11 laboratorios diferentes (red de PML-RARA como ejemplo en la figura 31). Los coeficientes de correlación fueron superiores para el método de NCN en cinco FG, ligeramente superiores con el método de ΔCt en dos FG, mientras que ambos métodos fueron equivalentes para los dos FG restantes (tabla 33). Sólo para la cuantificación de los transcritos de E2A-PBX1, ABL parecía no ser útil como CG para normalizar los resultados de RQ-PCR. En general, se encontró que el uso de los transcritos del gen ABL para la normalización mejora enormemente la linealidad de los resultados (red de PML-RARA como ejemplo en la figura 32) y evitaba el solapamiento en los valores de Ct y CN de FG observado entre diluciones diferentes.

Finalmente, los inventores comprobaron los resultados de este modelo para la cuantificación de MRD. La curva de correlación entre el valor de Ct (eje Y) y el valor de CN ($\log_{10}$, eje X) para los pocillos relacionada con las muestras positivas para FG codificadas ($n = 824$, lo que cubre las nueve dianas de FG) mostró una pendiente media y una ordenada en el origen de -3,35 y 39,7, respectivamente. Estos buenos resultados indicaron que incluso con nueve conjuntos de plásmidos diferentes (uno por transcrito), la cuantificación de los transcritos de FG en las muestras de ARN era similar, independientemente de cuál fuera el conjunto de plásmido.

Niveles de expresión de genes de fusión en muestras de leucemia de diagnóstico

Los inventores compararon 55 muestras apareadas de BM y PB tomadas en el momento del diagnóstico. No se analizaron dos pares adicionales en la red de MLLAF4 debido al número insuficiente. El análisis estadístico reveló que la fuente de las muestras no tenía un efecto significativo en el nivel de expresión en el diagnóstico del FG relevante expresado como NCN, excepto para PML-RARA usando B2M o GUS como CG. Estos análisis sugerirían que cualquier fuente de material diagnóstico podría actuar como una referencia adecuada para los estudios de MRD. Globalmente, la mediana del NCN de cada transcrito de FG era variable, oscilando desde 8,5 copias (E2A-PBX1) hasta 0,1 copias (SIL-TAL1) por copia de transcrito de gen ABL (figura 33a). También se observó un resultado de este tipo con los CG B2M y GUS. Los niveles de expresión relativos de los diferentes FG fueron generalmente constantes independientemente del CG usado para la normalización (figura 33b, c), aunque se observó cierta heterogeneidad en algunos casos (véase PML-RARA, AML1-ETO y SIL-TAL1 en la sección de ejemplos). En la mayoría de los casos, el NCN del transcrito de FG en muestras de pacientes era comparable a los observados en los controles de la línea celular correspondiente (véase cada ejemplo). Estos resultados se corrigieron según la proporción de blastocitos en la muestra cuando se dispuso de la información.

Serie de diluciones de ARN en ARN de *E. coli*

Se diluyó ARN de pacientes o líneas celulares positivas para FG en ARN de *E. coli*, usando etapas de dilución de diez veces (de 10^{-1} a 10^{-6} , véase la sección Material y métodos). Se observó una concordancia en los experimentos de dilución limitante entre la última dilución positiva del ARN de pacientes o líneas celulares y la sensibilidad pronosticada partiendo de la base de los niveles de FG y CG en el ARN no diluido correspondiente. Estos datos indicaban que la cuantificación del CG y el FG con CN en la muestra pura era correcta. Un análisis de regresión lineal en las mismas diluciones mostró que la razón FG/CG no cambiaba significativamente (inferior a un factor de dos) a lo largo de 3 a 5 diluciones logarítmicas, dependiendo del nivel de expresión de FG en la muestra pura. Estos resultados indicaron eficacias de amplificación de RQ-PCR iguales para el FG y el CG en un gran intervalo de diluciones.

Expresión de los datos de RQ-PCR

La monitorización de MRD mediante el análisis por RQ-PCR está convirtiéndose en una herramienta para la toma de decisiones en ensayos terapéuticos multicéntricos. Por este motivo, es de capital importancia que los resultados de la RQ-PCR se expresen de una manera uniforme. La mayoría de las publicaciones usaban una razón de número de copias entre el FG y el CG con una curva patrón, expresándose esta razón como un valor decimal o un porcentaje. Para

obtener la curva patrón, los laboratorios usaban o bien ADNc de línea celular o bien ADN de plásmido. Hasta ahora, pocos autores usaban el método de $\Delta\Delta Ct$ y, que los inventores sepan, hasta ahora no se había usado una curva patrón de ADNc de diagnóstico.

- 5 Se trataron cuatro posibilidades: 1) diluciones de ARN de línea celular, 2) porcentaje del número de células positivas con respecto a la muestra de diagnóstico, 3) razones de número de copias y 4) el método de $\Delta\Delta Ct$.
- 10 1) Las diluciones de ARN de línea celular parecían ser muy sensibles a la degradación durante el transporte, tal como se muestra en el estudio de los inventores. La variabilidad de expresión para una línea celular puede verse sometida a grandes variaciones. Una posible variación de este tipo depende de la fuente de la línea celular, del momento del cultivo celular en el que se ha realizado la extracción del ARN y finalmente de la eficacia de la RT. Para estudios multicéntricos, la opción para superar tales dificultades podría ser preparar y distribuir centralmente el ADNc.
- 15 2) Los resultados expresados como frecuencia de células positivas tendrían la enorme ventaja de permitir la comparación directa con otras técnicas de MRD. Además, permitiría una determinación más fiable de la cinética de reducción del transcrito de FG dentro de pacientes individuales, dada la variabilidad en los niveles de expresión del transcrito de FG entre pacientes tal como se observó en este estudio. Sin embargo, un enfoque de este tipo depende de la disponibilidad del material de diagnóstico frente al cual pueden considerarse los niveles relativos de MRD. Puesto que el nivel preciso de expresión de FG y sus variaciones durante el tratamiento a nivel de una única célula no están totalmente claros, los inventores decidieron finalmente expresar los resultados en cuanto a las razones entre la diana (transcrito de FG) y la referencia (transcrito de CG) en los experimentos de los inventores.
- 20 3) La razón (NCN) se expresó como copias de FG por copia del transcrito del gen ABL o GUS y por 100 copias del transcrito del gen B2M debido a su alto nivel de expresión. Esta razón debe ser independiente de la cantidad de ARN de partida. Para este fin, los inventores usaron curvas patrón de plásmido, que ofrecen la posibilidad de cuantificar directamente el número de copias de los transcritos. Los datos de los inventores muestran que los plásmidos son calibradores adecuados para la normalización del análisis de RQ-PCR entre laboratorios o dentro de un laboratorio. El ADN de plásmido es probablemente una buena opción que proporciona estabilidad y robustez que es poco probable que se logre cuando se usa la producción de ADNc a gran escala como posible material de QC. Los posibles inconvenientes de este método son: en primer lugar, el riesgo de contaminación, aunque los inventores usaron diluciones de plásmido que contenían copias de FG dentro del mismo intervalo que las muestras de pacientes. Siempre se requieren las precauciones rigurosas habituales para el análisis de PCR para limitar este riesgo. En segundo lugar, el uso de calibradores de plásmido reduce el número de pocillos disponible para las muestras de pacientes y aumenta ligeramente el coste. En tercer lugar, los calibradores introducen etapas/cálculos adicionales que aumentan posiblemente la variabilidad. Finalmente, los plásmidos de ADN no evalúan directamente la eficacia de la RT; sin embargo, el nivel de expresión de CG en muestras de pacientes representa claramente un control de las etapas de pre-PCR.
- 25 30 35 40 4) El método de $\Delta\Delta Ct$ (boletín de usuario n.º 2 de Applied Biosystems) no tiene esas desventajas, aunque tiene sus propias limitaciones. El método se basa en las eficacias relativas de los ensayos de FG y CG que son comparables y constantes de una placa a otra; por tanto, resulta crítico que se incluyan rutinariamente patrones de ARN o ADNc positivos, para permitir que se detecte el deterioro en el rendimiento del ensayo por una elevación en el valor de Ct tal como se encontró una vez en el estudio de los inventores para el análisis de 70 muestras de CML, incluyendo 17 muestras apareadas. Este método puede ser muy eficaz en laboratorios expertos y puede usarse para determinar el nivel relativo de MRD en comparación con la muestra de diagnóstico. Hay preocupaciones de que este enfoque puede no prestarse por sí mismo a la evaluación de variaciones entre experimentos en el entorno dentro de un laboratorio o entre laboratorios. Esto puede crear dificultades en la comparación de los datos de RQ-PCR entre grupos diferentes, particularmente cuando se usan diferentes máquinas (hay al menos ocho proveedores en la actualidad).
- 45 50

Propuesta para evaluar el nivel de sensibilidad de experimentos de RQ-PCR basándose en los datos de EAC

Antecedentes

55 Cuando se encuentra una ausencia de amplificación del transcrito de FG en una muestra de pacientes durante el seguimiento, es necesario evaluar el límite de detección para el ensayo particular para determinar la fiabilidad y la relevancia clínica del resultado obtenido. Para abordar esta cuestión, los inventores proponen dos fórmulas para calcular el nivel de sensibilidad de un experimento dado. El uso de valores de números de copias se notificará más adelante en el presente documento.

Cálculo

65 La fórmula se basa en los resultados de experimentos de dilución de *E. coli* y en la correlación entre el CN de FG y el CN de CG con una pendiente próxima a 1 en muestras de diagnóstico (véase cada ejemplo particular). En esta fórmula, la sensibilidad está directamente relacionada con el NCN del FG en el diagnóstico y el CN de CG de

ES 2 337 301 T3

la muestra. Idealmente, el cálculo debe basarse en el NCN de diagnóstico de los pacientes, tras la corrección para el porcentaje de blastocitos. Si no está disponible, pueden usarse datos de EAC. En este modelo, deben amplificarse 10 copias del plásmido de FG por cada transcrito de fusión particular. Si sólo pueden amplificarse 100 copias, la sensibilidad debe reducirse en un log10.

$$\text{SENS} = -\log_{10} (\text{NCN}) - \log_{10} (\text{CN de CG})$$

En esta fórmula, SENS es la sensibilidad (log10) del experimento para la muestra de diagnóstico y debe expresarse como 10^{SENS} , NCN es o bien la razón de la muestra de pacientes en el diagnóstico o si no está disponible, la mediana de NCN correspondiente a partir de los datos de EAC.

La fórmula es válida para todos los CG en el diagnóstico pero se debe ser consciente del sesgo hacia la subestimación para la razón BCR-ABL/ABL para muestras que contienen un alto nivel de células leucémicas. Sin embargo, sólo el gen ABL no mostró ninguna diferencia significativa entre BM y PB y entre muestras normales y muestras leucémicas en el diagnóstico. Por tanto, esta fórmula sólo puede usarse con ABL como CG sin ninguna corrección para evaluar el nivel de sensibilidad del experimento durante el seguimiento.

Tres ilustraciones a través de casos reales

- En el diagnóstico

El paciente A presenta una T-ALL (ALL de células T) pediátrica en el diagnóstico. La búsqueda del transcrito de FG SIL-TAL1, en su muestra de PB sigue siendo negativa. La cuantificación del transcrito del gen ABL usando RQ-PCR con el protocolo de EAC de los inventores es de 46000 copias. Por tanto, la sensibilidad estimada del experimento basándose en los datos de EAC para la mediana de la expresión del transcrito de FG SIL-TAL1 en PB (0,09, tabla 22) en el diagnóstico es:

$$\text{SENS} = -\log_{10} (0,09) - \log_{10} (46000) = -3,6 \text{ (o } 10^{-3,6})$$

- En la recidiva

El paciente B presenta una recidiva tardía de una ALL de precursores de células B positiva para TEL-AML1. La cuantificación del transcrito de FG TEL-AML1 en su muestra de PB es de 419000 copias. La cuantificación del transcrito del gen ABL en la misma muestra es de 17000 copias. La razón TEL-AML1/ABL para este paciente es de 25 (419000/17000). Por tanto, la sensibilidad estimada basada en la expresión de FG TEL-AML1 en este paciente es:

$$\text{SENS} = -\log_{10} (25) - \log_{10} (17000) = -5,6 \text{ (o } 10^{-5,6})$$

- Durante el seguimiento

Se realizó el seguimiento del mismo paciente B 3 meses después mediante RQ-PCR para la detección del transcrito de FG TEL-AML1 en muestras de PB y BM. El transcrito de FG TEL-AML1 no se detecta mediante RQ-PCR en ambas muestras. Los resultados de la cuantificación del transcrito del gen ABL en las muestras de PB y BM son respectivamente 7700 y 13700 copias. Basándose en la observación de que NCN de TEL-AML1 no difiere significativamente entre PB y BM (figura 11), se usa la razón en este paciente en la recidiva (419000/17000) para calcular la sensibilidad de este experimento:

$$\text{SENS (BM)} = -\log_{10} (419/17) - \log_{10} (13700) = -5,5 \text{ (o } 10^{-5,5})$$

$$\text{SENS (PB)} = -\log_{10} (419/7) - \log_{10} (7700) = -5,3 \text{ (o } 10^{-5,3})$$

En comparación con el seguimiento del transcrito de FG mediante RT-PCR clásica, la sensibilidad en este caso se basa en muestras de pacientes y no de líneas celulares. El umbral de sensibilidad calculado con esta metodología es claramente más preciso que el basado en RT-PCR clásica en diluciones de líneas celulares (5).

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 *t(1;19)(q23;p13) con el transcrito de gen de fusión E2A-PBX1*

1.1 Antecedentes

10 El transcrito de FG leucemogénico E2A-PBX1 resulta de la fusión de los genes E2A y PBX1 (anteriormente pr1), a través de *t(1;19)(q23;p13)*. La *t(1;19)(q23;p13)* se encuentra en el 3-5% de la ALL de precursores de células B infantil y en el 3% de la ALL de precursores de células B de adultos. En el 95% de los casos, se expresan los transcritos de E2A-PBX1. Esta expresión está estrechamente asociada con la detección de cadenas de Ig p citoplasmáticas. Las ALL de precursores de células B restantes con *t(1;19)* son negativas para E2A-PBX1 y no muestran redistribución del gen E2A.

15 El gen E2A, ubicado en el cromosoma 19, codifica para los factores de unión al potenciador de Ig de hélice-bucle-hélice, E12 y E47, y el gen PBX1 en el cromosoma 1 codifica para una proteína de secuencia homeótica (“*homeobox*”) de unión al ADN. La organización genómica de E2A está bien definida y los puntos de rotura se producen casi exclusivamente en el intrón de 3,5 kb entre el exón 13 y 14. La organización genómica de PBX1 no se conoce aún
20 completamente y los puntos de rotura están dispersos a lo largo de una región intrónica de aproximadamente 50 kb entre el exón 1 y el 2. La mayoría de casos con transcritos de FG E2A-PBX1 muestran una unión constante del exón 13 de E2A al exón 2 de PBX1 (figura 3). Se ha descrito un transcrito de FG variante en aproximadamente el 5-10% de los pacientes positivos para E2A-PBX1. Se caracteriza por la inserción de un tramo de 27 nucleótidos en la unión E2A-PBX1. Esta secuencia insertada surge probablemente de un exón cortado y empalmado de manera alternativa de
25 PBX1.

El FG codifica para un activador transcripcional quimérico que contiene el dominio activador transcripcional N-terminal de E2A unido al dominio de secuencia homeótica de unión a ADN C-terminal de PBX1. La actividad transformante de las proteínas de E2A-PBX1 se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo*.

30 Se han notificado varios estudios que usan amplificación mediante RT-PCR del transcrito de FG E2A-PBX1 para evaluar MRD. Se realizaron todos con un ensayo cualitativo que mostraba un umbral de detección de hasta $10^{-4/-5}$. En ninguno de estos informes la presencia o ausencia de transcritos de E2A-PBX1 durante del seguimiento predice el desenlace del tratamiento. La serie más grande incluía 71 pacientes, no se encontraron diferencias en la supervivencia libre de acontecimientos entre pacientes positivos para PCR y negativos para PCR analizados al final del tratamiento de
35 consolidación. Todos estos estudios señalan las limitaciones de la evaluación cualitativa de MRD en la monitorización de pacientes con ALL positivos para *t(1;19)*, y subrayan la importancia de enfoques cuantitativos tales como métodos de RQ-PCR.

40 1.2 Datos de EAC

1.2.1 Diseño y optimización de cebadores (fases I y II)

45 Entre dos conjuntos de cebadores y sonda sometidos a prueba, se eligió uno: ENF101, ENR 161 y ENP 141. Las posiciones y secuencias de nucleótidos se muestran en la figura 3 y en la tabla 5, respectivamente. Este conjunto se seleccionó basándose en los valores de ΔR_n superiores en la fase de meseta con diluciones altas del ARN de la línea celular 697 positiva para E2A-PBX1 (también conocida como ACC42) en ARN de HL60. Durante los experimentos de fase II y fase III, este conjunto de cebadores y sonda permitió detectar una dilución 10^{-4} de ARN de 697 en ARN
50 de HL60 en siete de siete laboratorios; un ejemplo de gráficas de amplificación típicas (diluciones de ARN de línea celular 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-4}) se muestra en la figura 4. Se concluyó que ENF101, ENR 161 y ENP 141 son adecuados para la cuantificación de todos los transcritos de fusión de E2A-PBX1, incluyendo la forma variante.

1.2.2 Expresión de E2A-PBX1 en la línea celular 697 y muestras de diagnóstico de pacientes (fase IV)

55 Se analizaron una línea celular, 697, y 27 muestras de diagnóstico (14 muestras de BM y 13 de PB). Se disponía de los porcentajes de blastocitos (definidos morfológicamente) en todas excepto en dos muestras (1 de PB y 1 de BM) y oscilaban desde el 74 hasta el 100% (mediana = 96%). La mediana de los valores y el intervalo del 95% para los genes de control y los valores de Ct de E2A-PBX1, así como el número de copias de E2A-PBX1 normalizado (corregido según el porcentaje de blastocitos), se notifican en la tabla 6. Los valores de Ct detectados para E2A-PBX1 y CG en la línea celular 697 y en las muestras de pacientes eran comparables, lo que indica que se expresan a niveles similares. Se observó el coeficiente de correlación más alto entre transcritos de ABL y E2A-PBX1. Entre las muestras de PB y BM, diez eran muestras apareadas, recogidas en el mismo paciente en la presentación de la enfermedad. No pudo observarse diferencia estadísticamente significativa entre BM y PB en lo que se refiere a Ct o NCN en muestras
60 apareadas (figura 5).

1.2.3 Rondas de QC (fases IIIa a IVa)

Durante las diversas rondas de QC, se sometieron a prueba 11 muestras negativas (cinco de ARN negativo, tres de NAC y tres de NTC) y cinco muestras positivas (diluciones 10^{-3} (2 muestras) y 10^{-4} (3 muestras) de ARN de la línea celular 697 en ARN de HL60) en ocho de 10 laboratorios (tabla 7). La amplificación de E2A-PBX1 de las muestras negativas representa 156 pocillos. Se encontró que tres pocillos (correspondientes a 3 muestras diferentes) eran positivos (2%), pero ninguna de estas muestras se consideró positiva según los criterios definidos en la sección Material y métodos. La amplificación de E2A-PBX1 de las muestras positivas representa 78 pocillos. Se encontró que sólo un pocillo era negativo (1%). Según los criterios definidos en la sección Material y métodos, se encontró que las cinco muestras positivas eran positivas, tal como se esperaba a partir del umbral de sensibilidad definido en fases previas.

Ejemplo 2

15 *t(4;11)(q21;q23) con el transcrito de gen de fusión MLL-AF4*

2.1 Antecedentes

20 La *t(4;11)(q21;q23)* es la translocación de 11q23 más frecuente en la ALL de precursores de células B e implica a los genes MLL (HRX, Htrx, ALL1) y AF4 (FEL). Mientras que se observa positividad para MLL-AF4 en el 5% de los casos de ALL pediátrica y en adultos, este subgrupo representa del 40 al 60% de la ALL inducida por terapia y de lactantes. La función de MLL de mamíferos se desconoce todavía en gran parte, pero parece desempeñar un papel principal en la segmentación durante el desarrollo. Una desactivación de AF4 en ratón reciente sugirió que este gen codifica para un supuesto factor de transcripción que está implicado en la ontogenia del linaje linfóide. Se ha sugerido que el aumento de resistencia de la leucemia positiva para MLL-AF4 a la muerte celular inducida por estrés mostrado *in vitro* contribuye a su mal pronóstico.

30 Al nivel molecular, los puntos de rotura en los genes MLL y AF4 están diseminados dentro de los intrones, entre el exón 8 y el 12 (MLL) y el exón 3 y el 7 (AF4), siendo algunos transcritos más frecuentes en la ALL o bien de adultos o bien de lactantes.(5) Se notificó que usando una técnica de RT-PCR anidada con una sensibilidad de 10^{-4} , se obtenían niveles bajos de expresión de transcritos de MLL-AF4 en hasta el 13% de la ALL pediátrica en el diagnóstico, siendo algunos de ellos negativos para la redistribución de MLL-AF4 mediante análisis de tipo Southern, y en aproximadamente el 25% de muestras de hígado fetal o BM normal recientes. Basándose en estos datos, los autores sugirieron que los ensayos de RT-PCR para los transcritos de FG MLL-AF4 no eran adecuados para monitorizar la MRD. Sin embargo, estos hallazgos notables no se han confirmado hasta la fecha por otros grupos ni mediante otras técnicas.

40 No obstante, en el mismo periodo, el primer estudio de MRD prospectivo, que usaba RT-PCR anidada, en 25 pacientes positivos para MLL-AF4, mostró una correlación significativa entre la positividad de la PCR, la recidiva y la supervivencia. La heterogeneidad de los transcritos de FG MLL-AF4, su relativamente baja incidencia en ALL infantil y de adultos y su mal pronóstico con la terapia clásica explican el escaso número de estudios de MRD notificados para esta diana de RT-PCR.

2.2 Datos de EAC

2.2.1 Diseño y optimización de cebadores (fases I y II)

50 A partir de los tres conjuntos de sondas y seis de cebadores sometidos a prueba, se adoptaron una sonda común ENP242 y un cebador inverso común ENR262, ambos ubicados en el exón 5 de AF4 (figura 6 y tabla 8). Debido a la gran variedad de los transcritos de FG MLL-AF4, no pudo diseñarse un conjunto de cebador/sonda común para todas las variantes de MLL-AF4. Se usaron dos cebadores directos en el gen MLL con el fin de amplificar al menos el 90% de los transcritos de FG MLL-AF4 de no lactantes y el 60% de lactantes: ENF207 (exón 9) y ENF208 (exón 10) (5). Que los inventores sepan, no se han publicado hasta la fecha conjuntos de cebador/sonda para RQ-PCR para MLL-AF4 o cualquier otro transcrito de FG MLL.

60 Se disponía de tres líneas celulares para las pruebas: RS4;11 (exón 10 de MLL-exón 4 de AF4), MV4-11 (exón 9 de MLL-exón 5 de AF4) y ALL-PO que expresaba dos transcritos alternativos (exón 10 y 11 de MLL-exón 5 de AF4). Se construyeron tres plásmidos: exón 9-exón 5, exón 10-exón 4 y exón 11-exón 5 de MLL-AF4. Un ejemplo de gráficas de amplificación típicas (diluciones de ARN de línea celular 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-4}) se muestra en la figura 7; los datos de sensibilidad de los inventores en el material de la línea celular eran comparables a los observados anteriormente para la detección de transcritos de FG MLL-AF4 usando un ensayo de PCR anidada (5). El fenómeno de “curva de arrastre” era un acontecimiento raro dentro de las muestras negativas y la mayor parte de los laboratorios relacionados (véase la sección Material y métodos y el ejemplo 9).

2.2.2 Expresión de MLL-AF4 en líneas celulares y muestras de diagnóstico de pacientes (fase IV)

Entre las 22 muestras incluidas (14 de BM y ocho de PB, incluyendo dos muestras apareadas), la mayoría de ellas (n = 19) se reclutaron de los protocolos terapéuticos franceses LALA-FRALLE para ALL y se sometieron a prueba en Marsella. El porcentaje de blastocitos en las muestras no se conocía para todas las muestras; de este modo los resultados no se corrigieron según esta proporción. La expresión normalizada del transcrito de FG MLL-AF4 (NCN) parecía ser similar entre líneas celulares (n = 3) y pacientes (tabla 9). No se observaron diferencias en NCN de MLL-AF4 entre muestras de PB y BM (figura 8). Se redujo el intervalo del 95% de la expresión cuando se usó o bien ABL o bien GUS como CG (tabla 9) en comparación con los resultados obtenidos con B2M o sin ningún CG. Además, la correlación entre los niveles de transcrito de MLL-AF4 y ABL era la más alta observada entre los tres genes de control en las muestras de diagnóstico (tabla 9).

2.2.3 Rondas de QC (fases IIIa a IVa)

Se observaron pocas muestras falsas negativas (6%, 7/110) para las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} . La amplificación del ADNc de MLLAF4 dentro de muestras negativas (muestras negativas para FG, NAC y NTC), también denominada falsa positividad, se limitó al 3% (5/176) y se restringió a laboratorios individuales (tabla 10). El valor de Ct en los pocillos falsos positivos era siempre mayor de 30 y la mayoría de las veces superior a 37.

Ejemplo 3

t(12;21)(p13;q22) con el transcrito de gen de fusión TEL-AML1

3.1 Antecedentes

Los transcritos de FG TEL(ETV6)-AML1(CBFA2, RUNX1) resultan de la t(12;21)(p13;q22) críptica y se encuentran en aproximadamente el 25% de la ALL de precursores de células B infantil. Tanto TEL como AML1 codifican para factores de transcripción nucleares, que son críticos para la hematopoyesis normal. Su fusión condujo a leucemogénesis mediante la alteración de la función normal de TEL y/o la creación de un represor transcripcional que afecta a la expresión del gen diana AML1. Se han descritos dos puntos de rotura de translocación recurrentes. El principal rompe dentro del intrón 5 de TEL y el intrón 1 de AML1, generando transcritos de FG exón 5 de TEL-exón 2 de AML1. El minoritario se encuentra en aproximadamente el 10% de las ALL positivas para TEL-AML1 y rompe dentro del intrón 2 de AML1, generando transcritos de FG exón 5 de TEL-exón 3 de AML1 que son 39 pb más cortos (figura 9). Este último transcrito de FG, junto con transcritos que carecen del exón 3 de AML1, se detectan también en casos con fusión del exón 2 de AML1, como resultado de corte y empalme alternativo. Se han descrito casos con puntos de rotura en el intrón 4 de TEL, pero siguen siendo excepcionales.

El pronóstico de ALL positiva para TEL-AML1 es todavía controvertido. Hay un acuerdo en que la presencia de los transcritos de FG TEL-AML1 está asociada con una alta probabilidad de supervivencia libre de acontecimientos durante 4 años. Sin embargo, algunos autores, aunque no otros, notificaron tasas de recidiva similares a las de la ALL en general, produciéndose una mayoría de las recidivas fuera de la terapia. Todavía no está claro si estas variaciones de un estudio a otro se deben a sesgos metodológicos o a diferencias en la eficacia de los regímenes de quimioterapia.

Pocos estudios han notificado hasta la fecha resultados de MRD para pacientes con ALL positiva para TEL-AML1. La mayoría de estos estudios se basaban en una evaluación cualitativa o semicuantitativa del nivel de transcrito. La alta frecuencia de positividad para el transcrito de TEL-AML1 en la ALL de precursores de células B indujo a varios grupos a desarrollar estrategias de RT-PCR cuantitativa dirigidas a este transcrito para seguir la MRD. Los datos preliminares muestran que todavía puede detectarse MRD tras la terapia de inducción en el 40 al 50% de los pacientes, y que se encuentran altos niveles de MRD en algunos pacientes. Sin embargo, a pesar de la frecuencia relativamente alta de la fusión TEL-AML1, sólo se han analizado hasta la fecha pequeñas series de pacientes (siempre menos de 30 pacientes), y la poca frecuencia de las recidivas además de su posible aparición tardía hacía difícil realizar cualquier correlación clínica hasta la fecha.

3.2 Datos de EAC

3.2.1 Diseño y optimización de cebadores (fases I y II)

La línea celular usada para las pruebas fue REH93, que presenta una fusión de exón 5 de TEL-exón 2 de AML1. Se usaron también dos constructos de plásmido, uno que contenía el “transcrito largo” (exón 5 de TEL-exón 2 de AML1), y el otro que contenía el “transcrito corto” (exón 5 de TEL-exón 3 de AML1) (véase la sección Materiales y métodos).

Al final de la fase de optimización, se seleccionó un conjunto de cebador/sonda (ENF 301 en el exón 5 de TEL, ENR361 en el exón 3 de AML1 y ENPr341 en el exón 5 de TEL) a partir de los cinco conjuntos que se sometieron a prueba inicialmente (figura 9 y tabla 11). Un ejemplo de gráficas de amplificación típicas (diluciones de ARN de línea celular 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-4}) se muestra en la figura 10; las condiciones de RT y PCR optimizadas permitieron detectar una dilución 10^{-4} de la línea celular REH en ARN de PBL y 10 copias de plásmidos en el 100% de los casos, lo

que concuerda con los resultados obtenidos previamente en la acción concertada BIOMED-1 (5). Debe indicarse que variantes moleculares tales como transcritos con una fusión del exón 4 de TEL siguen sin detectarse usando este conjunto de cebadores.

3.2.2 Expresión de TEL-AML1 en la línea celular REH y muestras de diagnóstico de pacientes (fase IV)

Se estudió la expresión de TEL-AML1 en la línea celular REH y en 57 muestras de la ALL de precursores de células B positivas para TEL-AML1, 30 de BM y 27 de PB, incluyendo 23 muestras apareadas (tabla 12). Las muestras contenían del 18% al 100% de blastocitos leucémicos. Se obtuvo una mayoría de estas células de pacientes del Hospital Saint-Louis (París, FR). Se calculó el NCN y se ajustó al porcentaje de blastocitos presentes en cada muestra.

La expresión de TEL-AML1 en la línea celular REH estaba dentro del intervalo detectado en muestras de leucemia primarias.

No se observaron diferencias significativas para NCN de ABL en la expresión de TEL-AML1 cuando se compararon muestras de PB y BM recogidas en el diagnóstico en los mismos pacientes (figura 11).

3.2.3 Rondas de QC (fases IIIa a IVa)

Tal como se esperaba a partir del umbral de sensibilidad definidos en fases previas, se encontró que las diluciones de ARN 10^{-3} y 10^{-4} de la línea celular REH eran siempre positivas (tabla 13) según los criterios definidos en la sección Métrica y métodos. Se encontró que una dilución $5 \cdot 10^{-5}$ era positiva en 7/7 laboratorios. Durante las diversas rondas de QC, se sometieron a prueba 11 muestras negativas (seis muestras de ARN negativo y cinco de NAC o NTC) en de 7 a 11 laboratorios, correspondientes a un total de 279 pocillos de amplificación (tabla 13). Se encontró que nueve de estos pocillos (3%) eran falsamente positivos, correspondientes a tres muestras falsas positivas de 93 (3%) según los criterios mencionados anteriormente. Estos pocillos falsos positivos se observaron en 6 laboratorios diferentes. No se observó ningún caso de falsa positividad con 3 pocillos positivos y los valores de Ct eran siempre superiores a 39. Todos los pocillos falsos positivos correspondían a ARN negativo, mientras que NAC y NTC eran siempre negativos. Esta observación sugiere que estos resultados falsos positivos podrían deberse a contaminaciones producidas antes de la amplificación, tal como la etapa de RT.

Ejemplo 4

t(9;22)(q34;q11) con el transcrito de gen de fusión BCR-ABL m-bcr

4.1 Antecedentes

El FG BCR-ABL está asociado con la formación del cromosoma Filadelfia (Ph) y es una de las anomalías genéticas más comunes detectadas en leucemias. En ALL, se detecta Ph en el 25-30% de los casos adultos y el 2-5% de los casos infantiles. Menos frecuentemente, está asociado con leucemia mieloide aguda. En el subconjunto de ALL, se sabe que esta lesión genética confiere un pronóstico muy malo y, por consiguiente, su detección es importante al planear terapias agresivas, incluyendo trasplante alogénico de médula ósea. Además, se encuentra el cromosoma Ph en más del 95% de los casos de CML y es el distintivo de esta enfermedad. A nivel molecular, el cromosoma Ph o t(9;22) da como resultado la yuxtaposición de la parte 5' del gen BCR (cromosoma 22) con la parte 3' del gen ABL (cromosoma 9). En la inmensa mayoría de los pacientes, los puntos de rotura en el gen BCR están agrupados dentro de tres regiones bien definidas: i) una secuencia de 55 Kb del primer intrón, denominada región de agrupamiento de puntos de rotura minoritaria ("*minor breakpoint cluster region*") (m-bcr), ii) una región de 5,8 Kb que abarca los exones 12 a 16, denominada región de agrupamiento de puntos de rotura principal ("*major breakpoint cluster region*") (M-bcr) y iii) finalmente el intrón 19, denominado μ -bcr. Un análisis de los puntos de rotura de μ -bcr no se tratará adicionalmente debido a su extrema poca frecuencia. En el caso de los puntos de rotura de m-bcr, el primer exón del gen BCR (el) está yuxtapuesto con el segundo exón del gen ABL (a2). El transcrito de fusión resultante (el-a2) codifica para una proteína quimérica de 190 Kda (p190). Este tipo de FG BCR-ABL se encuentra en el 65% de los adultos y el 80% de los niños con ALL positiva para Ph. Sólo en casos esporádicos se encuentra el gen BCR-ABL que codifica para p190 en CML.

A pesar de los enormes esfuerzos, todavía no se entienden completamente los mecanismos moleculares mediante los que la proteína BCR-ABL híbrida alcanza capacidad transformante. Sin embargo, la proteína BCR-ABL muestra una actividad tirosina cinasa aumentada y desregulada y parece desregular las rutas de transducción de señales dependientes de citocinas normales conduciendo a la inhibición de la apoptosis y mediante crecimiento independiente de factores de crecimiento.

Todos los estudios sobre el valor clínico de MRD en pacientes con ALL Ph+ indican que las células positivas para BCR-ABL no pueden erradicarse ni siquiera mediante quimioterapia intensa. En una serie de 36 pacientes con ALL Ph+ tratados mediante SCT, se notificó que la evaluación mediante RT-PCR de MRD era, mediante análisis de múltiples variables, el mejor indicador de pronóstico para detectar una remisión completa continua. Recientemente, se notificó el seguimiento mediante análisis de RQ PCR de 13 pacientes con ALL positivos para m-bcr. Todos estos datos sugieren que, en pacientes con ALL Ph+, la monitorización cuantitativa de células leucémicas residuales podría demostrar ser más valiosa que su detección cualitativa para ayudar a tomar una decisión clínica.

4.2 Datos de EAC

4.2.1 Diseño y optimización de cebadores (fase I y II)

Se sometió a prueba la eficacia de cuatro conjuntos de cebador/sonda diferentes, diseñados usando el software “Primer ExpressTM”, en experimentos de dilución en serie 1:10 de ARN de la línea celular TOM-1 (unión e1-a2 o m-bcr) en ARN de células HL60. Todos los conjuntos de cebador/sonda estaban libres de artefactos de amplificación no específicos, aunque dos conjuntos eran superiores en cuanto a la sensibilidad y al valor de ΔR_n en la fase de meseta. Ambos conjuntos tenían eficacias de amplificación comparables y alcanzaron una sensibilidad de 10^{-5} y $\Delta R_n > 3,0$ en la dilución de la línea celular 10^{-1} . Tras pruebas extensas, se seleccionó el conjunto que incluía ENF402 (ubicado en el exón 1 de BCR), ENR561 y la sonda ENP541, ambos ubicados en el exón 2 de ABL. Tanto el cebador inverso como la sonda son comunes para el conjunto usado para la detección mediante RQ-PCR de los transcritos de FG BCR-ABL (M-bcr) (figura 12, tabla 14). Un ejemplo de gráficas de amplificación típicas (diluciones de ARN de línea celular 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-4}) se muestra en la figura 13.

4.2.2 Expresión de FG BCR-ABL m-bcr en la línea celular TOM-1 y en muestras de diagnóstico de pacientes (fase IV)

Para establecer intervalos de referencia de los transcritos de m-bcr, los inventores determinaron la expresión de FG en 17 muestras de BM y siete muestras de PB de pacientes con ALL secuenciales en el diagnóstico así como preparadas centralmente y ARN distribuido de la línea celular TOM-1 (tabla 15). Para el FG y los tres transcritos de CG sometidos a ensayo, se amplificaron series separadas de diluciones de plásmidos en cada experimento para calcular el número de copias del transcrito. Aunque las muestras con Ct de ABL $> 29,3$ se excluyeron del análisis debido a que no eran adecuadas para la amplificación, los valores de Ct de todos los transcritos eran generalmente inferiores en las líneas celulares que en el material del paciente (tanto BM como PB), lo más probablemente debido a la baja calidad de algunos de los ARN del paciente. Sin embargo, tras la normalización respecto a la expresión de los genes de control, los niveles de transcrito de m-bcr eran comparables en pacientes y en la línea celular TOM-1, y muy similares en cuatro muestras de BM y PB apareadas (figura 14).

Los cebadores y la sonda usados para amplificar el ARNm de ABL también pueden amplificar el ARNm del FG BCR-ABL y, por tanto, el ensayo de la expresión génica de ABL usado para normalizar los datos puede verse afectado por los niveles del transcrito de m-bcr en las muestras.

4.2.3 Rondas de control de calidad (fase IIIa a IVa)

Sólo 3/129 pocillos dieron resultados falsos negativos (véase Materiales y métodos para los detalles) en las tres rondas de QC y en todos los casos la falsa negatividad se obtuvo para las diluciones 10^{-4} de TOM-. Además, se detectaron resultados falsos positivos en el 5,3% de las pruebas de PCR (13/246, tabla 16).

Ejemplo 5

t(9;22)(q34;q11) con el transcrito de gen de fusión BCR-ABL M-bcr

5.1 Antecedentes

La mayoría de los casos de CML están asociados con la presencia de t(9;22) lo que da como resultado un pequeño cromosoma 22 derivado conocido como cromosoma Filadelfia. Como consecuencia, el protooncogén ABL en el cromosoma 9 se fusiona con el gen BCR en el cromosoma 22. En pacientes con CML y aproximadamente el 35% de pacientes adultos con ALL positivos para Filadelfia, el punto de rotura en el cromosoma 22 está ubicado entre los exones 12 a 16 del gen BCR, en la denominada región de agrupamiento de puntos de rotura principal (M-bcr). El punto de rotura en el cromosoma 9 está ubicado en la mayoría de los casos entre los exones 1 y 2 en el gen ABL. El producto de transcripción de este FG BCR-ABL es un ARN de fusión aberrante de 8,5 kb con dos variantes de unión b2a2 y/o b3a2 que da lugar a la proteína quimérica BCR-ABL (p210), una tirosina cinasa con actividad desregulada. Pueden observarse casos raros con transcritos de BCR-ABL b2a3 y b3a3.

Debido a su alta sensibilidad, se ha usado de manera amplia RT-PCR cualitativa para monitorizar la enfermedad residual en CML, produciendo resultados parcialmente contradictorios. El análisis secuencial de pacientes que recibieron trasplante de BM alogénico (BMT) mostró que la positividad para PCR repetida se correlacionaba con un aumento del riesgo de recidiva. Por el contrario, otros estudios no encontraron ninguna correlación entre la positividad para PCR y la recidiva posterior y mostraron que los supervivientes a largo plazo de BMT alogénico podrían ser positivos para PCR incluso años tras el trasplante sin sufrir nunca recidiva.

Varios grupos desarrollaron un método de RT-PCR competitiva para cuantificar el nivel de transcritos de FG BCR-ABL en un esfuerzo por mejorar el valor predictivo de la detección de ARNm de BCR-ABL. El análisis secuencial de pacientes que habían experimentado BMT mostró que la monitorización de los niveles de transcritos de FG BCR-ABL puede ser útil para predecir una recidiva inminente mientras que el paciente está todavía en remisión hematológica y citogenética. Basándose en estudios de RT-PCR cuantitativa, dos grupos han propuesto definir un parámetro de

“recidiva molecular”. Además, la cuantificación de los transcritos de FG BCR-ABL también se ha demostrado que es útil para monitorizar la respuesta en pacientes tratados con α -interferón e imatinib.

A pesar de muchos informes alentadores, la monitorización de los transcritos de FG BCR-ABL con RT-PCR competitiva ha tenido un impacto clínico limitado, debido parcialmente al hecho de que este enfoque es difícil de normalizar. Desde la llegada de la PCR en tiempo real, varios grupos han publicado informes que describen la viabilidad de monitorizar pacientes con CML con esta técnica. Sin embargo, la mayoría de los estudios de RQ-PCR incluían demasiados pocos pacientes o pacientes de diferentes protocolos terapéuticos que junto con las diferencias metodológicas hacen difícil evaluar el impacto clínico y definir directrices generales para monitorizar pacientes con CML con RQ-PCR. La disponibilidad de un protocolo normalizado para la RQ-PCR facilitará la comparación de datos entre diferentes centros, haciendo posible definir un umbral en el que es probable que un paciente experimente recidiva y en última instancia evaluar el impacto de una intervención terapéutica temprana basándose en la cinética de los transcritos de FG BCR-ABL.

5.2 Datos de EAC

5.2.1 Diseño y optimización de cebadores (fase I y II)

Se diseñaron dos cebadores de BCR directos alternativos, uno ubicado en el exón 13 de BCR (exón b2) y el segundo en el exón 14 de BCR (exón b3) y una sonda y un cebador de ABL inverso, ambos en el segundo exón del gen ABL (figura 12). Este conjunto, junto con cinco conjuntos comparables ya disponibles dentro de la red, se evaluó para determinar la sensibilidad así como la robustez de la reacción de PCR (véase la sección Materiales y métodos). Basándose en estos parámetros, se eligió el conjunto diseñado por el grupo de EAC. Dado que se amplificaron series de diluciones de la línea celular K-562 con igual eficacia con cualquiera de los dos cebadores directos, se seleccionó un cebador directo común ENF501, ubicado en el exón 13 de BCR (exón b2) para amplificar ambas variantes de fusión de BCR-ABL b3-a2 y b2-a2 (figura 12, tabla 17). Un ejemplo de gráficas de amplificación típicas (diluciones de ARN de línea celular 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-4}) se muestra en la figura 15.

5.2.2 Expresión de BCR-ABL M-bcr en la línea celular K-562 y en muestras de diagnóstico de pacientes (fase IV)

- Para CML, en K-562 y en pacientes en el diagnóstico

Se cuantificó la expresión de los transcritos de BCR-ABL M-bcr en 29 pacientes con CML con el fin de establecer el intervalo de niveles de expresión de FG en muestras de diagnóstico (tabla 18, figura 16a). Estas muestras incluían 15 muestras de BM y 14 de PB. La expresión del FG BCR-ABL en relación con CG era muy similar entre BM y PB. No se encontraron grandes variaciones en los niveles de expresión de BCR-ABL M-bcr entre pacientes individuales. Se encontró que la expresión de ARNm de BCR-ABL en la línea celular K-562 era superior que en muestras de diagnóstico de CML en dos logaritmos en relación con el gen B2M y un logaritmo en relación con el gen GUS (véase la tabla 18).

- En ALL positiva para BCR-ABL M-bcr

Además de muestras de diagnóstico de pacientes con CML en fase crónica, se cuantificó la expresión de BCR-ABL M-bcr en muestras de diagnóstico de ALL positivas para BCR-ABL M-bcr (tabla 19, figura 16b). Se encontró que la expresión de BCR-ABL en relación con B2M y GUS era superior en muestras de ALL en comparación con muestras de CML (tablas 18 y 19). Los inventores observaron una diferencia estadística en el nivel de expresión de FG entre pacientes con CML y ALL con M-bcr o bien con B2M o bien con GUS como CG ($p=0,001$), mientras que no se observaron diferencias entre m-bcr y M-bcr en ALL (figura 17).

El conjunto de cebadores diseñado para amplificar el gen de control ABL está ubicado en el exón 2 y también amplifica el FG BCR-ABL. Por este motivo, el uso de ABL como gen de control podría introducir un sesgo para cuantificar BCR-ABL en muestras de ALL Ph+ y de CML cuando una gran proporción de las células expresa BCR-ABL. El uso de la razón (BCR-ABL/ABL) conduciría teóricamente a una subestimación de la carga tumoral en estas muestras dado que la razón máxima es uno. Sin embargo, este sesgo tuvo un impacto minoritario en la cuantificación relativa de transcritos de FG en el diagnóstico (véase a continuación). Los inventores encontraron valores de hasta 3,0 en muestras de BM y de hasta 4,4 en muestras de PB de pacientes con CML en el diagnóstico (tabla 18), aunque todas las medianas de las razones BCR-ABL/ABL eran inferiores a 1, excepto para PB de pacientes con CML en el diagnóstico (tablas 15 y 18). Estos resultados inesperados obtenidos con calibradores de plásmidos se confirmaron sin calibradores (método de Act) e ilustran claramente los límites de precisión de la cuantificación de transcritos génicos mediante RQ-PCR. Se observaron resultados similares en un contexto de oligocentro.

5.2.3 Rondas de control de calidad (fase IIIa a IVa)

El porcentaje de falsos positivos era del 4,9% (14/285) para la primera y segunda rondas de control de calidad (tabla 20). Los laboratorios que mostraron los resultados falsos negativos tenían una reducción consecuente en la sensibilidad para todas las dianas en una fase particular, lo que indicaba que la causa de la inferior sensibilidad era una eficacia de RT inferior en vez de un problema relacionado con la PCR.

En la tercera ronda de control de calidad (fase IVa), se observó una tasa de falsa positividad (5,5%, 6/110) similar a las fases previas a pesar de una frecuencia particularmente alta (18%, 4/22) de resultados falsos positivos dentro de muestras negativas para FG (tabla 20). Esta observación se explica posiblemente por la inclusión del ARN de K-562 no diluido entre las muestras codificadas, en lugar de la dilución 10^{-1} y de ese modo el aumento del riesgo de contaminar accidentalmente pocillos vecinos cuando se pipetea el ADNc sobre la placa de PCR. Debe indicarse que la mayoría de las muestras falsas positivas (NAC/NTC) se concentraron en laboratorios individuales mientras que el resto de los laboratorios (un laboratorio por ronda de QC) mostró sólo ocasionalmente pocillos falsos positivos individuales o no mostró falsos positivos.

10 Ejemplo 6

Microdeleción intracromosómica en 1p32 con el transcrito de gen de fusión SIL-TAL1

6.1 Antecedentes

15 La microdeleción en 1p32 es la aberración cromosómica más frecuente encontrada en T-ALL infantil. La microdeleción implica el gen TAL1 (gen de leucemia 1 aguda de células T, también conocida como leucemia de células madre (SCL) o gen 5 de leucemia de células T (TCL5)) y el gen SIL (locus interruptor de SCL), que está ubicado a aproximadamente 90 kb en el sentido de 5'. Como resultado, las secuencias codificantes de TAL1 se colocan bajo el control del promotor de SIL, que se expresa en células T, y por consiguiente el gen TAL1 se expresa de manera ectópica en la T-ALL implicada.

20 El gen TAL1, en particular los exones 4, 5 y 6, codifica para una proteína de 42 kDa, que es un factor de transcripción de hélice-bucle-hélice básico (bHLH). La proteína de TAL1 puede formar heterodímeros con otros factores de transcripción bHLH, incluyendo miembros de la familia de E2A, y es un factor esencial para el desarrollo de todos los linajes hematopoyéticos. El gen SIL es un miembro de la familia génica inmediata-temprana, pero su función en células hematopoyéticas no está aún bien definida.

30 Aunque tanto los genes SIL como TAL1 contienen varios puntos de rotura de deleción conservados, la mayoría de los casos ($\geq 95\%$) implican el punto de rotura sildb1 en combinación con el punto de rotura taldb1 o taldb2. Mediante corte y empalme alternativo, pueden formarse tres transcritos de SIL-TAL1 diferentes, de los que el transcrito de tipo II es el más predominante. No hay relación aparente entre la aparición de los transcritos de SIL-TAL1 y el pronóstico o desenlace.

35 Se encuentran exclusivamente transcritos de SIL-TAL1 en T-ALL, en la que están presentes en el 5-25% de los pacientes. La frecuencia está relacionada con el inmunofenotipo de la T-ALL (la presencia del FG SIL-TAL1 está restringida a la T-ALL CD3- y TCR $\alpha\beta$ +) y la aparición de deleciones génicas de TCRD. Los transcritos de FG SIL-TAL1 parecen ser más frecuentes en niños en comparación con adultos.

40 La detección de deleciones de TAL1 al nivel del ADN ya se ha descrito. Un informe reciente describió un método de RQ-PCR a base de TaqMan para la detección de deleciones de TAL1 a nivel del ADN en pacientes con T-ALL. En ese informe, se colocaron el cebador directo y la sonda en el exón 1b de SIL (y parte del siguiente intrón) y el cebador inverso se ubicó en el exón 1b de TAL1. Usando la línea celular CEM, pudo obtenerse una sensibilidad de 10^{-5} , que es equivalente a un único genoma leucémico. Que los inventores sepan, no se han publicado hasta la fecha conjuntos de cebadores/sonda para RQ-PCR para transcritos de FG SIL-TAL1.

6.2 Datos de EAC

6.2.1 Diseño y optimización de cebadores (fases I y II)

50 Inicialmente, se sometieron a prueba tres sondas TaqMan (ubicadas en el exón 1a de SIL, el exón 4 de TAL1 y el exón 5 de TAL1), dos cebadores directos (ambos en el exón 1a de SIL) y cinco cebador inversos (dos en el exón 3 de TAL1, dos en el exón 4 de TAL1 y uno en el exón 6 de TAL1) para determinar la especificidad y eficacia.

55 Se seleccionaron un único cebador directo (ENF601; ubicado en el exón 1a de SIL), un cebador inverso (ENR664; ubicado en el exón 3 de TAL1) y una sonda (ENP641; ubicada en el exón 1a de SIL) (figura 18 y tabla 21). Un ejemplo de gráficas de amplificación típicas (diluciones de ARN de línea celular 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-4}) se muestra en la figura 19.

60 El conjunto de cebador/sonda seleccionado detectará prácticamente todos los transcritos de SIL-TAL1 (el tipo II más común así como el tipo III), pero no detectará translocaciones de TAL1 o la expresión "aberrante" del gen TAL1 sin redistribuciones aparentes.

6.2.2 Expresión de SIL-TAL1 en líneas celulares y en muestras de diagnóstico de pacientes (fase IV)

65 Se sometió a prueba ARN sin diluir de seis líneas celulares positivas para SIL-TAL1 diferentes por duplicado para determinar la expresión de CG (ABL, B2M y GUS) y por triplicado para determinar la expresión del FG SIL-TAL1 (tabla 22). En tres laboratorios, se incluyó también un total de dieciséis pacientes positivos para SIL-TAL1 en el diagnóstico (10 muestras de BM y 10 de PB, incluyendo cinco pares).

Los valores de Ct para los transcritos de CG eran significativamente inferiores en las líneas celulares en comparación con las muestras de pacientes (tabla 22), lo que puede deberse al hecho de que se usaron muestras de pacientes almacenadas o alternativamente a que su expresión es superior en líneas celulares que en muestras de pacientes primarias. La expresión del transcrito de SIL-TAL1 (Ct, CN y NCN) era comparable entre las seis líneas celulares sometidas a prueba, pero en los pacientes se encontró una variación ligeramente más grande en la expresión del transcrito de FG SIL-TAL1 (tabla 22). No obstante, la expresión normalizada del transcrito de FG SIL-TAL1 no era diferente entre líneas celulares y pacientes. Además, la comparación entre muestras de BM y PB (incluyendo cinco pares) mostró que la expresión del transcrito de SIL-TAL1 era similar en ambos compartimentos (figura 20).

6.2.3 Rondas de control de calidad con muestras ciegas (fases IIIa a IVa)

Se observó falsa positividad en dos de 46 muestras negativas para FG (4,3%) y en ninguno de 162 pocillos de NAC/NTC (0%) dando como resultado una falsa positividad total del 1,0% (2/208). Sólo se observó falsa negatividad en la primera ronda de QC (fase IIIa), pero estaba ausente en las dos siguientes rondas de QC (tabla 23). Por tanto, la falsa negatividad no parece ser un problema, aunque esto puede depender del nivel de transcritos de FG SIL-TAL1 en la muestra de células leucémicas.

Ejemplo 7

t(15;17)(q22;q21) con el transcrito de gen de fusión PML-RARA

7.1 Antecedentes

Los transcritos de FG PML-RARA, que son el resultado molecular de la translocación t(15;17)(q22;q21), están asociados con la mayoría de los casos de APL, un subconjunto de AML distinto con citomorfología M3.

La APL representa el 10-15% de la AML *de novo* en adultos más jóvenes en el sur de Europa. Entre pacientes pediátricos, se considera habitualmente que la incidencia de APL es inferior y que representa el 3-9%, aunque datos publicados de estudios cooperativos italianos indican que la APL se produce en niños italianos con la misma incidencia observada en adultos. Además, varias pequeñas series de diferentes países en América central y del sur han indicado una frecuencia mayor de la esperada de APL pediátrica.

Los dos genes fusionados en la t(15;17) son PML, ubicado en el cromosoma 15 y el gen del receptor α de ácido retinoico (RARA) en el cromosoma 17. Se ha mostrado que otros genes se fusionan a RARA en ejemplos poco comunes de casos de APL morfológica negativos para la t(15;17), tales como PLZF en el cromosoma 11q23, NPM en 5q35, NUMA en 11q13 y STAT5B en 17q21.

La proteína quimérica PML-RARA es un represor transcripcional. En ausencia de ligando (ácido retinoico, RA), se une al ADN junto con correpresores tales como SMRT (mediador de silenciamiento para RAR y TR) y N-CoR (correpressor de receptor nuclear) y hace que la cromatina sea inaccesible a activadores transcripcionales o la maquinaria de transcripción basal.

Los puntos de rotura de RARA se producen siempre en el intrón 2, que tiene 17 Kb de longitud (figura 21). En cambio, tres regiones del locus de PML están implicadas en los puntos de rotura de la translocación t(15;17): el intrón 6 (bcr1; 55% de los casos), el exón 6 (bcr2; 5%) y el intrón 3 (bcr3; 40%) (figura 21). Como consecuencia, hay tres posibles isoformas de PML-RARA, denominadas larga (L, o bcr1), variante (V, o bcr2) y corta (S, o bcr3). Debe indicarse que el tamaño de los productos de PCR varía en casos positivos para bcr2, debido a las posiciones variables de los puntos de rotura en el exón 6 del gen PML y a la inclusión de un número variable de nucleótidos derivados del intrón 2 de RARA en el transcrito de FG. Se forman transcritos quiméricos de PML-RARA y RARA-PML como consecuencia de la translocación recíproca entre los loci de PML y RARA. Sin embargo, la observación de que los transcritos de FG RARA-PML están presentes en la mayoría pero no en todos los casos de APL, ha favorecido el uso de los transcritos de FG PML-RARA como diana de PCR para la detección de células con APL en el diagnóstico y durante la monitorización. Se han desarrollado condiciones normalizadas para el análisis mediante RT-PCR de los transcritos de FG PML-RARA mediante la acción concertada BIOMED-1 (5). Se han diseñado conjuntos de cebadores para permitir la detección de los diversos transcritos de FG PML-RARA, generados mediante la existencia de diferentes regiones de puntos de rotura de PML así como la presencia de corte y empalme alternativo entre exones centrales de PML.

En la última década, la disponibilidad de terapia de diferenciación con ácido todo-trans retinoico (ATRA) ha producido una mejora notable en el desenlace de pacientes con APL. El desafío es cómo identificar el subgrupo relativamente pequeño de pacientes con riesgo particular de recidiva que no pueden distinguirse de manera fiable basándose en las características antes del tratamiento y que se beneficiarían posiblemente de un tratamiento más intenso en la primera remisión. Globalmente, hay un acuerdo general de que una prueba positiva para PML-RARA tras la consolidación es un factor de pronóstico fuerte de recidiva hematológica posterior, mientras que resultados repetidamente negativos están asociados con supervivencia a largo plazo en la mayoría de los pacientes. Un grupo notificó que la reaparición de positividad para PCR, detectada mediante la vigilancia de BM cada tres meses de médulas realizada tras la finalización de la terapia, era altamente predictiva de recidiva. Usando una estrategia de este tipo, se pronosticaron satisfactoriamente aproximadamente el 70% de las recidivas. Se ha usado una perspectiva diferente en la aplicación de MRD para identificar pacientes con APL con riesgo superior de recidiva mediante el ensayo MRC ATRA, en el que se evaluó la cinética

de lograr una remisión molecular. Finalmente, tiene que comprobarse todavía el beneficio del tratamiento temprano en el momento de la recidiva molecular, aunque las pruebas preliminares apoyan una estrategia de este tipo.

Entre los diferentes métodos (cariotipificación convencional, FISH e inmunotinción de PML con anticuerpos específicos), la detección mediante RT-PCR de los transcritos de FG PML-RARA parece ser el único enfoque adecuado para la detección de MRD (5). Además, la PCR cuantitativa podría proporcionar información sobre la correlación entre los diferentes niveles de enfermedad en fases tempranas de la terapia y el desenlace clínico. Sin embargo, ha habido relativamente pocos estudios que notifiquen el uso de RQ-PCR en pacientes con APL.

7.2 Datos de EAC

7.2.1 Diseño y optimización de cebadores (fases I y II)

Se evaluaron una sonda y dos cebadores inversos en el exón 3 del gen RARA en combinación con siete cebadores directos en el gen PML. Se diseñaron cinco cebadores directos en el exón 6 de PML, dos y tres cebadores específicos para los puntos de rotura bcr1 y bcr2 respectivamente, mientras que se diseñaron dos cebadores para bcr3 en el exón 3 de PML. Basándose en datos publicados sobre la localización de los puntos de rotura de PML bcr2, se diseñaron los cebadores directos respectivos en el exón 6 de PML con el fin de cubrir al menos el 80% de los casos de bcr2. La única línea celular disponible para las pruebas era NB-4,165 que tiene un punto de rotura de PML bcr1; para la evaluación de los conjuntos de cebador/sonda bcr2 y bcr3, se usó ARN de BM de pacientes en el diagnóstico. Se prepararon constructos de plásmido para las tres variantes de punto de rotura de PML-RARA (véase la sección Materiales y métodos).

Tras amplias pruebas en la línea celular y diluciones de plásmido y ARN del paciente, se seleccionaron tres conjuntos de cebador/sonda específicos, basándose en la sensibilidad máxima: la sonda de RARA ENP942, el cebador inverso común de RARA ENR962 y tres cebadores directos de PML ENF903 (para bcr1), ENF906 (para bcr2) y ENF905 (para bcr3), respectivamente (figura 21). Las secuencias se enumeran en la tabla 24. Aunque puede usarse posiblemente ENF906 para amplificar casos de bcr1 así como de bcr2, la comparación directa de ENF906 y ENF903 para la amplificación de PML-RARA en diluciones en serie de la línea celular NB-4 reveló que este último cebador proporciona un ensayo más sensible para la amplificación de casos de bcr1. Un ejemplo de gráficas de amplificación típicas (ARN 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-4} de NB-4 (bcr1) en ARN de PBL) se muestra en la figura 22.

7.2.2 Expresión de PML-RARA en líneas celulares y muestras de diagnóstico de pacientes (fase IV)

Se estudió la expresión de PML-RARA en la línea celular NB-4 y en 16 pacientes positivos para AML-M3 bcr1. (Tabla 25, figura 23). Las muestras de pacientes consistían en 14 muestras de BM y 9 de PB, incluyendo seis muestras de BM/PB apareadas, obtenidas en el diagnóstico. Las muestras contenían del 10% al 100% de blastocitos leucémicos. Se calcularon los números de copias normalizados y se ajustaron para el porcentaje de blastocitos presentes en cada muestra. La expresión de PML-RARA en la línea celular NB-4 estaba dentro del intervalo de expresión de FG detectado en muestras de leucemia primaria.

Se estudió la expresión de PML-RARA en seis pacientes positivos para bcr3 en el diagnóstico, que consistían en seis muestras de BM y cuatro de PB (incluyendo cuatro muestras de BM/PB apareadas). Aunque el número era muy limitado, no se observaron diferencias significativas en la expresión de PML-RARA bcr3 cuando se compararon PB y BM en muestras apareadas excepto para los resultados normalizados para B2M (véase la figura 23).

7.2.3 Rondas de QC (fases IIIa a IVa)

Durante las diversas rondas de QC, se sometieron a prueba 145 muestras negativas en de 7 a 11 laboratorios durante las tres fases (tabla 26). Cinco de 100 muestras de NAC/NTC (5%) y cinco de 45 muestras negativas para FG (11%) eran falsamente positivas para la amplificación de bcr1 (tabla 26). Globalmente, la frecuencia de falsa positividad era del 6,9% (10/145). La denominada falsa positividad se limitó a laboratorios individuales y el valor de Ct en el pocillo falso positivo era siempre mayor de 30 y la mayoría de las veces superior a 35.

En cambio, según los criterios mencionados anteriormente, no se observó ninguna muestra falsa negativa ($n = 96$) para las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} , ni para bcr1, bcr2 ni bcr3. Ninguno de los 42 pocillos sometidos a prueba independientemente para bcr2 y bcr3 a la dilución 10^{-4} resultó falsamente positivo. Sólo 8 de 180 pocillos (4,4%) sometidos a prueba para bcr1 a la dilución 10^{-4} resultaron falsamente negativos.

Ejemplo 8

Inv(16)(p13q22) con el transcrito de gen de fusión CBFB-MYH11

8.1 Antecedentes

La inversión pericéntrica del cromosoma 16, inv(16)(p13q22), se encuentra en aproximadamente el 8-9% de los casos de AML recién diagnosticados. Las AML positivas para inv(16) se incluyen con las de la translocación t(8;21) en un grupo denominado generalmente leucemias de “factor de unión central” (“Core Binding Factor”) (CBF), caracteri-

zándose ambas por redistribuciones de genes que codifican para componentes del factor de transcripción heterodimérico CBF, que desempeña un papel esencial en la hematopoyesis. Inv(16) o la t(16;16)(p13;q22) poco común conducen a la fusión del gen de la cadena CBFB con el gen MYH11 de la cadena pesada de la miosina del músculo liso. El ARNm de FG resultante puede detectarse mediante RT-PCR y representa un marcador molecular adecuado tanto para estudios de diagnóstico como de monitorización. Hasta la fecha, se han notificado diez transcritos de FG CBFB-MYH11 diferentes. Más del 85% de los pacientes positivos tienen el transcrito de tipo A; los transcritos de tipo D y E representan cada uno casi el 5%, mientras que los otros tipos se producen en casos esporádicos. La AML positiva para CBFB-MYH11 se considera habitualmente que tiene un pronóstico favorable, obteniendo más del 50% de los pacientes CR (respuesta completa) a largo plazo. Tales resultados favorables con quimioterapia convencional condujeron a algunos autores a considerar que el BMT alogénico no está indicado para consolidar la primera CR en estos pacientes, ni siquiera cuando se dispone de un donante adecuado. No obstante, la tasa de recidiva es todavía alta, lo que indica que se necesitan métodos fiables para detectar MRD durante el CR hematológico con el fin de adaptar mejor la intensidad de la terapia tras la remisión a cohortes específicas de pacientes. Hasta la fecha, el uso de métodos basados en RT-PCR cualitativa empleados para detectar transcritos de FG CBFB-MYH11 no permitió la discriminación constante de subgrupos de pronóstico de pacientes en CR. De hecho, el uso de RT-PCR anidada convencional ha producido resultados de MRD conflictivos: mientras que en la mayoría de los informes se encontró que la inmensa mayoría de los pacientes en CR prolongada eran negativos para PCR, algunos supervivientes a largo plazo nunca se convirtieron en negativos para RT-PCR. Además, el 10-20% de los pacientes negativos para PCR experimentó finalmente recidiva, lo que sugiere que lograr la negatividad para PCR no es sinónimo de cura. Algunas de las dificultades al interpretar los resultados anteriores se derivan de la falta de normalización de las metodologías implicadas. Los estudios de RT-PCR cuantitativa usando RQ-PCR o PCR competitiva permitieron monitorizar la disminución de transcritos de FG CBFB-MYH11 durante las fases tempranas de las terapias de inducción y consolidación. Sin embargo, debido al bajo número de pacientes examinados hasta la fecha, no fue posible definir una cinética o un nivel de punto de corte para pronosticar la recidiva.

8.2 Datos de EAC

8.2.1 Diseño y optimización de cebadores (fases I y II)

Durante la fase I, los inventores sometieron a prueba seis conjuntos de cebador/sonda: tres para la forma A, dos para la D y una para la E. Dado que los transcritos de CBFB-MYH11 de tipo A, D y E representan aproximadamente el 95% de todos los casos, con el fin de amplificar estos transcritos, los inventores decidieron usar un cebador directo común ubicado en el exón 5 de CBFB (ENF803) y una sonda común ubicada en el exón 5 de CBFB (ENPr843). Se eligieron tres cebadores inversos diferentes ubicados respectivamente en el exón 12 de MYH11 para el tipo A (ENR862), el exón 8 de MYH11 para el tipo D (ENR863) y el exón 7 de MYH11 para el tipo E (ENR865) (figura 24 y tabla 27). Un ejemplo de gráficas de amplificación típicas (diluciones de ARN 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-4}) se muestra en la figura 25 para los tres tipos de transcritos de CBFB-MYH11.

8.2.2 Expresión de CBFB-MYH11 en la línea celular ME-1 y muestras de diagnóstico de pacientes (fase IV)

Se sometió a prueba ARN puro de la línea celular ME-1 (tipo A) en ocho laboratorios diferentes (tabla 28). Además, se analizaron muestras de BM o PB de diagnóstico de 24 pacientes de tipo A, tres de tipo D y cuatro de tipo E (figura 26). Los valores de transcritos de FG en el diagnóstico eran similares en las tres categorías de pacientes, aunque muestran un intervalo de variación de paciente a paciente de un logaritmo.

8.2.3 Rondas de QC (fase IIIa a IVa)

No se observó ningún resultado falso negativo para la dilución 10^{-3} , mientras que a la dilución 10^{-4} se observó un máximo del 12% de resultados falsos negativos (tabla 29). La falsa positividad estaba ausente durante todas las fases en pocillos de NAC y NTC (0%, n = 104), mientras que se observó un único caso (2 pocillos de 16) de falsa positividad durante la fase IVa en una muestra negativa para FG codificada y se debía a contaminación (tabla 29).

Ejemplo 9

t(8;21)(q22;q22) con el transcrito de gen de fusión AML1-ETO

9.1 Antecedentes

El gen de fusión AML1(CBFA2, RUNX1)-ETO (MTG8) resulta de la t(8;21)(q22;q22) que es la redistribución cromosómica más común asociada con AML, detectándose en aproximadamente el 8% de los casos de AML en niños y adultos jóvenes. El gen AML1 codifica para la subunidad $\alpha 2$ del factor de transcripción heterodimérico CBF (factor de unión central) que es crítico para el desarrollo hematopoyético y cuya subunidad β está alterada por la inv(16)/t(16;16) que conduce al FG CBFB-MYH11 FG (véase el ejemplo 8).

Tal como se muestra en la figura 27, los puntos de rotura de AML1 están ubicados en el intrón 5, mientras que los puntos de rotura de ETO se producen en el sentido de 5' del exón 2. Esto da lugar a un único tipo de transcrito de FG AML1-ETO, en el que el exón 5 de AML1 está fusionado con el exón 2 de ETO (5), simplificándose de ese modo las estrategias de selección molecular y monitorización de MRD en comparación con FG con múltiples regiones de puntos de rotura, tales como t(4;11) con MLL-AF4, t(15;17) con PML-RARA e inv(16) con CBFB-MYH11.

AML1-ETO es una importante diana de PCR para la detección de MRD en vista del desenlace generalmente favorable de los pacientes con la t(8;21), de manera que se ha mostrado que el uso rutinario de BMT en la primera CR no confiere beneficio de supervivencia global. Por tanto, es de importancia primordial identificar el subgrupo relativamente pequeño de pacientes con alto riesgo de recidiva que podrían beneficiarse de la terapia adicional. Sin embargo, el papel de la detección de MRD en la AML positiva para AML1-ETO ha sido algo controvertido en vista de la detección de transcritos de FG en pacientes con remisión a largo plazo tras la quimioterapia, PBSCT/BMT autólogo e incluso BMT alogénico. Se ha observado que la detección de transcritos residuales en pacientes que están curados de su enfermedad proporciona pruebas de que AML1-ETO es insuficiente para mediar AML y se ha mostrado recientemente que se relaciona con una fracción de células madre, monocitos y células B presente en la médula en remisión. Por tanto, es probable que los informes relativamente frecuentes de positividad para PCR en pacientes que se consideran curados de AML positiva para t(8;21) reflejen los niveles superiores de sensibilidad logrados comúnmente para ensayos de RT-PCR de AML1-ETO (normalmente de 1 en 105 a de 1 en 106), en comparación con los de otras dianas de FG de AML (normalmente 1 en 104-105). A pesar del hecho de que un reciente estudio haya mostrado que la RT-PCR cualitativa convencional tiene el potencial de proporcionar un factor de pronóstico independiente en la AML positiva para AML1-ETO, ha habido algunos problemas referentes a la idoneidad de los ensayos de “punto final” sensibles para la detección de MRD como medio de determinación del enfoque de tratamiento en este subgrupo de pacientes.

A lo largo de los últimos años, se han investigado métodos de RT-PCR cuantitativa para determinar si pueden identificar de manera más fiable el subgrupo relativamente pequeño de pacientes destinados a recidiva. Ensayos de RT-PCR competitiva han revelado la variación en la expresión de AML1-ETO en relación con ABL entre casos en el diagnóstico (10 veces en BM, 32 veces en PB) y sugieren que los ARNm de AML1-ETO y ABL tienen estabilidad comparable. Además, estos estudios revelaron cinéticas variables de reducción del transcrito de FG tras la quimioterapia. Los pacientes con niveles bajos o indetectables de transcritos de AML1-ETO estaban asociados con el mantenimiento de CCR, mientras que números altos o crecientes de transcritos pronosticaban recidiva. Estos datos preliminares prometedores sugieren que la RQ-PCR es probablemente valiosa para la monitorización de MRD en este subconjunto de AML, con las ventajas añadidas de que esta última técnica es menos laboriosa, más reproducible y más susceptible de normalización prestándose por sí misma a su uso en ensayos clínicos a gran escala. Estudios preliminares de RQ-PCR han confirmado esencialmente los resultados obtenidos mediante RT-PCR competitiva, revelando una variación de 3,5-20 veces en los niveles de expresión de FG AML1-ETO en BM de diagnóstico que no estaba relacionada con el porcentaje de blastocitos y que es necesario tener en cuenta cuando se evalúa la respuesta a la terapia. Además, se indicó la variabilidad en la cinética de respuesta a la quimioterapia y de manera interesante, se detectaron también transcritos de AML1-ETO en pacientes con remisión a largo plazo de AML. Sin embargo, el valor predictivo de la RQ-PCR sigue teniendo que establecerse en grandes números de pacientes sometidos a un enfoque de tratamiento constante.

9.2 Datos de EAC

9.2.1 Diseño y optimización de cebadores (fases I y II)

Inicialmente, se sometieron a prueba las secuencias de cebador y sonda publicadas por Marcucci *et al* (7) junto con dos conjuntos “internos”. Mientras que el primer conjunto de cebador/sonda era superior en lo que se refiere a la sensibilidad, los inventores observaron señales de fondo recurrentes significativas en las muestras de control negativo. Por tanto, los inventores decidieron diseñar dos nuevas sondas compatibles con este conjunto de cebadores conduciendo a la selección de ENP747 colocado en el punto de rotura, junto con el cebador directo ENF701 colocado en el exón 5 de AML1 y el cebador inverso ENR761 en el exón 2 de ETO (figura 27 y tabla 30). (5) La línea celular disponible para la pruebas era KASUMI-1. Se encontró que el ensayo de RQ-PCR de AML1-ETO era particularmente robusto, asociado con un ΔR_n relativamente alto (véase la figura 28a). Se evaluó por tanto la reducción en la concentración de la sonda desde 200 nM hasta 100 nM. La disminución en la concentración de la sonda no afectó a la sensibilidad del ensayo y el artefacto de “aumento gradual de la línea base” (“*baseline creeping*”) se observó sólo muy pocas veces (figura 28b).

9.2.2 Expresión de AML1-ETO en la línea celular KASUMI y muestras de diagnóstico de pacientes (fase IV)

Se sometió a prueba ARN sin diluir de la línea celular KASUMI-1 en cinco laboratorios diferentes (tabla 31). Cuatro laboratorios diferentes emprendieron el análisis de ARN de diagnóstico archivado de 22 muestras de pacientes. Todas las diferencias entre BM y PB por gen de control no eran significativas en muestras apareadas ($n = 10$, prueba de Wilcoxon). Tras aplicar los criterios de exclusión, se evaluaron 12 muestras de PB y 10 de BM (tabla 31).

La expresión del transcrito de FG AML1-ETO (Ct y CN) era superior en la línea celular KASUMI-1 que en las muestras de pacientes (mediana de la diferencia de aproximadamente dos valores de Ct). Entre las muestras de pacientes, no se observó ninguna diferencia en la expresión del transcrito de FG AML1-ETO. Con respecto a los genes de control, la expresión de ABL era comparable entre la línea celular y las muestras de pacientes. Se observó variación significativa en la expresión de B2M, tanto entre muestras de pacientes y la línea celular como entre muestras de BM y PB. Para GUS, se observaron resultados intermedios (tabla 31 y figura 29).

9.2.3 Rondas de QC (fases IIIa a IVa)

No se observaron resultados falsos negativos (de un total de 112 muestras analizadas) para las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} , lo que está en línea con la buena sensibilidad del ensayo de RQ-PCR (tabla 32). Globalmente, la frecuencia de falsa positividad era del 9,7% (15/154). Seis de las 108 muestras NAC/NTC (5,6%) y nueve de las 46 muestras negativas para FG (20%) eran falsamente positivas para la amplificación de AML1-ETO (tabla 32). En muestras negativas para FG codificadas, la falsa positividad se restringía en la mayoría de los casos a laboratorios individuales.

Lista de Abreviaturas

10	ABL:	gen Abelson
	ALL:	leucemia linfoblástica aguda
15	LPA:	leucemia promielocítica aguda
	B2M:	beta-2-microglobulina
	BM:	médula ósea
20	BMT:	trasplante de médula ósea
	CBF:	factor de unión central
25	CG:	gen de control
	CML:	leucemia mieloide crónica
	CN:	número de copias
30	COEF. de CORR.:	coeficiente de correlación
	CV:	coeficiente de variación
35	EAC:	Europe Against Cancer (Europa contra el cáncer)
	ENF:	cebador directo de la red europea
	ENP:	sonda TaqMan de la red europea
40	ENPr:	sonda inversa TaqMan de la red europea
	ENR:	cebador inverso de la red europea
45	FAM:	6-carboxi-fluoresceína
	FG:	gen de fusión
	FISH:	hibridación fluorescente <i>in situ</i>
50	GUS:	beta-glucuronidasa
	MGB:	unión al surco menor
55	MMLV:	virus de la leucemia murina de Moloney
	MNC:	células mononucleares
	MRD:	enfermedad residual mínima
60	MRDv:	valor de enfermedad residual mínima
	NAC:	control sin amplificación
65	NCN:	número de copias normalizado
	ND:	no realizado

ES 2 337 301 T3

NTC:	control sin molde
PB:	sangre periférica
5 PBL:	linfocito de sangre periférica
PBMN:	células mononucleares de sangre periférica
PBSCT:	trasplante de células madre de sangre periférica
10 PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
QC:	control de calidad
15 RQ-PCR:	reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
RT:	transcripción inversa
SENSv:	valor de sensibilidad
20 TAMRA:	6-carboxi-tetrametil-rodamina

Lista de bibliografía

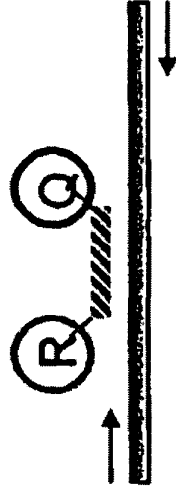
1. **Lowenberg B, Downing JR, Burnett A.** Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999; 341: 1051-1062.
2. **Verma A y Stock W.** Management of adult acute lymphoblastic leukemia: moving toward a risk-adapted approach. *Curr Opin Oncol* 2001; 13: 14-20.
3. **Appelbaum FR.** Perspectives on the future of chronic myeloid leukemia treatment. *Semin Hematol* 2001; 38: 35-42.
4. **Campana D y Pui C-H.** Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood* 1995; 85: 1416-1434.
5. **Van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F, Parreira A, Gameiro P, Diaz MG, Malec M, Langerak AW, San Miguel JF, Biondi A.** Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999; 13: 1901-1928.
6. **Van der Velden V, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen J.** Detection of minimal residual disease in hematopoietic malignancies by real-time quantitative PCR: Principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*, en prensa 2003.
7. **Marcucci G., Livak KJ, Bi W, Strout MP, Bloomfield CD, Caligiuri MA.** Detection of minimal residual disease in patients with AML1/ETO-associated acute myeloid leukemia using a novel quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assay. *Leukemia* 1998; 12:1482-1489.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Conjuntos de ácidos nucleicos BCR-ABL para RQ-PCR que comprenden una sonda nucleotídica que tiene la secuencia SEQ ID N° 21 y cebadores directo e inverso que tienen las secuencias SEQ ID N° 20 y SEQ ID N° 22.
2. Conjuntos de ácidos nucleicos BCR-ABL para RQ-PCR que comprenden una sonda nucleotídica que tiene la secuencia SEQ ID N° 21 y cebadores directo e inverso que tienen las secuencias SEQ ID N° 23 y SEQ ID N° 22.
- 10 3. Uso de los conjuntos según la reivindicación 1 ó 2 en un método de RQ-PCR para la detección de enfermedad residual mínima en pacientes leucémicos, en el que el conjunto de la reivindicación 1 se usa para amplificar transcritos del gen de fusión BCR-ABL m-bcr y el conjunto de la reivindicación 2 se usa para amplificar transcritos del gen de fusión BCR-ABL M-bcr, y dicho método de RQ-PCR comprende:
 - 15 (i) seleccionar muestras amplificables y cualificadas de pacientes para el análisis posterior;
 - (ii) definir las condiciones óptimas para realizar la reacción de RT;
 - (iii) definir las condiciones óptimas para el protocolo de RQ-PCR; y
 - 20 (iv) establecer un procedimiento normalizado para el análisis de los datos,en el que se amplifica un transcrito de gen de control apropiado en paralelo al transcrito de gen de fusión.
- 25 4. Uso según la reivindicación 3, en el que se fija un umbral común a 0,1 para estar en fase exponencial y una línea base común entre los ciclos 3 y 15.
5. Uso según la reivindicación 3 ó 4, que comprende someter muestras de ARN extraídas de las muestras que van a analizarse a una reacción de RT que comprende
 - 30 añadir 1 µg de ARN total en 10 µl de H₂O;
 - incubar a 70°C durante 10 min.;
 - enfriar en hielo y añadir los siguientes reactivos hasta un volumen final de 20 µl;
 - 35 realizar la transcriptasa inversa (o bien de MMLV o bien Superscript I o II): 100 U;
 - usando:
 - 40 tampón RT (según la RTasa usada)
 - DNTP: 1 Mm
 - DTT: 10 Mm
 - 45 hexámeros aleatorios: 25 µM
 - inhibidor de ARNasa: 20 U
 - incubar posteriormente a:
 - 50 temperatura ambiente durante 10 min.;
 - 42°C durante 45 min.; y
 - 55 99°C durante 3 min.,
 - colocar la muestra a 4°C tras la etapa de RT; y
 - diluir el ADNc final con 30 µl de H₂O.

Figura 1

a) Fase de hibridación



b) Fase de extensión

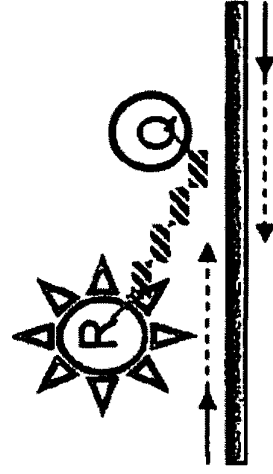
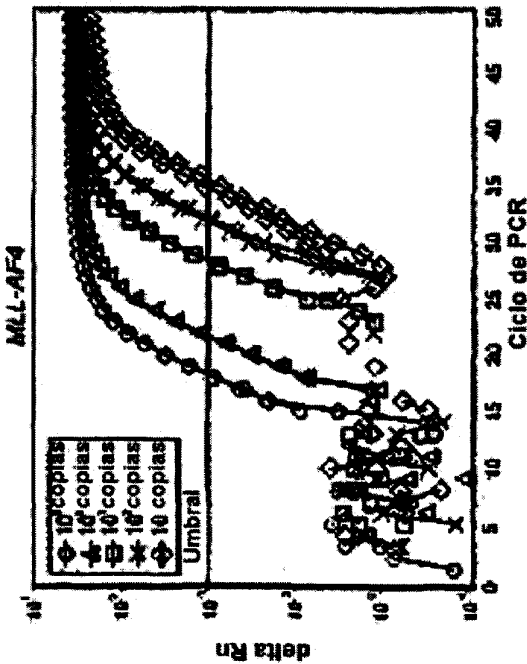


Figura 2

a) Gráfica de amplificación



b) Curva patrón

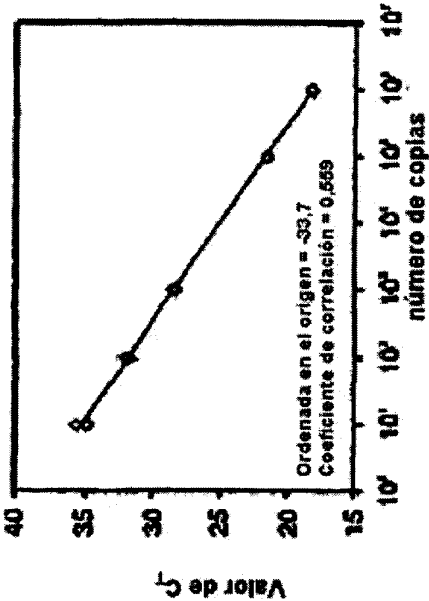


Figura 3

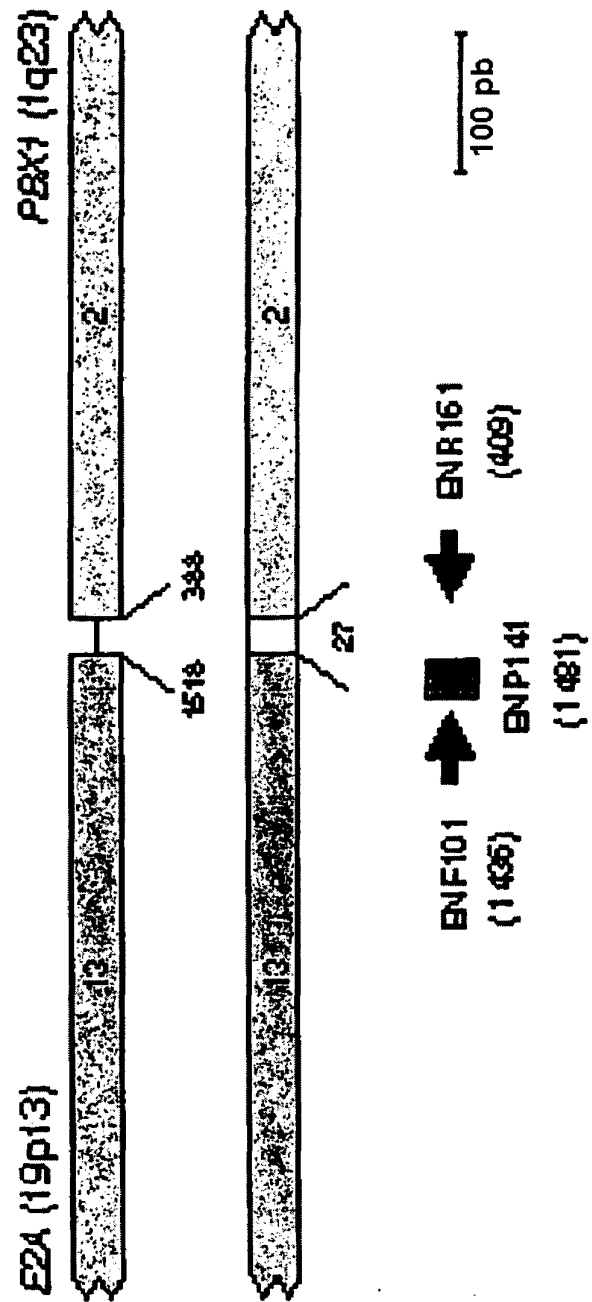


Figura 4

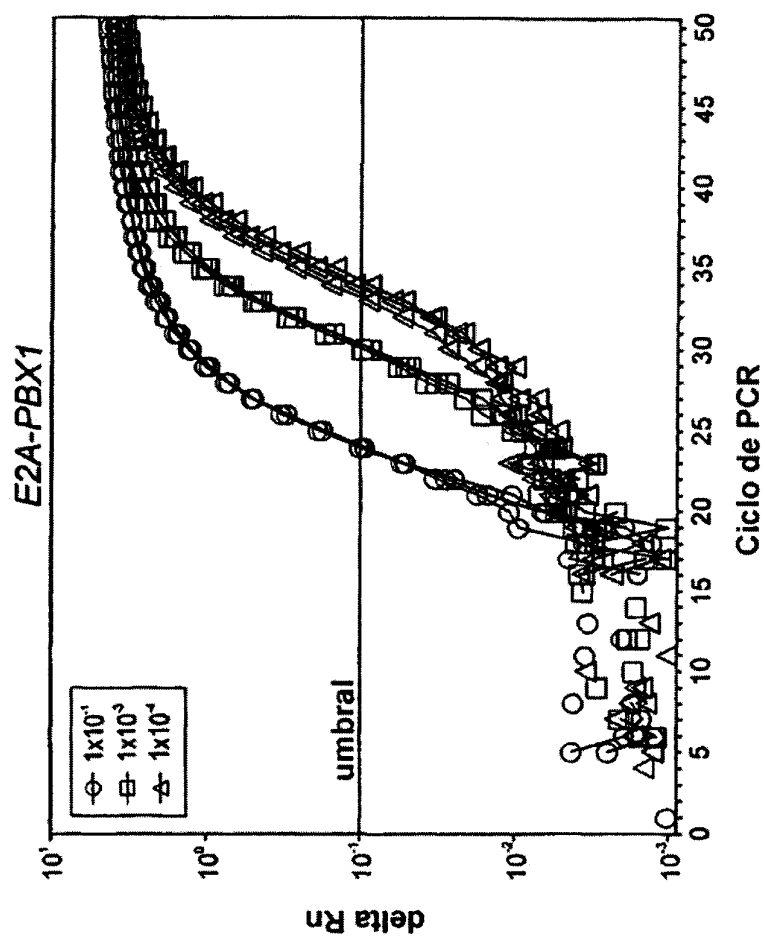


Figura 5

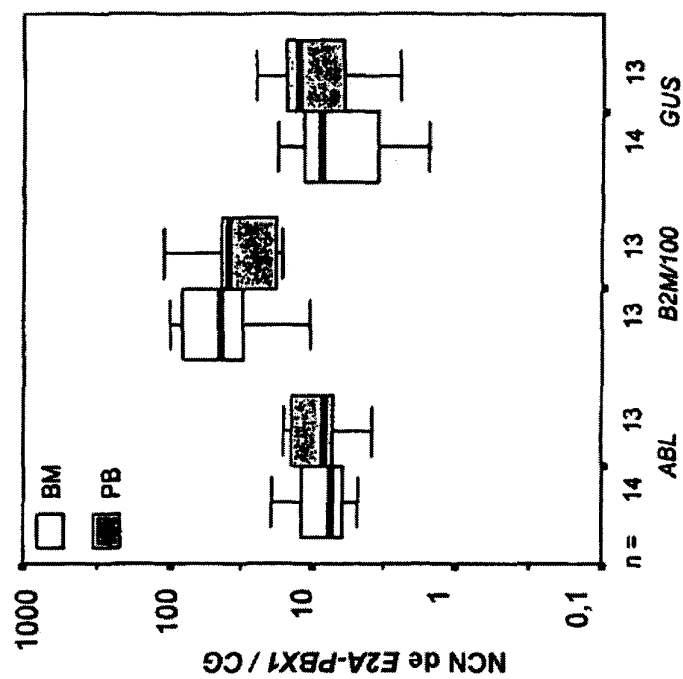


Figura 6

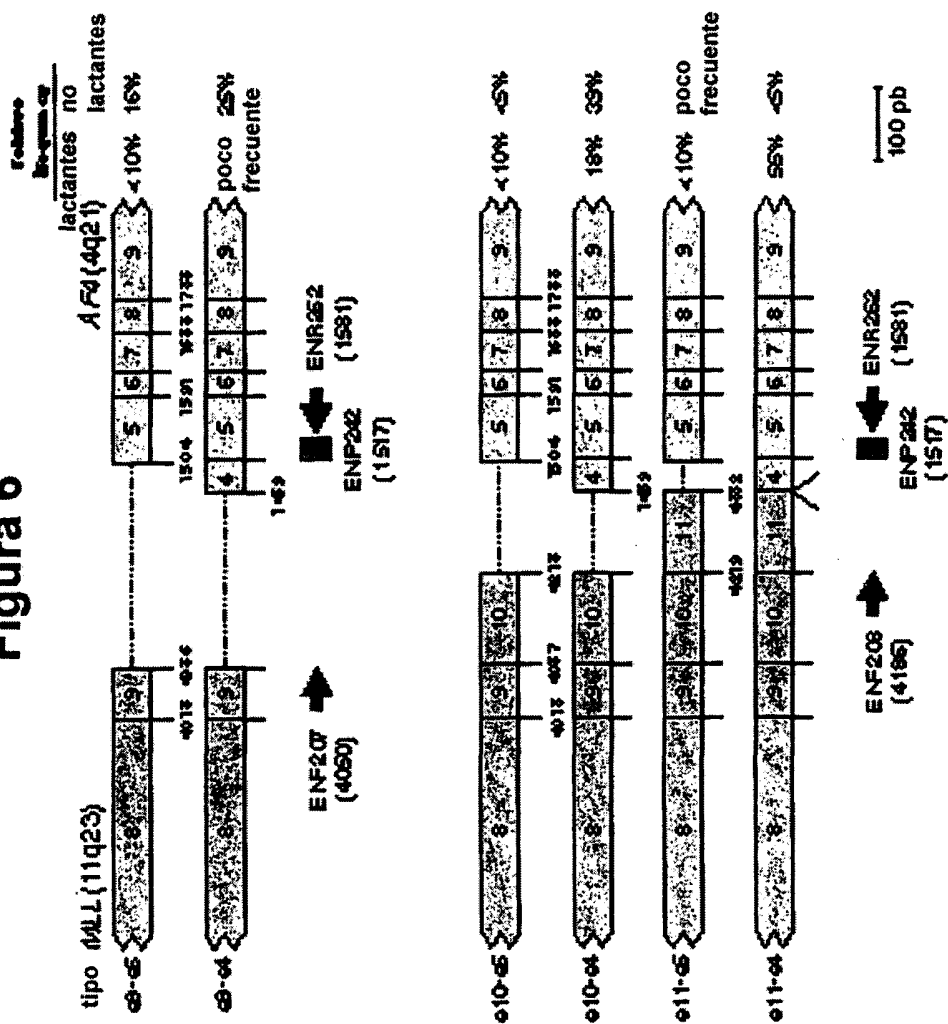


Figura 7

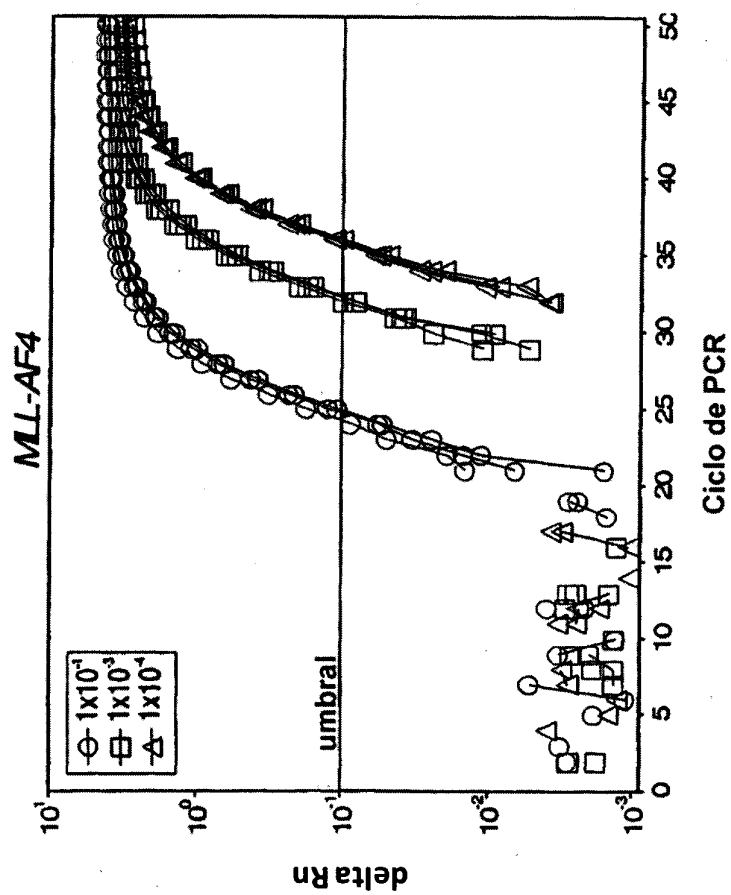


Figura 8

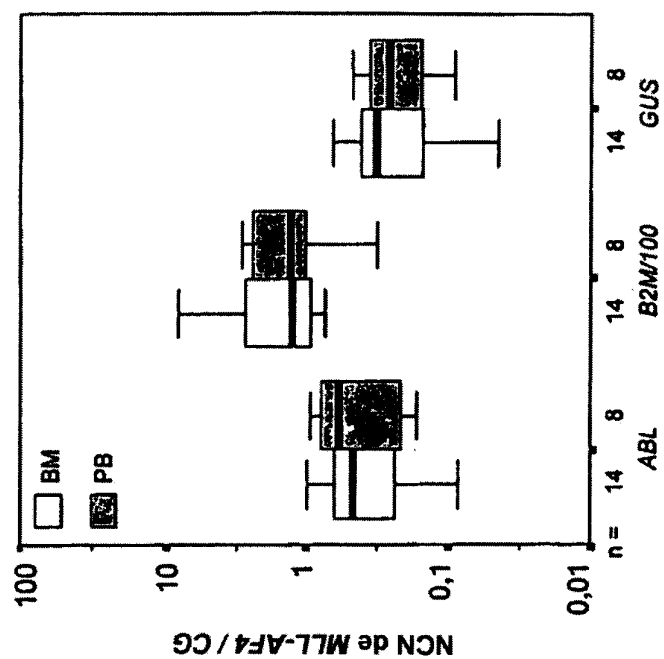


Figura 9

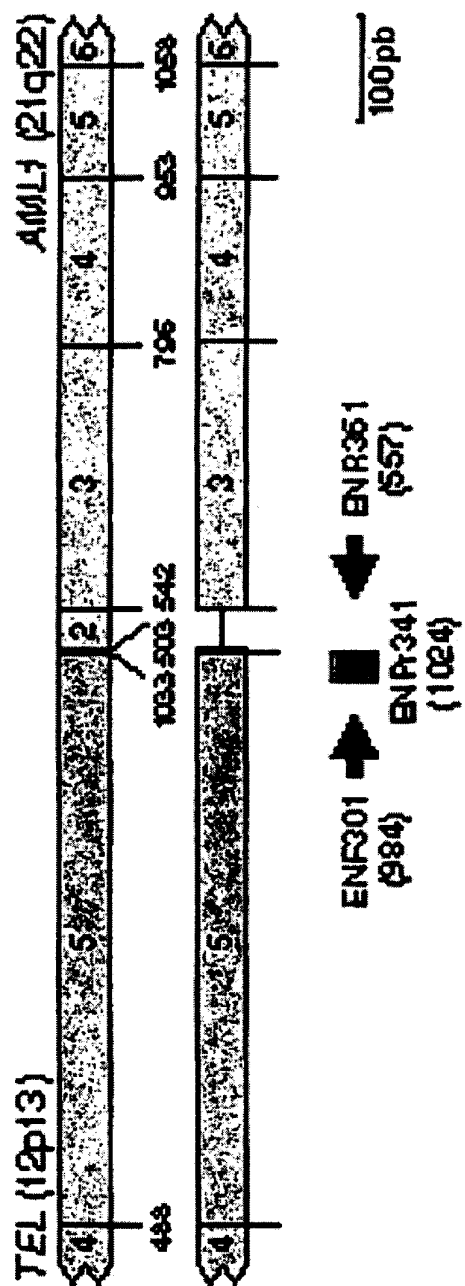


Figura 10

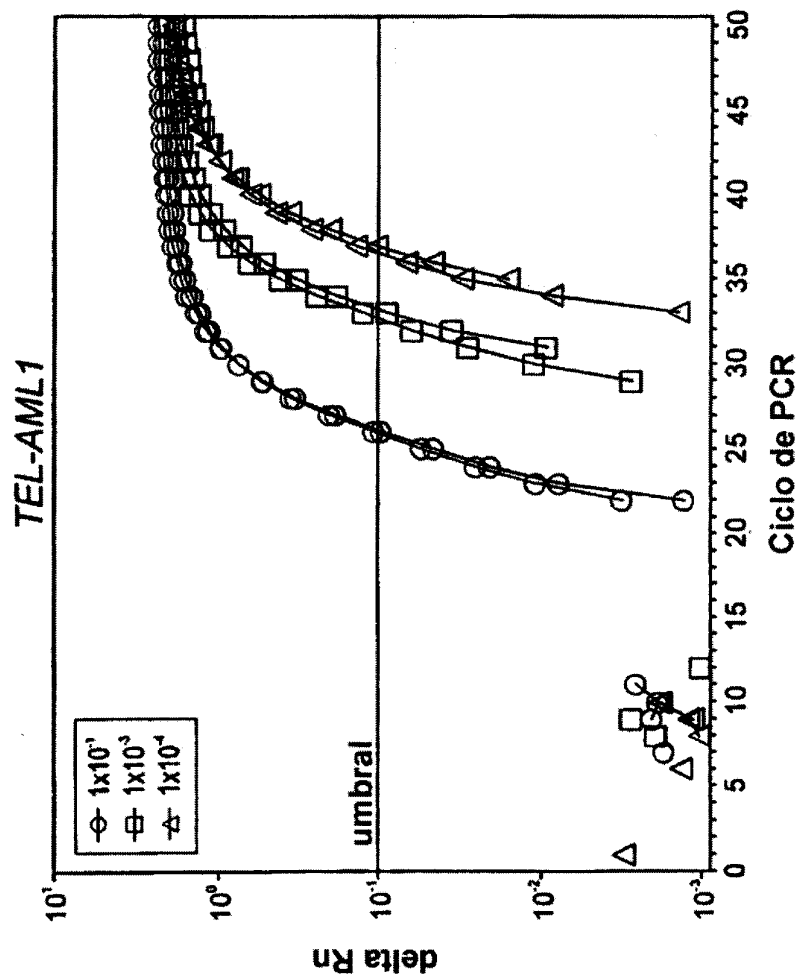


Figura 11

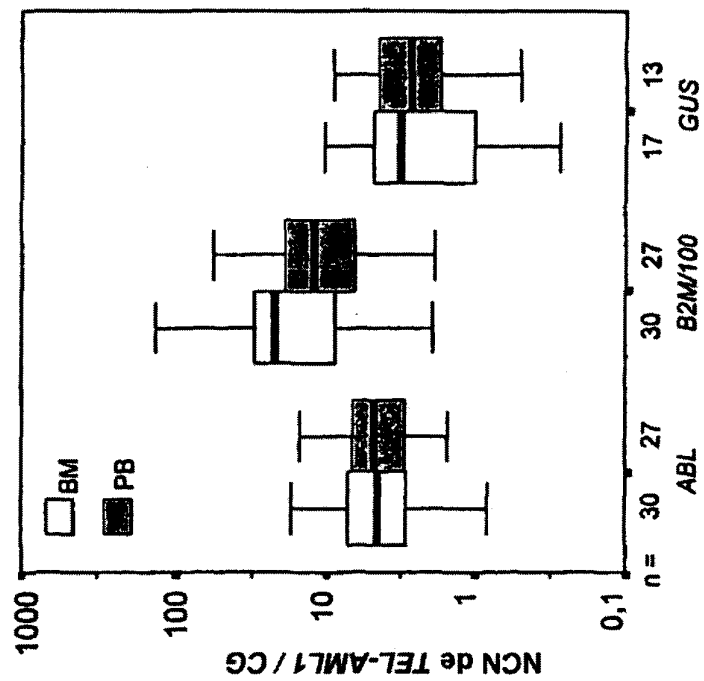


Figura 12

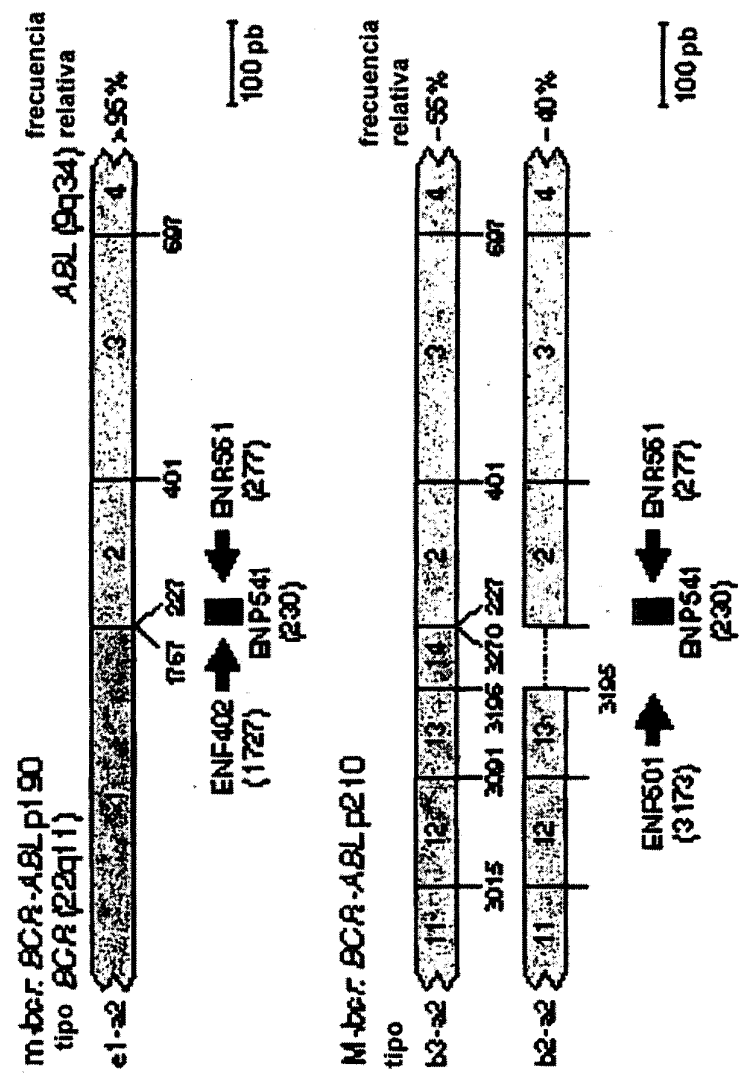


Figura 13

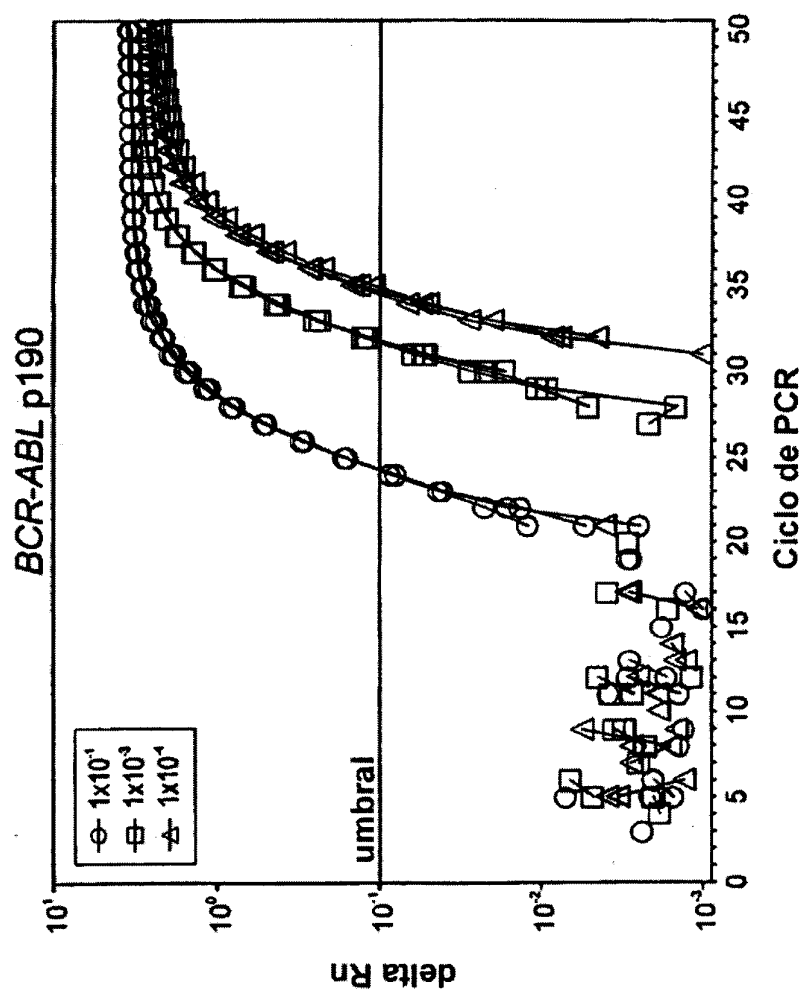


Figura 14

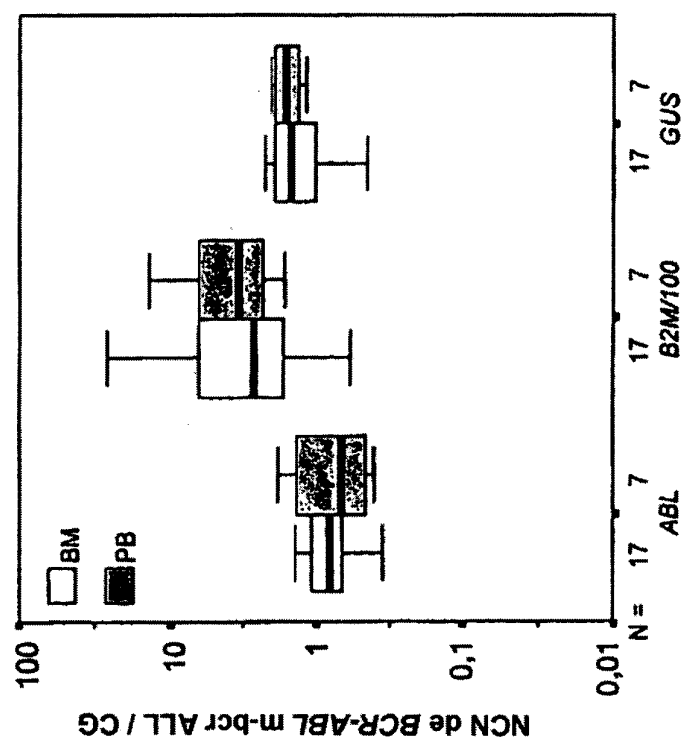


Figura 15

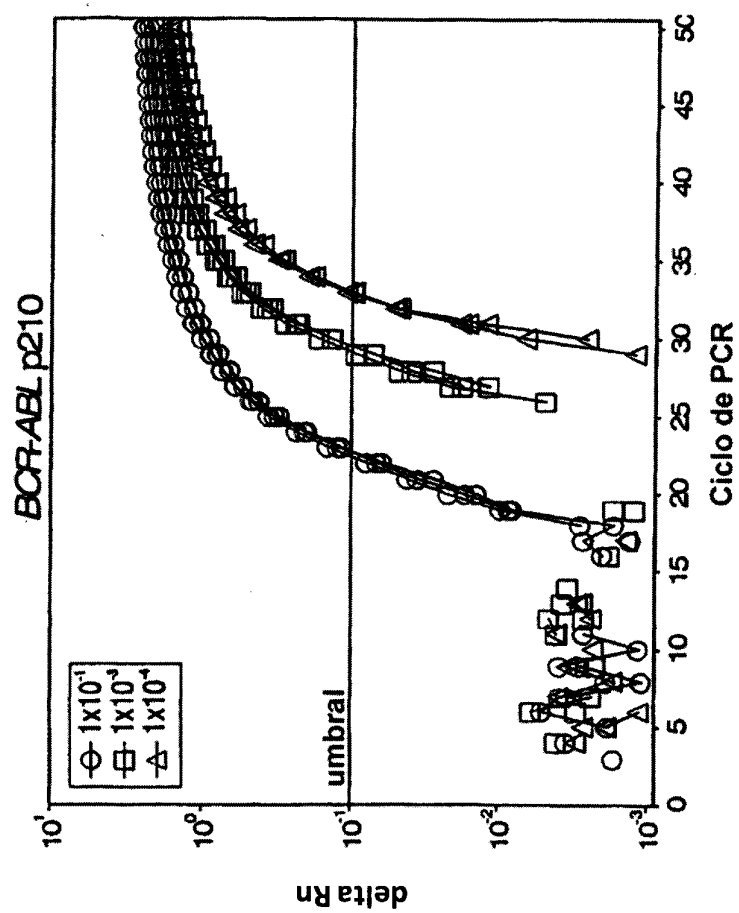


Figura 16a

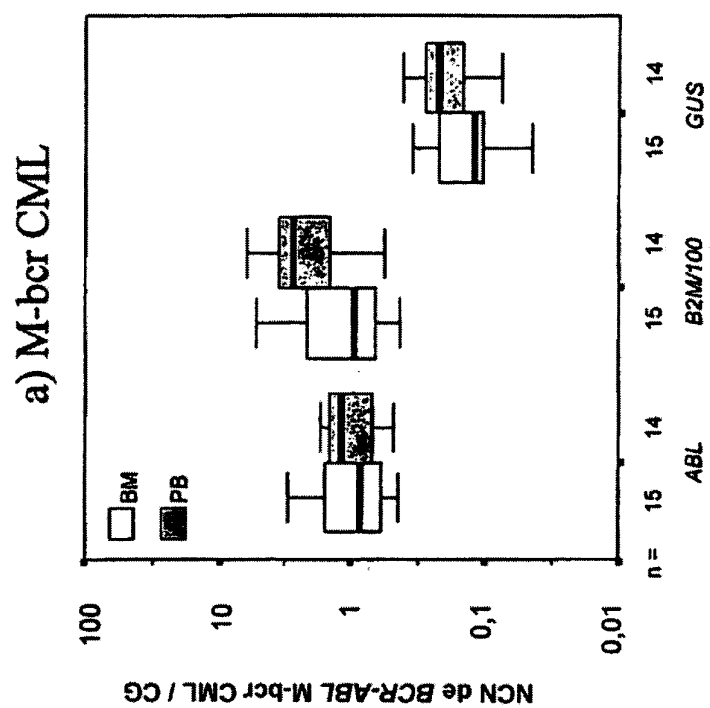


Figura 16b

b) M-bcr ALL

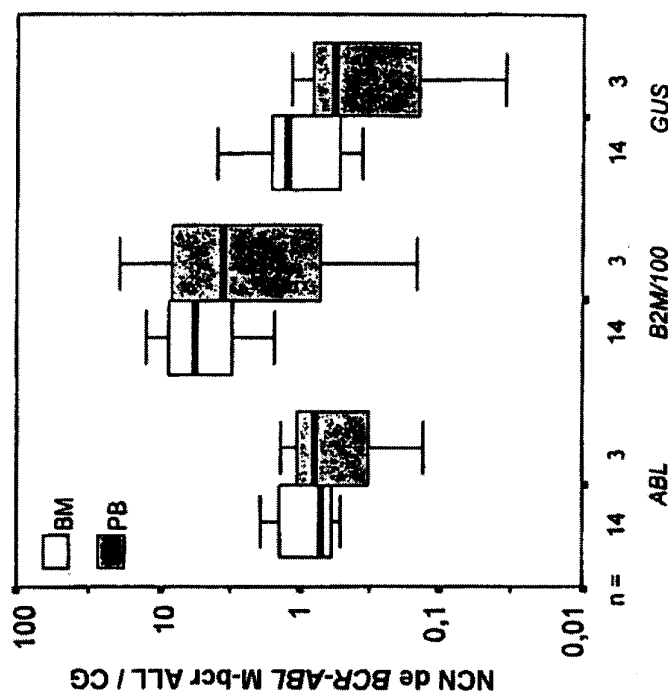


Figura 17

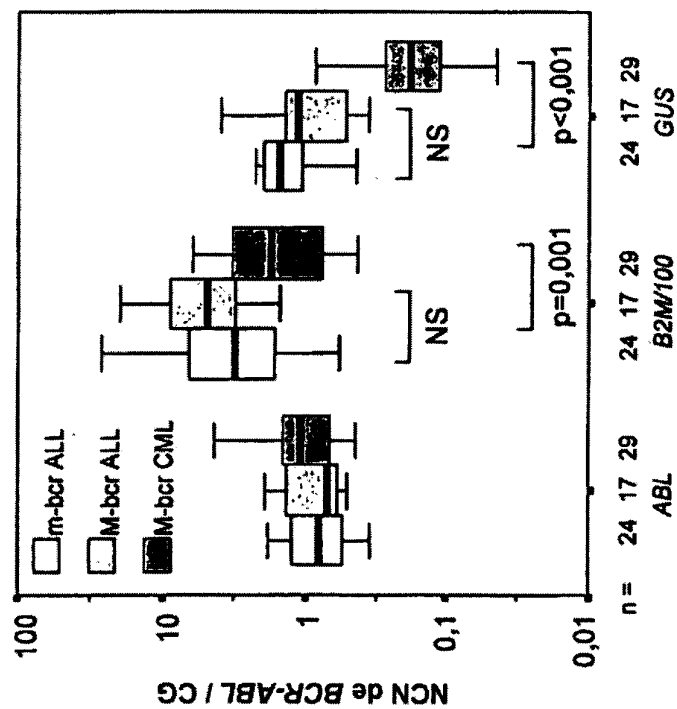


Figura 18

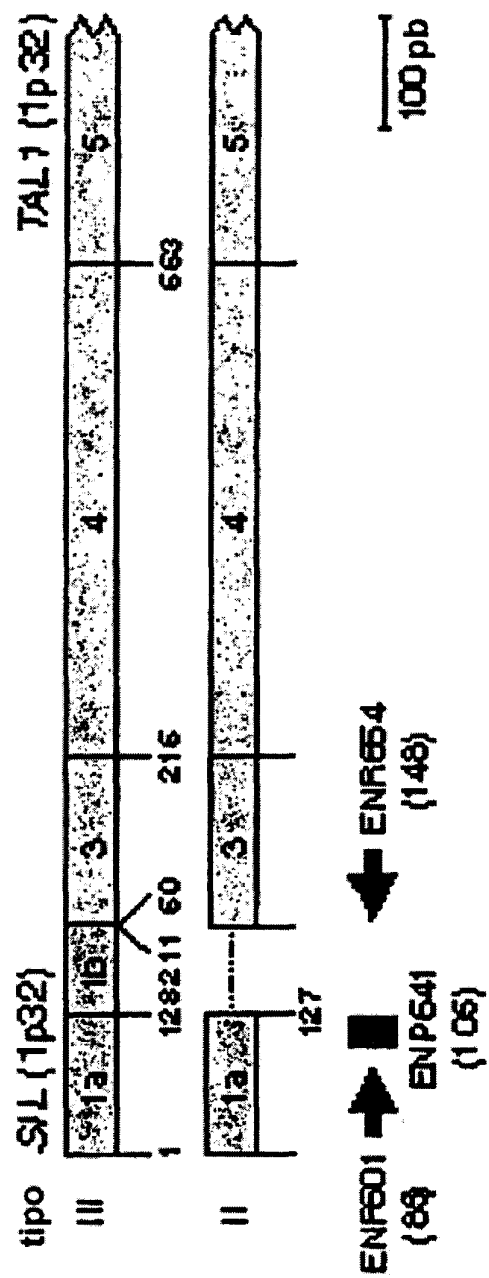


Figura 19

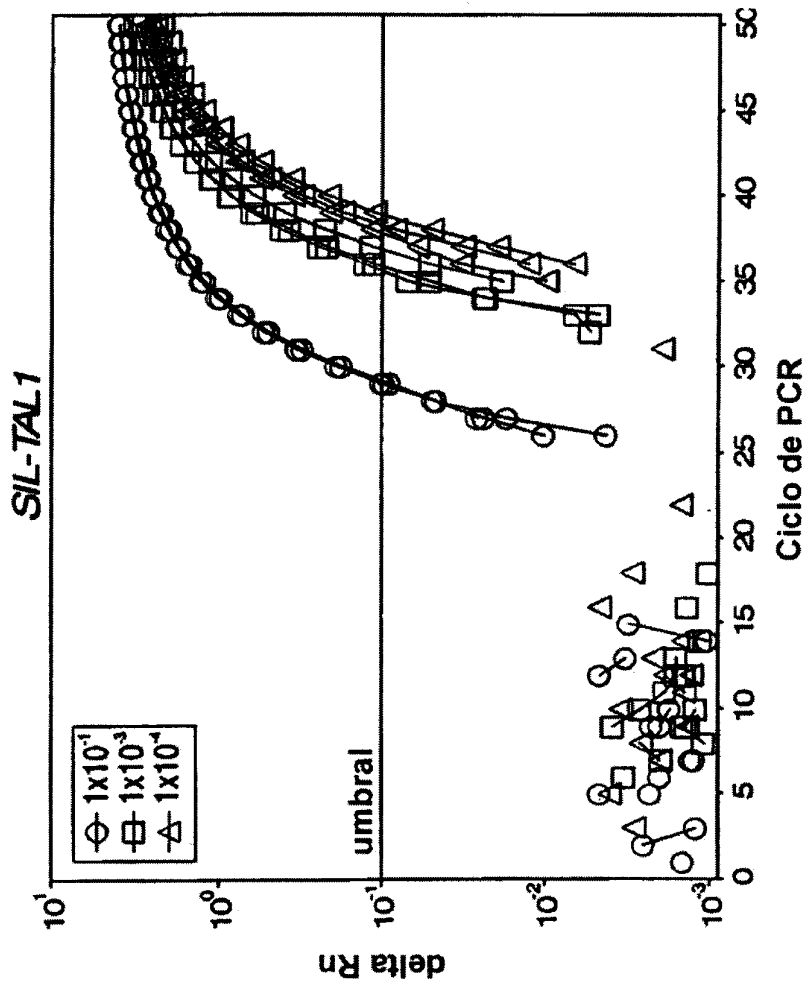


Figura 20

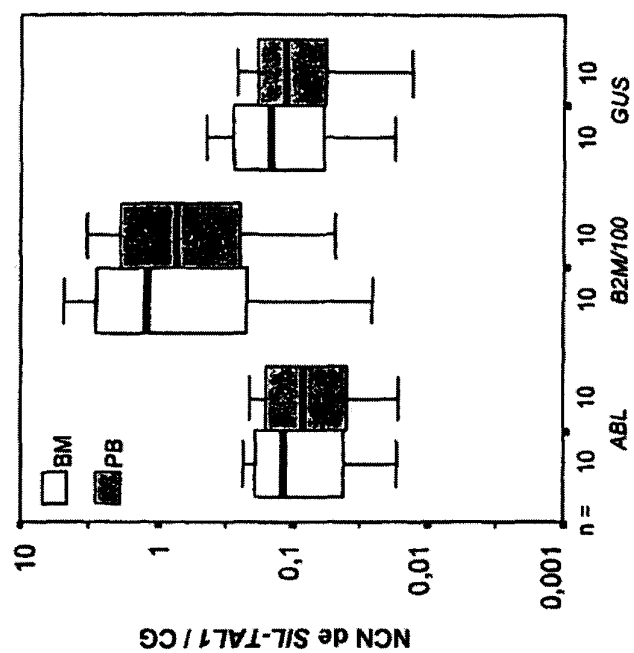


Figura 21

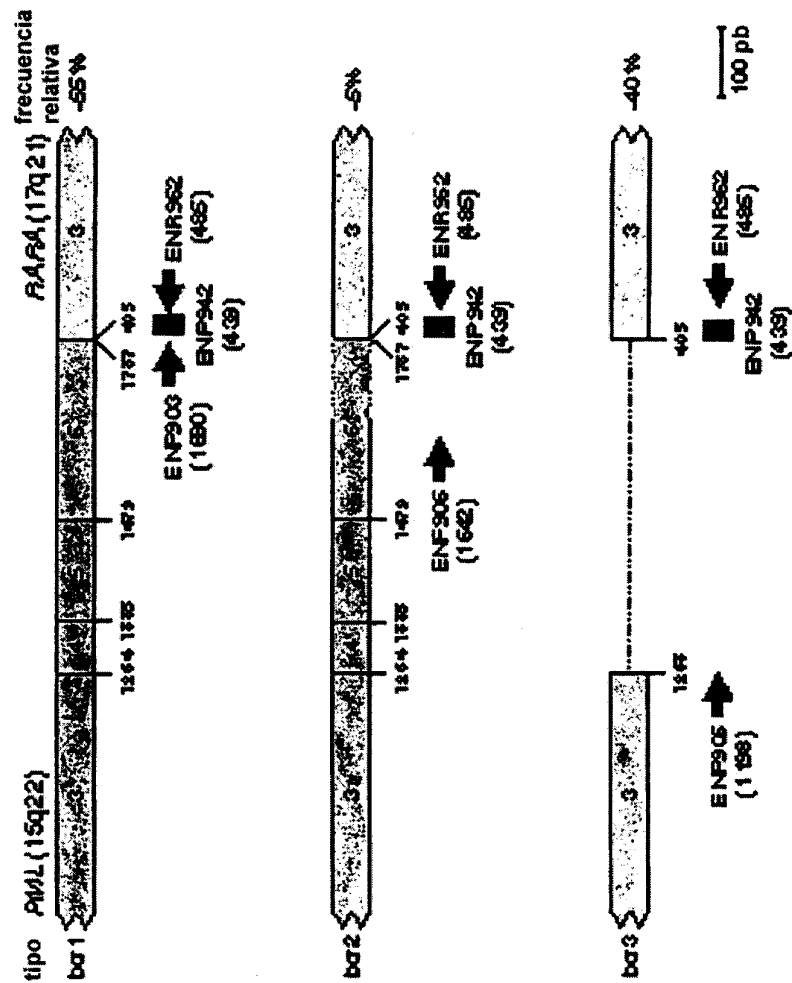


Figura 22

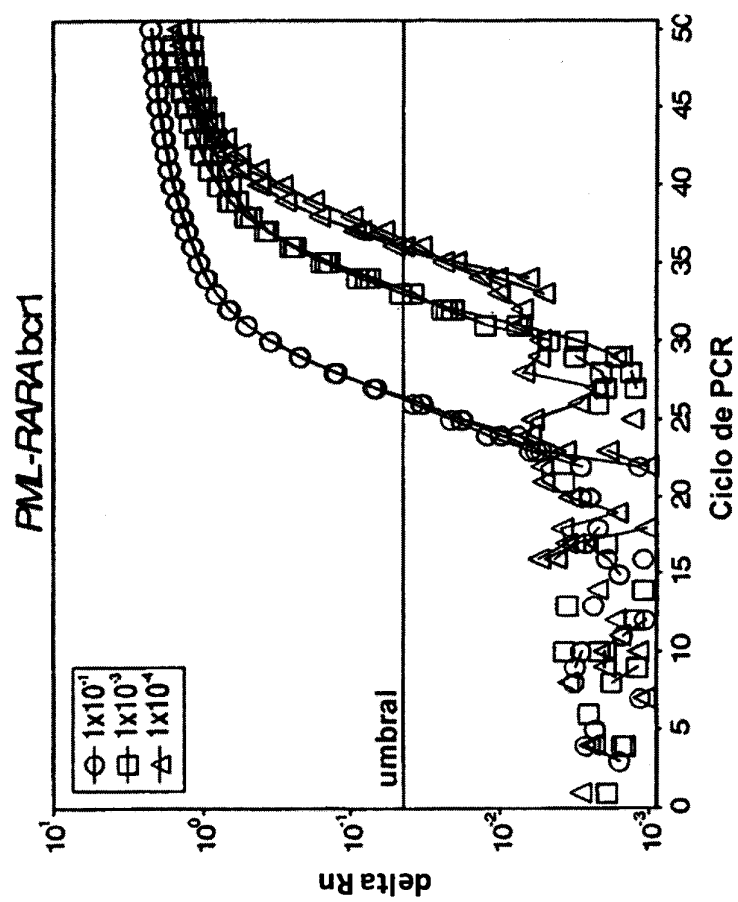


Figura 23

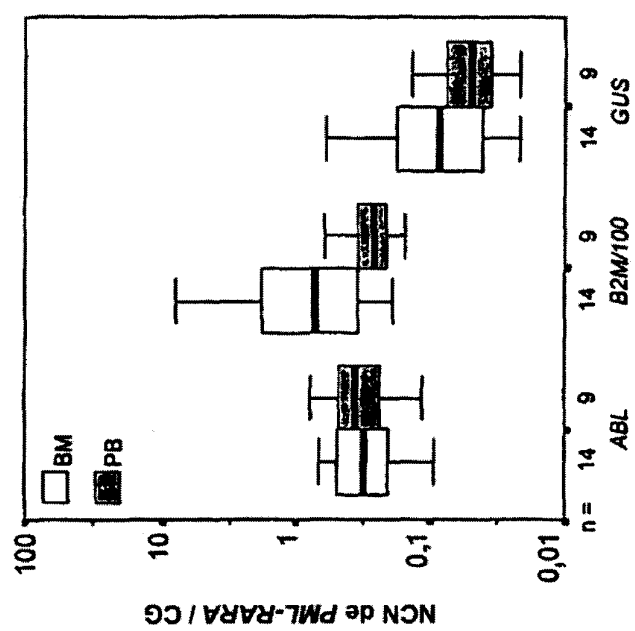


Figura 24

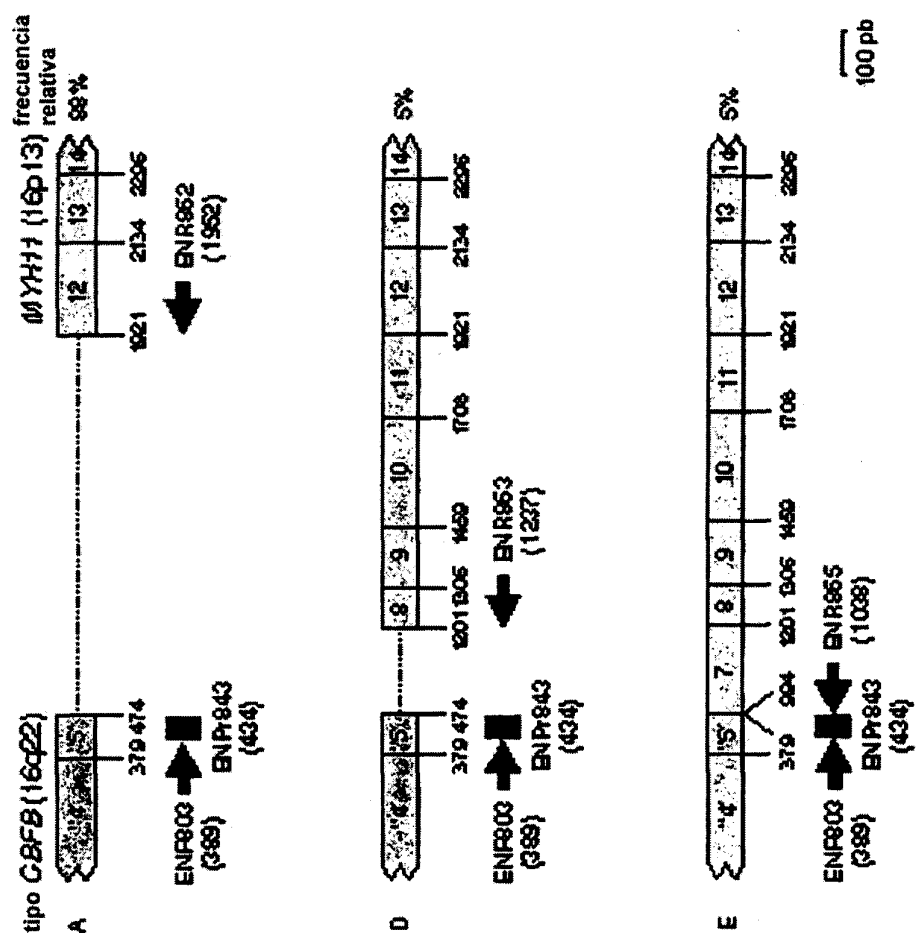


Figura 25 a)

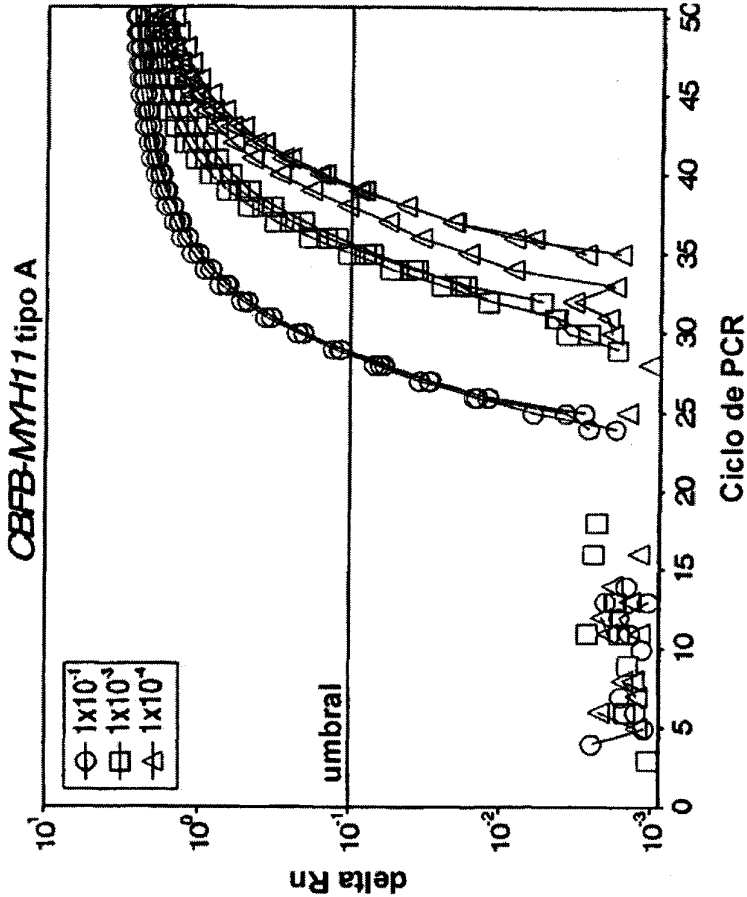


Figura 25 b)

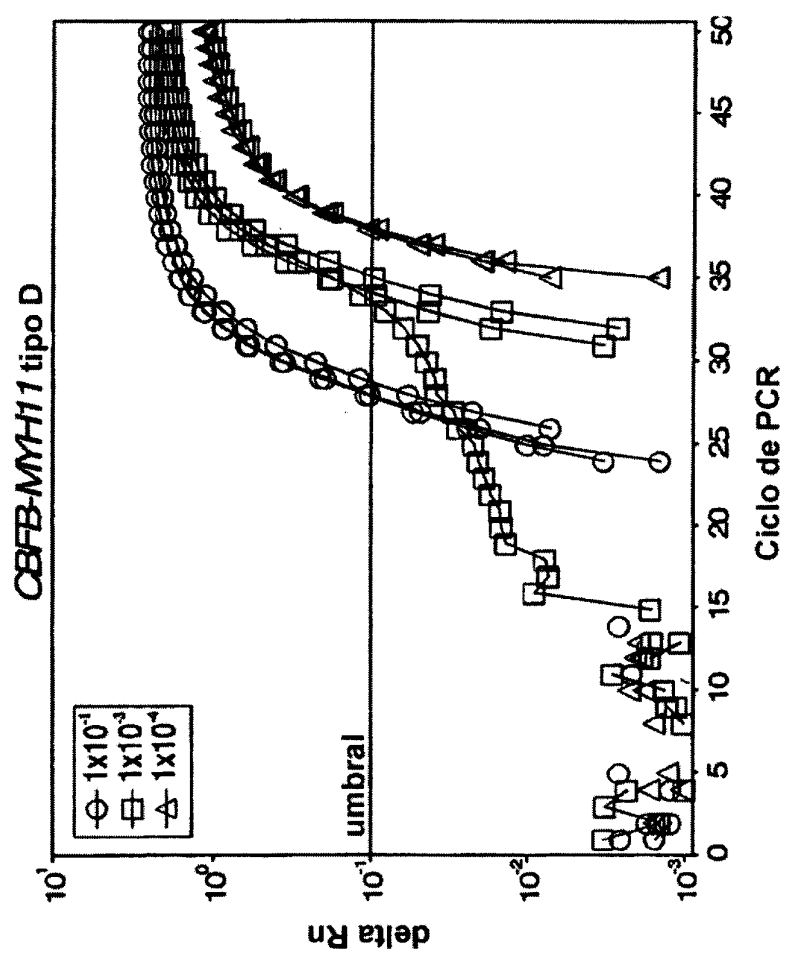


Figura 25 c)

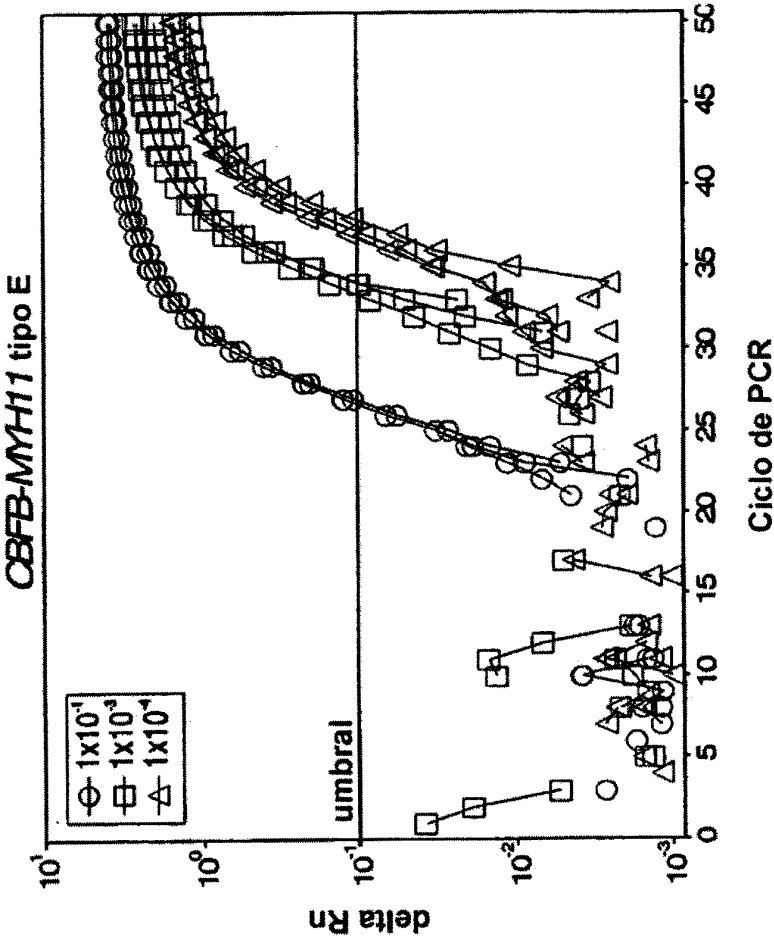


Figura 26

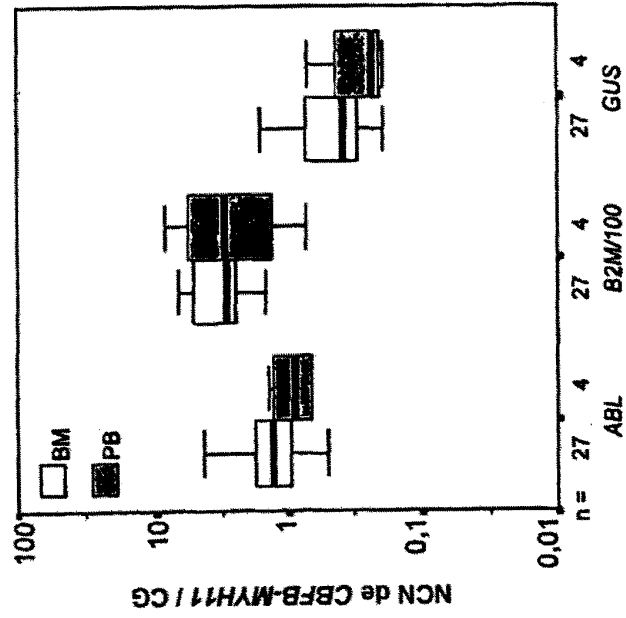


Figura 27

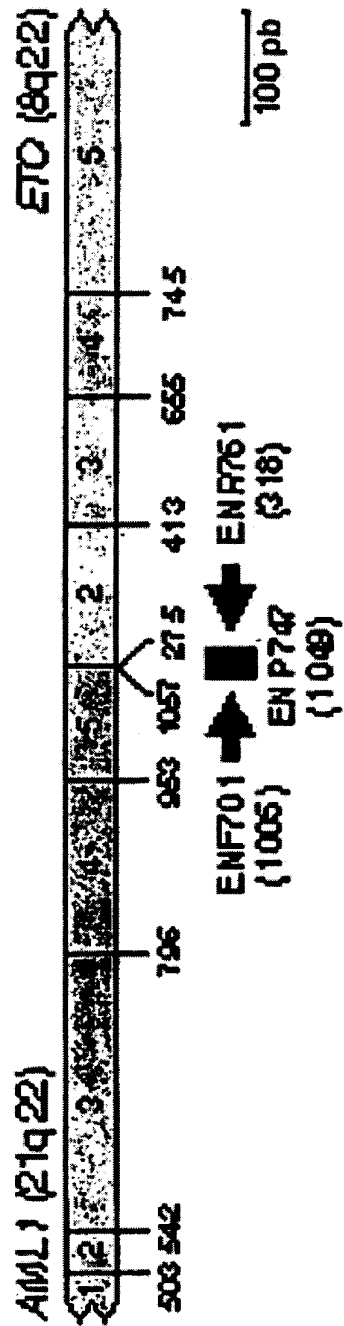


Figura 28 a)

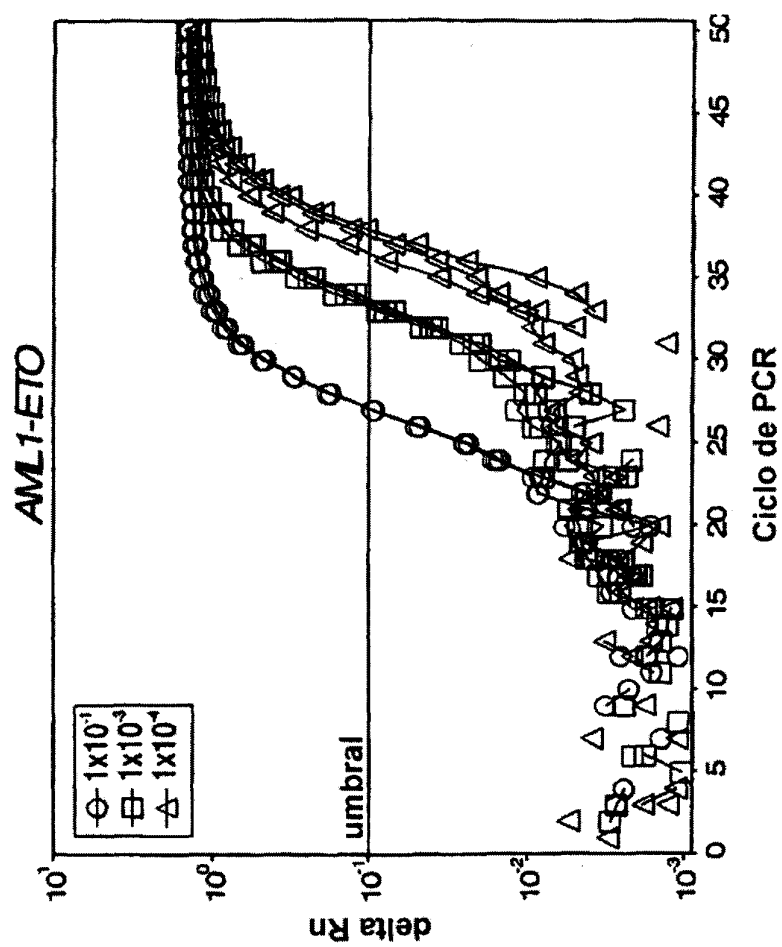


Figura 28 b)

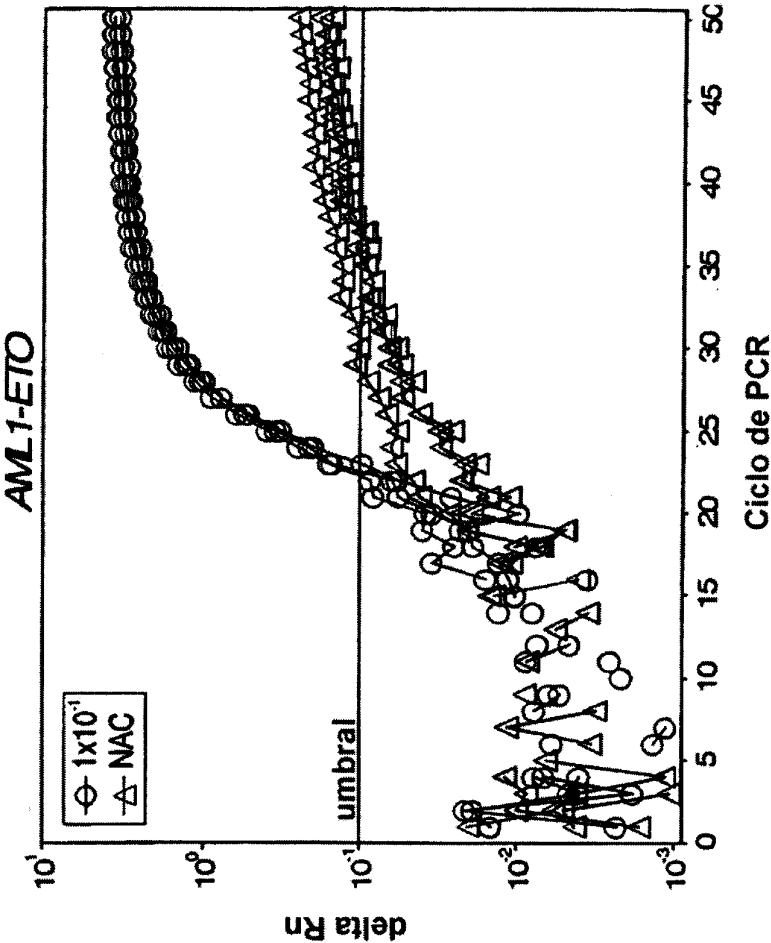


Figura 29

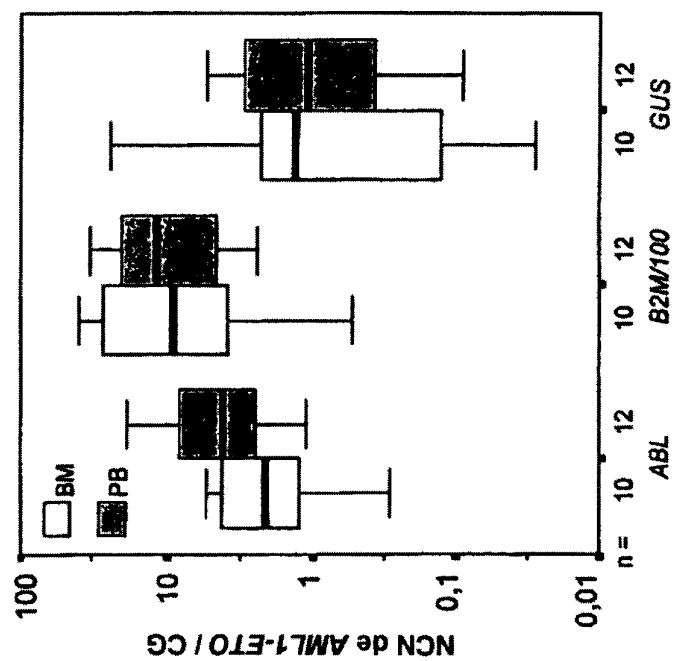


Figura 30

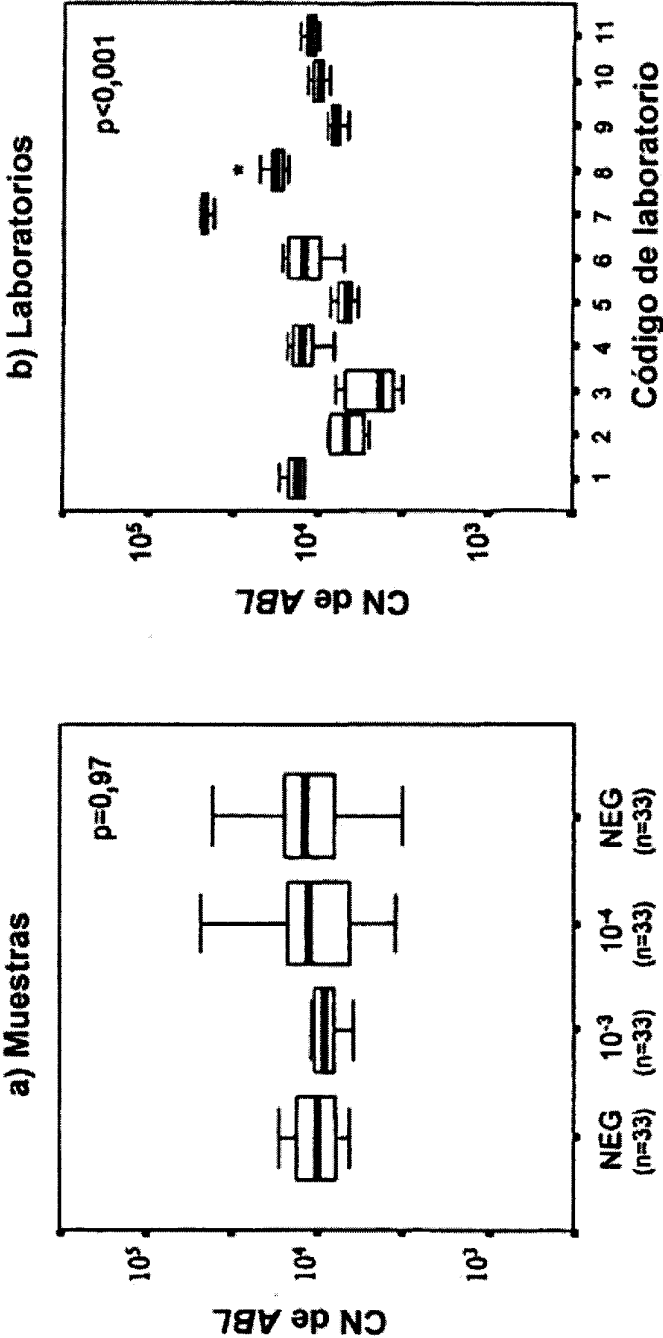


Figura 31

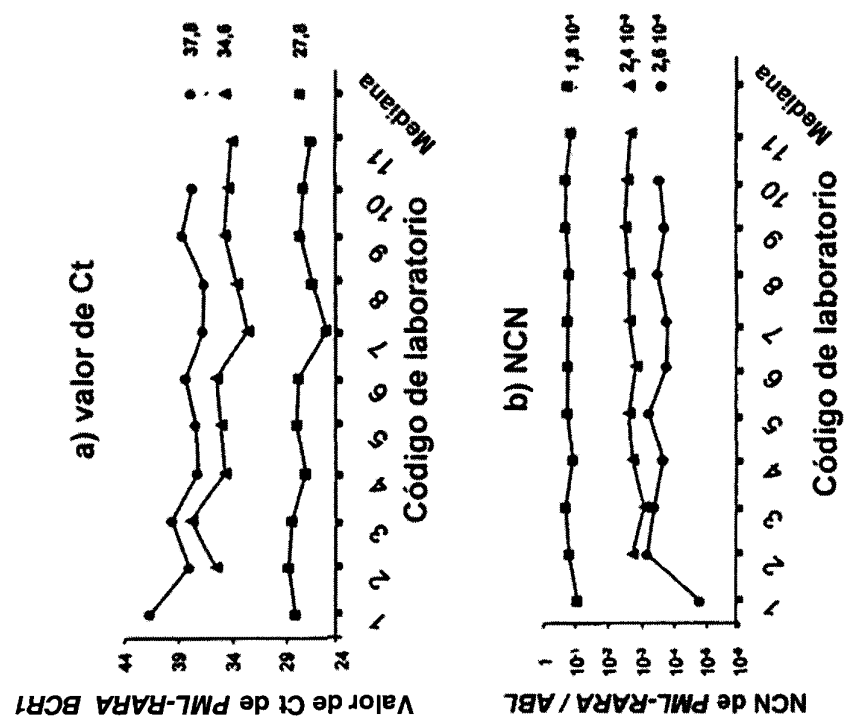


Figura 32

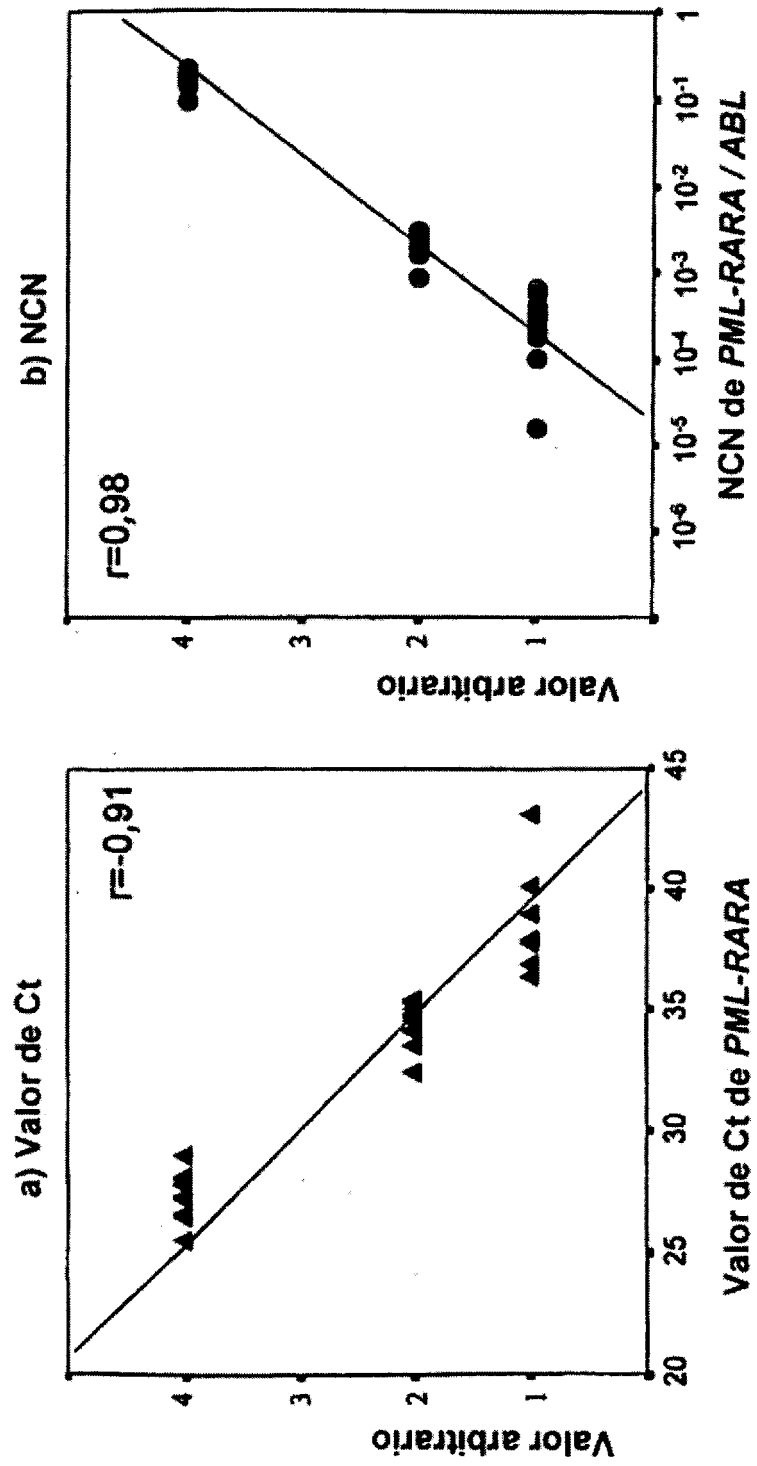


Figura 33a

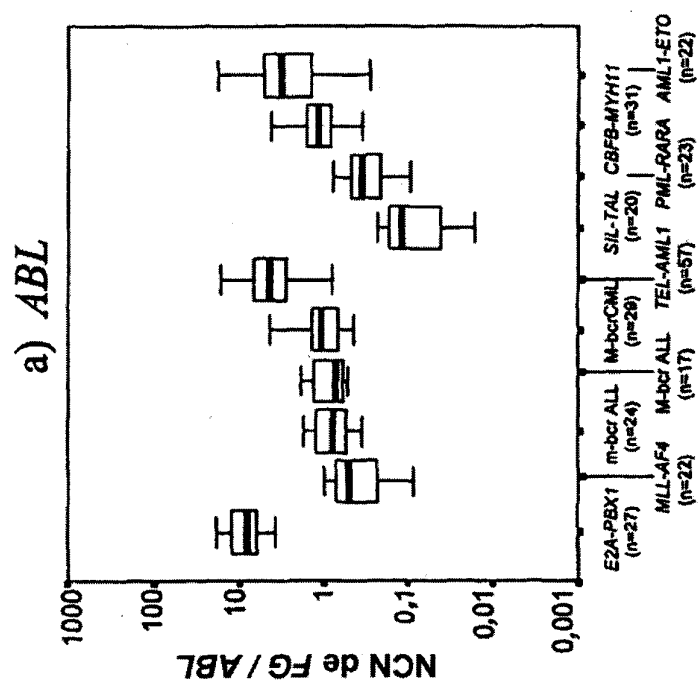


Figura 33b

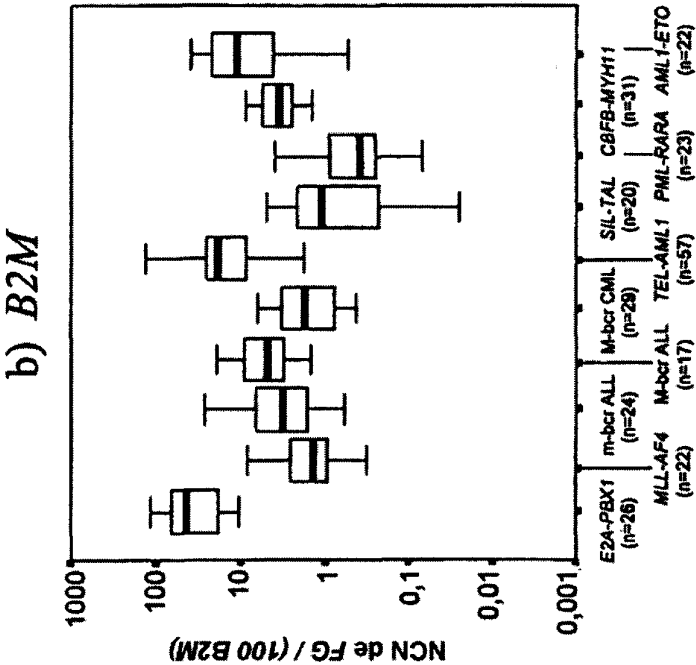


Figura 33c

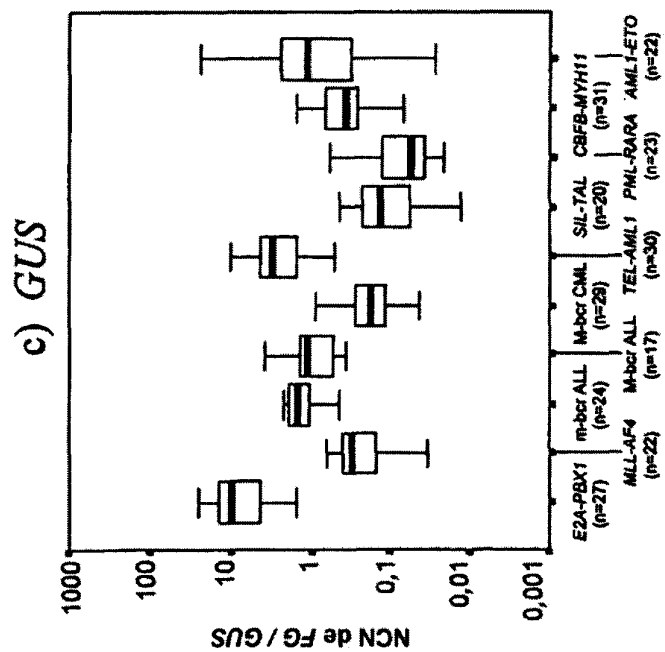


FIGURA 34

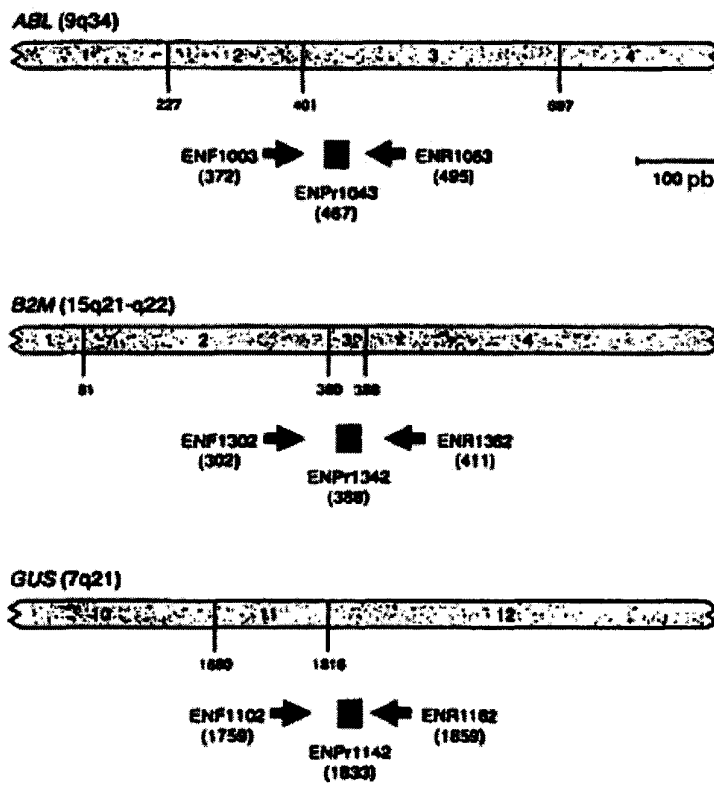


FIGURA 35

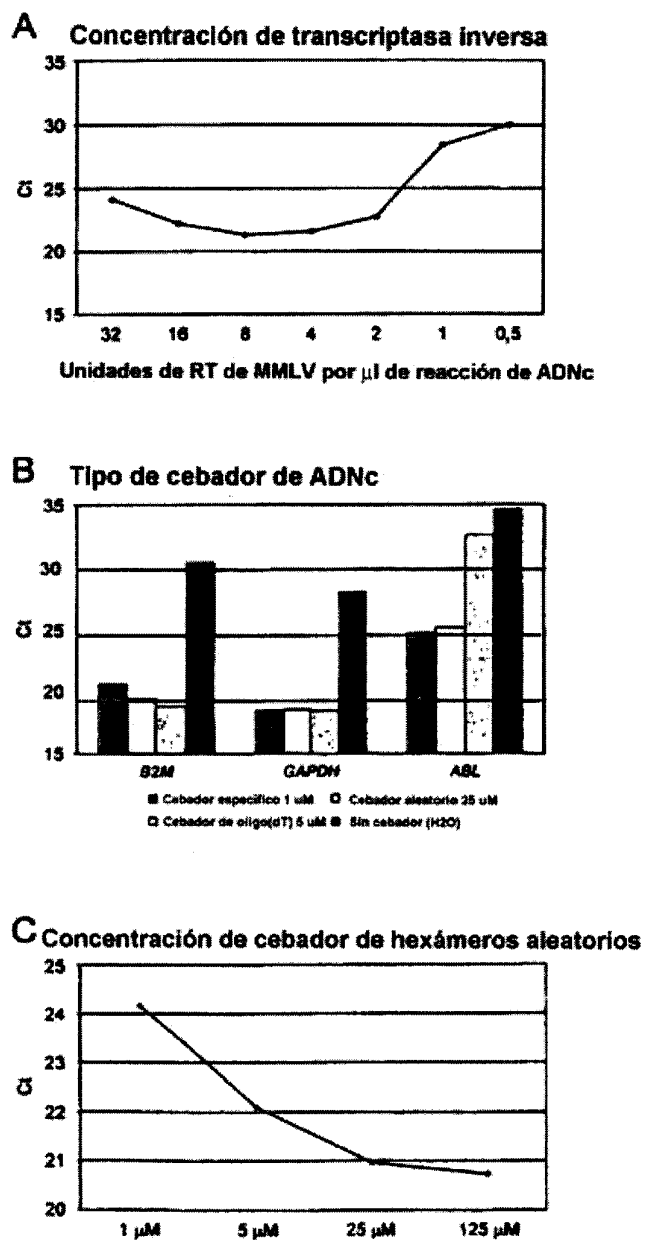


FIGURA 36

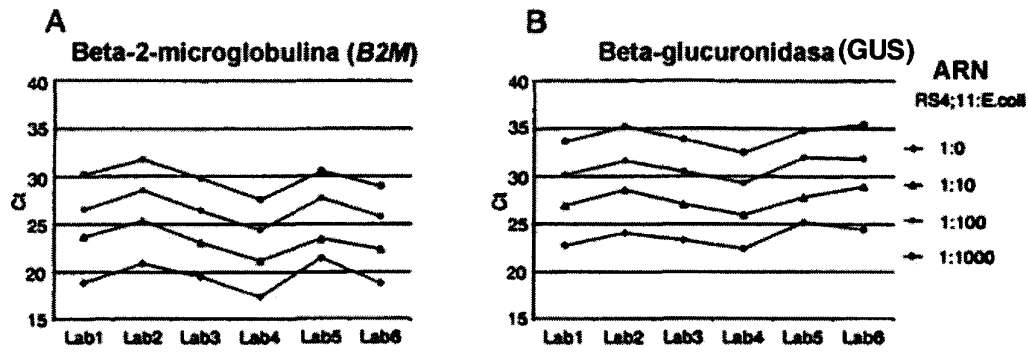


FIGURA 37

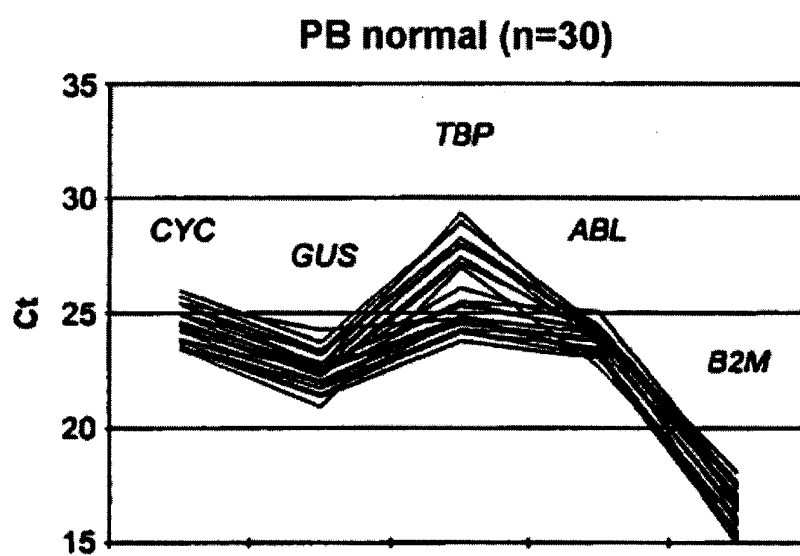


FIGURA 38a

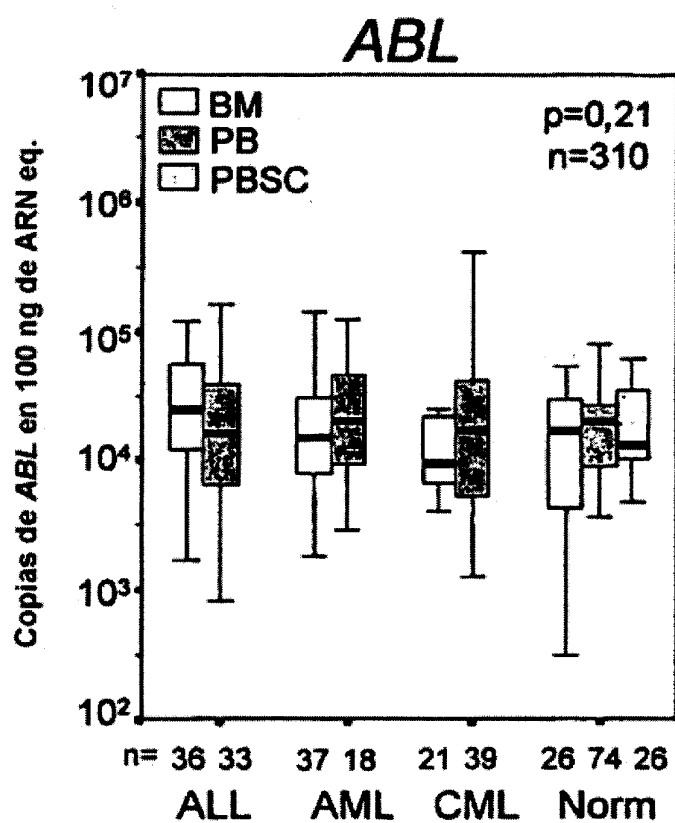


FIGURA 38b

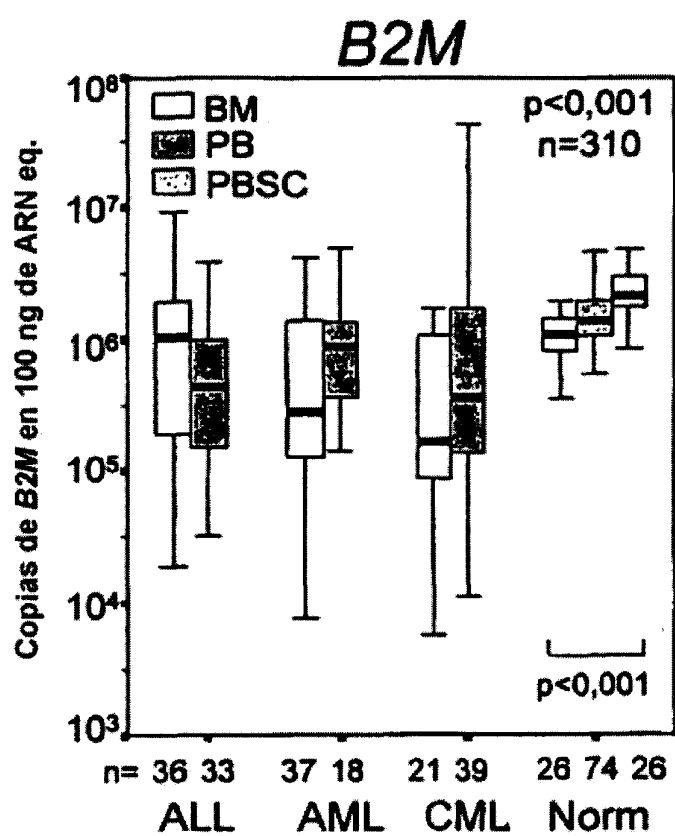


FIGURA 38c

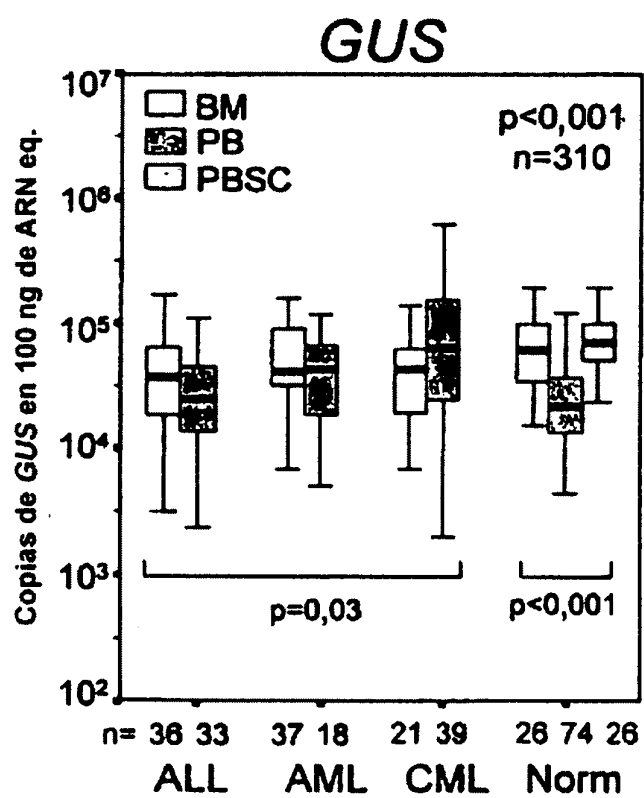


FIGURA 39a

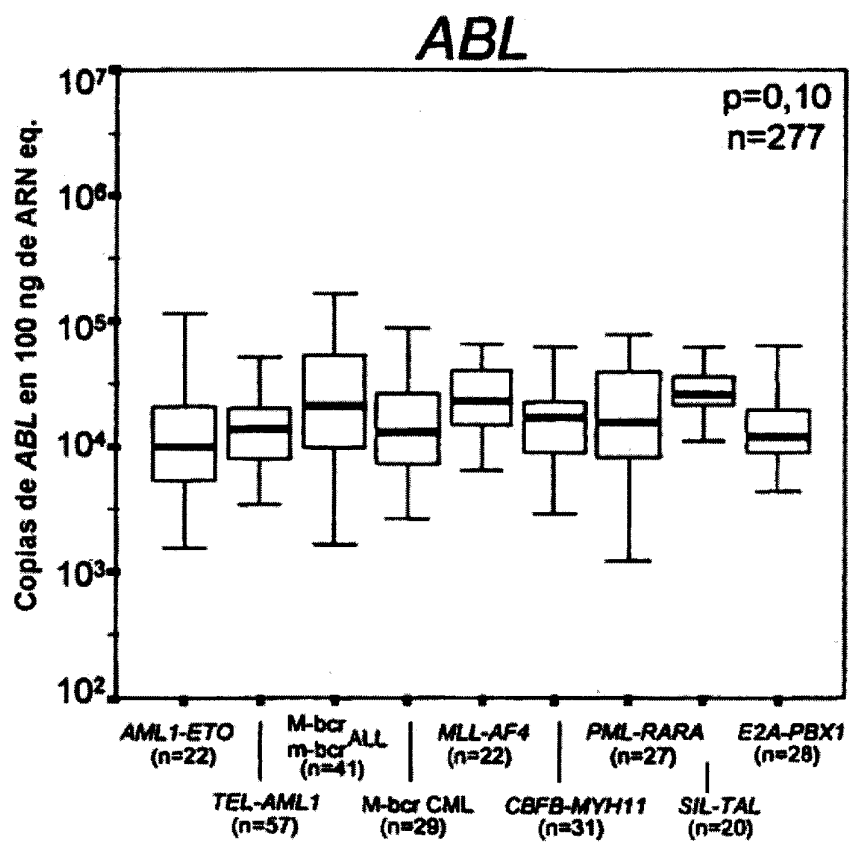


FIGURA 39b

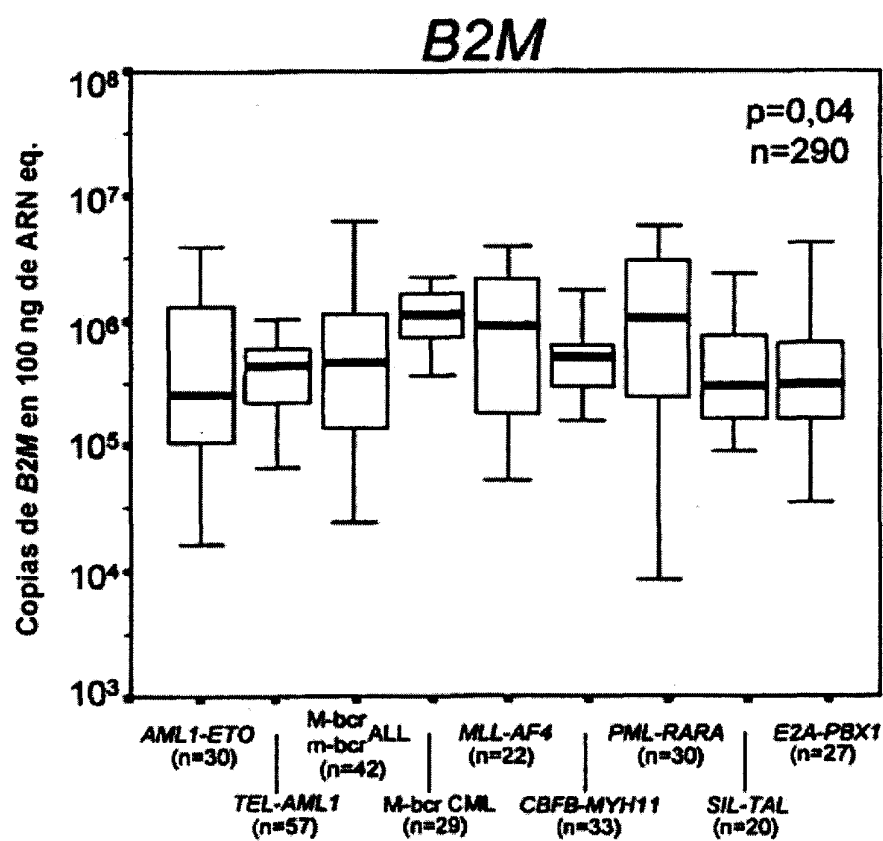


FIGURA 39c

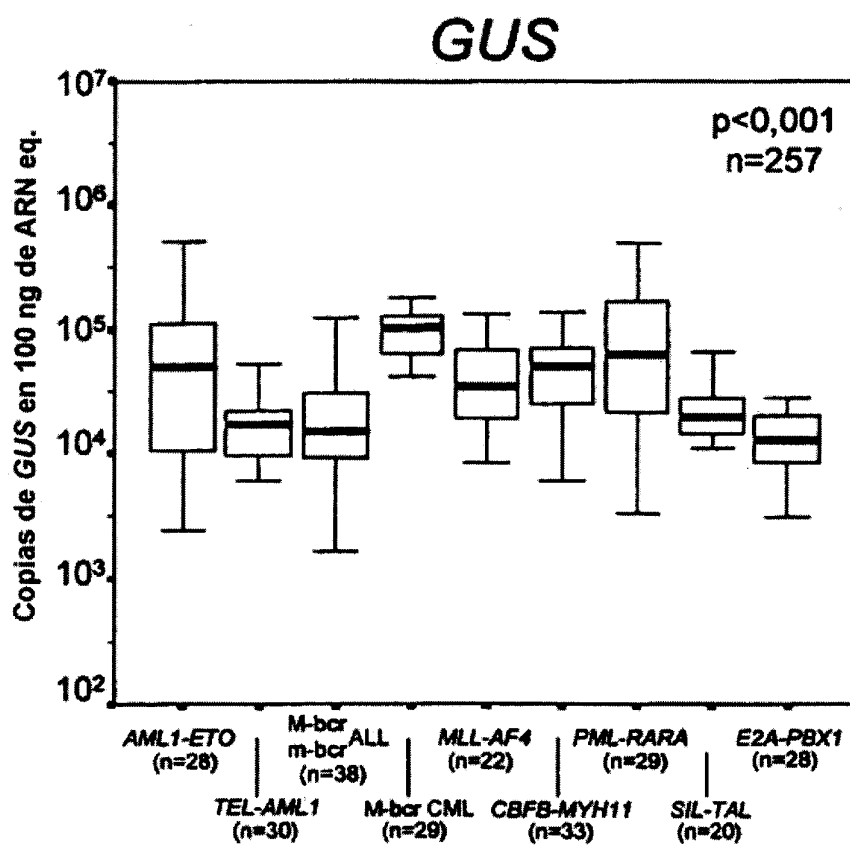


FIGURA 40a

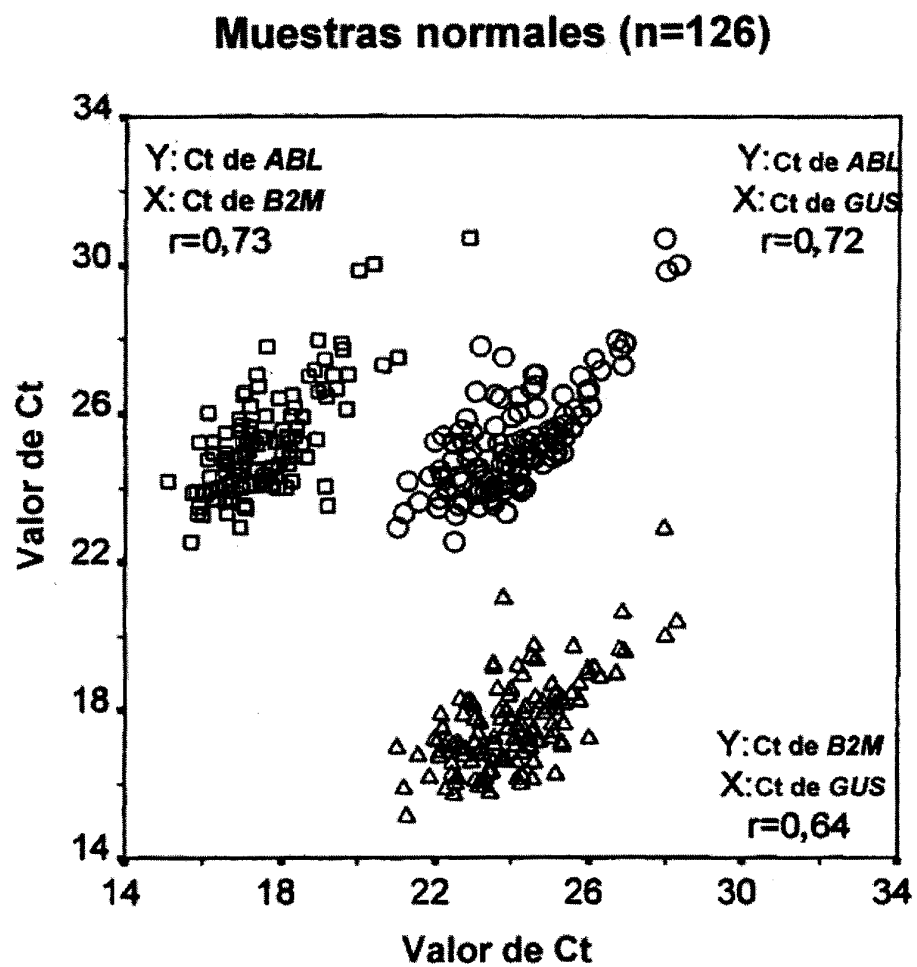


FIGURA 40b

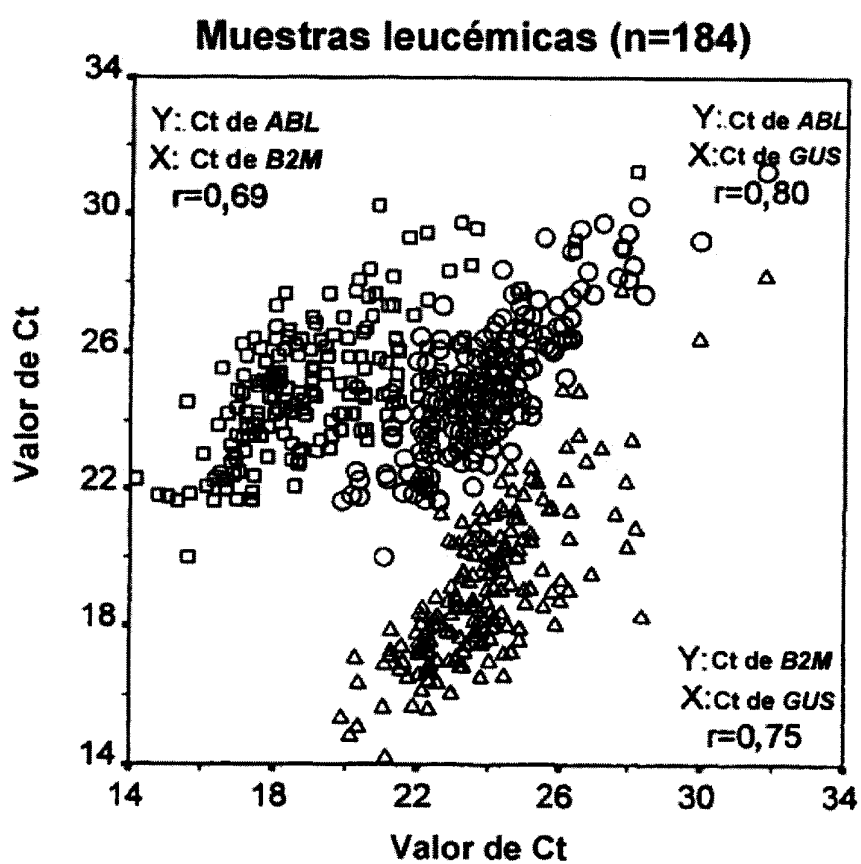
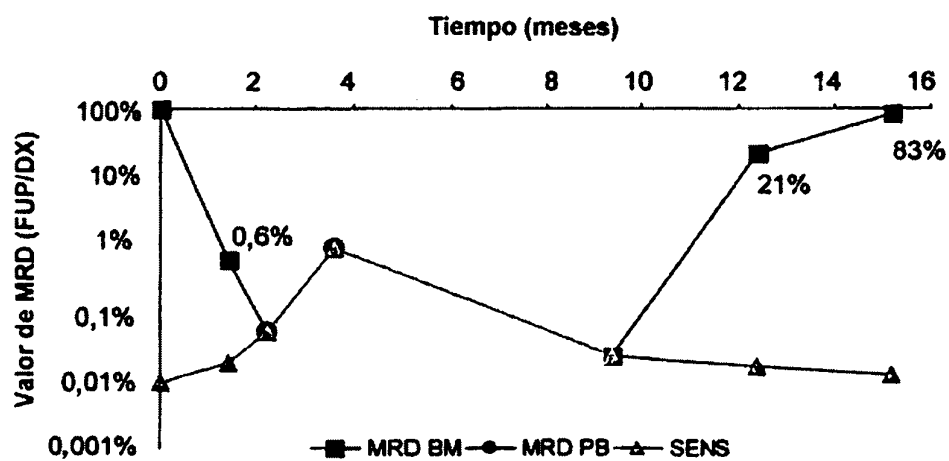


FIGURA 41



ES 2 337 301 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE

5 <120> Método normalizado y optimizado de reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa cuantitativa en tiempo real para la detección de MRD en leucemia

<130> 60938-2765Div2

10

<150> EP 03 290 572.1

<151> 07-03-2003

15 <150> PCT/EP04/004008

<151> 08-03-2004

<150> EP 04 718.310.8

20 <151> 08-03-2004

<160> 47

<170> PatentIn versión 3.3

25

<210> 1

<211> 31

<212> ADN

30

<213> Humano

<400> 1

35 **tggagataac actctaagca taactaaagg t** 31

<210> 2

<211> 28

40 <212> ADN

<213> Humano

<400> 2

45 **ccatttttgg ttgggcttc acaccatt** 28

<210> 3

50 <211> 21

<212> ADN

<213> Humano

55 <400> 3

gatgtagtgtg cttgggaccc a 21

<210> 4

60 <211> 18

<212> ADN

<213> Humano

65

ES 2 337 301 T3

	<400> 4		
	gagtatgcct gccgtgtg	18	
5	<210> 5		
	<211> 26		
	<212> ADN		
10	<213> Humano		
	<400> 5		
	cctccatgat gctgcttaca tgtctc	26	
15	<210> 6		
	<211> 18		
	<212> ADN		
20	<213> Humano		
	<400> 6		
25	aatccaaatg cggcatct	18	
	<210> 7		
	<211> 26		
30	<212> ADN		
	<213> Humano		
	<400> 7		
35	gaaaatatgt ggttgagag ctcat	26	
	<210> 8		
40	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> Humano		
45	<400> 8		
	ccagcactct cgtcgtgac tttca	26	
	<210> 9		
50	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Humano		
55	<400> 9		
	ccgagtgaag atccccttt ta	22	
60	<210> 10		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Humano		
65			

ES 2 337 301 T3

<400> 10

ccagcctcat gcacaacca 19

5 <210> 11

<211> 22

<212> ADN

10 <213> Humano

<400> 11

ccctccctga cctgtctcgg cc 22

15

<210> 12

<211> 21

<212> ADN

20 <213> Humano

<400> 12

gggctcctcg gatactcaaa a 21

25

<210> 13

<211> 25

<212> ADN

30 <213> Humano

<400> 13

cccaagtatc cctgtaaaac aaaaa 25

35

<210> 14

<211> 23

40 <212> ADN

<213> Humano

<400> 14

gatggagtcc acaggatcag agt 23

45

<210> 15

<211> 22

50 <212> ADN

<213> Humano

<400> 15

catggccgcc tccttgaca gc 22

55

<210> 16

60 <211> 22

<212> ADN

<213> Humano

65

ES 2 337 301 T3

<400> 16
gaaaggaaac ttggatggct ca 22

5 <210> 17
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Humano

10 <400> 17
ctctgtctcc ccgcctgaa 19

15 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Humano

<400> 18
tcccaatggg catggcgtgc 20

25 <210> 19
 <211> 16
 <212> ADN
 30 <213> Humano

<400> 19
cggctcgtgc tggcat 16

35 <210> 20
 <211> 18
 <212> ADN
 40 <213> Humano

<400> 20
ctggcccaac gatggcga 18

45 <210> 21
 <211> 25
 50 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 21
cccttcagcg gccagtagca tctga 25

55 <210> 22
 60 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Humano

65

ES 2 337 301 T3

<400> 22

cactcagacc ctgaggctca a 21

5 <210> 23

<211> 21

<212> ADN

10 <213> Humano

<400> 23

tccgctgacc atcaayaagg a 21

15

<210> 24

<211> 21

<212> ADN

20 <213> Humano

<400> 24

tccgctgacc atcaayaagg a 21

25

<210> 25

<211> 21

<212> ADN

30 <213> Humano

<400> 25

cactcagacc ctgaggctca a 21

35

<210> 26

<211> 19

<212> ADN

<213> Humano

40

<400> 26

cgctcctacc ctgcaaaca 19

45

<210> 27

<211> 22

<212> ADN

<213> Humano

55

<400> 27

acctcagctc cgcggaagtt gc 22

60

<210> 28

<211> 19

<212> ADN

65 <213> Humano

ES 2 337 301 T3

	<400> 28		
	ccgaggaaga ggatgcaca	19	
5	<210> 29		
	<211> 19		
	<212> ADN		
10	<213> Humano		
	<400> 29		
	tcttcctgcc caacagcaa	19	
15	<210> 30		
	<211> 19		
	<212> ADN		
20	<213> Humano		
	<400> 30		
25	acctggatgg accgcctag	19	
	<210> 31		
	<211> 19		
30	<212> ADN		
	<213> Humano		
	<400> 31		
35	ccgatggctt cgacgagtt	19	
	<210> 32		
	<211> 20		
40	<212> ADN		
	<213> Humano		
	<400> 32		
45	agtgcccgagc cctccctcgc	20	
	<210> 33		
50	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Humano		
55	<400> 33		
	gcttgtagat gcggggtaga g	21	
60	<210> 34		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Humano		
65			

<400> 34

cattagcaca acaggccttt ga 22

5 <210> 35

<211> 22

<212> ADN

10 <213> Humano

<400> 35

tcgcgtgtcc ttctccgagc ct 22

15

<210> 36

<211> 17

<212> ADN

20 <213> Humano

<400> 36

25 **agggcccgct tggactt 17**

<210> 37

<211> 21

30 <212> ADN

<213> Humano

<400> 37

35 **cctcgtaag catccctgtg a 21**

<210> 38

<211> 23

40 <212> ADN

<213> Humano

<400> 38

45 **ctctttctcc agcgtctgct tat 23**

<210> 39

50 <211> 22

<212> ADN

<213> Humano

55 <400> 39

cacctaccac agagccatca aa 22

60 <210> 40

<211> 30

<212> ADN

<213> Humano

65

ES 2 337 301 T3

	<400> 40		
	aacctcgaaa tcgtactgag aagcactcca	30	
5	<210> 41		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Humano		
10	<400> 41		
	atccacaggt gagtctggca tt	22	
15	<210> 42		
	<211> 18		
	<212> ADN		
20	<213> Humano		
	<400> 42		
25	ccttcagcgg ccagtagc	18	
	<210> 43		
	<211> 19		
	<212> ADN		
30	<213> Humano		
	<400> 43		
35	ggacacaggc ccatggtac	19	
	<210> 44		
	<211> 19		
40	<212> ADN		
	<213> Humano		
	<400> 44		
45	ccttgaggct atccagcgt	19	
	<210> 45		
50	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Humano		
55	<400> 45		
	cctgctcaga tacatcaaac atg	23	
60	<210> 46		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Humano		
65			

ES 2 337 301 T3

<400> 46

cctgtgacct ttgtgagcaa 20

5

<210> 47

<211> 19

<212> ADN

10 <213> Humano

<400> 47

15 **gtctgccgtg aacagtcca** 19

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65