



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 789**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07799583 .5**

96 Fecha de presentación : **13.07.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2041312**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.2009**

54 Título: **Genotipado ABCB1 para predecir toxicidad inducida por un agente estabilizador de microtúbulos.**

30 Prioridad: **14.07.2006 US 807453 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.04.2011

73 Titular/es: **The Govt. of the Usa as Represented by
the Secretary of the Dept. of Health and Human
Services
National Institutes of Health Office of Technology
Transfer 6011 Executive Boulevard, Suite 325
Rockville, Maryland 20852-3804, US
University of Freiburg**

72 Inventor/es: **Figg, William, D.;**
Mross, Klaus;
Behringer, Dirk;
Sparreboom, Alex;
Sissung, Tristan, M. y
Mielke, Stephen

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 356 789 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**REMISIÓN A SOLICITUD RELACIONADA**

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de Estados Unidos N° 60/807.453 presentada el 14 de julio de 2006, incorporada en este documento por referencia.

5

CAMPO

Esta solicitud se refiere a métodos para identificar sujetos que tengan probabilidad de efectos adversos significativos por la administración de taxanos u otros agentes estabilizadores de microtúbulos, así como moléculas de ácido nucleico aisladas y kits que pueden usarse para poner en práctica estos métodos.

ANTECEDENTES

10

Los taxanos son una familia de compuestos que se identificaron originalmente en extractos de la corteza del tejo (*Taxus*). El paclitaxel (Taxol®) y docetaxel (Taxotere®) son taxanos con amplia actividad antitumoral. Estos fármacos se aprobaron originalmente para su uso en sujetos con tumor de mama u ovario, pero tienen actividad contra diversos tumores incluyendo linfoma, carcinoma pulmonar macrocítico, de cabeza y cuello, gástrico, de vejiga, de próstata, y otros carcinomas. La dosificación y planificación de estos fármacos se han optimizado durante las últimas dos décadas. Los efectos adversos causados por el tratamiento con taxano incluyen reacción severa de hipersensibilidad, neutropenia, neuropatía periférica, mialgia/artralgia, trastornos cutáneos y ungulares, y alopecia. La neutropenia es la principal toxicidad limitante de la dosis del tratamiento con paclitaxel, aunque parece que la frecuencia de neuropatía periférica aumenta con la dosis acumulativa. Aunque la incidencia de las reacciones severas de hipersensibilidad se ha reducido por el uso de premedicación, la neuropatía periférica acumulativa y la neutropenia persisten como problemas al tratamiento óptimo con taxanos.

15

20

Los taxanos son parte de la familia más grande de fármacos anti-cáncer cuyo mecanismo de acción está dirigido a los microtúbulos (MT). Tanto el paclitaxel como el docetaxel se unen a la subunidad β -tubulina y estabilizan los MT. Esta estabilización de los MT conduce a una detención mitótica y a la posterior apoptosis. Otros compuestos con un mecanismo similar de acción incluyen las epotilonas, discodermolida, eleuterobina, las sarcodictinas, y las laulimalidas (He *et al.*, (2001) *Drug Discovery Today* 6:1153-1164).

25

30

Una de las proteínas principales implicadas en la eliminación y distribución de los taxanos es ABCB1 (también conocida como resistencia a múltiples fármacos 1 (MDR1) o P-glicoproteína). ABCB1 es un miembro de la familia del casete de unión a ATP de transportadores de evacuación que se expresan en varios tejidos, incluyendo tejidos con función excretora, células madre neurales, la barrera hemato-encefálica, y células precursoras hematopoyéticas. Aunque ABCB1 no se ha detectado en células nerviosas periféricas, la transferencia de fármacos a través de la circulación sistémica a los nervios periféricos está regulada por la barrera hemato-nerviosa que consta de células endoteliales capilares. Las células que componen la barrera hemato-nerviosa expresan ABCB1 y se cree que protegen el tejido nervioso periférico transportando sustancias tóxicas desde el sistema nervioso de nuevo a la circulación sistémica.

35

Debido a la gravedad de los efectos adversos resultantes de la administración de taxanos y otros agentes estabilizadores de MT, se necesitan métodos para identificar individuos con riesgo aumentado de estos efectos secundarios antes de comenzar el tratamiento.

SUMARIO

40

La presente invención se define en las reivindicaciones. Se han identificado polimorfismos en el gen *ABCB1* que son predictivos de efectos adversos inducidos por el tratamiento con taxanos u otros agentes estabilizadores de microtúbulos (MT). En base a estas observaciones, se proporcionan métodos para identificar un sujeto con riesgo aumentado de efectos adversos. En algunos ejemplos, los sujetos identificados como que tienen riesgo aumentado de efectos secundarios adversos por el agente estabilizador de MT reciben una terapia modificada diseñada para reducir dichos efectos secundarios indeseables.

45

En un ejemplo, el método incluye determinar el genotipo del sujeto para polimorfismos predictivos *ABCB1*, tales como los que indican una probabilidad aumentada de un resultado clínico particular. Los polimorfismos predictivos *ABCB1* ejemplares incluyen, aunque sin limitación, uno o más de 1236C>T, 2677G>T/A, y 3435C>T, tal como dos, tres o cuatro de dichos polimorfismos (por ejemplo 2677G>T/A y 3435C>T). En ejemplos particulares, la presencia de uno o más de estos polimorfismos, tales como dos o tres de estos polimorfismos, es predictiva de riesgo aumentado de efectos adversos, mientras que la ausencia de dichos polimorfismos predictivos indica que el sujeto probablemente no experimentará efectos adversos. En un ejemplo particular, el agente estabilizador de MT es un taxano. En otro ejemplo particular, el agente estabilizador de MT es una epotilona.

50

55

También se proporcionan métodos para disminuir la aparición de efectos adversos inducidos por un agente estabilizador de MT determinando el genotipo de un sujeto para polimorfismos *ABCB1* y alterando el transcurso del tratamiento si el sujeto tiene al menos un polimorfismo predictivo, tal como al menos dos o al menos tres de dichos polimorfismos predictivos. En un ejemplo, la cantidad de agente estabilizador de MT administrada a un sujeto se disminuye, por ejemplo, donde la dosificación se disminuye en al menos un 20%. En otro ejemplo, se aumenta el intervalo entre tratamientos con agente estabilizador de MT o se aumenta la duración de infusión del agente estabilizador de MT (por ejemplo, administrando la misma dosis de un agente estabilizador de MT durante un periodo más grande de tiempo). En otro ejemplo más, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de factor estimulador de colonias (CSF) después del tratamiento con agente estabilizador de MT para reducir la incidencia de neutropenia. También pueden usarse combinaciones de estos.

60

También se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas, tales como las que constan de cualquiera de

las SEC ID N° 1-12. Un especialista en la técnica apreciará que dichos cebadores pueden incluir un marcador detectable, tal como un fluoróforo o enzima. Se describen kits que pueden usarse para identificar un sujeto con riesgo aumentado de efectos adversos inducidos por agente estabilizador de MT. En un ejemplo, se incluyen dos o más cebadores mostrados en las SEC ID N° 1-12 en el kit, por ejemplo, para detectar la presencia o ausencia de uno o más polimorfismos predictivos en el gen *ABCB1*. Dichos kits pueden incluir reactivos adicionales, tales como tampones y reactivos que permiten la detección de una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, por amplificación y/o hibridación específica.

Los objetos y características anteriores y otros de la descripción llegarán a ser más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que procede con referencia a las figuras adjuntas.

10 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 es un diagrama que muestra la asociación entre el riesgo de desarrollar neuropatía periférica de grado 3 y el estado del genotipo *ABCB1* en 22 sujetos que recibieron tratamiento con paclitaxel durante 12 semanas. CC, genotipo *ABCB1* 3435CC; CT, genotipo *ABCB1* 3435CT; TT, genotipo *ABCB1* 3435TT. El valor P se obtuvo a partir de un ensayo de rango logarítmico bilateral exacto.

15 La FIG. 2 es un diagrama que muestra la asociación entre el riesgo de neutropenia y el estado del genotipo *ABCB1* en 18 sujetos. Los datos se presentan como un porcentaje de disminución en el recuento absoluto de neutrófilos para cada genotipo después de 12 semanas de tratamiento con paclitaxel. Genotipo no doble variante, tipo silvestre en ambos, o heterocigótico en uno o ambos alelos *ABCB1* 2677 y *ABCB1* 3435; doble variante, *ABCB1* 2677TT y *ABCB1* 3435TT. El valor P no ajustado fue 0,0025.

20 La FIG. 3 es un diagrama que muestra la asociación entre la aparición de neuropatía periférica inducida por docetaxel y el estado del genotipo *ABCB1* en 50 sujetos que recibieron docetaxel una vez a la semana durante 3 semanas consecutivas seguido de un período de descanso de 1 semana hasta el fallo del tratamiento. Los datos se presentan como un porcentaje de la disminución de sujetos que no tienen neuropatía para cada genotipo. El trazo superior muestra los sujetos que tienen el genotipo *ABCB1* 2677GG (tipo silvestre para ambos alelos), el trazo inferior muestra los sujetos que tienen el genotipo *ABCB1* 2677GT o 2677GA (heterocigótico en el alelo *ABCB1* 2677) o doble variante *ABCB1* 2677TT. El valor P fue 0,017 por el ensayo de rango logarítmico.

LISTA DE SECUENCIAS

30 Las secuencias de ácido nucleico enumeradas en la lista de secuencias adjunta se muestran usando abreviaturas de una letra convencionales para las bases nucleotídicas, como se define en 37 C.F.R. 1.822. Se muestra solamente una cadena de cada secuencia de ácido nucleico, pero la cadena complementaria se entiende incluida por cualquier referencia a la cadena presentada. En la lista de secuencias adjunta:

La SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2 son cebadores directo e inverso, respectivamente, usados para amplificar por PCR *ABCB1* para detectar polimorfismos en el nucleótido 1236.

35 La SEC ID N° 3 y la SEC ID N° 4 son cebadores directo e inverso, respectivamente, usados para amplificar por PCR *ABCB1* para detectar polimorfismos en el nucleótido 2677.

La SEC ID N° 5 y la SEC ID N° 6 son cebadores directo e inverso, respectivamente, usados para amplificar por PCR *ABCB1* para detectar polimorfismos en el nucleótido 3435.

La SEC ID N° 7 y la SEC ID N° 8 son cebadores directo e inverso, respectivamente, usados para secuenciar por PCR productos que abarcan la posición 1236 de *ABCB1* para determinar el genotipo.

40 La SEC ID N° 9 y la SEC ID N° 10 son cebadores directo e inverso, respectivamente, usados para secuenciar por PCR productos que abarcan la posición 2677 de *ABCB1* para determinar el genotipo.

La SEC ID N° 11 y la SEC ID N° 12 son cebadores directo e inverso, respectivamente, usados para secuenciar por PCR productos que abarcan la posición 3435 de *ABCB1* para determinar el genotipo.

45 La SEC ID N° 13 es una secuencia de ADNc de *ABCB1* humana ejemplar que puede usarse para identificar las posiciones 1236, 2677, y 3435 referenciadas descritas en este documento.

La SEC ID N° 14 es la proteína codificada por la SEC ID N° 13.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Abreviaturas y términos

50 Las siguientes explicaciones de términos y métodos se proporcionan para describir mejor la presente descripción y para guiar a los especialistas en la técnica en la práctica de la presente descripción. Las formas singulares "un", "una" y "el", la se refieren a uno o más de uno, salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Por ejemplo, la expresión "que incluye un ácido nucleico" incluye uno o plurales ácidos nucleicos y se considera equivalente a la expresión "que incluye al menos un ácido nucleico". El término "o" se refiere a un único elemento de elementos alternativos indicados o una combinación de dos o más elementos, salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Como se usa en este documento, "comprende" significa "incluye". Por tanto, "que comprende A o B" significa "que incluye A, B, o A y B", si excluir elementos adicionales. Por ejemplo, la expresión "mutaciones o polimorfismos" o "una o más mutaciones o polimorfismos" significa una mutación, un polimorfismo, o combinaciones de los mismos, donde "un" puede referirse a más de uno.

Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento en la práctica o ensayo de la presente descripción, a continuación se describen método y materiales adecuados. Los materiales, métodos, y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

5 Salvo que se indique otra cosa, los términos técnicos se usan de acuerdo con el uso convencional. Pueden encontrarse definiciones de términos comunes en biología molecular en Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19854287-9); Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

ABCB1: casete de unión a ATP, subfamilia B (MDR/TAP), gen o proteína del miembro 1

10 **CSF:** factor estimulador de colonias

G-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos

GM-CSF: factor estimulador de colonias de macrófagos granulocitos

MDR1: gen o proteína de resistencia a múltiples fármacos

MT: microtúbulo

15 **PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

20 **ABCB1:** casete de unión a ATP, subfamilia B (MDR/TAP), miembro 1; conocido de otro modo como el gen de resistencia a múltiples fármacos (*MDR1*), que codifica la proteína conocida como P-glucoproteína. *ABCB1* es un miembro de la familia del casete de unión a ATP de transportadores de evacuación. Se descubrió por primera vez como una proteína responsable de la resistencia contra fármacos anti-cáncer en células cancerosas humanas. En general, *ABCB1* se expresa en muchos tejidos normales, por ejemplo, epitelio intestinal, glándula suprarrenal, riñón, hígado, páncreas, y células del endotelio capilar del cerebro y los testículos. Desempeña una tarea en la excreción de xenobióticos foráneos del cuerpo y evitando su transferencia a través de la placenta y la barrera hemato-encefálica.

25 Las secuencias de *ABCB1* están disponibles al público. Por ejemplo, el número de acceso a GenBank NC_000007 describe una secuencia génica de *ABCB1* humana, y los números de acceso a GenBank BC130424 y AY910577 describen secuencias de ADNc de *ABCB1* humanas ejemplares y AAI30425 y AAW82430 describen secuencias proteicas de *ABCB1* humanas. Un especialista en la técnica apreciará que las moléculas de ácido nucleico y proteicas de *ABCB1* pueden variar de las disponibles al público, tales como las secuencias *ABCB1* que tienen una o más sustituciones, deleciones, inserciones, o combinaciones de los mismos, reteniendo al mismo tiempo la actividad biológica *ABCB1*. Además, las moléculas *ABCB1* incluyen fragmentos que retienen la actividad biológica *ABCB1* deseada.

30 **Administración:** Para proporcionar o dar a un sujeto un agente, tal como una composición que incluye un agente estabilizador de MT, tal como un taxano o una epotilona, solo o en combinación con otro agente, por cualquier vía eficaz. Las vías ejemplares de administración incluyen, aunque sin limitación, vía oral, por inyección (tal como subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, e intravenosa), sublingual, rectal, transdérmica, intranasal, vaginal y por inhalación.

35 **Análogo:** Un compuesto químico sintético que usa una estructura común como cadena principal (por ejemplo, donde se han añadido grupos laterales o dichos grupos se han delecionado de la estructura precursora). El análogo difiere en la estructura de la molécula precursora tal como por una diferencia en la longitud de una cadena alquilo, un fragmento molecular, en uno o más grupos funcionales, o un cambio en la ionización. Por ejemplo, un análogo de paclitaxel tendrá la estructura anular de taxano (como se describe por Kinston *et al.*, *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Springer-Verlag, 1993) con alteraciones en las cadenas laterales en comparación con el paclitaxel.

Cáncer: Neoplasma maligno que ha experimentado anaplasia característica con pérdida de diferenciación, velocidad aumentada de crecimiento, invasión del tejido adyacente, y tiene capacidad de metástasis.

45 **Factor estimulador de colonias (CSF):** Cualquiera de una familia de glucoproteínas que promueve la diferenciación de células madre hematopoyéticas, particularmente en neutrófilos o macrófagos. En un ejemplo particular, un CSF es el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF). En otro ejemplo, un CSF es el factor estimulador de colonias de macrófagos granulocitos (GM-CSF). En algunos ejemplos, pueden usarse cantidades terapéuticamente eficaces de CSF para tratar la neutropenia.

50 **Disminuido/que disminuye:** Que llega a ser menor o más pequeño, como en número, cantidad, o intensidad. En un ejemplo, que reduce la frecuencia de existencia de efectos adversos inducidos por un agente estabilizador de MT en al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, o al menos el 50%. En otro ejemplo, que reduce la cantidad de agente estabilizador de MT administrada a un sujeto en al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, o al menos el 50%. En un ejemplo adicional, que reduce la incidencia, duración, o gravedad de los efectos adversos inducidos por agentes estabilizadores de MT.

60 **Docetaxel (Taxotere®):** Un miembro de la familia de los taxanos de compuestos con actividad anti-tumoral derivado de *Taxus baccata* por un proceso semi-sintético, con la fórmula química (2*R*,3*S*)-*N*-carboxi-3-fenilisoserina, *N*-terc-butyl éster, 13-éster con 5β-20-epoxi-1,2α,4,7β,10β,13α-hexahidroxitax-11-en-9-ona, 4-acetato 2-benzoato, trihidrato. El docetaxel es un agente anti-microtúbulos que promueve el ensamblaje y estabilización de los MT evitando la despolimerización. La estabilización de los MT conduce a detención mitótica y citotoxicidad.

Programa de dosificación: Momento de administración de un agente terapéutico, tal como un agente estabilizador de MT. Por ejemplo, un agente terapéutico puede administrarse al menos una vez al día, al menos una vez por semana, al menos una vez cada dos semanas, al menos una vez cada tres semanas, o al menos una vez cada seis semanas. En un ejemplo específico, el programa de dosificación de paclitaxel puede ser una infusión de tres horas una vez cada tres semanas.

Epotilona: Una clase de microlidas inicialmente descubiertas a partir de la mixobacteria *Sorangium cellulosum*. Las epotilonas tienen actividad estabilizadora de MT y pueden tener actividad antitumoral. Los ejemplos incluyen epotilona A, epotilona B, e ixabepilona.

Factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF): Un miembro de la familia de CSF que estimula el crecimiento y la diferenciación de neutrófilos a partir de la población de células precursoras hematopoyéticas. El G-CSF puede usarse como un accesorio al tratamiento quimioterapéutico citotóxico de tumores sólidos. Se ha demostrado que reduce la incidencia de neutropenia febril y disminuye el tiempo de recuperación de los niveles de neutrófilos después de quimioterapia. También se ha aprobado una forma pegilada de G-CSF para su uso en el tratamiento de la neutropenia. Véase Komrokji y Lyman (2004) *Expert Opin. Biol. Ther.* 4:1897-1910.

Factor estimulador de colonias de macrófagos granulocitos (GM-CSF): Un miembro de la familia de CSF que estimula la proliferación de neutrófilos, macrófagos, y eosinófilos. El GM-CSF puede usarse para tratar la neutropenia que sucede como resultado de quimioterapia citotóxica para tumores sólidos. Véase Komrokji y Lyman (2004) *Expert Opin. Biol. Ther.* 4:1897-1910.

Aumentado: Mayor en cantidad, tamaño, o grado. En un ejemplo, el periodo de tiempo durante el cual se administra quimioterapia con agente estabilizador de MT se prolonga en al menos dos horas, tal como al menos 23 horas. En otro ejemplo, se prolonga el intervalo entre la administración de dosis de agente estabilizador de MT en al menos una semana, al menos dos semanas, o al menos cinco semanas.

Riesgo aumentado: Una probabilidad elevada de que suceda cierto acontecimiento. Por ejemplo, sujetos que tienen uno o más polimorfismos predictivos en el gen *ABCB1* pueden tener una probabilidad aumentada de experimentar efectos adversos inducidos por un agente estabilizador de MT, tal como neutropenia o neuropatía periférica.

Aislado: Un componente biológico "aislado" (tal como una molécula de ácido nucleico, proteína, o célula) se ha separado sustancialmente o purificado de otros componentes, tales como otros componentes en la célula del organismo, o el propio organismo, en el que existe el componente de forma natural, tal como otro ADN cromosómico y extra-cromosómico y ARN, proteínas y células. Las moléculas de ácido nucleico y proteínas que se han "aislado" incluyen moléculas de ácido nucleico (tal como ADN o ARN) y proteínas purificadas por métodos de purificación convencionales. El término también abarca moléculas de ácido nucleico y proteínas preparadas por expresión recombinante en una célula hospedadora así como moléculas de ácido nucleico y proteínas sintetizadas químicamente.

Ixabepilona (BMS-247550): Un miembro de la familia de epotilonas con la estructura química (1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-dihidroxi-8,8,10,12,16-pentametil-3-[(1E)-1-metil-2-(2-metiliazol-4-il)etenil]-17-oxa-4-azabicyclo[4.1.0]heptadecano-5,9-diona.

Agente estabilizador de microtúbulos: Una clase de compuestos que se unen a oligómeros o polímeros de tubulina y potencian la polimerización de la tubulina o estabiliza los MT. Esto está en contraste con agentes que despolimerizan los MT, tales como los alcaloides de la vinca. En un ejemplo, un agente estabilizador de MT es un taxano, tal como paclitaxel. En otro ejemplo, un agente estabilizador de MT es una epotilona, tal como ixabepilona. En un ejemplo adicional, un agente estabilizador de MT es discodermolida o eleuterobina. En otro ejemplo, un agente estabilizador de MT es una sarcodictinas o una laulimalida.

Efectos adversos inducidos por un agente estabilizador de microtúbulos: Efectos secundarios negativos como resultado de la administración de un fármaco anti-cáncer de agente estabilizador de MT a un sujeto, tal como un ser humano. Los efectos ejemplares incluyen reacción de hipersensibilidad, efectos hematológicos (neutropenia, leucopenia, anemia), efectos cardiovasculares (bradicardia, hipotensión), neuropatía periférica, mialgia/artralgia, náuseas y vómitos, alopecia, y combinaciones de los mismos. Son conocidos para los médicos especialistas otros efectos.

Neutropenia: Una afección en la que existe una reducción en el recuento sanguíneo de neutrófilos, que a menudo conduce a susceptibilidad aumentada a infección. La gravedad de la neutropenia se define en líneas generales por el recuento absoluto de neutrófilos - leve, entre $1 \times 10^9/\text{ml}$ y $2 \times 10^9/\text{ml}$; moderada, entre $0,5 \times 10^9/\text{ml}$ y $1 \times 10^9/\text{ml}$; grave, menos de $0,5 \times 10^9/\text{ml}$. La causa más común de neutropenia es producción alterada de neutrófilos como resultado de tratamiento con fármacos, particularmente fármacos anti-cáncer. En un ejemplo, la neutropenia inducida por un agente estabilizador de MT puede tratarse ajustando el tratamiento con agente estabilizador de MT o administrando CSF después de un tratamiento con agente estabilizador de MT.

Paclitaxel (Taxol®): Un miembro de la familia de taxanos con actividad anti-tumoral derivado de *Taxus baccata* por un proceso semi-sintético, con la fórmula química $5\beta,20\text{-epoxi-}1,2\alpha,4,7\beta,10\beta,13\alpha\text{-hexahidroxitax-}11\text{-en-}9\text{-ona, }4,10\text{-diacetato, }2\text{-benzoato, }13\text{-éster con (}2R,3S\text{)-}N\text{-benzoil-}3\text{-fenilisosserina}$. El paclitaxel es un agente anti-microtúbulos que promueve el ensamblaje y estabilización de los MT evitando la despolimerización. La estabilización de los MT conduce a detención mitótica y citotoxicidad. El tratamiento con paclitaxel generalmente provoca índices inferiores de neutropenia que el tratamiento con docetaxel.

Neuropatía periférica: Un síndrome de pérdida sensorial, debilidad muscular y atrofia, reflejos disminuidos de los tendones profundos, y síntomas vasomotores, individualmente o en cualquier combinación. En un ejemplo, la neuropatía periférica inducida por un agente estabilizador de MT está caracterizada más comúnmente por entumecimiento y paratesia en una distribución de guante-y-media. En un ejemplo adicional, la neuropatía periférica

inducida por un agente estabilizador de MT puede tratarse ajustando el tratamiento con agente estabilizador de MT.

Polimorfismo: Una variación en una secuencia génica, tal como una variación en una secuencia *ABCB1*. Los polimorfismos pueden ser aquellas variaciones (diferencias en la secuencia de ADN) que se encuentran generalmente entre individuos o diferentes grupos étnicos y localizaciones geográficas que, teniendo una secuencia diferente, producen productos génicos funcionalmente equivalentes. El término también puede hacer referencia a variantes en la secuencia que pueden conducir a productos génicos que no son funcionalmente equivalentes. Los polimorfismos también abarcan variaciones que pueden clasificarse como alelos y/o mutaciones que pueden producir productos génicos que pueden tener una función alterada. Los polimorfismos también abarcan variaciones que pueden clasificarse como alelos y/o mutaciones que producen ausencia de producto génico o un producto génico inactivo o un producto génico activo producido en una tasa anormal o en un tejido inapropiado o en respuesta a un estímulo inapropiado. Además, el término también se usa de forma intercambiable con alelo según sea apropiado.

Puede hacerse referencia a los polimorfismos, por ejemplo, por la posición del nucleótido en el que existe la variación, por el cambio en la secuencia de aminoácidos causado por la variación de nucleótido, o por un cambio en alguna otra característica de la molécula de ácido nucleico o proteína que está ligada a la variación. Por ejemplo, un polimorfismo 1236C>T en *ABCB1* se refiere a una sustitución de la C en la posición 1236 de la secuencia de ADNc de *ABCB1* por una T, que no provoca ningún cambio de aminoácido en la proteína. En otro ejemplo, un polimorfismo 2677G>T/A se refiere a una sustitución de la G en la posición 2677 de la secuencia de ADNc de *ABCB1* por una T o una A, provocando un cambio de alanina 893 en la proteína a serina o treonina, respectivamente. En un ejemplo adicional, 3435C>T se refiere a una sustitución de la C en la posición 3435 de la secuencia de ADNc de *ABCB1* por una T, que no provoca ningún cambio de aminoácido en la proteína. Las localizaciones de estas posiciones pueden determinarse a partir de una secuencia de ADNc de *ABCB1* conocida en la técnica, por ejemplo el N° de acceso a GenBank BC130424 (SEC ID N° 13).

Un polimorfismo predictivo es uno que indica una probabilidad aumentada de un resultado clínico particular. Por ejemplo, la presencia de uno o más de los polimorfismos 1236C>T, 2677G>T/A, y 3435C>T en el gen *ABCB1* son indicativos de un sujeto con más probabilidad de experimentar efectos adversos por tratamiento con agente estabilizador de MT (tal como neuropatía periférica o neutropenia) en comparación con un sujeto que no tiene estos polimorfismos.

Muestra: Incluye muestras biológicas que contienen células, ADN genómico, ARN, o proteínas (o combinaciones de los mismos) obtenidos de un sujeto, tal como las presentes en sangre periférica, orina, saliva, esputo, biopsia de tejido, muestra quirúrgica, aspirado con aguja fina, y material de autopsia. En un ejemplo particular, una muestra incluye plasma sanguíneo obtenido de un sujeto humano.

Sujeto: Organismos vertebrados multicelulares vivos, una categoría que incluye seres humanos y animales no humanos (tales como sujetos vertebrados de laboratorio o veterinarios).

Posterior a: En un momento más tarde de o después de otro acontecimiento. Por ejemplo, la administración posterior de un CSF indica la administración de un CSF en algún momento después de la administración de un agente estabilizador de MT, tal como al menos 24 horas después de la administración del agente estabilizador de MT, al menos 72 horas después de la administración del agente estabilizador de MT, o al menos siete días después de la administración del agente estabilizador de MT.

Sustitución sinónima: Una sustitución nucleotídica que produce un nuevo codón que especifica el mismo aminoácido. Dichas sustituciones a menudo suceden en la posición de la tercera base de un codón. Sin embargo, la sustitución de base en la posición de la primera base puede dar lugar ocasionalmente a una sustitución sinónima, como en el caso de algunos codones de leucina y arginina (por ejemplo $\underline{C}UA \Leftrightarrow \underline{U}UA$, $\underline{C}UG \Leftrightarrow \underline{U}UG$, $\underline{A}GA \Leftrightarrow \underline{C}GA$ y $\underline{A}GG \Leftrightarrow \underline{C}GG$).

Taxano: Un "taxano" es un compuesto químico basado en la estructura anular de taxano descrita en Kinston et al., *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Springer-Verlag, 1993. Un miembro del grupo de diterpenoides derivados de la corteza de *Taxus brevifolia* o de forma semi-sintética a partir de las agujas de un miembro del género *Taxus*, tal como *Taxus baccata*. Los taxanos también pueden fabricarse sintéticamente por síntesis total. Su mecanismo de acción es a través de la unión a polímeros de tubulina y estabilizando el MT, provocando detención en el ciclo celular y finalmente muerte celular. Los taxanos pueden usarse como agentes anti-neoplásicos en el tratamiento de varios tumores sólidos, incluyendo de un mama, de ovario, pulmonar macrocítico, y de próstata. En un ejemplo, un taxano es paclitaxel. En otro ejemplo, un taxano es docetaxel. En un ejemplo adicional, un taxano es un análogo de paclitaxel que contiene la estructura anular de taxano.

Cantidad terapéuticamente eficaz: Una cantidad de un agente terapéutico (tal como una composición que incluye un agente estabilizador de MT, tal como paclitaxel o ixabepilona), que solo, o junto con uno o más agentes terapéuticamente adicionales, induce la respuesta deseada, tal como tratamiento de un tumor sólido, tal como de mama, de ovario, pulmonar macrocítico, o sarcoma de Kaposi relacionado con SIDA. En un ejemplo, es una cantidad de agente estabilizador de MT necesaria para prevenir o retardar el desarrollo de un tumor, prevenir o retardar la metástasis de un tumor, causar la regresión de un tumor existente, o tratar uno o más signos o síntomas asociados con un tumor, en un sujeto, tal como un sujeto que tiene cáncer de mama. De forma ideal, una cantidad terapéuticamente eficaz proporciona un efecto terapéutico sin causar efecto citotóxico sustancial en el sujeto. Las preparaciones descritas en este documento se administran en cantidades terapéuticamente eficaces.

En un ejemplo, una respuesta deseada es disminuir el tamaño, volumen, o cantidad (tal como metástasis) de un tumor sólido. Por ejemplo, la composición que incluye un agente estabilizador de MT puede, en algunos ejemplos, disminuir el tamaño, volumen, o cantidad de tumores (tales como tumores de ovario) por una cantidad deseada, por ejemplo, en al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 50%, al menos el 75%, o incluso al menos el 90%, en comparación con una respuesta en ausencia de la

composición terapéutica.

5 En general, una cantidad eficaz de una composición que incluye un agente estabilizador de MT administrada a un sujeto humano variará dependiendo de varios factores asociados con ese sujeto, por ejemplo, la salud global del sujeto. Una cantidad eficaz de una composición que incluye un agente estabilizador de MT puede determinarse variando la dosificación del producto y midiendo la respuesta terapéutica resultante, tal como la regresión de un tumor. Los agentes terapéuticos descritos pueden administrarse en una única dosis, o en varias dosis, según sea necesario, para obtener la respuesta deseada. Sin embargo, la cantidad eficaz puede depender de la fuente aplicada, el sujeto que se está tratando, la gravedad y el tipo de afección que se está tratando, y el modo de administración.

10 En ejemplos particulares, una dosis terapéuticamente eficaz de un agente estabilizador de MT incluye al menos 35 mg/m² (tal como 35-300 mg/m²) de paclitaxel administrado por vía intravenosa durante al menos 1 hora (tal como 1-24 horas) al menos cada semana (tal como cada 1-3 semanas). Las composiciones descritas que incluyen un agente estabilizador de MT puede administrarse sola, en presencia de un vehículo farmacéuticamente aceptable, en presencia de otros agentes terapéuticos (tales como otros agentes anti-neoplásicos), o ambos.

15 **Tratamiento:** Se refiere a una intervención terapéutica que mejora un signo o síntoma de una enfermedad o afección patológica relacionada con una enfermedad (tal como un tumor, por ejemplo un tumor de mama, ovario, o pulmón). El tratamiento también puede inducir la remisión o cura de una afección, tal como un tumor. Reducir un signo o síntoma asociado con un tumor (tal como un tumor de mama, ovario, o pulmón) puede evidenciarse, por ejemplo, por una aparición retardada de los síntomas clínicos de la enfermedad, una reducción en la gravedad de algunos o todos los síntomas clínicos de la enfermedad, un progreso más lento de la enfermedad (por ejemplo, prolongado la vida de un sujeto que tiene tumor), una reducción en la cantidad de recaídas de la enfermedad, una mejora en la salud global o bienestar del sujeto, o por otros parámetros bien conocidos en la técnica que son específicos para el tumor particular. En otro ejemplo, el tratamiento puede incluir una intervención terapéutica que mejora el efecto adverso inducido por un agente estabilizador de MT, tal como neuropatía periférica o neutropenia, por ejemplo alterando el régimen de tratamiento con agente estabilizador de MT.

25 El tratamiento incluye prevenir una enfermedad, por ejemplo, inhibiendo el desarrollo completo de una enfermedad, tal como evitando el desarrollo de un tumor (tal como una metástasis o el desarrollo de un tumor primario). La prevención no requiere una ausencia total de un tumor. En un ejemplo, el tratamiento incluye intervención terapéutica que evita el desarrollo de los efectos adversos inducidos por un agente estabilizador de MT tal como neuropatía periférica o neutropenia. En un ejemplo particular, si se determina que un sujeto tiene un polimorfismo *ABCB1* predictivo de neutropenia inducida por un agente estabilizador de MT, el tratamiento puede incluir la administración de un CSF para evitar el desarrollo de neutropenia.

30 **Tumor:** Un neoplasma. Un tipo particular de tumor es un tumor sólido. Los ejemplos de tumores sólidos, tales como sarcomas y carcinomas, incluyen, aunque sin limitación: fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, y otros sarcomas, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomioma, rhabdomyosarcoma, carcinoma de colon, malignidad linfoide, cáncer pancreático, cáncer de mama, cánceres pulmonares, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma el conducto biliar, coriocarcinoma, tumor de Wilm, cáncer cervical, tumor testicular, carcinoma de vejiga, y tumores del SNC (tales como un glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma). Ciertas clases de tumores responden terapéuticamente al tratamiento con un agente estabilizador de MT y esta clase de tumores se conoce como un tumor sensible a agente estabilizador de MT.

Método para identificar el riesgo de efectos adversos

45 Se proporcionan métodos para identificar un sujeto en riesgo aumentado de desarrollar efectos adversos inducidos por un agente estabilizador de MT. El sujeto puede tener, por ejemplo, un tumor que se cree que es un tumor que es sensible a un agente estabilizador de MT. En un ejemplo, el método incluye determinar si el sujeto tiene al menos un polimorfismo predictivo en un gen *ABCB1*, donde la presencia de al menos un polimorfismo predictivo en un gen *ABCB1* (tal como al menos dos polimorfismos predictivos en un gen *ABCB1*) indica que el sujeto tiene un riesgo aumentado de desarrollar efectos adversos inducidos por un agente estabilizador de MT. En contraste, un sujeto que no tiene un polimorfismo predictivo en un gen *ABCB1* indica que el sujeto no tiene un riesgo aumentado para efectos adversos inducidos por un agente estabilizador de MT.

55 Un polimorfismo predictivo es uno que indica que un sujeto tiene una probabilidad aumentada de un resultado clínico particular. Por ejemplo, un polimorfismo predictivo *ABCB1* incluye uno o más polimorfismos *ABCB1* que pueden usarse para determinar si un sujeto tiene una probabilidad aumentada de desarrollar uno o más efectos adversos resultantes del tratamiento con un agente estabilizador de MT. Ejemplos particulares de polimorfismos *ABCB1* predictivos incluyen, aunque sin limitación: 1236C>T, 2677G>T, 2677G>A, o 3435C>T, o combinaciones de los mismos.

60 En un ejemplo, si el sujeto tiene al menos dos o al menos tres polimorfismos predictivos en un gen *ABCB1*, esto indica que el sujeto está en riesgo aumentado de desarrollar efectos adversos inducidos por un agente estabilizador de MT, tal como neuropatía periférica y neutropenia. Por ejemplo, si el sujeto tiene un polimorfismo *ABCB1* 3435C>T, esto puede indicar un riesgo aumentado de desarrollo de neuropatía periférica después de la administración de un agente estabilizador de MT. En otro ejemplo, si el sujeto tiene ambos polimorfismos *ABCB1* 2677G>T/A y 3435C>T, el sujeto puede tener un riesgo aumentado de desarrollo de neutropenia después del tratamiento con agente estabilizador de MT.

Determinación del genotipo *ABCB1*

Los ácidos nucleicos para detectar polimorfismos en *ABCB1* pueden obtenerse de numerosas fuentes biológicas. Las muestras biológicas ejemplares incluyen, aunque sin limitación, sangre completa o fracciones de la misma (tal como plasma), células bucales obtenidas por intercambio o elixir bucal, biopsia tumoral, aspirados con aguja fina, amniocentesis o muestras del vello coriónico, muestras patológicas, y manchas de sangre en tarjetas de Guthrie. Véase, por ejemplo, el capítulo 17 en *Human Molecular Genetics 2*. Eds. Tom Strachan y Andrew Read. Nueva York: John Wiley & Sons Inc., 1999. En un ejemplo, se aísla ADN de plasma de un sujeto.

Los métodos para aislar ácidos nucleicos (tal como ADN genómico, ADNc, o ARNm) de una muestra biológica son conocidos en la técnica. Aunque se proporcionan métodos ejemplares, los métodos no se limitan a aquellos enumerados. Los métodos particulares para aislar moléculas de ácido nucleico de una muestra biológica son bien conocidos en la técnica, y pueden incluir precipitación con etanol después de lisis celular, métodos de purificación en columna, y métodos de aislamiento basados en perlas magnéticas o de vidrio. Además, pueden usarse kits disponibles en el mercado, tales como los kits de purificación de ADN QIAamp® (Qiagen, Valencia, CA) o los kits de purificación de ADN Puregene® (Gentra Systems, Minneapolis, MN). En un ejemplo particular, se aísla ADN genómico de plasma humano de un sujeto usando un método de columna de centrifugación.

Los métodos para detectar polimorfismos (tales como polimorfismos predictivos de *ABCB1*) en una molécula de ácido nucleico son conocidos en la técnica. Aunque se proporcionan métodos ejemplares, los métodos no están limitados de este modo. Los métodos particulares para detectar un polimorfismo predictivo en uno o más nucleótidos particulares (por ejemplo en *ABCB1*) incluyen, aunque sin limitación, polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), mapeado de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP), secuenciación directa de ácidos nucleicos, hibridación, hibridación fluorescente in situ (FISH), análisis por electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), ensayo de protección de RNasa, oligonucleótidos alelo-específicos (ASO), análisis dot blot, amplificación por PCR alelo-específica (ARMS), ensayo de ligamiento de oligonucleótidos (OLA) y PCR-SSCP. Los métodos para realizar dichos métodos son rutinarios. Véanse, por ejemplo, los capítulos 6 y 17 en *Human Molecular Genetics 2*. Eds. Tom Strachan y Andrew Read. Nueva York: John Wiley & Sons Inc., 1999.

En un ejemplo particular, la presencia de uno o más polimorfismos predictivos, tales como los de *ABCB1*, se determina por secuenciación directa de nucleótidos. En un ejemplo adicional, la presencia de uno o más polimorfismos se determina por un ensayo con *Taq* polimerasa, tal como un ensayo TaqMan® (Holland *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:7276-80; Lee *et al.* (1999) *J. Mol. Biol.* 285:73-83). Este ensayo se basa en el hecho de que la *Taq* polimerasa no tiene actividad exonucleasa 3' a 5' correctora, pero tiene una actividad exonucleasa 5' a 3'. Este ensayo implica el uso de dos cebadores de PCR convencionales (directo e inverso), que son específicos para la secuencia diana (tal como *ABCB1*), y un tercer cebador, que es alelo-específico, diseñado para unirse específicamente a un sitio en la secuencia diana corriente abajo del sitio de unión del cebador directo. El tercer cebador generalmente está marcado con dos fluoróforos, un colorante informador en el extremo 5', y un colorante inactivador, que tiene una longitud de onda de emisión diferente en comparación con el colorante informador, en el extremo 3'. El tercer cebador también lleva un grupo de bloqueo en el nucleótido 3' terminal, de modo que no puede cebar por sí mismo ninguna síntesis de ADN nuevo. Durante la reacción de PCR, la ADN polimerasa *Taq* sintetiza una nueva cadena de ADN cebada por el cebador directo y según la enzima se aproxima al tercer cebador, su actividad exonucleasa 5' a 3' degrada progresivamente el tercer cebador desde su extremo 5'. El resultado final es que la cadena de ADN naciente se extiende más allá del sitio de unión del tercer cebador y los colorantes informador e inactivador ya no se unen a la misma molécula. Como el colorante informador ya no está cerca del colorante inactivador, puede detectarse el aumento resultante en la intensidad de emisión del informador.

En otro ejemplo, la presencia de polimorfismos predictivos en *ABCB1* puede detectarse usando un método de ensayo de ligamiento de oligonucleótidos (OLA). El OLA incluye dos fases, una amplificación por PCR y un ligamiento de oligonucleótidos. En la primera reacción se hibrida un cebador de PCR a la secuencia diana. Los cebadores se diseñan con el nucleótido o nucleótidos normales o mutantes en el extremo 3' y diferentes marcadores fluorescentes en el extremo 5'. La segunda reacción es una reacción de ligamiento. Se liga un cebador común que es complementario a la secuencia de ADN diana inmediatamente corriente abajo (3') del sitio SNP a un cebador que aparea perfectamente con la secuencia 5'. Los productos oligonucleotídicos ligados resultantes pueden detectarse usando electroforesis en gel capilar y detección fluorescente de las marcas fluorescentes respectivas para determinar el genotipo.

En un ejemplo adicional, puede usarse un ensayo basado en perlas utilizando hibridación de oligonucleótidos alelo-específicos unidos a un marcador fluorescente para identificar polimorfismos en *ABCB1*. Los oligonucleótidos específicos para cada alelo, que se unen a perlas marcadas diferentes de forma fluorescente, se hibridan a un ADN amplificado que contiene el polimorfismo de interés. Los oligonucleótidos alelo-específicos solamente hibridarán de forma significativa si el alelo está presente en la muestra. Las perlas hibridadas después se capturan, por ejemplo, con una molécula detectora biotinilada, y se mide la fluorescencia relativa de las perlas para cada marcador. Esto permite la determinación del genotipo para un polimorfismo particular, por ejemplo, en el gen *ABCB1*.

Sujetos

En un ejemplo, se analizan sujetos mamíferos para la presencia de uno o más polimorfismos predictivos *ABCB1*, tales como un sujeto humano o veterinario. En algunos ejemplos, el sujeto tiene un trastorno que puede tratarse por la administración de un agente estabilizador de MT. Los ejemplos de trastornos que pueden tratarse por la administración de un agente estabilizador de MT incluyen, aunque sin limitación, tumores sólidos, tales como cánceres sólidos de mama, pulmón (tal como carcinoma pulmonar macrocítico), ovario, vejiga o uréter, esófago, cabeza o cuello, y riñón, así como sarcoma de Kaposi.

Por ejemplo, el sujeto puede estar recibiendo tratamiento para un tumor que incluye la administración de un agente estabilizador de MT. En otro ejemplo, el sujeto es un candidato para la administración de un agente estabilizador de MT, por ejemplo, alguien que tiene un tumor del tipo sensible a agentes estabilizadores de MT.

Agentes estabilizadores de microtúbulos

Polimorfismos *ABCB1* particulares están asociados con riesgo aumentado de aparición de efectos adversos después de la administración de agentes estabilizadores de MT, y se mencionan en este documento como polimorfismos *ABCB1* predictivos. Los agentes estabilizadores de MT son compuestos que se unen a oligómeros o polímeros de tubulina y potencian la polimerización de la tubulina o estabilizan los MT, conduciendo a citotoxicidad.

En un ejemplo, el agente estabilizador de MT es de la clase de epotilonas, tales como ixabepilona (BMS-247550). En otro ejemplo, el agente estabilizador de MT es de la clase de taxanos, tales como paclitaxel (Taxol®), docetaxel (Taxotere®), o un análogo químico de paclitaxel que comparte la estructura anular de taxano.

Efectos adversos

En este documento se muestra que polimorfismos particulares en un gen *ABCB1* están asociados con riesgo aumentado de ciertos efectos adversos inducidos por agentes estabilizadores de MT. Los efectos adversos inducidos por un agente estabilizador de MT incluyen efectos secundarios indeseables que pueden ser el resultado de la administración de cantidades terapéuticamente eficaces de un agente estabilizador de MT. En algunos ejemplos, dichos efectos no se observan uniformemente en toda la población. Es decir, algunos sujetos padecen más efectos o efectos más graves que otros. En ejemplos particulares, los métodos descritos pueden usarse para distinguir dichos sujetos.

En un ejemplo, el efecto adverso es neuropatía periférica. En un ejemplo particular, el riesgo aumentado de desarrollar neuropatía periférica se predice por la presencia del polimorfismo 3435C>T. En otro ejemplo, el efecto adverso es neutropenia. En un ejemplo particular, el riesgo aumentado de desarrollar neutropenia se predice por la presencia de polimorfismos tanto en 2677G>T/A como en 3435C>T.

Método para disminuir la aparición de efectos adversos

Se proporcionan métodos para disminuir la aparición de uno o más efectos adversos de los agentes estabilizadores de MT, tales como neuropatía periférica y neutropenia. En un ejemplo, se determina el genotipo de un sujeto para los polimorfismos predictivos *ABCB1* 2677G>T/A y 3435C>T, y si se determina que es sujeto tiene al menos un polimorfismo predictivo, lo que indica por tanto que el sujeto tiene un riesgo aumentado de desarrollar uno o más efectos adversos de los agentes estabilizadores de MT, pueden tomarse enfoques para reducir los efectos adversos de los agentes estabilizadores de MT.

Por ejemplo, puede modificarse la administración de un agente estabilizador de MT, pueden administrarse agentes que se conoce para tratar uno o más efectos adversos de los agentes estabilizadores de MT, o combinaciones de los mismos, disminuyendo de este modo la aparición de efectos adversos en el sujeto que tiene un riesgo aumentado de desarrollar efectos adversos de los agentes estabilizadores de MT.

Administración de un agente estabilizador de microtúbulos

La cantidad, momento, o velocidad de administración (o combinaciones de los mismos) de un agente estabilizador de MT puede modificarse para reducir la aparición o gravedad de efectos adversos causados por el tratamiento, tal como neuropatía periférica y neutropenia. En algunos ejemplos las modificaciones son relativas a los métodos terapéuticos rutinarios para administrar un agente estabilizador de MT a un sujeto (tal como lo que sería rutinario para un paciente con cáncer). En un ejemplo, se disminuye la cantidad de agente estabilizador de MT administrada, por ejemplo, relativa a una cantidad administrada de forma rutinaria, tal como una reducción de al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, o al menos el 50%. En un ejemplo particular, la dosis de paclitaxel se reduce de 175 mg/m² a una cantidad menor de 175 mg/m² (tal como de 150 mg/m² a 50 mg/m², tal como de 140 mg/m² a 100 mg/m², por ejemplo 135 mg/m²). En otro ejemplo, se aumenta el intervalo entre la administración de dosis de un agente estabilizador de MT, por ejemplo, relativo a un intervalo usado de forma rutinaria. En ejemplos particulares, el intervalo se aumenta en al menos una semana, al menos dos semanas, o al menos cinco semanas. En un ejemplo adicional, se aumenta el intervalo entre dosis de agente estabilizador de microtúbulos de una semana a tres semanas. En otro ejemplo, se disminuye la velocidad de administración del agente estabilizador de MT aumentando el periodo de tiempo de administración, por ejemplo relativo a una velocidad administrada de forma rutinaria. En ejemplos particulares, se aumenta el tiempo de administración en al menos una hora, al menos dos horas, o al menos 23 horas. En un ejemplo adicional, se aumenta el tiempo de administración de una hora a tres horas.

Administración de tratamientos adicionales

Neutropenia

La incidencia, gravedad, o duración de la neutropenia en sujetos que se ha identificado que están en riesgo aumentado en base al genotipo *ABCB1* puede reducirse por tratamiento adicional. En un ejemplo, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de CSF a sujetos en riesgo de neutropenia inducida por un agente estabilizador de MT, por ejemplo antes, durante, o después de la administración del agente estabilizador de MT. En un ejemplo particular, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de CSF posterior a la administración de agente estabilizador de MT. En un ejemplo particular, el CSF es G-CSF. En un ejemplo adicional, se administra al menos 1 µg/kg/día de G-CSF (tal como 4-8 µg/kg/día de G-CSF, por ejemplo 5 µg/kg/día) empezando al menos 24 horas (tal como 24-72 horas) después de la administración del agente estabilizador de microtúbulos. En otro ejemplo, se administra al menos 1 mg de G-CSF pegilado (tal como 1-10 mg de G-CSF pegilado, por ejemplo 6 mg) al menos 24 horas (tal como 24 horas a 7 días) después del tratamiento con agente estabilizador de MT por inyección subcutánea. En un ejemplo adicional, el CSF es GM-CSF. En un ejemplo particular, se administran al menos 100 µg/m² de GM-CSF (tal como 100-250 µg/m² de GM-CSF) empezando al menos 24 horas después de la administración del agente estabilizador de microtúbulos.

En otro ejemplo, se administra CSF antes del comienzo del tratamiento con un agente estabilizador de MT. En

un ejemplo particular, se administra al menos 1 µg/kg/día de G-CSF (tal como 4-8 µg/kg/día de G-CSF, por ejemplo 5 µg/kg/día) empezando al menos 24 horas (tal como 24-72 horas) antes de la administración del agente estabilizador de MT. En otro ejemplo, se administra al menos 1 mg de G-CSF pegilado (tal como 1-10 mg de G-CSF pegilado, por ejemplo, 6 mg) al menos 24 horas (tal como 24 horas a 7 días) antes del tratamiento con agente estabilizador de MT por inyección subcutánea. En un ejemplo adicional, se administran al menos 100 µg/m² de GM-CSF (tal como 100-250 µg/m² de GM-CSF) empezando al menos 24 horas antes de la administración de agente estabilizador de microtúbulos.

En un ejemplo adicional, se administra CSF de forma concurrente con el tratamiento con un agente estabilizador de MT. En un ejemplo particular, se administra al menos 1 µg/kg/día de G-CSF (tal como 4-8 µg/kg/día de G-CSF, por ejemplo 5 µg/kg/día) empezando inmediatamente después de la administración de un agente estabilizador de MT. En otro ejemplo, se administra al menos 1 mg de G-CSF pegilado (tal como 1-10 mg de G-CSF pegilado, por ejemplo 6 mg) empezando inmediatamente después de la administración de un agente estabilizador de MT por inyección subcutánea. En un ejemplo adicional, se administran al menos 100 µg/m² de GM-CSF (tal como 100-250 µg/m² de GM-CSF) empezando inmediatamente después de la administración de un agente estabilizador de MT.

Neuropatía periférica

La incidencia, gravedad, o duración de la neuropatía periférica en sujetos que se ha identificado que están en riesgo aumentado en base al genotipo *ABCB1* puede reducirse por tratamiento adicional. En un ejemplo, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de amitriptilina a sujetos en riesgo de neuropatía periférica inducida por un agente estabilizador de MT, por ejemplo antes, durante, o después de la administración del agente estabilizador de MT. En un ejemplo particular, se administran al menos 5 mg (tal como 10-50 mg, por ejemplo 25 mg) de amitriptilina al menos 24 horas después de la administración de agente estabilizador de MT.

En otro ejemplo, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de glutamina a sujetos en riesgo de neuropatía periférica inducida por un agente estabilizador de MT por ejemplo antes, durante, o después de la administración del agente estabilizador de MT. En un ejemplo particular, se administran al menos 5 g (tal como 5-20 g, por ejemplo 10 g) de glutamina por vía oral tres veces al día, empezando al menos 24 horas (tal como 24-72 horas) después del tratamiento con agente estabilizador de MT durante al menos 1 día (por ejemplo 4 días).

En un ejemplo adicional, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de vitamina E a sujetos en riesgo de neuropatía periférica inducida por un agente estabilizador de MT por ejemplo antes, durante, o después de la administración del agente estabilizador de MT. En un ejemplo particular, se administran al menos 100 mg (tal como 100-600 mg, por ejemplo 300 mg) de vitamina E por vía oral dos veces al día empezando en el momento de la administración de agente estabilizador de MT y continuando al menos 1 mes (tal como 1-6 meses, por ejemplo 3 meses) después del tratamiento con agente estabilizador de MT.

Reactivos de diagnóstico

Otro aspecto de la descripción incluye reactivos que pueden usarse para detectar uno o más genotipos de polimorfismo *ABCB1* en un sujeto. Por ejemplo, los reactivos descritos pueden usarse para determinar si un sujeto tiene uno o más polimorfismos en la posición 1236, 2677 y 3435 del ADNc de *ABCB1* (por ejemplo, la SEC ID N° 13), tal como un polimorfismo 1236C>T, 2677G>T/A o 3435C>T.

Ácidos nucleicos aislados

Se proporcionan moléculas de ácido nucleico aislado que en algunos ejemplos se usan para determinar el genotipo de un sujeto para polimorfismos en un gen *ABCB1*. Se proporcionan ácidos nucleicos aislados ejemplares en las SEC ID N° 1-12. En un ejemplo, una molécula de ácido nucleico aislada consta de cualquiera de las SEC ID N° 1-12. Sin embargo, un especialista en la técnica apreciará que cambios minoritarios en estas secuencias aún permitirán la detección del polimorfismo deseado en *ABCB1*. Por ejemplo, la descripción proporciona moléculas de ácido nucleico aislados que incluyen cualquiera de las SEC ID N° 1-12 que contienen una o dos deleciones, sustituciones, inserciones, o combinaciones de las mismas. En un ejemplo adicional, las moléculas de ácido nucleico aislado que incluyen, constan esencialmente de, o constan de las SEC ID N° 1-12 pueden incluir nucleótidos modificados, tales como nucleótidos que contienen fosforotioato.

Los ácidos nucleicos aislados descritos también pueden incluir uno o más marcadores detectables, por ejemplo, para permitir la detección de una molécula de ácido nucleico. Un marcador detectable es un agente con capacidad de detección, por ejemplo, por ELISA, espectrofotometría, citometría de flujo, o microscopía. Por ejemplo, puede unirse un marcador al extremo 5' o 3' de cualquier a de las SEC ID N° 1-12, o cualquier parte entre ellos. Los ejemplos de marcadores incluyen, aunque sin limitación, isótopos radiactivos, sustratos enzimáticos, co-factores, ligandos, agentes quimioluminiscentes, fluoróforos, haptenos, enzimas, y combinaciones de los mismos. Los métodos para el marcaje y las directrices en la elección de marcadores apropiados para diversos propósitos se analizan por ejemplo en Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989) y Ausubel *et al.* (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, 1998).

En un ejemplo particular, se usa una o más de las SEC ID N° 1-6 para amplificar por PCR regiones de un gen *ABCB1* que contienen polimorfismos conocidos (tal como 2, 3, 4, 5 ó 6 de estas secuencias). En un ejemplo adicional, se usa una o más de las SEC ID N° 7-12 para determinar la secuencia de nucleótidos de regiones de *ABCB1* que contienen polimorfismos conocidos (tal como 2, 3, 4, 5 ó 6 de estas secuencias).

Kits de diagnóstico

Se proporcionan kits que pueden usarse para determinar si un sujeto está en riesgo aumentado de efectos adversos inducidos por un agente estabilizador de MT. En un ejemplo, el kit contiene uno o más reactivos para detectar al menos un polimorfismo en un gen *ABCB1*. En un ejemplo particular, el uno o más reactivos detectan la presencia de uno o más (tal como al menos dos) de los siguientes polimorfismos: 1236C>T, 2677G>T/A, o 3435C>T. En otro

ejemplo, el uno o más reactivos incluyen al menos uno de los ácidos nucleicos aislados mostrados en las SEC ID N° 1-12, tal como 2, 3,4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o las 12 secuencias. En un ejemplo, el kit incluye las SEC ID N° 1-6. En otro ejemplo, el kit incluye las SEC ID N° 7-12. En otro ejemplo más, el kit incluye las SEC ID N° 1-12.

5 Los kits descritos pueden incluir adicionalmente otros agentes, tales como tampones, agentes que permiten la amplificación de una secuencia de ácido nucleico (tal como la Taq polimerasa o dNTP), agentes que permiten la secuenciación de una secuencia de ácido nucleico (tal como didesoxinucleótidos trifosfato marcados de forma fluorescente o Taq polimerasa), o combinaciones de los mismos. En otro ejemplo, los kits pueden incluir adicionalmente agentes que permiten la detección de polimorfismos por el ensayo TaqMan® (tal como cebadores marcados de forma fluorescente o Taq polimerasa).

10 EJEMPLO 1

Sujetos

Este ejemplo describe la demográfica y el régimen de tratamiento para los sujetos evaluados.

15 Se examinaron veintiséis sujetos. Había 14 sujetos varones y 12 sujetos mujeres con una edad media de 59,5 años (intervalo: 42-72). Los detalles de su demográfica se presentan en la Tabla 1. Los sujetos se trataron con infusiones semanales de paclitaxel de una o tres horas. Todos los sujetos tenían cáncer localmente avanzado o metastático demostrado histológicamente, para los que el paclitaxel como monoterapia era una opción terapéutica.

Tabla 1 - Demográfica en la medida inicial

Característica	Valor ^a
Duración de la infusión de paclitaxel	
1 hora	12
3 horas	14
Sitio de tumor primario	
Mama	5
Pulmón	9
Ovario	3
Vejiga o uréter	2
Esófago	3
Cabeza y cuello	3
Riñón	1
Terapia previa	24
Quimioterapia que contiene vinca	9
Quimioterapia que contiene platino	14
Terapia de radiación	11

^aLos números representan la cantidad de sujetos.

20 El paclitaxel (30 mg) formulado en una mezcla de Cremophor y etanol absoluto (1:1, vol/vol) (Bristol Myers Squibb, Munich, Alemania) se diluyó en 500 ml de dextrosa al 5% (peso/vol) en agua y se administró a los sujetos mediante un catéter venoso periférico o central usando una bomba de infusión programable accionada por motor. Los sujetos elegibles se asignaron aleatoriamente entre una duración de infusión de una hora y tres horas para recibir un total de seis infusiones intravenosas semanales de paclitaxel a una dosis de 100 mg/m². Después de seis semanas de terapia (definidas como un ciclo) se evaluó la respuesta de forma bi-dimensional, habitualmente por tomografía computarizada. Los sujetos con una enfermedad estable, respuesta parcial o respuesta completa después de un ciclo, recibieron un segundo ciclo, con la condición de que los efectos tóxicos no fueran prohibitivos.

25 EJEMPLO 2

Aislamiento de ácidos nucleicos

Este ejemplo describe métodos usados para aislar el ADN de plasma humano.

30 Se extrajo el ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico de 1 ml de plasma humano usando el kit QIAamp Ultrasensitive Virus (Qiagen Inc., Valencia, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN resultante se reconstituyó en un tampón que contenía Tris 10 mM (pH 7,6) y ácido etilendiaminetetraacético 1 mM. Se reconocerá

que se conocen en la técnica métodos adicionales para aislar el ADN de plasma humano, sangre completa, u otras muestras biológicas.

EJEMPLO 3

Detección de polimorfismos ABCB1

5 Este ejemplo describe métodos usados para genotipar *ABCB1* en las posiciones 1236, 2677 y 3435, con relación a la secuencia codificante de referencia de *ABCB1* (CDS) número de acceso a Genbank NM_000927, con el sitio de inicio de la traducción designado como el número de posición de bases uno. Aunque se describe un método particular, se reconocerá que se conocen bien en la técnica métodos adicionales para determinar el genotipo de un sujeto en una posición particular.

10 Para el análisis de variantes *ABCB1*, se preparó una reacción de 50 µl para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando las combinaciones de cebadores de PCR enumeradas en la Tabla 2. La reacción constaba de 1x tampón de PCR, 2 mM de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (dNTP), cloruro de magnesio 1,5 mM, y 1 unidad de ADN polimerasa Taq Platinum® (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

15 94°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 68°C durante 30 segundos, y 72°C durante 30 segundos, con un ciclo final de 7 minuto a 72°C. La PCR de secuenciación directa de nucleótidos se realizó usando el kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction V3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) usando los cebadores de secuenciación enumerados en la Tabla 2. Las secuencias se generaron en un ABI Prism® 310 Genetic Analyzer. El genotipo se llamó variante si difería de la secuencia consenso de BC130424.

20 **Tabla 2 - Cebadores usados para la amplificación y secuenciación de *ABCB1***

SNP	Secuencia cebador de PCR (SEC ID N°)	Secuencia cebador de secuenciación (SEC ID N°)
1236 C>T	F^a GTTCACTTCAGTTACCCATCTCG (1)	F GTCAGTTCCTATATCCTGTGTCTG (7)
	R^b TATCCTGTCCATCAACTGACC (2)	R TCCTGTCCATCAACTGACCCTG (8)
2677 G>A/T	F AGGCTATAGGTTCCAGGCTTGC (3)	F CCCATCATTGCAATAGCAGGAG (9)
	R AGAACAGTGTGAAGACAATGGCC (4)	R GAACAGTGTGAAGACAATGGCCT (10)
3435 C>T	F ATCTCACAGTAACTTGGCAGTTTC (5)	F GCTGGTCCTGAAGTTGATCTGTG (11)
	R AACCCAAACAGGAAGTGTGGCC (6)	R AAACAGGAAGTGTGGCCAGATGC (12)

^aCebador directo;

^bCebador inverso.

Todos los datos se presentan como valores medios con el intervalo de confianza del 95% asociado (95%CI), salvo que se especifique otra cosa. Se realizó un análisis de frecuencia de genotipo del equilibrio de Hardy-Weinberg

usando Clump versión 1.9. La unión entre cada par de SNP se determinó en términos de estadística clásica D'. El valor absoluto para D' ($|D'|$) de 1 indica un desequilibrio de unión completa, mientras que un valor de 0 indica un equilibrio de unión completa. Todos los valores P son bilaterales, y se consideró que aquellos menores de o iguales a 0,05 reflejaban resultados estadísticamente significativos.

5 Se realizó análisis genético para detectar SNP de *ABCB1* en sujetos descritos en el Ejemplo 1. Como se muestra en la Tabla 3, las frecuencias de genotipo observadas de *ABCB1* estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg ($P > 0,11$), y eran similares a los valores publicados previamente para una población predominantemente blanca. Se observó una fuerte unión entre los tres SNP en *ABCB1*, con un D' de 1 para los loci 1236C>T y 2677G>T/A ($P < 0,001$); un D' de 0,64 ($P = 0,007$) para los loci 1236C>T y 3435C>T; y un D' de 0,49 para los loci 2677G>T/A y 3435C>T ($P = 0,042$). Los haplotipos más frecuentemente observados fueron T-T-T (40,7%), C-G-C (22,5%), y C-T-C (12,4%), aunque en total, se observaron 6 haplotipos diferentes.

Tabla 3 - Frecuencias de genotipo y alelo

Polimorfismo	Efecto ^d	Frecuencias de genotipo ^a			Frecuencias de alelo ^b	
		WT ^e	Het	Var	p	q
<i>ABCB1</i> 1236C>T	G411G	5 (19,27%)	17 (65,4%)	4 (15,4%)	0,52	0,48
<i>ABCB1</i> 2677G>T	A893S	2 (7,7%)	13 (50,0%)	11 (42,3%)	0,32	0,67
<i>ABCB1</i> 3435C>T	111451	4 (15,4%)	14 (53,8%)	8 (30,8%)	0,42	0,58

15 ^aLos números representan la cantidad de sujetos con el porcentaje en paréntesis; la diferencia en la cantidad total de sujetos se debe al hecho de que no todas las muestra produjeron datos de secuenciación o mostraron amplificación por PCR;

^bNotación de Hardy-Weinberg para las frecuencias de alelo (p, frecuencia para alelo de tipo silvestre y q, frecuencia para alelo variante);

^cEl número representa la posición en la secuencia de nucleótidos;

20 ^dEl número representa el codón de aminoácido;

^eWT, Homocigótico tipo silvestre; Het, Heterocigótico; Var. Homocigótico variante.

EJEMPLO 4

Análisis farmacocinético

25 Este ejemplo describe el análisis de la farmacocinética del paclitaxel en sujetos tratados y su asociación con el genotipo *ABCB1*.

30 Se obtuvieron muestras de sangre de los sujetos descritos en el Ejemplo 1 durante la primera administración de paclitaxel en la medida inicial y en momentos puntuales en serie durante y después de la infusión. Se determinaron las concentraciones de paclitaxel total en plasma por un método validado en base a la cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa con detección ultravioleta, mientras que las concentraciones plasmáticas de paclitaxel no unido se determinaron por diálisis en micro-equilibrio usando un indicador de [³H]paclitaxel. Los parámetros farmacocinéticos pertinentes se calcularon por métodos no compartimentales usando WinNonlin® versión 5.0 (Pharsight, Mountain View, CA, USA).

35 Todos los datos se presentan como valores medios con el 95%CI asociado, salvo que se especifique de otro modo. La variabilidad farmacocinética interindividual se evaluó como el coeficiente de variación, y se expresó como un porcentaje. Las asociaciones de los genotipos variantes con parámetros farmacocinéticos individuales se evaluaron estadísticamente con el ensayo no paramétrico de Kruskal-Wallis. Todos los valores P son bilaterales, y se consideró que aquellos menores de o iguales a 0,05 reflejaban resultados estadísticamente significativos.

40 Los datos farmacocinéticos para el paclitaxel total y no unido estaban disponibles para los 26 sujetos descritos en el Ejemplo 1. El parámetro que describe el tiempo durante el cual las concentraciones de paclitaxel total en plasma estaban por encima de 0,05 μM estaba solamente disponible para 25 sujetos. Como se muestra en la Tabla 4, ninguno

de los genotipos *ABCB1* estudiados estaba asociado con diferencias interindividuales en los parámetros farmacocinéticos de paclitaxel.

Tabla 4 - Asociación entre el estado del genotipo *ABCB1* y la farmacocinética de paclitaxel

Genotipo	T>0,05 μ M	P	AUCp	P	AUCu	P
	(horas)		[(ng/ml) x h]		[(ng/ml) x h]	
	Media (95%CI)		Media (95%CI)		Media (95%CI)	
<i>ABCB1</i> 1236C>T						
Tipo silvestre (N=5) [†]	20,3 (8,8-34,2)	0,67	4657 (2909-9916)	0,34	5007 (371-641)	0,39
Heterocigótico (N=17)	15,6 (9,3-19,3)*		5264 (3879-6235)		470 (445-519)	
Variante (N=4) [†]	15,6 (8,8-24,9)		3547 (2309-5600)		407 (362-522)	
<i>ABCB1</i> 2677G>T						
Tipo silvestre (N=2) [†]	15,1 (8,8-21,3)	0,97	3348 (2909-3787)	0,18	540 (507-572)	0,26
Heterocigótico (N=13)	17,3 (9,6-20,7)*		5146 (3776-7762)		482 (371-641)	
Variante (N=11)	12,6 (8,8-19,8)		4203 (2309-5600)		445 (362-516)	
<i>ABCB1</i> 3435C>T						
Tipo silvestre (N=4) [†]	937 (8,8-19,3)	0,23	4534 (2909-5146)	0,18	420 (313-572)	0,31
Heterocigótico (N=14)	19,8 (10,5-21,3)*		5485 (3787-6344)		512 (432-523)	
Variante (N=8)	13,7 (8,7-18,9)		3656 (2259-5600)		448 (362-522)	

5 *indica el genotipo del paciente con datos T>0,05 μ M no disponibles;

[†]indica que los intervalos de confianza del 95% están no disponibles y en su lugar se ha citado el intervalo.

Abreviaturas: T>0,05 μ M, duración de la concentración total en plasma de paclitaxel que excede 0,05 μ M; AUCp, área bajo la curva de paclitaxel total; AUCu, área bajo la curva de paclitaxel no unido; 95%CI, intervalo de confianza del 95%; P, ensayo de Kruskal-Wallis.

10

EJEMPLO 5

*Asociación de Genotipos *ABCB1* y neurotoxicidad*

Este ejemplo describe la evaluación de la neurotoxicidad en sujetos tratados con paclitaxel y la asociación de neuropatía periférica con el genotipo *ABCB1*.

15

Se realizaron el examen clínico, el diagnóstico hematológico con un recuento celular de sangre completa, y la evaluación de los síntomas y la toxicidad semanalmente mientras los sujetos descritos en el Ejemplo 1 estaban en terapia con paclitaxel. Antes de la terapia, y si era posible después de seis y doce semanas de terapia, estos exámenes se suplementaban por la evaluación del valor de neuropatía periférica, la química clínica (creatinina sérica, transaminasas, fosfatasa alcalina, y bilirrubina), análisis de electrocardiograma y estado de funcionamiento. Para la evaluación de la neurotoxicidad, se usó un sistema de valoración de neuropatía periférica clínica estandarizado, que incluía preguntar los síntomas del paciente, solicitar un examen clínico en base a un ensayo de diapason, y una

20

evaluación de la fuerza y los reflejos periféricos. Este valor clínico individual podría variar de 0 (mejor) a 12 (peor) puntos, y en base a los criterios de inclusión de este ensayo, la neuropatía periférica se definió como un acontecimiento cuando el valor excedía un valor de 3 por primera vez. Un valor tenía que obtenerse, como mínimo, antes de y después de seis y doce semanas de terapia para incluir a los sujetos.

5 Todos los datos se presentan como valores medios con el 95%CI asociado, salvo que se especifique de otro modo. Se analizó la probabilidad de desarrollo de una neuropatía periférica durante la terapia con paclitaxel como función del tiempo, de acuerdo con diversos genotipos, usando el método de Kaplan-Meier. Se determinó la significancia estadística de las diferencias entre las curvas de Kaplan-Meier usando un ensayo de rango logarítmico exacto. Todos los valores P son bilaterales, y se consideró que aquellos menores de o iguales a 0,05 reflejaban resultados estadísticamente significativos.

10 Se podía evaluar veintidós de los 26 sujetos con análisis genético para la neuropatía periférica acumulativa, mientras que se excluyeron cuatro sujetos debido a duraciones incorrectas de infusión, reducciones no permisibles de la dosis, o evaluación de seguimiento incompleta del valor de neuropatía periférica. Cuatro de estos 22 sujetos experimentaron un único acontecimiento de retardo de tratamiento (15 a 21 días) pero aún se consideraron elegibles para este análisis. Ningún sujeto recibió reducciones de la dosis hasta que desarrolló neuropatía periférica o se apartaron del protocolo.

15 Como se muestra en la FIG. 1, los sujetos que llevaban el genotipo *ABCB1* 3435CT o *ABCB1* 3435TT tenía más probabilidad de desarrollar neuropatía periférica acumulativa clínicamente significativa. Los cuatro sujetos de tipo silvestre para la transición *ABCB1* 3435C>T no desarrollaron neuropatía periférica durante el periodo de observación, mientras que 17 de los 18 sujetos que llevaban al menos un alelo variante en esta posición desarrollaron neuropatía periférica. Esta tendencia se aproximó a la significancia estadística ($P=0,09$) usando un ensayo de rango logarítmico exacto, no ajustado para comparaciones múltiples. Los alelos variantes se agruparon en base a observaciones previas de que la expresión y actividad de *ABCB1* está disminuida en sujetos que llevan al menos un alelo *ABCB1* 3435T. Aunque los datos anteriores no son estadísticamente significativos, lo más probablemente debido al pequeño tamaño de muestra, aún es notable que ningún sujeto que llevara el genotipo *ABCB1* 3435CC (tipo silvestre) desarrolló neuropatía periférica, mientras que aquellos sujetos heterocigóticos u homocigóticos de la variante para este alelo tenían una propensión mucho mayor a desarrollar este efecto secundario durante el tratamiento. No se observaron asociaciones similares para el genotipo *ABCB1* 2677G>T ($P=0,85$), o cualquier de los haplotipos ($P>0,05$).

20 Estos resultados demuestran que el polimorfismo *ABCB1* 3435C>T tiene poder predictivo en la evaluación de la expresión y actividad de *ABCB1* en la barrera hemato-nerviosa y, por tanto, neuropatía periférica inducida por taxanos.

EJEMPLO 6

Asociación de genotipos ABCB1 y mielotoxicidad

25 Este ejemplo describe la evaluación de mielotoxicidad en sujetos tratados con paclitaxel y la asociación de neutropenia con el genotipo *ABCB1*.

30 Se realizaron el examen clínico, el diagnóstico hematológico con un recuento celular de sangre completa, así como la evaluación de los síntomas y la toxicidad semanalmente mientras los sujetos descritos en el Ejemplo 1 estaban en terapia con paclitaxel. Los requisitos hematológicos para la administración de paclitaxel eran un recuento absoluto de neutrófilos $\geq 1,5 \times 10^9/l$ y un recuento de plaquetas $\geq 75 \times 10^3/l$. Se evaluaron las toxicidades diferentes de neuropatía periférica de acuerdo con las directrices de los criterios de toxicidad comunes del National Cancer Institute, versión 2.0.

35 Todos los datos se presentan como valores medios con el 95%CI asociado, salvo que se especifique de otro modo. Se evaluó la farmacodinámica hematológica por análisis de los valores nadir absolutos de los recuentos de neutrófilos relativos al valor de medida inicial entre los días 1 y 36, y se expresó como un porcentaje. Las asociaciones de los genotipos variantes con la neutropenia se evaluaron estadísticamente con el ensayo no paramétrico de Kruskal-Wallis. Se usó un ensayo de suma de rango de Wilcoxon exacto para determinar la significancia estadística de la diferencia en el porcentaje de caída del recuento absoluto de neutrófilos entre sujetos con un diplotipo doble variante 2677/3435 y los otros sujetos. Se presentó después de un ajuste de Bonferroni para corregirlo para una evaluación de una serie de cuatro parámetros hematológicos, así como una combinación de diplotipos después de un análisis exploratorio.

40 Estaban disponibles series completas de recuentos de neutrófilos dentro de las seis primeras semanas de tratamiento para 19 de los 26 sujetos. Se tuvo que excluir un paciente adicional debido a duración incorrecta de infusión de modo que finalmente 18 sujetos siguieron siendo evaluables para el análisis de mielotoxicidad. Tres de estos 18 sujetos tuvieron un único retardo en su suministro de tratamiento de 15 a 21 días pero aún se incluyeron. Como se muestra en la FIG. 2, la consideración de cuatro parámetros hematológicos, incluyendo los recuentos totales de plaquetas/neutrófilos en nadir, y los porcentajes de disminución de los recuentos de plaquetas o neutrófilos en nadir, demostró una asociación significativa entre el porcentaje de disminución desde la medida inicial en el recuento de neutrófilos en nadir y el diplotipo variante *ABCB1* 2677/3435. Específicamente, los sujetos variantes en ambos loci 2677 y 3435 mostraron un porcentaje de disminución aproximadamente 1,5 veces mayor ($P=0,02$, después de un ajuste conservativo) en el recuento de neutrófilos en nadir (media: 79,7%, intervalo: 74,2-83,1, $n=3$) en comparación con el resto de la población (media: 53,8%; intervalo: 27,5%-73,7%, $n=15$). Los alelos variantes se agruparon según la idea de que se determinó recientemente que ambos loci 2677 y 3435 eran determinantes importantes de la expresión de *ABCB1*. Este diplotipo particular no estaba relacionado con ninguno de los parámetros farmacocinéticos estudiados en los 26 sujetos en los que estaban disponibles los datos farmacocinéticos ($P>0,05$).

45 Estos resultados demuestran que los alelos 2677G>T/A y 3435C>T en combinación son capaces de predecir la expresión y actividad de *ABCB1* en la repoblación de neutrófilos y, por tanto, la probabilidad de neutropenia en

respuesta a quimioterapia con taxanos.

EJEMPLO 7

Asociación de genotipos ABCB1 y neurotoxicidad

Este ejemplo describe la evaluación de la neurotoxicidad en sujetos tratados con docetaxel y la asociación de la neuropatía periférica con el genotipo *ABCB1*.

Se evaluaron los genotipos *ABCB1* en pacientes de este ensayo que implicaba a 73 hombres con cáncer de próstata independiente de andrógenos que se trataron con docetaxel solo o docetaxel en combinación con talidomida. Se administró por vía intravenosa a los pacientes (30 mg/m²) durante 1 hora cada semana durante 3 semanas consecutivas (n = 23). Algunos pacientes recibieron adicionalmente 200 mg de talidomida por vía oral cada día (n = 50). La toxicidad se definió por los criterios de toxicidad comunes del Cancer Therapy Evaluation Program/National Cancer Institute (versión 2.0) y se evaluó a los pacientes para los síntomas de toxicidad semanalmente.

Como se muestra en la FIG. 3, hay una clara diferencia en el tiempo hasta la aparición de neuropatía periférica en sujetos tratados con docetaxel en base a los genotipos *ABCB1* 2677GG frente a 2677GT y 2677TT. Los sujetos que llevaban el genotipo *ABCB1* 2677GT, 2677TT o 2677GA tenían mayor probabilidad de desarrollar neuropatía periférica acumulativa clínicamente significativa. De los 15 sujetos de tipo silvestre para la transición *ABCB1* 2677G>T/A, 4 no desarrollaron neuropatía periférica durante el periodo de observación, mientras que 3 de los 35 que llevan al menos un alelo variante en esta posición no lo hicieron. De los 15 sujetos de tipo silvestre para la transición *ABCB1* 2677G>T/A, 11 desarrollaron neuropatía periférica durante el periodo de observación, mientras que 32 de los 35 sujetos que llevaban al menos un alelo variante en esta posición desarrollaron neuropatía periférica. Esta tendencia era estadísticamente significativa (p = 0,017) usando un ensayo de rango logarítmico, ajustado para múltiples comparaciones.

Como se muestra en la Tabla 5, también existe una tendencia hacia una asociación con el doble variante 2677TT + 3435TT, frente a todos los otros polimorfismos *ABCB1* en las posiciones 1236, 2677, y 3535 y el grado clínico aumentado de neutropenia (p = 0,053 después de un ajuste conservativo para múltiples comparaciones).

Tabla 5. Asociación de polimorfismos *ABCB1* y grado clínico de neutropenia

Genotipo	Nº de pacientes con grado clínico de neutropenia				
	Grado 0	Grado 2	Grado 3	Pacientes totales	Valor P*
2677TT + 3435TT	8	0	3	11	0,053
Otros genotipos <i>ABCB1</i>	35	3	1	39	

*Valor P determinado por el ensayo de tendencia de Cochran-Armitage

EJEMPLO 8

*Asociación del genotipo *ABCB1* con neurotoxicidad y mielotoxicidad después de tratamiento con epotilona*

Este ejemplo describe la evaluación de la mielotoxicidad y neurotoxicidad en sujetos tratados con ixabepilona y la asociación de la neutropenia y la neuropatía periférica con el genotipo *ABCB1*.

Los sujetos recibirán ixabepilona (BMS-247550) como tratamiento para cáncer de mama. Los sujetos recibirán infusiones de ixabepilona a 6 mg/m²/día durante una hora diariamente durante cinco días cada tres semanas o infusiones de ixabepilona a 8 mg/m²/día durante una hora diariamente durante tres días cada tres semanas. Los sujetos también pueden recibir una infusión de ixabepilona a 35-40 mg/m² durante tres horas cada tres semanas. Se aislará el ADN como se describe en el Ejemplo 2. El genotipo *ABCB1* se determinará como se describe en el Ejemplo 3. Se evaluará a los sujetos para el desarrollo de neuropatía periférica como se describe en los Ejemplos 5 y 7 y la neutropenia como se describe en el Ejemplo 6 durante el transcurso del tratamiento con ixabepilona.

EJEMPLO 9

*Genotipado de *ABCB1* y tratamiento con agente estabilizador de MT*

Este ejemplo describe las decisiones de tratamiento que pueden hacerse en base al genotipo *ABCB1* de un sujeto que está experimentando tratamiento con un agente estabilizador de MT.

Se aislará el ADN de los sujetos como se describe en el Ejemplo 2 u otros métodos adecuados. El genotipo para los polimorfismos *ABCB1* se determinará como se describe en el Ejemplo 3, u otros métodos conocidos en la técnica.

Si se descubre que un sujeto tiene el genotipo *ABCB1* de 3435CT o 3435TT, se concluye que el sujeto tiene un riesgo aumentado de desarrollar al menos uno o más efectos adversos inducidos por un agente estabilizador de MT, tal como neuropatía periférica, después del tratamiento con un agente estabilizador de MT. En esta situación, el régimen de tratamiento puede modificarse para disminuir la probabilidad de aparición o la gravedad de la neuropatía periférica. Esto

5 puede incluir, aunque sin limitación, disminuir la dosificación del agente estabilizador de MT (por ejemplo, disminuyendo la dosificación en al menos un 20%, tal como al menos un 50%), aumentar el intervalo entre dosis del agente estabilizador de MT (por ejemplo, aumentando el intervalo en al menos un día, al menos siete días, al menos catorce días, o incluso al menos 30 días), aumentar el tiempo durante el cual se administra una dosis de agente estabilizador de MT (por ejemplo, en al menos 1 h, al menos 12 h, o al menos 24 h), o combinaciones de los mismos.

10 Si se descubre que el sujeto tiene el genotipo *ABCB1* doble variante en ambas posiciones 2677 y 3435, se concluye que el sujeto tiene un riesgo aumentado de desarrollar al menos uno o más efectos adversos inducidos por un agente estabilizador de MT, tal como neutropenia, después del tratamiento con un agente estabilizador de microtúbulos. En esta situación, el régimen de tratamiento puede modificarse para disminuir la probabilidad de aparición de neutropenia. Esto puede incluir, aunque sin limitación, disminuir la dosificación del agente estabilizador de MT, aumentar el intervalo entre dosis del agente estabilizador de MT, aumentar el tiempo durante el cual se administra una dosis del agente estabilizador de MT (por ejemplo como se ha descrito anteriormente), administrar al menos una cantidad terapéuticamente eficaz de dosis de CSF después de la administración de agente estabilizador de MT, o combinaciones de los mismos.

15 En contraste, si se descubre que el sujeto tiene genotipo *ABCB1* de tipo silvestre en las posiciones 2677 y 3435, se concluye que el sujeto no tiene un riesgo aumentado de desarrollar al menos uno o más efectos adversos inducidos por un agente estabilizador de MT y, por tanto, no tiene que modificarse la administración del agente estabilizador de MT (tal como un taxano).

EJEMPLO 10

20 *Acumulación de paclitaxel en neuronas periféricas de ratones ABCB1 knockout*

Este ejemplo describe métodos que pueden usarse para evaluar la acumulación de paclitaxel en neuronas periféricas de ratones que carecen de la expresión de *ABCB1*.

25 Pueden usarse ratones que carecen de la expresión de *ABCB1* (tal como ratones *mdr1a* *-/-* o ratones *mdr1b* *-/-*) para evaluar la acumulación diferencial de paclitaxel en neuronas periféricas en base al nivel de expresión de *ABCB1*. Se administrarán 10-30 mg/kg de paclitaxel por vía intravenosa a ratones de tipo silvestre y de control. Se administrará [¹⁴C]paclitaxel, y se controlará la acumulación de paclitaxel en el tejido nervioso periférico por autorradiografía digital de cuerpo completo en posteriores momentos puntuales, tales como 1 hora, 3 horas, o 24 horas después de la administración. Asimismo, se administrará paclitaxel marcado de forma fluorescente a los ratones y se controlará la captación por las neuronas periféricas por microscopía fluorescente en posteriores momentos puntuales, tales como 1 hora, 3 horas, o 24 horas después de la administración. Estos experimentos confirmarán que una disminución en la expresión de *ABCB1* en neuronas periféricas provoca una acumulación aumentada de paclitaxel en este tejido.

35 En vista de las muchas posibles realizaciones a las que pueden aplicarse los principios de los ejemplos descritos, debe reconocer que las realizaciones ilustradas son solamente ejemplos preferidos de la invención y no deben tomarse como limitantes del alcance de la invención. En su lugar, el alcance de la descripción está definido por las siguientes reivindicaciones. Por lo tanto se reivindica como invención todo lo que viene dentro del alcance de estas reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar el riesgo de un sujeto de desarrollar efectos adversos inducidos por un agente estabilizador de microtúbulos, que comprende determinar en una muestra del sujeto si el sujeto tiene al menos un polimorfismo predictivo en un gen *ABCB1*, en el que el polimorfismo predictivo comprende uno o más de:
- 5 a) 2677G>T (Ala893Ser);
b) 2677G>A (Ala893Thr); o,
c) 3435C>T (sinónimo),
- 10 en el que si el sujeto tiene al menos un polimorfismo predictivo, el sujeto está en riesgo aumentado de desarrollar efectos adversos inducidos por un agente estabilizador de microtúbulos, en comparación con un sujeto que no tiene al menos un polimorfismo predictivo, en el que los efectos adversos inducidos por un agente estabilizador de microtúbulos comprenden neutropenia, neuropatía periférica, o ambas.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el agente estabilizador de microtúbulos comprende una epotilona.
3. El método de la reivindicación 2, en el que el agente estabilizador de microtúbulos comprende ixabepilona.
4. El método de la reivindicación 1, en el que el agente estabilizador de microtúbulos comprende un taxano.
- 15 5. El método de la reivindicación 4, en el que el agente estabilizador de microtúbulos comprende paclitaxel (Taxol®), docetaxel (Taxotere®), o un análogo de paclitaxel.
6. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que si el sujeto tiene al menos dos o al menos tres polimorfismos predictivos, el sujeto está en riesgo aumentado de desarrollar efectos adversos inducidos por un agente estabilizador de microtúbulos, en comparación con un sujeto que no tiene al menos un polimorfismo predictivo.
- 20 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el sujeto no está en riesgo aumentado de efectos adversos inducidos por un agente estabilizador de microtúbulos si el sujeto no tiene al menos un polimorfismo predictivo en el gen *mABCB1*.
8. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que el efecto adverso inducido por un agente estabilizador de microtúbulos es neuropatía periférica, y el polimorfismo predictivo comprende 3435C>T.
- 25 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el efecto adverso inducido por un agente estabilizador de microtúbulos es neutropenia, y el polimorfismo predictivo comprende 3435C>T y 2677G>T/A.
10. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que el sujeto tiene una enfermedad que es sensible a la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente estabilizador de microtúbulos.
- 30 11. Un método para determinar una terapia para disminuir la aparición de efectos adversos inducidos por un agente estabilizador de microtúbulos en un sujeto que tiene un trastorno que puede tratarse con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente estabilizador de microtúbulos, que comprende
- identificar un sujeto de acuerdo con cualquier reivindicación precedente,
- y, si el sujeto tiene al menos un polimorfismo predictivo, modificar el régimen terapéutico de administración de un agente estabilizador de microtúbulos, para disminuir los efectos adversos inducidos por un agente estabilizador de
- 35 microtúbulos.
12. El método de la reivindicación 11, en el que la cantidad eficaz de un agente estabilizador de microtúbulos es de aproximadamente 200 mg/m² si el sujeto no tiene un polimorfismo predictivo, y es menor de 100 mg/m² si el sujeto tiene un polimorfismo predictivo.
- 40 13. El método de la reivindicación 12, en el que tiene que disminuirse la cantidad de agente estabilizador de microtúbulos administrada, tiene que aumentarse un intervalo entre la administración del agente estabilizador de microtúbulos, tiene que aumentarse la planificación de dosificación de la administración del agente estabilizador de microtúbulos, tiene que administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de factor estimulador de colonias, o combinaciones de los mismos.
- 45 14. El método de la reivindicación 13, en el que el factor estimulador de colonias comprende el factor estimulador de colonias de granulocitos o el factor estimulador de colonias de macrófagos granulocitos.

FIG. 1

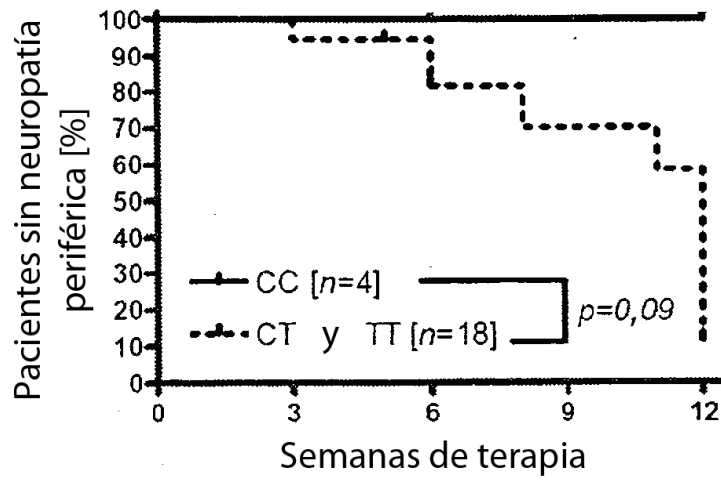


FIG. 2

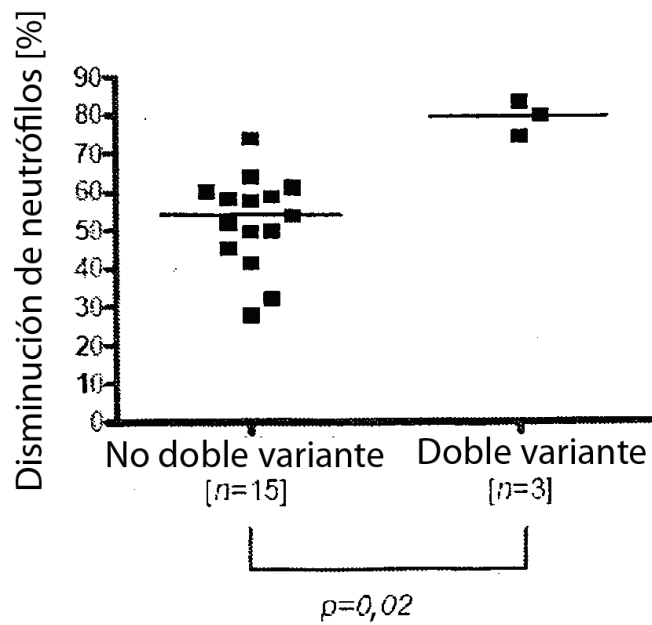


FIG. 3

Aparición de neuropatía periférica después de docetaxel
frente a
genotipos ABCB1 2677G>T/A

