

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 975**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06840081 .1**

96 Fecha de presentación: **30.11.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1960546**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.08.2008**

54 Título: **PROCEDIMIENTOS DE IDENTIFICACIÓN Y TRATAMIENTO DE INDIVIDUOS QUE MUESTRAN  
CARIOTIPOS.**

30 Prioridad:  
**01.12.2005 US 741280 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**30.01.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**30.01.2012**

73 Titular/es:  
**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY  
ROUTE 206 AND PROVINCE LINE ROAD  
PRINCETON NJ 05843-4000, US**

72 Inventor/es:  
**SAWYERS, Charles;  
LEE, Francis, Y. y  
SHAH, Neil, Pravin**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

**ES 2 372 975 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

Procedimientos de identificación y tratamiento de individuos que muestran cariotipos complejos

**Campo de la invención**

5 La invención descrita en este documento se refiere a procedimientos y composiciones de diagnóstico útiles en el tratamiento de trastornos, por ejemplo cánceres, que implican células que albergan cariotipos complejos.

**Antecedentes de la invención**

10 Las fases avanzadas de leucemia mieloide crónica (CML) - la fase acelerada (AP) y la crisis blástica (BC) - son las que peor responden a las opciones de tratamiento disponibles. Los pacientes de BC entran dentro de dos categorías: aquellos con crisis blástica mieloide (MBC) y aquellos con crisis blástica linfóide (LBC) (1). La tirosina quinasa activada de forma constitutiva BCR-ABL sigue siendo fundamental para la patofisiología subyacentes de la enfermedad en CML avanzada, y en leucemia linfóide aguda positiva para el cromosoma Filadelfia (Ph+ ALL). El imatinib tiene una actividad clínica sustancial en pacientes de CML de fase avanzada y aquellos con Ph+ ALL; sin embargo, las respuestas son a menudo de vida corta (2-5). A los 4 años de seguimiento, el 75% de los pacientes de AP CML y el 95% de los pacientes de BC desarrollaron resistencia a imatinib (6). Similar a la CML de fase crónica, las mutaciones en *BCR-ABL* son la razón más común para esta resistencia al tratamiento. Otros mecanismos, tales como la amplificación génica de *BCR-ABL* y la activación de quinasas SRC también habían estado implicados (7-10).

20 El dasatinib es un nuevo inhibidor de quinasa activo por vía oral, que se dirige a varias rutas oncogénicas, incluyendo quinasas de la familia BCR-ABL y SRC (11). El dasatinib es varios cientos de veces más potente que imatinib en células que expresan BCR-ABL de tipo silvestre y es activo contra todas excepto una de las mutaciones de BCR-ABL resistentes a imatinib conocidas (11-13). Estudios clínicos de fase I que comprenden tratamiento de pacientes de CML con dasatinib se describen en el documento Manley et al., *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA* (BBA) - *PROTEINS & PROTEOMICS*, vol. 1754, 3-13; Talpaz et al., *BLOOD*, vol. 104, no 11, Parte 1, 2004, página 104; y *DATABASE CLINICAL TRIALS* [Online] clinical trials; junio de 2005 (2005-06), "Advanced Chronic Myelogenous Leukemia (CML) - Follow On: Study of BMS-354825 in Subjects with CML" XP002431034 recuperado de [WWW.CLINICALTRIALS-GOV](http://WWW.CLINICALTRIALS-GOV), número de entrada en la base de datos NCT001123487. Adicionalmente, un estudio de mutagénesis *in vitro* demostró que, en comparación con imatinib, un espectro mucho más limitado de mutaciones de *BCR-ABL* es capaz de otorgar resistencia a dasatinib (14), probablemente debido a los requisitos conformacionales menos rigurosos para la unión de dasatinib frente a la de imatinib a BCR-ABL (15, 16). El dasatinib es también altamente activo contra la quinasa LYN de la familia SRC que se ha descubierto que se sobreexpresa y se activa en algunas líneas celulares de leucemia que se han hecho resistentes a imatinib (8). Estos datos sugieren que el dasatinib podría evitar múltiples mecanismos de resistencia a imatinib y puede ser, por lo tanto, de un valor particular en aquellos pacientes con CML avanzada y Ph+ ALL.

35 El cromosoma Filadelfia es una anomalía cromosómica genética específica que está asociada a leucemia mielógena crónica (CML) e implica una translocación cromosómica entre los cromosomas 9 y 22 que es fácilmente observable en el cariotipo de los pacientes. La translocación que da origen al cromosoma Filadelfia también da como resultado la formación de la tirosina quinasa activa de forma constitutiva BCR-ABL. El 95% de los pacientes con CML muestran esta anomalía, con el resto albergando una translocación críptica que es invisible en preparaciones cromosómicas con bandas G o una translocación más compleja que implica otro cromosoma o cromosomas así como los cromosomas 9 y 22. El 25-30% de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda (ALL) también son positivos para el cromosoma Ph. Se considera que los pacientes que tienen aberraciones cromosómicas adicionales además de solamente el cromosoma Filadelfia tienen un cariotipo "complejo".

45 Los inventores describen por primera vez en este documento datos que demuestran que los pacientes con cariotipos complejos tienen una mayor probabilidad de ser al menos parcialmente resistentes a un inhibidor de la proteína tirosina quinasa. Por consiguiente, existe una necesidad de procedimientos y composiciones de diagnóstico y terapéuticas diseñadas a medida para identificar y abordar dicha resistencia. Particularmente existe una necesidad de un tratamiento para el cáncer, mastocitosis y trastornos relacionados que implican pacientes que albergan un cariotipo complejo. La invención proporcionada en este documento cubre esta necesidad.

**Resumen de la invención**

50 De acuerdo con la presente invención, un cariotipo complejo es un cariotipo que incluye anomalías cromosómicas además de la presencia de un cromosoma Filadelfia.

55 La presente invención se refiere a un procedimiento para determinar la sensibilidad de un individuo con un trastorno asociado a BCR-ABL al tratamiento con N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, que comprende cribar una muestra biológica de dicho individuo en busca de la presencia de un cariotipo complejo; en el que la presencia de dicho cariotipo es indicativa de que el individuo es al menos parcialmente resistente a terapia con N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida, o una

sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma.

La presente invención se refiere además a un procedimiento de determinación de un régimen de tratamiento para un individuo que padece un trastorno asociado a BCR-ABL, que comprende:

5 determinar si una muestra biológica obtenida del individuo tiene un cariotipo complejo, en el que la presencia de dicho cariotipo es indicativa de que el paciente es al menos parcialmente resistente a terapia con N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma; y  
 10 recomendar la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, al individuo.

La presente invención también se refiere a un kit para su uso en el tratamiento de un individuo con un trastorno asociado a BCR-ABL, que comprende:

15 un medio para determinar si una muestra biológica obtenida de dicho individuo tiene un cariotipo complejo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma.

La presente invención se refiere además al uso de un kit en la determinación de una estrategia de tratamiento para un individuo con un trastorno asociado a BCR-ABL, comprendiendo el kit:

20 un medio para determinar si una muestra biológica obtenida de dicho individuo tiene un cariotipo complejo, en el que dicha estrategia de tratamiento comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma.

25 La presente invención proporciona un procedimiento de cribado de una muestra biológica, por ejemplo células que no responden, o que han dejado de responder, o que tienen una respuesta disminuida, a inhibidores de quinasa usados para inhibir la proliferación de dichas células. Por ejemplo, la presente invención proporciona un procedimiento de cribado de células de un individuo que padece cáncer que no ha recibido tratamiento con imatinib o está siendo tratado con imatinib, y cuyas células no responden o han dejado de responder o que tienen una respuesta disminuida a imatinib, en busca de la presencia de un cariotipo cromosómico complejo, en el que la presencia de dicho cariotipo cromosómico complejo, en solitario o junto con la detección de una mutación de BCR-ABL resistente al inhibidor de la proteína tirosina quinasa, es indicativa de que dicho individuo requiere la  
 30 administración de una cantidad terapéuticamente aceptable de dasatinib y/o un régimen de dosificación más agresivo de una cantidad terapéuticamente aceptable de dasatinib, en solitario o en combinación con otros agentes para inhibir la proliferación de dichas células.

35 La presente invención también proporciona un procedimiento de cribado de una muestra biológica, por ejemplo células que albergan un cariotipo cromosómico complejo, mediante el cual la presencia de un cariotipo cromosómico complejo es indicativa de que dicho individuo requiere la administración de una cantidad terapéuticamente aceptable de dasatinib y/o la administración de un régimen de dosificación más agresivo de una cantidad terapéuticamente aceptable de dasatinib, en solitario o en combinación con otros agentes para inhibir la proliferación de dichas células, en el que dicho otro agente es imatinib.

40 La presente descripción también proporciona un procedimiento de cribado de una muestra biológica, por ejemplo células que albergan un cariotipo cromosómico complejo, mediante el cual la presencia de un cariotipo cromosómico complejo es indicativa de que dicho individuo requiere la administración de una cantidad terapéuticamente aceptable de dasatinib y/o la administración de un régimen de dosificación más agresivo de una cantidad terapéuticamente aceptable de dasatinib, en solitario o en combinación con otros agentes para inhibir la proliferación de dichas células, en el que dicho otro agente es un inhibidor de farnesil transferasa y/o un inhibidor de Rab-GGTasa.

45 La presente invención también proporciona un procedimiento de cribado de una muestra biológica, por ejemplo células que albergan un cariotipo cromosómico complejo, mediante el cual la presencia de un cariotipo cromosómico complejo es indicativa de que dicho individuo requiere la administración de una cantidad terapéuticamente aceptable de dasatinib y/o la administración de un régimen de dosificación más agresivo de una cantidad terapéuticamente aceptable de dasatinib, en solitario o en combinación con otros agentes para inhibir la proliferación de dichas  
 50 células, en el que dicho otro agente es sal de clorhidrato de (R)-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmetil)-4-(2-tienilsulfonil)-1H-1,4-benzodiazepin-7-carbonitrilo.

55 La presente invención también proporciona un procedimiento de cribado de una muestra biológica, por ejemplo células que albergan un cariotipo cromosómico complejo, mediante el cual la presencia de un cariotipo cromosómico complejo es indicativa de que dicho individuo requiere la administración de una cantidad terapéuticamente aceptable de dasatinib y/o la administración de un régimen de dosificación más agresivo de una cantidad terapéuticamente aceptable de dasatinib, en solitario o en combinación con otros agentes para inhibir la proliferación de dichas células, en el que dicho otro agente es un inhibidor de proteína tirosina quinasa.

5 La presente invención también proporciona un procedimiento de cribado de una muestra biológica, por ejemplo células que albergan un cariotipo cromosómico complejo, mediante el cual la presencia de un cariotipo cromosómico complejo es indicativa de que dicho individuo requiere la administración de una cantidad terapéuticamente aceptable de dasatinib y/o la administración de un régimen de dosificación más agresivo de una cantidad terapéuticamente aceptable de dasatinib, en solitario o en combinación con otros agentes para inhibir la proliferación de dichas células, en el que dicho otro agente es imatinib.

10 La presente invención también proporciona un procedimiento de cribado de una muestra biológica, por ejemplo células que albergan un cariotipo cromosómico complejo, mediante el cual la presencia de un cariotipo cromosómico complejo es indicativa de que dicho individuo requiere la administración de una cantidad terapéuticamente aceptable de dasatinib y/o la administración de un régimen de dosificación más agresivo de una cantidad terapéuticamente aceptable de dasatinib, en solitario o en combinación con otros agentes para inhibir la proliferación de dichas células, en el que dicho otro agente es un inhibidor de mTOR.

15 La presente invención también proporciona un procedimiento de cribado de una muestra biológica, por ejemplo células que albergan un cariotipo cromosómico complejo, mediante el cual la presencia de un cariotipo cromosómico complejo es indicativa de que dicho individuo requiere la administración de una cantidad terapéuticamente aceptable de dasatinib y/o la administración de un régimen de dosificación más agresivo de una cantidad terapéuticamente aceptable de dasatinib, en solitario o en combinación con otros agentes para inhibir la proliferación de dichas células, en el que dicho otro agente es rapamicina.

20 La presente invención también proporciona un procedimiento de cribado de una muestra biológica, por ejemplo células que albergan un cariotipo cromosómico complejo, mediante el cual la presencia de un cariotipo cromosómico complejo es indicativa de que dicho individuo requiere la administración de una cantidad terapéuticamente aceptable de dasatinib y/o la administración de un régimen de dosificación más agresivo de una cantidad terapéuticamente aceptable de dasatinib, en solitario o en combinación con otros agentes para inhibir la proliferación de dichas células, en el que dicho otro agente es un agente estabilizante de tubulina.

25 La presente invención también proporciona un procedimiento de cribado de una muestra biológica, por ejemplo células que albergan un cariotipo cromosómico complejo, mediante el cual la presencia de un cariotipo cromosómico complejo es indicativa de que dicho individuo requiere la administración de una cantidad terapéuticamente aceptable de dasatinib y/o la administración de un régimen de dosificación más agresivo de una cantidad terapéuticamente aceptable de dasatinib, en solitario o en combinación con otros agentes para inhibir la proliferación de dichas células, en el que dicho otro agente es pacitaxol.

30 La presente invención también proporciona un procedimiento de cribado de una muestra biológica, por ejemplo células que albergan un cariotipo cromosómico complejo, mediante el cual la presencia de un cariotipo cromosómico complejo es indicativa de que dicho individuo requiere la administración de una cantidad terapéuticamente aceptable de dasatinib y/o la administración de un régimen de dosificación más agresivo de una cantidad terapéuticamente aceptable de dasatinib, en solitario o en combinación con otros agentes para inhibir la proliferación de dichas células, en el que dicho otro agente es una epotilona.

35 La presente invención también proporciona un procedimiento de cribado de una muestra biológica, por ejemplo células que albergan un cariotipo cromosómico complejo, mediante el cual la presencia de un cariotipo cromosómico complejo es indicativa de que dicho individuo requiere la administración de una cantidad terapéuticamente aceptable de dasatinib y/o la administración de un régimen de dosificación más agresivo de una cantidad terapéuticamente aceptable de dasatinib, en solitario o en combinación con otros agentes para inhibir la proliferación de dichas células, en el que dicho otro agente es un taxano.

40 La presente invención también proporciona un procedimiento de cribado de una muestra biológica, por ejemplo células que albergan un cariotipo cromosómico complejo, mediante el cual la presencia de dicho cariotipo cromosómico complejo es indicativa de que un paciente requiere la administración de una cantidad terapéuticamente aceptable de dasatinib y/o un régimen de dosificación más agresivo, o una mayor frecuencia de dosificación, de una cantidad terapéuticamente aceptable de dasatinib para inhibir la proliferación de dichas células, en el que dicho nivel aumentado es el 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 95% más que la dosis de dasatinib prescrita, o 1,5x, 2x, 2,5x, 3x, 3,5x, 4x, 4,5x, o 5x más dasatinib que la dosis prescrita y, como alternativa, en el que dicha mayor frecuencia de dosificación está en combinación con otro agente.

45 La presente invención también proporciona un procedimiento de cribado de una muestra biológica, por ejemplo células que albergan un cariotipo cromosómico complejo, mediante el cual la presencia de dicho cariotipo cromosómico complejo es indicativa de que un paciente requiere la administración de una cantidad terapéuticamente aceptable de dasatinib y/o un régimen de dosificación más agresivo, o una mayor frecuencia de dosificación, de una cantidad terapéuticamente aceptable de dasatinib para inhibir la proliferación de dichas células, en el que dicho nivel aumentado es el 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 95% más que la dosis de dasatinib prescrita, o 1,5x, 2x, 2,5x, 3x, 3,5x, 4x, 4,5x, o 5x más dasatinib que la dosis prescrita y, como alternativa, en el que dicha mayor frecuencia de dosificación está en combinación con otro agente, en el que dicho agente es imatinib; un agente estabilizante de tubulina (por ejemplo, pacitaxol, epotilona, taxano, etc.); un inhibidor de farnesil transferasa (por ejemplo, sal de

clorhidrato de (R)-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmetil)-4-(2-tienilsulfonil)-1H-1,4-benzodiazepin-7-carbonitrilo); otro inhibidor de proteína tirosina quinasa, especialmente un inhibidor de BCR-ABL tal como imatinib como se indica en este documento, o AMN107; o cualquier otra combinación o régimen de dosificación que comprende N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida descrito en este documento. Combinaciones adicionales que comprenden N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-1,3-tiazol-5-carboxamida que pueden ser útiles para poner en práctica los procedimientos de la presente invención.

La presente invención también describe un procedimiento de tratamiento de un individuo que padece un trastorno asociado a BCR-ABL que comprende la etapa de determinar si una muestra biológica obtenida del individuo tiene un cariotipo complejo, en el que la presencia de dicho cariotipo es indicativa de que el paciente es al menos parcialmente resistente a terapia con N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma; y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, al individuo; o en el que dicha tiazolcarboxamida se administra a una mayor dosificación o mayor frecuencia de dosificación si se determina que la muestra biológica tiene un cariotipo complejo; o en el que dicha tiazolcarboxamida se administra en combinación con otro compuesto descrito en este documento.

La presente invención también proporciona un kit para su uso en la determinación de una estrategia de tratamiento para un individuo con un trastorno asociado a BCR-ABL, que comprende un medio para determinar si una muestra biológica obtenida de dicho individuo tiene un cariotipo complejo; y opcionalmente instrucciones para el uso y la interpretación de los resultados del kit, en el que dicha estrategia de tratamiento comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma.

Los inventores de la presente invención han descubierto que mutaciones del polipéptido BCR-ABL aparecen en algunos individuos tratados con N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida y que estas mutaciones pueden hacer al polipéptido al menos parcialmente resistente a la terapia con N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida.

La presente invención describe procedimientos de identificación de sujetos que tienen polipéptidos BCR-ABL mutantes, y en particular, polipéptidos BCR-ABL que tienen una mutación en la posición 49, 53, 100, 126, 138, 146, 242, 271, 292, 324, 338, 351 y/o 458. En particular, la presente invención describe procedimientos de identificación de sujetos que tienen una mutación N49S, N53S, C100R, S126P, E138G, N146S, I242T, K271R, E292V, L324Q, V338M, M351A, y M458T. En algunos aspectos, la presente invención describe procedimientos de identificación de sujetos que tienen una mutación N49S, N53S, C100R, S126P, E138G, N146S, I242T, K271R, E292V, L324Q, V338M, M351A y M458T. La invención describe además procedimientos de identificación de sujetos que tienen, no solamente la mutación N49S, N53S, C100R, S126P, E138G, N146S, I242T, K271R, E292V, L324Q, V338M, M351A y M458T, sino cualquier número de mutaciones adicionales que están asociadas a resistencia al menos parcial a terapia con fármacos, incluyendo terapia con imatinib y/o N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma.

La presente invención también describe el tratamiento de dichos sujetos diseñando a medida su régimen de tratamiento dependiendo de si albergan o no polipéptidos BCR-ABL mutantes, y en particular, polipéptidos BCR-ABL que tienen al menos una mutación N49S, N53S, C100R, S126P, E138G, N146S, I242T, K271R, E292V, L324Q, V338M, M351A y M458T.

La presente invención también describe el tratamiento de dichos sujetos diseñando a medida su régimen de tratamiento dependiendo de si albergan o no polipéptidos BCR-ABL mutantes que tienen una mutación N49S, N53S, C100R, S126P, E138G, N146S, I242T, K271R, E292V, L324Q, V338M, M351A y/o M458T.

La presente invención también describe polipéptidos BCR-ABL mutantes que tienen al menos una mutación N49S, N53S, C100R, S126P, E138G, N146S, I242T, K271R, E292V, L324Q, V338M, M351A y/o M458T y polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos. La presente invención describe además polipéptidos BCR-ABL mutantes que no solamente tienen las mutaciones N49S, N53S, C100R, S126P, E138G, N146S, I242T, K271R, E292V, L324Q, V338M, M351A y/o M458T sino cualquier número de mutaciones adicionales que están asociadas a resistencia al menos parcial a terapia con fármacos, incluyendo terapia con imatinib y/o N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma.

La invención describe procedimientos de establecimiento de un régimen de tratamiento para un individuo que tiene un trastorno relacionado con BCR-ABL. El régimen de tratamiento puede comprender la administración de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, a una mayor dosis o frecuencia de dosificación que la

recomendada para un individuo que tiene un polipéptido BCR-ABL no mutado o un BCR-ABL que carece de la mutación N49S, N53S, C100R, S126P, E138G, N146S, I242T, K271R, E292V, L324Q, V338M, M351A y/o M458T. Como alternativa, el régimen de tratamiento puede comprender terapia de combinación con N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida y cualquier otro agente que funciona para inhibir la proliferación de células cancerosas o inducir apoptosis de células cancerosas, incluyendo, por ejemplo, un agente estabilizante de tubulina, un inhibidor de farnesil transferasa, un inhibidor de BCR-ABL T3151 y/o otro inhibidor de proteína tirosina quinasa. Otros agentes preferidos incluyen imatinib, AMN107, PD180970, CGP76030, AP23464, SKI 606, NS-187 o AZD0530. El régimen de tratamiento puede incluir la administración de una dosis más alta de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida con un segundo agente terapéutico, una dosis reducida de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida con un segundo agente terapéutico, o una dosis inalterada de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida con un segundo agente terapéutico.

La presente invención proporciona un kit para su uso en la determinación de la estrategia de tratamiento para un individuo con un trastorno asociado a proteína tirosina quinasa, que comprende un medio para detectar una quinasa BCR-ABL mutante, incluyendo aunque sin limitarse a, N49S, N53S, C100R, S126P, E138G, N146S, I242T, K271R, E292V, L324Q, V338M, M351A y/o M458T, en una muestra biológica de dicho paciente; y opcionalmente instrucciones para el uso y la interpretación de los resultados del kit. El kit también puede comprender, por ejemplo, un medio para obtener una muestra biológica de un individuo. La estrategia de tratamiento puede comprender, por ejemplo, la administración de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma.

#### **Breve descripción de las figuras/dibujos**

El archivo de esta solicitud de patente contiene al menos una figura realizada en color. Copias de esta patente con figuras en color serán proporcionadas por la Oficina de Patentes y Marcas previa petición y pago de la tasa necesaria.

**Figura 1. Tiempo hasta el avance en pacientes sensibles.** Se muestra el diagrama de **Kaplan-Meier** de tiempo con respecto al avance en los 35 pacientes que cumplieron los criterios para respuesta hematológica secundaria o principal, por cohorte de enfermedad. Un paciente en la cohorte LBC/Ph+ALL permanece en estudio a los 167.

**Figura 2. Correlaciones moleculares de respuesta a dasatinib. A)** Efecto de dasatinib sobre las actividades de quinasa BCR-ABL y SRC en pacientes que albergan *BCR-ABL* de tipo silvestre o con la mutación T3151. Los lisados de proteína preparados a partir de los pacientes AP-7 (izquierda) y AP-8 (derecha) se prepararon a partir de PBMC aislado inmediatamente antes de (0 h) y cuatro horas después (4 h) de ingerir la primera dosis (90 mg) de dasatinib. Se muestran los resultados de inmunotransferencia de Western con anticuerpo para  $\alpha$ -CRKL o  $\alpha$ -P-SRC. Se usó anticuerpo anti-actina como control de carga. **B)** Análisis farmacocinético de dasatinib en el paciente AP-7 (azul) y AP-8 (rosa). Se representan las concentraciones en plasma de dasatinib en los momentos indicados después de la ingestión de la dosis inicial de dasatinib. **C)** Cuantificación de la proporción de [P-CRKL/CRKL total] inmediatamente antes (0 h), y cuatro horas después (4 h) de la ingestión de la dosis inicial de dasatinib en pacientes sin la mutación T3151 de *BCR-ABL* que no consiguieron alcanzar una respuesta hematológica o citogenética objetivo. **D)** Efecto de dasatinib sobre el porcentaje blástico en sangre periférica en pacientes sin la mutación T3151 de *BCR-ABL* que no consiguieron alcanzar una respuesta hematológica o citogenética. Se muestra el número de días después de la dosis inicial de dasatinib.

**Las figuras 3A-E** muestran la secuencia de polinucleótidos (SEC ID N° 1) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID N° 2) del polipéptido BCR-ABL de tipo silvestre. La abreviatura de una letra estándar para los aminoácidos se usa para ilustrar la secuencia de aminoácidos deducida. La secuencia de polinucleótidos contiene una secuencia de 3393 nucleótidos (SEC ID N° 1; gij77942; gijNP\_005148.1 y gijM14752.1), que codifica un polipéptido de 1130 aminoácidos (SEC ID N° 2; gij177943; gijNP\_005148.1 y gijM14752.1).

#### **Descripción detallada de la invención**

El imatinib es un inhibidor de molécula pequeña de la tirosina quinasa BCR/ABL que produce remisiones clínicas en pacientes de CML con toxicidad mínima con respecto a modalidades de tratamiento más antiguas. El imatinib es actualmente una terapia de vanguardia para CML pero cada vez se encuentra más resistencia. De acuerdo con un estudio, la incidencia estimada a los 2 años de resistencia a mesilato de imatinib era del 80% en la fase blástica, del 40% al 50% en la fase acelerada, y el 10% en la fase crónica después del fallo de interferón- $\alpha$  (Kantarjian et al, Blood, 101(2): 473-475 (2003). El dasatinib es un inhibidor doble de SRC/ABL que compite con ATP (Lombardo, L. J., et al., J. Med. Chem., 47: 6658-6661 (2004)). Particularmente, el dasatinib ha mostrado ser varios cientos de veces más eficaz en el tratamiento de la CML que el Imatinib. Teniendo en cuenta la demostración de que los pacientes con cariotipos complejos tienen una mayor probabilidad de ser al menos parcialmente resistentes a Imatinib y Dasatinib, respectivamente, los inventores de la presente invención describen por primera vez procedimientos para identificar pacientes que pueden beneficiarse más de una monoterapia de régimen de dosificación más agresivo que comprende Dasatinib, o la combinación de Dasatinib con otros inhibidores de proteína

tirosina quinasa, u otros agentes.

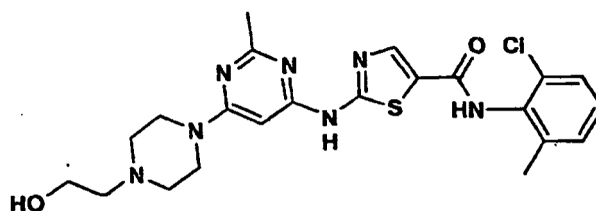
La presente invención también se basa, en parte, en el descubrimiento de que algunos individuos tratados con N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-(6-(4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-il)-2-metilpirimidin-4-ilamino)tiazol-5-carboxamida desarrollan mutaciones en posición de aminoácidos seleccionadas en el dominio de quinasa BCR-ABL y que estas mutaciones están asociadas a resistencia al menos parcial a terapia con N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-(6-(4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-il)-2-metilpirimidin-4-ilamino)tiazol-5-carboxamida.

El reconocimiento de que estas mutaciones existen en un individuo que tiene un trastorno asociado a BCR-ABL pueden ayudar, entre otras cosas, en la determinación de la sensibilidad de individuos al tratamiento con N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, y puede ayudar a diseñar a medida regímenes de tratamiento de forma apropiada.

La estructura y el uso de Dasatinib como un agente anti-canceroso se describen en el documento Lombardo, L. J., et al., J. Med. Chem., 47: 6658-6661 (2004).

La estructura y el uso de imatinib como agente anti-canceroso se describen en los documentos B. J. Druker et al., N. Engl. J. Med. 344, 1031 (2001) y S. G. O'Brien et al., N. Engl. J. Med. 348, 994 (2003).

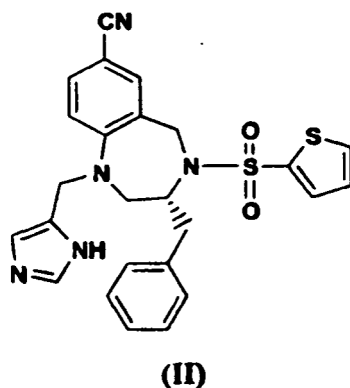
Donde el término "Dasatinib" se usa en este documento, se entiende (a menos que se indique otra cosa) que se pretende indicar el compuesto N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida que tiene la siguiente estructura (I):



(I)

así como todas las sales, hidratos y solvatos farmacéuticamente aceptables de la misma. El compuesto (I) también puede denominarse como N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-((6-(4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil)-2-metil-4-pirimidinil)amino)-1,3-tiazol-5-carboxamida de acuerdo con la nomenclatura de la IUPAC. La utilización del término "N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida" abarca (a menos que se indique otra cosa) solvatos (incluyendo hidratos) y formas polimórficas del compuesto (I) o sus sales. Las composiciones farmacéuticas de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida incluyen todas las composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida y uno o más diluyentes, vehículos y/o excipientes. Un ejemplo de una composición farmacéutica que comprende N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida es SPRYCEL™ (Bristol-Myers Squibb Company). SPRYCEL™ comprende N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida como ingrediente activo, también denominado como dasatinib, y como ingredientes o excipientes inactivos, monohidrato de lactosa, celulosa microcristalina, croscarmelosa sódica, hidroxipropilcelulosa y estearato de magnesio en un comprimido que comprende hipromelosa, dióxido de titanio y polietilenglicol.

Donde la expresión "un inhibidor de farnesil transferasa" en este documento, se entiende (a menos que se indique otra cosa) que el compuesto tiene la fórmula (II), sal de clorhidrato de (R)-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmetil)-4-(2-tienilsulfonil)-1H-1,4-benzodiazepin-7-carbonitrilo, es un agente anti-canceroso. El compuesto de fórmula (II) es un inhibidor de FT citotóxico que se sabe que destruye células cancerosas no proliferantes preferentemente. El compuesto de fórmula (II) puede ser útil además para destruir células madre.



Los usos del compuesto de fórmula (II) también se describen en el documento WO2004/015130, publicado el 19 de febrero de 2004.

Las expresiones “combinación” y “combinación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida”, como se usan en este documento, se refieren a una combinación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida e imatinib; una combinación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida y un agente estabilizante de tubulina (por ejemplo, paclitaxol, epotilona, taxano, etc.); una combinación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida y un inhibidor de farnesil transferasa (por ejemplo, (R)-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmetil)-4-(2-tienilsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepin-7-carbonitrilo); una combinación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida y otro inhibidor de proteína tirosina quinasa; una combinación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida con AMN-107, PD180970, CGP76030, AP23464, SKI 606, NS-187, AZD0530 y/o ARIAD; y/o cualesquiera compuestos descritos y mencionados en el documento Deininger et al (Blood, 105(7): 2640-2653 (2005); pero no se limitan a IFN, IFN pegilado, homoharringtonina, citabina, hidroxurea, inhibidores de farnesil transferasa, lonafarnib, tipifarnib, inhibidores de MEK1, PD98059, inhibidores de RAF-1, BAY43-9006, inhibidores de quinasa PI3, LY294002, inhibidores de mTOR, rapamicina, inhibidores de quinasa dependiente de ciclina, favopiridol; una combinación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida e inhibidores que no compiten con ATP ONO 12380; una combinación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida e inhibidor de quinasa Aurora VX-680; una combinación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida e inhibidor de p38 MAP quinasa High-796; una combinación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida con cualquier número de inhibidores de BCR-ABL; una combinación de cualesquiera compuestos descritos y/o mencionados en el documento La Rosee et al (Leukemia, 16: 1213-1219 (2002); sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y opcionalmente en cantidades terapéuticamente eficaces de los mismos.

Para su uso en este documento, un “inhibidor de BCR-ABL” se refiere a cualquier molécula o compuesto que pueda inhibir parcialmente la actividad o expresión de BCR-ABL o BCR-ABL mutante. Estos incluyen inhibidores de las quinasa de la familia Src tales como BCR/ABL, ABL, c-Src, SRC/ABL, y otras formas incluyendo, aunque sin limitarse a, JAK, FAK, FPS, CSK, SYK, BTK FGR, FYN, YES, BLK, HCK, LCK y LYN, así como otras proteína tirosina quinasa, incluyendo PDGFR, c-kit y receptores Eph. Se ha identificado una serie de inhibidores, basados en la clase de 2-fenilaminopirimidina de farmacóforos, que tienen una afinidad y especificidad excepcionalmente altas por Abl (véase, por ejemplo, Zimmerman et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 7, 187 (1997)). Todos estos inhibidores están abarcados dentro de la expresión un inhibidor de BCR-ABL. El Imatinib, uno de estos inhibidores, también conocido como STI-571 (anteriormente denominado como el compuesto de ensayo CGP 57148 de Novartis y también conocido como Gleevec), se ha ensayado con éxito en un ensayo clínico de un agente terapéutico para CML. AMN107, es otro inhibidor de quinasa BCR-ABL que se diseñó para encajar en el sitio de unión a ATP de la proteína BCR-ABL con mayor afinidad que imatinib. Además de ser más potente que imatinib (CI<sub>50</sub><30 nM) contra la BCR-ABL de tipo silvestre, AMN107 también es significativamente activo contra 32/33 mutantes de BCR-ABL resistentes a imatinib. En estudios preclínicos, AMN107 demostró actividad in vitro e in vivo contra células que expresan BCR-ABL de tipo silvestre y resistente a imatinib. En ensayos clínicos de fase I/II, AMN107 ha producido respuestas hematológicas y citogenéticas en pacientes de CML, que no respondían inicialmente a imatinib ni desarrollaron resistencia a imatinib (Weisberg et al., *British Journal of Cancer* (2006) 94, 1765-1769). SKI-606, NS-187, AZD0530, PD180970, CGP76030 y AP23464 son todos ejemplos de inhibidores de quinasa que pueden usarse en la presente invención. SKI-606 es un inhibidor de 4-anilino-3-quinolincarbonitrilo de Abl que ha demostrado una potente actividad antiproliferativa contra células de CML (Golas et al., *Cancer Research* (2003) 63, 375-381). AZD0530 es un inhibidor doble de quinasa Abl/Src que está sometándose a ensayos clínicos en curso para el tratamiento de tumores sólidos y leucemia (Green et al., *Preclinical Activity of AZD0530, a novel, oral, potent, and*



selective inhibitor of the Src family kinases. Póster 3161 presentado en la EORTC-NCI-AACR, Ginebra Suiza 28 de septiembre de 2004). PD180970 es un derivado de pirido[2,3-d]pirimidina que ha demostrado inhibir BCR-ABL e inducir apoptosis en células leucémicas que expresan BCR-ABL (Rosee et al., *Cancer Research* (2002) 62, 7149-7153). CGP76030 es un inhibidor doble específico de quinasa Src y Abl que demostró inhibir el crecimiento y la supervivencia de células que expresan quinasas BCR-ABL resistentes a imatinib (Warmuth et al., *Blood*, (2003) 101(2), 664-672). AP23464 es un inhibidor de quinasa basado en ATP que había demostrado inhibir mutantes de BCR-ABL resistentes a imatinib (O'Hare et al., *Clin Cancer Res* (2005) 11(19), 6987-6993). NS-187 es un inhibidor de tirosina quinasa Bcr-Abl/Lyn doble selectivo que había demostrado inhibir mutantes de BCR-ABL resistentes a imatinib (Kimura et al., *Blood*, 106(12): 3948-3954 (2005)).

Los "trastornos asociados a proteína tirosina quinasa" son aquellos trastornos que resultan de actividad aberrante de tirosina quinasa, y/o que se alivian mediante la inhibición de una o más de estas enzimas. Los trastornos incluidos en el alcance de la presente invención pueden incluir leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda positiva para el cromosoma Filadelfia (Ph+ ALL), carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón macrocítico, glioma, cáncer gastrointestinal, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer pancreático, glioblastoma multiforme, cáncer de cuello del útero, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon, y cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, tumor de células germinales, sarcoma pediátrico, linfocito citolítico natural senonasal, mieloma múltiple, leucemia mielógena aguda, leucemia linfocítica crónica, mastocitosis y cualesquiera síntomas asociados con mastocitosis. Además, los trastornos incluyen urticaria pigmentosa, mastocitosis tal como mastocitosis cutánea difusa, mastocitoma solitario en ser humano, así como mastocitoma canino y algunos subtipos raros como mastocitosis bullosa, eritrodérmica y teleangiectática, mastocitosis con un trastorno hematológico asociado, tal como un trastorno mieloproliferativo o mielodisplásico, o leucemia aguda, trastorno mieloproliferativo asociado con mastocitosis, y leucemia de mastocitos. Diversos cánceres también están incluidos dentro del alcance de trastornos asociados a proteína tirosina quinasa incluyendo (aunque sin limitarse a) los siguientes: carcinoma, incluyendo los de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, cuello del útero, tiroides, testículos, particularmente seminomas testiculares y piel; incluyendo carcinoma de células escamosas; tumores del estroma gastrointestinal ("GIST"); tumores hematopoyéticos de linaje linfocítico, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma Hodgkins, linfoma no Hodgkins, linfoma de células capilares y linfoma de Burkitt; tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, incluyendo leucemias mielógenas aguda y crónica y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimático, incluyendo fibrosarcoma y rabdomiosarcoma; otros tumores, incluyendo melanoma, seminoma, tetratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma, y schwannomas; tumores de origen mesenquimático, incluyendo fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xenoderma pigmentoso, queratoactantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides, teratocarcinoma, tumores de células germinales no seminomatosas que no responden a la quimioterapia, y sarcoma de Kaposi.

Los "trastornos asociados a proteína tirosina quinasa" también pueden incluir aquellos trastornos que resultan de la actividad de BCR-ABL, incluyendo actividad de BCR-ABL mutante, y/o que son aliviados mediante la inhibición de la expresión y/o actividad de BCR-ABL, BCR-ABL mutante. Una translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22 produce la proteína de fusión BCR-ABL oncógena. La frase "trastornos asociados a proteína tirosina quinasa" incluye "trastornos asociados a BCR-ABL mutante" y "trastornos asociados a BCR-ABL".

La expresión "cariotipo cromosómico complejo" pretende abarcar todas las anomalías cromosómicas no Filadelfia, calotipos que incluyen anomalías cromosómicas además de la presencia de un cromosoma Filadelfia, además del significado de esta frase en la técnica, incluyendo los siguientes ejemplos no limitantes descritos en los documentos: Espinoza et al., *Cancer Gen. and Cyto.*, 157: 175-7 (2005); Heller et al., *Int. J. Oncol.*, 24(1)127-36 (2004); Giehl et al., *Leukemia* 19: 1192-1197 (2005); y Oudat et al., *Arch. Path. Lab. Medicine*, 125: 437-439 (2001).

Los términos "tratar", "tratamiento" y "terapia" como se usan en este documento se refieren a terapia curativa, terapia profiláctica, terapia preventiva y terapia para mitigar una enfermedad.

La frase "régimen de dosificación más agresivo" o "régimen con mayor frecuencia de dosificación", como se usa en este documento se refieren a un régimen de dosificación que supera necesariamente el régimen de dosificación basal y/o prescrito de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida debido a una mayor frecuencia de administración, dosis incrementada o aumentada, o la vía de administración que puede dar como resultado un mayor nivel biodisponible de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida. Los ejemplos no limitantes de dichos regímenes de dosificación pueden encontrarse como referencia en el documento *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts) 2004, Volumen 104: Resumen 20, "Hematologic and Cytogenetic Responses in imatinib-Resistant Accelerated and Blast Phase Chronic Myeloid Leukemia (CML) Patients Treated with the Dual SRC/ABL Kinase Inhibitor N-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-2-methyl-4-pyrimidinyl]amino]-5-thiazolecarboxamide: Results from a Phase I Dose Escalation Study.", de Moshe Talpaz, et al; y/o regímenes de dosificación descritos en el documento Deininger et al (*Blood*, 105(7): 2640-2653 (2005)).

Debe entenderse que esta invención no está limitada a procedimientos, reactivos, compuestos, composiciones, o sistemas biológicos particulares, que, por supuesto, pueden variar. Debe entenderse también que la terminología usada en este documento es con el fin de describir aspectos particulares solamente, y no pretende ser limitante. Como se usan en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “uno/a”, y “el/la” incluyen referentes en plural a menos que el contenido dicte claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a “un péptido” incluye una combinación de dos o más péptidos, y similares.

“Aproximadamente” como se usa en este documento cuando se hace referencia a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal, y similares, pretende abarcar variaciones del  $\pm 20\%$  o  $\pm 10\%$ , más preferiblemente  $\pm 5\%$ , aún más preferiblemente  $\pm 1\%$ , y aún más preferiblemente  $\pm 0,1\%$  del valor especificado, ya que dichas variaciones son apropiadas para realizar los procedimientos descritos.

Los regímenes de tratamiento pueden establecerse en base a la detección de un cariotipo complejo. Por ejemplo, la invención abarca el cribado de células de un individuo que puede padecer, o que padece, un trastorno que es tratado habitualmente con una proteína tirosina quinasa. Dicho trastorno puede incluir leucemia o trastornos asociados con ella, o cánceres descritos en este documento. Las células de un individuo se criban, usando procedimientos conocidos en la técnica, para la identificación de un cariotipo complejo.

Si un cariotipo complejo se encuentra en las células de dicho individuo, el régimen de tratamiento puede desarrollarse apropiadamente. Por ejemplo, la presencia de un cariotipo complejo puede indicar que dichas células son o se convertirán en al menos parcialmente resistentes a los inhibidores de quinasa usados habitualmente, incluyendo inhibidores de BCR-ABL. Por ejemplo, un cariotipo complejo puede indicar que las células en un individuo son o se espera que se vuelvan al menos parcialmente resistentes al tratamiento con un inhibidor de quinasa tal como N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi)etil]-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida y que puede garantizarse la administración de dosis más elevadas del mismo o regímenes de dosificación más agresivos o terapia de combinación. Como se describe en este documento, en dichos casos, el tratamiento puede incluir el uso de una mayor frecuencia de dosificación o una mayor dosificación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi)etil]-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida o una sal, hidrato o solvato de la misma, una combinación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi)etil]-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma y otro fármaco inhibidor de quinasa tal como imatinib, AMN107, PD180970, GGP76030, AP23464, SKI 606 y/o AZD0530; una combinación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi)etil]-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida y un agente estabilizante de tubulina (por ejemplo, pacitaxol, epotilona, taxano, etc.); una combinación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi)etil]-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida y un inhibidor de farnesil transferasa; cualquier otra combinación descrita en este documento; y cualquier otra combinación o régimen de dosificación que comprende N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi)etil]-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida descrita en este documento. En un aspecto, un nivel aumentado de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi)etil]-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida sería de aproximadamente el 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 95% más que la dosis típica de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi)etil]-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida para una indicación particular o para un individuo (por ejemplo, 50 mg, 70 mg, 90 mg, 120 mg BID [dos veces al día]), o aproximadamente 1,5x, 2x, 2,5x, 3x, 3,5x, 4x, 4,5x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, o 10x más N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi)etil]-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida que la dosis típica de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi)etil]-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida para una indicación particular o para un individuo.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi)etil]-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma puede administrarse por vía oral como una sal del ácido de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi)etil]-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida. La dosificación real empleada puede modificarse dependiendo de los requisitos del paciente y de la gravedad de la afección que se está tratando. La determinación de la dosificación apropiada para una situación particular está dentro el alcance de la técnica. La cantidad eficaz de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi)etil]-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma (y sal del compuesto I) puede ser determinada por un especialista en la técnica, e incluye cantidades de dosificación ejemplares para un ser humano adulto de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi)etil]-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, al día, que puede administrarse en una única dosis o en forma de dosis individuales divididas, tales como de 1, 2, 3, ó 4 veces al día. En algunas realizaciones, N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi)etil]-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma se administra 2 veces al día a 70 mg. Como alternativa, puede dosificarse a, por ejemplo, 50, 70, 90, 100, 110 ó 120 BID (dos veces al día), o 100, 140 ó 180 una vez, dos veces o tres veces al día. Se entenderá que el nivel de dosis específica y la frecuencia de dosificación para cualquier sujeto particular puede modificarse y dependerá de diversos factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de acción de ese compuesto, la especie, edad, peso corporal, estado de salud general, sexo y dieta del sujeto, el modo y el tiempo de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos, y la gravedad de la afección particular. Los sujetos preferidos para el tratamiento incluyen animales, de la forma más preferible especies de

mamífero tales como seres humanos, y animales domésticos tales como perros, gatos y similares, sometidos a trastornos asociados a proteína tirosina quinasa. Lo mismo se aplica también al Compuesto II o cualquier combinación del Compuesto I y II, o cualquier combinación descrita en este documento.

- 5 Un régimen de tratamiento es un ciclo de terapia administrado a un individuo que padece un trastorno asociado a proteína quinasa que puede incluir el tratamiento con uno o más inhibidores de quinasa, así como otras terapias tales como radiación y/o otros agentes (es decir, terapia de combinación). Cuando se administra más de una terapia, las terapias pueden administrarse de forma concurrente o de forma consecutiva (por ejemplo, más de un inhibidor de quinasa pueden administrarse juntos o en momentos diferentes, en un calendario diferente). La administración de más de una terapia puede ser en momentos diferentes (es decir, de forma consecutiva) y seguir formando parte del mismo régimen de tratamiento. Como se describe en este documento, por ejemplo, puede descubrirse que células de un individuo que padece un trastorno asociado a proteína quinasa desarrollan al menos resistencia parcial a N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida si está presente un cariotipo complejo. En base al presente descubrimiento de que dichas células pueden ser sensibles a terapia de combinación o una dosificación o régimen de dosificación más agresivo de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, puede establecerse un régimen de tratamiento que incluye tratamiento con la combinación como monoterapia, o en combinación con otro inhibidor de quinasa, o en combinación con otro agente como se describe en este documento. Adicionalmente, la combinación puede administrarse con radiación u otros tratamientos conocidos.
- 10
- 15
- 20 Por lo tanto, la presente invención incluye un procedimiento para establecer un régimen de tratamiento para un individuo que padece un trastorno asociado a proteína tirosina quinasa o tratar a un individuo que padece un trastorno asociado a proteína tirosina quinasa que comprende determinar si una muestra biológica obtenida de un individuo tiene un cariotipo complejo, y administrar al sujeto un régimen de tratamiento apropiado en base a si un cariotipo complejo está presente. La determinación puede realizarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, cribando dicha muestra de células en busca de la presencia de un cariotipo complejo u obteniendo la información de una fuente secundaria de que el individuo tiene un cariotipo complejo.
- 25

- Los regímenes de tratamiento también pueden establecerse en base a la presencia de una o más quinasas BCR-ABL mutantes descritas en este documento. Por ejemplo, la invención abarca cribar células de un individuo que puede padecer, o padece, un trastorno que es tratado habitualmente con un inhibidor de quinasa. Dicho trastorno puede incluir leucemia mieloide o trastornos asociados con ella, o cánceres descritos en este documento. Las células de un individuo se criban, usando procedimientos conocidos en la técnica, para la identificación de una mutación en una quinasa BCR-ABL. Las mutaciones de interés son aquellas que dan como resultado que la quinasa BCR-ABL se activa de forma constitutiva. Las mutaciones específicas incluyen, por ejemplo, N49S, N53S, C100R, S126P, E138G, N146S, I242T, K271R, E292V, L324Q, V338M, M351A y M458T. Otras mutaciones incluyen, por ejemplo, E279K, F359C, F359I, L364I, L387M, F486S, D233H, T243S, M244V, G249D, G250E, G251S, Q252H, Y253F, Y253H, E255K, E255V, V256L, Y257F, Y257R, F259S, K262E, D263G, K264R, S265R, V268A, V270A, T272A, Y274C, Y274R, D276N, T277P, M278K, E279K, F486S, F283S, A288T, A288V, M290T, K291R, E292G, I293T, P296S, L298M, L298P, V299L, Q300R, G303E, V304A, V304D, C305S, C305Y, T306A, F311L, I314V, T315I, T315A, E316G, F317L, F317I, M318T, Y320C, Y320H, G321E, D325H, Y326C, L327P, R328K, E329V, Q333L, A337V, V339G, L342E, M343V, M343T, A344T, A344V, I347V, A350T, M351T, E352A, E352K, E355G, K357E, N358D, N358S, F359V, F359C, F359I, I360K, I360T, L364H, L364I, E373K, N374D, K378R, V379I, A380T, A380V, D381G, F382L, L387M, M388L, T389S, T392A, T394A, A395G, H396K, H396R, A399G, P402T, T406A, S417Y, F486S o cualquier combinación de las mismas, es decir, M244V, G250E, Q252H, Q252R, Y253F, Y253H, E255K, E255V, T315L, F317L, M351T, E355G, F359V, H396R, F486S y cualquier combinación de las mismas; M244V, E279K, F359C, F359I, L364I, L387M, F486S y cualquier combinación de las mismas; y L248R, Q252H, E255K, V299L, T315I, F317V, F317L, F317S y cualquier combinación de las mismas.
- 30
- 35
- 40
- 45

- Si una mutación que activa la quinasa BCR-ABL se encuentra en las células de dicho individuo, los regímenes de tratamiento pueden desarrollarse apropiadamente. Por ejemplo, una mutación identificada puede indicar que dichas células son o se volverán al menos parcialmente resistentes a los inhibidores de quinasa utilizados habitualmente. Por ejemplo, una mutación N49S, N53S, C100R, S126P, E138G, N146S, I242T, K271R, E292V, L324Q, V338M, M351A y M458T puede indicar que las células en un individuo son o se espera que se vuelvan al menos parcialmente resistentes al tratamiento con un inhibidor de quinasa tal como N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida. Como se describe en este documento, en dichos casos, el tratamiento puede incluir el uso de una mayor frecuencia de dosificación o una mayor dosificación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida o una sal, hidrato o solvato de la misma, una combinación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma y otro fármaco inhibidor de quinasa tal como imatinib, AMN107, PD180970, GGP76030, AP23464, SKI 606 y/o AZD0530; una combinación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida y un agente estabilizante de tubulina (por ejemplo, paclitaxol, epotilona, taxano, etc.); una combinación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida y un inhibidor de farnesil transferasa; cualquier otra combinación descrita en este documento; y cualquier otra combinación o régimen de dosificación que comprende N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-
- 50
- 55
- 60

piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida descrito en este documento. En un aspecto, un nivel aumentado de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida sería aproximadamente el 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 95% más que la dosis típica de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida para una indicación particular o para un individuo, o aproximadamente 1,5x, 2x, 2,5x, 3x, 3,5x, 4x, 4,5x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x o 10x más N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida que la dosis típica de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida para una indicación particular o para un individuo.

Adicionalmente, los regímenes de dosificación pueden adaptarse adicionalmente en base a la presencia de una mutación de aminoácidos adicional en una quinasa BCR-ABL y/o la presencia de un cariotipo complejo. Como se describe en este documento, una mutación en E279K, F359C, F359I, L364I, L387M, F486S, D233H, T243S, M244V, G249D, G250E, G251S, Q252H, Y253F, Y253H, E255K, E255V, V256L, Y257F, Y257R, F259S, K262E, D263G, K264R, S265R, V268A, V270A, T272A, Y274C, Y274R, D276N, T277P, M278K, E279K, E282G, F283S, A288T, A288V, M290T, K291R, E292G, I293T, P296S, L298M, L298P, V299L, Q300R, G303E, V304A, V304D, C305S, C305Y, T306A, F311L, I314V, T315I, E316G, F317L, M318T, Y320C, Y320H, G321E, D325H, Y326C, L327P, R328K, E329V, Q333L, A337V, V339G, L342E, M343V, M343T, A344T, A344V, I347V, A350T, M351T, E352A, E352K, E355G, K357E, N358D, N358S, F359V, F359C, F359I, I360K, I360T, L364H, L364I, E373K, N374D, K378R, V379I, A380T, A380V, D381G, F382L, L387M, M388L, T389S, T392A, T394A, A395G, H396K, H396R, A399G, P402T, T406A, S417Y, F486S, o cualquier combinación de las mismas pueden indicar que la quinasa BCR-ABL ha desarrollado resistencia al menos parcial a la terapia con un inhibidor de proteína quinasa tal como imitinab.

Al poner en práctica los muchos aspectos de la invención en este documento, pueden seleccionarse muestras biológicas de muchas fuentes tales como biopsia de tejido (incluyendo muestra de células o células cultivadas a partir de ésta; biopsia de médula ósea o tejido sólido, por ejemplo células de un tumor sólido), sangre, células sanguíneas (glóbulos rojos o leucocitos), suero, plasma, linfa, fluido ascítico, fluido quístico, orina, esputo, heces, saliva, aspirado bronquial, líquido cefalorraquídeo o pelo. Pueden usarse células de una muestra, o puede usarse un lisado de una muestra de células. En algunas realizaciones, la muestra biológica es una muestra de células de biopsia de tejido o células cultivadas a partir de ésta, por ejemplo, células extirpadas de un tumor sólido o un lisado de la muestra de células. En algunas realizaciones, la muestra biológica comprende células sanguíneas.

Las composiciones farmacéuticas para su uso en la presente invención pueden incluir composiciones que comprenden uno o una combinación de inhibidores de BCR-ABL en una cantidad eficaz para alcanzar el propósito pretendido. La determinación de una dosis eficaz de una composición farmacéutica de la invención está dentro de las capacidades de los especialistas en la técnica. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a esa cantidad de ingrediente activo que mejora los síntomas o la afección. La eficacia terapéutica y la toxicidad pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y DL50 (la dosis letal para el 50% de la población).

Los regímenes de dosificación que implican N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida útiles para poner en práctica la presente invención se describe en el documento US Nº de Serie 10/395.503, presentado el 24 de marzo de 2003; y Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2004, Volumen 104: Resumen 20, "Hematologic and Cytogenetic Responses in imatinib-Resistant Accelerated and Blast Phase Chronic Myeloid Leukemia (CML) Patients Treated with the Dual SRC/ABL Kinase Inhibitor N-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-2-methyl-4-pyrimidinyl]amino]-5-thiazolecarboxamide: Results from a Phase I Dose Escalation Study.", de Moshe Talpaz, et al.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un inhibidor de BCR-ABL puede estar en función de si un cariotipo complejo está presente. Una dosis terapéuticamente relevante de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida para pacientes que tienen un cariotipo complejo, por ejemplo, podría variar en cualquier punto entre 1 y 14 veces o más superior a la dosis típica. Por consiguiente, las dosis terapéuticamente relevantes de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida para cualquiera de los trastornos asociados a BCR-ABL o asociados a proteína tirosina quinasa en el que un cariotipo complejo está presente pueden ser, por ejemplo, de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250 ó 300 veces superior que la dosis prescrita o convencional. Como alternativa, dosis terapéuticamente relevantes de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida pueden ser, por ejemplo, aproximadamente 0,9x, 0,8x, 0,7x, 0,6x, 0,5x, 0,4x, 0,3x, 0,2x, 0,1x, 0,09x, 0,08x, 0,07x, 0,06x, 0,05x, 0,04x, 0,03x, 0,02x, o 0,01x de la dosis prescrita.

De acuerdo con O'hare et al. (Cancer Res., 65(11): 4500-5 (2005)), el mutante M244V tenía un cambio múltiplo de "1,3" en el ensayo de quinasa GST-Abl, un cambio múltiplo de "1,1" en el ensayo de autofosforilación, y un cambio múltiplo de "2" en el ensayo de proliferación celular; el mutante G250E tenían un cambio múltiplo de "0,5" en el ensayo de quinasa GST-Abl, un cambio múltiplo de "3" en el ensayo de autofosforilación, y un cambio múltiplo de "2" en el ensayo de proliferación celular; el mutante Q252H tenía un cambio múltiplo de "4" en el ensayo de proliferación celular; el mutante Y253F tenía un cambio múltiplo de "0,6" en el ensayo de quinasa GST-Abl, un cambio múltiplo de

“4” en el ensayo de autofosforilación, y un cambio múltiplo de “4” en el ensayo de proliferación celular; el mutante Y253H tenía un cambio múltiplo de “3” en el ensayo de quinasa GST-Abl, un cambio múltiplo de “2” en el ensayo de autofosforilación, y un cambio múltiplo de “2” en el ensayo de proliferación celular; el mutante E255K tenía un cambio múltiplo de “0,3” en el ensayo de quinasa GST-Abl, un cambio múltiplo de “2” en el ensayo de autofosforilación, y un cambio múltiplo de “7” en el ensayo de proliferación celular; el mutante F317L tenía un cambio múltiplo de “1,5” en el ensayo de quinasa GST-Abl, un cambio múltiplo de “1,4” en el ensayo de autofosforilación, y un cambio múltiplo de “9” en el ensayo de proliferación celular; el mutante M351T tenía un cambio múltiplo de “0,2” en el ensayo de quinasa GST-Abl, un cambio múltiplo de “2” en el ensayo de autofosforilación, y un cambio múltiplo de “1,4” en el ensayo de proliferación celular; el mutante F359V tenía un cambio múltiplo de “0,8” en el ensayo de quinasa GST-Abl, un cambio múltiplo de “2” en el ensayo de autofosforilación, y un cambio múltiplo de “3” en el ensayo de proliferación celular; el mutante H396R tenía un cambio múltiplo de “1,3” en el ensayo de quinasa GST-Abl, un cambio múltiplo de “3” en el ensayo de autofosforilación, y un cambio múltiplo de “2” en el ensayo de proliferación celular.

Para pacientes que albergan la mutación T315I, la administración de dosis más altas de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida, o combinaciones de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida e imatinib; una combinación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida y un agente estabilizante de tubulina (por ejemplo, paclitaxol, epotilona, taxano, etc.); una combinación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida y un inhibidor de farnesil transferasa; una combinación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida y otro inhibidor de proteína tirosina quinasa; cualquier otra combinación descrita en este documento; puede garantizarse un régimen con mayor frecuencia de dosificación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida; y cualquier otra combinación o régimen de dosificación que comprende N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida descrita en este documento. Como alternativa, también pueden garantizarse combinaciones de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida con un inhibidor de T315I.

La presente invención proporciona procedimientos de determinación de la sensibilidad de un individuo que tiene un trastorno asociado a proteína tirosina quinasa a cierto régimen de tratamiento y procedimientos de tratamiento de un individuo que tiene un trastorno asociado a proteína tirosina quinasa.

Los trastornos incluidos en el alcance de la presente invención incluyen, por ejemplo, leucemias, incluyendo, por ejemplo, leucemia mieloide crónica (CML), leucemia linfoblástica aguda y leucemia linfoblástica aguda positiva para el cromosoma Filadelfia (Ph+ ALL), carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón macrocítico, glioma, cáncer gastrointestinal, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer pancreático, glioblastoma multiforme, cáncer de cuello del útero, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon, y cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, tumor de células germinales, sarcoma pediátrico, linfocito citolítico natural senonasal, mieloma múltiple, leucemia mielógena aguda, leucemia linfocítica crónica, mastocitosis y cualesquiera síntomas asociados con mastocitosis. Además, los trastornos incluyen urticaria pigmentosa, mastocitosis tales como mastocitosis cutánea difusa, mastocitoma solitario en ser humano, así como mastocitoma canino y algunos subtipos raros como mastocitosis bullosa, eritrodérmica y teleangiectática, mastocitosis con un trastorno hematológico asociado, tal como un trastorno mieloproliferativo o mielodisplásico, o leucemia aguda, trastorno mieloproliferativo asociado con mastocitosis, y leucemia de mastocitos. Diversos cánceres adicionales también están incluidos dentro del alcance de los trastornos asociados a proteína tirosina quinasa incluyendo, por ejemplo, los siguientes: carcinoma, incluyendo los de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, cuello del útero, tiroides, testículos, particularmente seminomas testiculares y piel; incluyendo carcinoma de células escamosas; tumores del estroma gastrointestinal (“GIST”); tumores hematopoyéticos de linaje linfocítico, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma Hodgkins, linfoma no Hodgkins, linfoma de células capilares y Linfoma de Burkitt; tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, incluyendo leucemias mielógenas aguda y crónica y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimático, incluyendo fibrosarcoma y rhabdomyosarcoma; otros tumores, incluyendo melanoma, seminoma, tetratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimático, incluyendo fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xenoderma pigmentoso, queratoactantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides, teratocarcinoma, tumores de células germinales no seminomatosas que no responden a la quimioterapia, y sarcoma de Kaposi. En algunas realizaciones preferidas, el trastorno es leucemia, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de colon, melanoma, o tumores sólidos. En algunas realizaciones preferidas, la leucemia es leucemia mieloide crónica (CML), Ph+ ALL, AML, CML resistente a imatinib, CML intolerante a imatinib, CML acelerada, CML de fase blástica linfocítica.

Un “tumor sólido” incluye, por ejemplo, sarcoma, melanoma, carcinoma de colon, carcinoma de mama, carcinoma de próstata, u otro cáncer con tumor sólido.

Los términos “cáncer”, “canceroso” o “maligno” se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, por ejemplo, leucemia, linfoma, blastoma, carcinoma y sarcoma. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, Leucemia linfoblástica aguda positiva para el cromosoma Filadelfia (Ph+ ALL), carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón macrocítico, glioma, cáncer gastrointestinal, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer pancreático, glioblastoma multiforme, cáncer de cuello del útero, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon, y cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, tumor de células germinales, sarcoma pediátrico, linfocito citolítico natural senonasal, mieloma múltiple, leucemia mielógena aguda (AML), y leucemia linfocítica crónica (CML).

“Leucemia” se refiere a enfermedades malignas progresivas de los órganos que forman la sangre y se caracteriza generalmente por una proliferación y desarrollo distorsionados de leucocitos y sus precursores en la sangre y la médula ósea. La leucemia generalmente se clasifica clínicamente en base a (1) la duración y el carácter de la enfermedad - aguda o crónica; (2) el tipo de célula implicada; mieloide (mielógena), linfoide (linfógena), o monocítica; y (3) el aumento o no aumento del número de células anormales en sangre-leucémica o aleucémica (subleucémica). La leucemia incluye, por ejemplo, leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia granulocítica aguda, leucemia granulocítica crónica, leucemia promielocítica aguda, leucemia de células T adultas, leucemia aleucémica, una leucemia leucocitémica, leucemia basófila, leucemia de blastocitos, leucemia bovina, leucemia mielocítica crónica, leucemia cutis, leucemia embrionaria, leucemia eosinófila, leucemia de Gross, leucemia de células capilares, leucemia hemoblástica, leucemia hemocitoblástica, leucemia histiocítica, leucemia de células madre, leucemia monocítica aguda, leucemia leucopénica, leucemia linfática, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, leucemia linfógena, leucemia linfoide, leucemia de células de linfosarcoma, leucemia de mastocitos, leucemia megacariocítica, leucemia micromieloblástica, leucemia monocítica, leucemia mieloblástica, leucemia mielocítica, leucemia granulocítica mieloide, leucemia mielomonocítica, leucemia de Naegeli, leucemia de células del plasma, leucemia plasmacítica, leucemia promielocítica, leucemia de células de Rieder, leucemia de Schilling, leucemia de células madre, leucemia subleucémica, y leucemia de células indiferenciadas. En algunos aspectos, la presente invención proporciona tratamiento para leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, y/o leucemia linfoblástica aguda positiva para el cromosoma Filadelfia (Ph+ ALL).

### Resultados de ensayo clínico de aumento de la dosis de Dasatinib

Un total de 44 pacientes con CML avanzada o Ph+ ALL con resistencia/intolerancia a imatinib se incluyeron en un ensayo clínico de aumento de la dosis para dasatinib (Tabla 1). Once pacientes tenían AP, 23 tenían MBC, y 10 tenían LBC o Ph+ ALL. El 64% (28/44) de los pacientes habían recibido tratamiento anterior con quimioterapia (excluyendo hidroxiurea), incluyendo el 23% (10/44) que habían sufrido un anterior trasplante de médula ósea o células madre. De los 44 pacientes, el 91% (40/44) eran resistentes a imatinib, y el 61% (27/44) estaban en dosis de más de 600 mg al día. El nueve por ciento (4/44) eran intolerantes a imatinib, debido a anomalías de LFT, sarpullido o dolor de huesos. El 61% (27/44) tenían mutaciones en BCR-ABL detectadas antes del comienzo del tratamiento con dasatinib.

El suceso adverso más significativo era la mielosupresión. Como se esperaba en esta población de pacientes, una fracción significativa de pacientes tenía mielosupresión de grado 3 ó 4 en el momento de su inclusión en el estudio (Tabla suplementaria 2). Sin embargo, neutropenia de grado 3 ó 4 se producía en el tratamiento en 9/11 (82%), 22/23 (96%) y 8/10 (80%) pacientes con AP, MBC, y LBC/Ph+ ALL, respectivamente (Tabla 2a). Análogamente, trombocitopenia de grado 3/4 se producía en 9/11 (82%), 19/23 (83%), y 7/10 (70%) en AP, MBC y LBC/Ph+ ALL, respectivamente. La mielosupresión era generalmente reversible, tratada mediante interrupción o reducción de la dosis y ya no era un problema en pacientes que recuperaron la hematopoyesis negativa para Ph.

Sucesos adversos no hematológicos de grado 3/4 se produjeron en el 20% (9/44) de los pacientes e incluían efusión pleural o pericárdica, disnea, síndrome de lisis tumoral y hemorragia rectal (Tabla 2b). Estos sucesos se trataron con cuidados generales y, en algunos casos, interrupción y reducción de la dosis. Sucesos adversos de grado 1-2 adicionales incluían diarrea, sarpullido, eritema y dolor de cabeza. Las toxicidades no parecían estar relacionadas con la dosis dado que sucesos adversos similares se produjeron en todas las cohortes de dosis, pero dichas conclusiones están limitadas por el hecho de que algunos pacientes aumentaban la dosis. De forma importante, los pacientes tolerantes a imatinib eran capaces de tolerar dasatinib y ningún paciente se retiró del estudio debido a una toxicidad relacionada con fármacos. Una dosis máxima tolerada no se definió.

Los pacientes con AP, MBC, LBC y Ph+ ALL se trataron durante una media (intervalo) de 5 (1,3-12,9), 5 (0,2-12), y 3 (0,5-7,7) meses, respectivamente. El número de pacientes en cada cohorte de dosis de dasatinib era de 1 (35 mg), 8 (50 mg), 17 (70 mg), 11 (90 mg) y 7 (120 mg), aunque algunos pacientes experimentaron aumento de la dosis después de 4 semanas. La respuesta hematológica principal se alcanzó en el 70% (31/44) de la población total de pacientes, con respuesta hematológica completa en el 45% (20/44) de los pacientes (Tabla 3). El 57% (25/44) de los pacientes alcanzaba una respuesta citogenética. Una respuesta citogenética completa se alcanzó en el 25% (11/44) de los pacientes y una respuesta citogenética principal (respuesta citogenética completa más respuesta citogenética parcial) se alcanzó en el 43% (19/44) de los pacientes. Se observaron respuestas en todas las cohortes de dosis.

En pacientes AP, 9/11 (81%) alcanzaron una respuesta hematológica principal, 6 (55%) de los cuales se confirmaron después de 4 semanas. Respuestas citogenéticas principales se produjeron en 3/11 (27%) pacientes de AP. En pacientes de MBC, 14/23 (61%) conseguían una respuesta hematológica principal, 7 de los cuales (30%) se confirmaron después de 4 semanas. Se observaron respuestas citogenéticas en 12/23 (52%) de pacientes de MBC.

5 La tasa de respuesta hematológica principal en LBC/Ph+ ALL era de 8/10 (80%) de los cuales 5 (50%) se confirmaron después de 4 semanas. Los pacientes de LBC/Ph+ALL tenían una tasa de respuesta citogenética principal de 8/10 (80%) y una tasa de respuesta citogenética global de 9/10 (90%).

10 La duración de la respuesta variaba entre pacientes de AP, MBC y LBC/Ph+ ALL, con recaídas produciéndose en los tres grupos (figura 1). En la cohorte de AP, 9/11 (81%) de los pacientes que alcanzaban una respuesta hematológica principal permanecieron en estudio durante una media de 8 meses (intervalo de 2-13 meses). Una fracción mayor de pacientes de MBC recayeron, pero 6 de 23 (26%) permanecieron en el estudio con seguimiento variando entre 5 - 12 meses, incluyendo tres que seguían teniendo una respuesta citogenética completa a 10, 11 y 12 meses cada uno. Como con los pacientes de AP, los pacientes de MBC que alcanzan una respuesta hematológica principal se comportaron bien con un seguimiento medio de hasta 5 meses (intervalo 1-12 meses). Por 15 el contrario, todos menos uno de los pacientes de LBC/Ph+ ALL recayeron, a pesar de la alta tasa de respuesta hematológica principal, con un seguimiento medio de 4 meses (intervalo 1-8 meses).

### Correlaciones moleculares de resistencia a Dasatinib

20 Nueve de los 44 pacientes (20%) no consiguieron cumplir los criterios para respuesta hematológica principal o secundaria. Para obtener un entendimiento sobre los determinantes moleculares de la falta de respuesta a dasatinib, la inhibición de quinasa BCR-ABL, según se determinó mediante fosforilación del sustrato Crkl, se midió en estos pacientes. Como se esperaba, la fosforilación de CRKL se reducía sustancialmente a las 4 horas en un paciente sensible (AP-7) son mutación de *BCR-ABL* detectable (figura 2a). Dos de los pacientes no sensibles (AP-3 y AP-8) 25 tenían la mutación T315I de *BCR-ABL*, que otorga resistencia a imatinib y dasatinib in vitro. El Dasatinib no tenían ningún efecto sobre la fosforilación de Crkl en estos pacientes T315I (figura 2a), a pesar de niveles en suero adecuados (figura 2b). Cabe destacar que, la actividad de quinasa SRC, según lo medido usando un anticuerpo específico de fosforilación que detecta SRC activa, se inhibió de forma comparable en el paciente T315I de tipo silvestre y no sensible (figura 2a), sugiriendo que la inhibición de quinasa SRC era insuficiente para inducir respuesta clínica en estos pacientes.

30 El mecanismo de insensibilidad en los pacientes no T315I es menos claro. Aunque todos menos uno tenían otras mutaciones de resistencia a imatinib, es improbable que estos sean sensibles al fallo del tratamiento, dado que la fosforilación de Crkl se inhibió en todos ellos en los que muestras estaban disponibles (figura 2c). Además, pacientes de fase crónica con estas mismas mutaciones de pre-tratamiento han respondido a dasatinib (Talpalz et al, presentada). Durante un examen más estrecho de los recuentos de blastocitos en sangre periférica durante las 2 35 semanas iniciales de terapia, es evidente que dasatinib tenía actividad anti-leucémica en algunos de estos no sensibles, pero era insuficiente para conseguir una respuesta hematológica (figura 2d). En un paciente con una mutación E255K (ALL-4), T315I sigue siendo la probable explicación al fallo del tratamiento dado que el avance de la enfermedad se producía después de una caída transitoria de los recuentos en sangre, seguida de recaída con un subclón que porta solamente la mutación T315I.

40 Dado que T315I solamente puede explicar un subconjunto de no sensibles, se considera el papel potencial de anomalías cromosómicas no Ph. En general, 25/43 pacientes tenían cariotipos complejos, 17 de los cuales eran sensibles (68%). 18/43 pacientes tenían cariotipos de Ph simples, 17 de los cuales eran sensibles (94%) ( $p=0,049$ ). Particularmente, todos menos uno de los no sensibles tenían cariotipos complejos, siendo la única excepción un paciente con T315I.

### DISCUSIÓN

45 La principal limitación de imatinib como tratamiento para CML de fase avanzada es la rápida adquisición de resistencia, generalmente debido al crecimiento de subclones de CML que albergan mutaciones en el dominio quinasa de *BCR-ABL* que interfieren en la unión a imatinib. En este documento se muestra que dasatinib tiene actividad de agente único en CML de fase avanzada resistente a imatinib, incluyendo aquellos con una amplia gama 50 de mutaciones de *BCR-ABL* resistentes a imatinib. Estas tasas de respuesta significativas confirman la predicción de que la resistencia a imatinib es accionada por la reactivación de actividad de BCR-ABL (7). Como en los ensayos tempranos con imatinib en CML de fase avanzada, la duración de la respuesta variaba significativamente entre pacientes de AP y aquellos con crisis blástica. Con dasatinib, las respuestas de AP son duraderas con un seguimiento máximo de 13 meses, mientras que todos excepto un paciente con crisis blástica linfóide o Ph+ ALL recayeron en 6 meses. Los sensibles con BC mielóide también recaen, pero 3 de los 8 pacientes que consiguieron 55 una respuesta hematológica completa han tenido respuestas duraderas durante 10 meses o más y siguen con dasatinib. En base a estos descubrimientos, actualmente se están realizando estudios de fase II de dasatinib en pacientes con CML resistente a imatinib de fase avanzada.

La principal complicación asociada a dasatinib en CML de fase avanzada era la mielosupresión grave (grado 4) en aproximadamente el 70% de los pacientes, que es mayor que la descrita anteriormente con imatinib en estudios en

fase I/II (30-50%) (2, 4). Aunque esta diferencia puede no demostrarse significativa en estudios más grandes, existen varias razones por las cuales dasatinib podría ser más mielosupresor que imatinib. Dasatinib es varios cientos de veces más potente y, a diferencia de imatinib, no es un sustrato para p-glicoproteína; por lo tanto, dasatinib puede alcanzar mayores concentraciones en poblaciones de progenitoras hematopoyéticas tempranas y células madre. Adicionalmente, dasatinib podría conducir a una eliminación más rápida de células que contienen el cromosoma Ph, desenmascarando de este modo citopenias en una alta proporción de pacientes. Dasatinib no parece ser mielosupresor contra células hematopoyéticas normales dado que los pacientes que consiguieron la remisión citogenética a menudo recuperaban recuentos sanguíneos normales, incluyendo varios receptores de aloinjertos anteriores que rápidamente revirtieron a hematopoyesis donante después de iniciar la terapia con dasatinib. Además, la mielosupresión no ha sido una complicación de tratamiento con dasatinib en pacientes con tumores sólidos (25).

Los síndromes de edema clínicamente significativos se produjeron en algunos pacientes, pero parecen clínicamente distintos del edema relacionado con imatinib. Por ejemplo, efusiones pleurales no malignas se desarrollaron en 10 pacientes, a menudo en ausencia de otro edema, mientras que el efecto secundario común relacionado con imatinib de edema periorbital era menos frecuente. De hecho, varios pacientes experimentaron resolución de edema generalizado después de cambiar de imatinib a dasatinib en la inclusión en el estudio. Otros efectos secundarios comunes asociados a imatinib tales como calambres musculares y náuseas se observaron raramente. También es notable que el tratamiento prolongado con un inhibidor de quinasa pan-SRC no causaba disfunción clínicamente significativa, como podía predecirse a partir de modelos en ratón knockout (18).

La correlación del genotipo de *BCR-ABL* con la respuesta clínica a dasatinib refleja las predicciones de descubrimientos preclínicos, en que la mutación T315I otorga resistencia primaria. Además, es probable que T315I sea responsable de una gran fracción de resistencia adquirida en base a análisis preliminar de pacientes en este estudio que recayeron (N. Shah, descubrimientos no publicados). Mecanismos adicionales claramente juegan un papel dado que varios pacientes de BC con mutaciones de *BCR-ABL* presumiblemente sensibles a dasatinib no consiguieron responder. Estudios farmacocinéticos en estos pacientes demostraron la inhibición de actividad de quinasa *BCR-ABL* el día uno de tratamiento, confirmando que estas mutaciones son, de hecho, sensibles a dasatinib a un nivel bioquímico. El hecho de que estos pacientes no consiguieron responder clínicamente plantea nuevas preguntas sobre otros determinantes moleculares de resistencia, incluyendo la posibilidad de CML independiente de *BCR-ABL*, como se ha descrito recientemente en un paciente (19). Todos estos pacientes tenían cariotipos complejos; por lo tanto, parece probablemente que las anomalías genéticas secundarias desempeñen un papel. El precedente viene de recientes estudios de pacientes con glioblastoma con mutaciones de *VIII EGFR*, mostrando que mutaciones secundarias en el gen supresor tumoral *PTEN* otorgan resistencia a inhibidores de *EGFR* (20).

Estos descubrimientos clínicos iniciales con dasatinib en CML podrían proporcionar entendimiento sobre una estrategia más amplia para desarrollar terapia para cáncer con inhibidor de quinasa. La resistencia adquirida es un problema en aumento con otros cánceres tratados con inhibidores de quinasa, tales como cáncer de pulmón y GIST, todos los cuales comparten un mecanismo común de resistencia a través de mutación de la quinasa objetivo (21-24). Dasatinib ofrece una solución convincente a la resistencia a imatinib en CML en base a los detalles moleculares que subyacen en su unión al dominio de quinasa *BCR-ABL*. A diferencia de imatinib que se une exclusivamente a la conformación inactiva de *BCR-ABL*, la unión de dasatinib es tolerante a la conformación y no resulta relativamente afectada por mutaciones de resistencia a imatinib. Un tema general podría ser que combinaciones de inhibidores de quinasa, que se unen a distintas conformaciones, podrían usarse secuencialmente o en combinación para retrasar la aparición de resistencia. Una debilidad significativa tanto de dasatinib como de imatinib es el fallo de ambos de estos compuestos para inhibir la *BCR-ABL* mutante T315I. Por lo tanto, es probable que el control a largo plazo eficaz de CML avanzada requiera un tercer agente con actividad contra esta mutación llamada "portera". Sin embargo, la eficacia de dasatinib incluso en un cáncer generalmente complejo tal como CML de crisis blástica refuerza el potencial terapéutico de dirigirse a lesiones genéticas clínicas.

#### Procedimiento de detección del cariotipo

La invención proporciona procedimientos de cribado de una muestra biológica de un individuo que padece un trastorno asociado a *BCR-ABL* o proteína tirosina quinasa en busca de la presencia de un cariotipo complejo, así como procedimientos para tratar individuos que se identifican como que tienen un cariotipo complejo.

En la técnica se conocen procedimientos de determinación de si un paciente tiene un cariotipo complejo, particularmente en la técnica citogenética, incluyendo, aunque sin limitarse a siembra en placas de cromosomas, tinción, FISH, tinción gimsa, tinción de cromosomas usando tintes o sondas fluorescentes, etc. Las técnicas de biología molecular convencionales se contemplan para determinar si un cariotipo complejo está presente en las células de un individuo dado. Muchos kits están disponibles para determinación del cariotipo, incluyendo los diseñados para la determinación del cariotipo de linfocitos de la sangre periférica incluyendo aquellos de Biological Industries (Israel), No. de catálogo 01-198-1 usando los procedimientos descritos con el kit, por ejemplo.

El sustrato sólido es típicamente vidrio o un polímero, siendo los polímeros usados más habitualmente celulosa, poliacrilamida, nylon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno. Los soportes sólidos pueden estar en forma de tubos, perlas, discos o microplacas, o cualquier otra superficie adecuada para realizar un inmunoensayo. Los



procesos de unión son bien conocidos en la técnica y generalmente están constituidos por reticulación, unión de forma covalente o adsorción física de la molécula al portador insoluble.

Adicionalmente, la invención proporciona ensayos para la detección de un cariotipo complejo en una muestra biológica, tal como preparaciones de celulosa, y similares. Una serie de procedimientos para amplificar y/o detectar la presencia de un cariotipo complejo se conocen bien en la técnica y pueden emplearse en la práctica de este aspecto de la invención.

La invención también proporciona ensayos para detectar la presencia de una proteína quinasa BCR-ABL mutante en una muestra biológica. Los resultados de dicho ensayo pueden ser importantes en el establecimiento de un régimen de tratamiento para un paciente, en solitario o junto con la identificación de un cariotipo complejo, dado que algunas mutaciones de BCR-ABL otorgan resistencia a inhibidores de proteína tirosina quinasa. Los procedimientos para detectar una proteína quinasa BCR-ABL mutante también se conocen bien e incluyen, por ejemplo, inmunoprecipitación, análisis inmunohistoquímico, análisis de transferencia de Western, ensayos de unión molecular, ELISA, ELIFA y similares. Por ejemplo, en una realización, un procedimiento de detección de la presencia de una proteína quinasa BCR-ABL mutante en una muestra biológica comprende en primer lugar poner en contacto a la muestra con un anticuerpo para BCR-ABL, un fragmento reactivo con quinasa BCR-ABL mutante del mismo, o una proteína recombinante que contiene una región de unión al antígeno de un anticuerpo para quinasa BCR-ABL mutante; y a continuación detectar la unión de proteína quinasa BCR-ABL mutante en la muestra a él.

#### Polipéptidos, polinucleótidos y anticuerpos

La presente invención proporciona nuevos nucleótidos de BCR-ABL aislados y sus proteínas codificadas que tienen mutaciones en algunos aminoácidos que pueden hacer a un individuo al menos parcialmente resistente a terapia con N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil] amino]-5-tiazolcarboxamida o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma. Al menos una de las mutaciones es una mutación N49S, N53S, C100R3, S126P, E138G, N146S, I242T, K271R, E292V, L324Q, V338M, M351A y M458T.

La secuencia de aminoácidos de una sola letra de la proteína BCR-ABL humana de tipo silvestre mostrada se conoce en la técnica y se proporciona como SEC ID N° 2. La secuencia de ácido nucleico de BCR-ABL está codificada por los nucleótidos 1 a 3681 de la SEC ID N° 1.

Para fines de designación abreviada de las variantes mutantes descritas en este documento, se observa que los números se refieren a la posición del resto de aminoácido a lo largo de la secuencia de aminoácidos del polipéptido BCR-ABL según se proporciona como la SEC ID N° 2. Por ejemplo, L324 se refiere al aminoácido leucina en la posición 324. Las sustituciones de aminoácidos en una posición particular se escriben como el aminoácido de tipo silvestre, el número de posición, y el aminoácido sustituido en su interior, en ese orden. Por ejemplo, L324Q se refiere a una sustitución de leucina por glutamina en la posición 324. La identificación de aminoácidos usa el alfabeto de una sola letra de aminoácidos, como se muestra en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Asp	D	Ácido aspártico	Ile	I	Isoleucina
Thr	T	Treonina	Leu	L	Leucina
Ser	S	Serina	Tyr	Y	Tirosina
Glu	E	Ácido glutámico	Phe	F	Fenilalanina
Pro	P	Prolina	His	H	Histidina
Gly	G	Glicina	Lys	K	Lisina
Ala	A	Alanina	Arg	R	Arginina
Cys	C	Cisteína	Trp	W	Triptófano
Val	V	Valina	Gln	Q	Glutamina
Met	M	Metionina	Asn	N	Asparagina

Por consiguiente, la presente invención proporciona nuevos polipéptidos BCR-ABL aislados que comprenden la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 2 o que tienen identidad sustancial con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 2 y que tienen al menos una mutación seleccionada entre el grupo constituido por: la mutación N49S, N53S, C100R, S126P, E138G, N146S, I242T, K271R, E292V, L324Q, V338M, M351A y M458T, y fragmentos de las mismas. La presente invención también proporciona polipéptidos que tienen al

menos una mutación N49S, N53S, C100R, S126P, E138G, N146S, I242T, K271R, E292V, L324Q, V338M, M351A y M458T y una o más de las siguientes mutaciones o cualquier combinación de las mismas: E279K, F359C, F359I, L364I, L387M, F486S, D233H, T243S, M244V, G249D, G250E, G251S, Q252H, Y253F, Y253H, E255K, E255V, V256L, Y257F, Y257R, F259S, K262E, D263G, K264R, S265R, V268A, V270A, T272A, Y274C, Y274R, D276N, T277P, M278K, E279K, E282G, F283S, A288T, A288V, M290T, K291R, E292G, I293T, P296S, L298M, L298P, V299L, Q300R, G303E, V304A, V304D, C305S, C305Y, T306A, F311L, I314V, T315I, E316G, F317L, M318T, Y320C, Y320H, G321E, D325H, Y326C, L327P, R328K, E329V, Q333L, A337V, V339G, L342E, M343V, M343T, A344T, A344V, I347V, A350T, M351T, E352A, E352K, E355G, K357E, N358D, N358S, F359V, F359C, F359I, I360K, I360T, L364H, L364I, E373K, N374D, K378R, V379I, A380T, A380V, D381G, F382L, L387M, M388L, T389S, T392A, T394A, A395G, H396K, H396R, A399G, P402T, T406A, S417Y o F486S, incluyendo por ejemplo, M244V, G250E, Q252H, Q252R, Y253F, Y253H, E255K, E255V, T315I, F317L, M351T, E355G, F359V, H396R, F486S; M244V, E279K, F359C, F359I, L364I, L387M, F486S y cualquier combinación de las mismas; y L248R, Q252H, E255K, V299L, T315I, F317V, F317L, F317S y cualquier combinación de las mismas.

La presente invención también describe variantes modificadas de forma conservativa de la SEC ID N° 2 que tienen al menos una mutación N49S, N53S, C100R, S126P, E138G, N146S, I242T, K271R, E292V, L324Q, V338M, M351A y/o M458T, y fragmentos de las mismas.

"Variantes modificadas de forma conservativa" se aplica tanto a secuencias de aminoácidos como de ácido nucleico. Con respecto a secuencias de ácido nucleico particulares, variantes modificadas de forma conservativa se refiere a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o en los que el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, para secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que una alanina es especificada por un codón, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas" que son una especie de variaciones modificadas de forma conservativa. Cada secuencia de ácido nucleico en este documento que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un especialista en la técnica reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es habitualmente el único codón para metionina, y TGG que es habitualmente el único codón para triptófano) puede modificarse para dar una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita con respecto al producto de expresión, pero no con respecto a las secuencias de sonda reales. Como para las secuencias de aminoácidos, un especialista en la técnica reconocerá que sustituciones, deleciones o adiciones individuales a secuencias de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína que altera, añade o deleciona un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada de forma conservativa" donde la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos de funcionalidad similar se conocen bien en la técnica. Dichas variantes modificadas de forma conservativa son además de y no excluyen variantes polimórficas, homólogos interespecíficos, y alelos descritos en este documento.

Los siguientes ocho grupos contienen cada uno aminoácidos que con sustituciones conservativas de uno por otro: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, Proteins (1984)).

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de forma intercambiable en este documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos son un imitador químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural.

Como se usa en este documento, el término "polinucleótido" significa una forma polimérica de nucleótidos de al menos aproximadamente 10 bases o pares de bases de longitud, ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido, y pretende incluir formas de cadena sencilla y doble de ADN.

Como se usa en este documento, se dice que un polinucleótido está "aislado" cuando está sustancialmente separado de polinucleótidos contaminantes que corresponden o son complementarios a genes diferentes del gen Bcr-Abl o mutantes del mismo. Como se usa en este documento, se dice que un polipéptido está "aislado" cuando está sustancialmente separado de un polipéptido contaminante que corresponde a polipéptidos diferentes del péptido BCR-ABL o polipéptidos mutantes o fragmentos de los mismos. El especialista en la técnica puede emplear fácilmente procedimientos de aislamiento de polinucleótidos o polipéptidos bien conocidos en la técnica para obtener dichos polinucleótidos y/o polipéptidos aislados.

Como se usa en este documento "identidad sustancial" con una secuencia especificada se refiere a al 80% o más de identidad, es decir, el 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 91%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% de identidad con la secuencia especificada.

En el contexto de las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el término “identidad” se usa para identificar y expresar el porcentaje de restos de aminoácidos en las mismas posiciones relativas que son los mismos. También en este contexto, el término “homología” se usa para identificar y expresar el porcentaje de restos de aminoácidos en las mismas posiciones relativas que son idénticas o son similares, usando los criterios de aminoácidos conservados del análisis BLAST, como se entiende generalmente en la técnica. Por ejemplo, los valores de identidad y homología pueden generarse mediante WU-BLAST-2 (Altschul et al., *Methods in Enzymology*, 266: 460-480 (1996): <http://blast.wustl.edu/blast/README.html>).

El “porcentaje (%) de identidad de la secuencia de aminoácidos” con respecto a las secuencias identificadas en este documento se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia de BCR-ABL, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia. El alineamiento para fines de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos puede conseguirse de diversas maneras que están dentro del alcance de la técnica que pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo asignar algoritmos necesarios para alcanzar el máximo alineamiento a lo largo de las secuencias de longitud completa que se están comparando. Para los fines de este documento, los valores de porcentaje de identidad de aminoácidos también pueden obtenerse usando el programa informático de comparación de secuencias, ALIGN-2, cuyo código fuente se ha presentado con documentación para el usuario en la oficina de derechos de autor Estadounidense, Washington, D.C., 20559, registrado con el N° de registro de derechos de autor estadounidense TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente a través de Genentech, Inc., South San Francisco, Calif. Todos los parámetros de comparación de secuencia se establecen mediante el programa ALIGN-2 y no varían.

Los polinucleótidos descritos en este documento son útiles para diversos fines, incluyendo, por ejemplo, su uso en la detección de los genes, ARNm, o fragmentos del mismo; como reactivos para el diagnóstico y/o el pronóstico de trastornos asociados a BCR-ABL, incluyendo cánceres; como secuencias codificantes capaces de dirigir la expresión de sus polipéptidos codificados; y como herramientas para modular o inhibir la función de la proteína codificada.

Realizaciones específicas adicionales de este aspecto incluyen cebadores y pares de cebadores, que permiten la amplificación específica de los polinucleótidos descritos en este documento o de partes específicas cualesquiera de los mismos, y sondas que hibridan selectiva o específicamente con moléculas de ácido nucleico descritas en este documento o con cualquier parte de las mismas. Las sondas pueden estar marcadas con un marcador detectable, tal como, por ejemplo, un radioisótopo, compuesto fluorescente, compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, quelante de metales o enzima. Dichas sondas y cebadores pueden usarse para detectar la presencia de un polinucleótido descrito en este documento en una muestra y como un medio para detectar una célula que expresa una proteína descrita en este documento.

Como se usa en este documento, los términos “hibridar”, “hibridación”, “hibrida” y similares, usados en el contexto de polinucleótido, pretenden referirse a condiciones de hibridación convencionales, preferiblemente tales como en formamida al 50% /6 x SSC/SDS al 0,1% /100 µg/ml de ADNcs, en el que las temperaturas para la hibridación están por encima de 37°C y temperaturas para lavado en 0,1x SSC/SDS al 0,1% están por encima de 55°C, y de la forma más preferible a condiciones de hibridación rigurosas.

La “rigurosidad” de las reacciones de hibridación puede ser determinada fácilmente por un especialista en la técnica, y generalmente es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado y la concentración de sal. En general, las sondas más largas requieren temperaturas más altas para una hibridación apropiada, mientras que las sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación generalmente depende de la capacidad del ADN desnaturizado para volver a hibridar cuando cadenas complementarias están presentes en un entorno por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor sea el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor será la temperatura relativa que puede usarse. Como resultado, se deduce que temperaturas relativas más altas tenderían a hacer a las condiciones de reacción más rigurosas, mientras que temperaturas más bajas las harían menos rigurosas. Para detalles y explicación adicionales de la rigurosidad de las reacciones de hibridación, véase Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

“Condiciones rigurosas” o “condiciones de alta rigurosidad”, son conocidas por los especialistas en la técnica y como se define en este documento, pueden ser identificadas por aquellos que: (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para el lavado, por ejemplo cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecil sulfato sódico al 0,1% a 50°C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1%/Ficoll al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C; o (3) emplean formamida al 50%, 5x SSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonificado (50 µg/ml), SDS al 0,1%, y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2 x SSC (cloruro sódico/citrato sódico) y formamida al 50% a 55°C, seguido de un lavado a alta rigurosidad constituido por 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55°C.

“Condiciones moderadamente rigurosas” pueden identificarse como las descritas por Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, e incluyen el uso de solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos rigurosas que las descritas anteriormente. Un ejemplo no limitante de condiciones moderadamente rigurosas es incubación durante una noche a 37°C en una solución que comprende: formamida al 20%, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10%, y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón tamizado desnaturalizado, seguido de lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 37-50°C. El especialista en la técnica reconocerá cómo ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc., según sea necesario para acomodar factores tales como la longitud de la sonda y similares.

La invención también describe moléculas de ADN o ARN recombinantes que comprenden un polinucleótido descrito en este documento, incluyendo, por ejemplo, fagos, plásmidos, fagémidos, cósmidos, YAC, BAC, así como diversos vectores virales y no virales bien conocidos en la técnica, y células transformadas o transfectadas con dichas moléculas de ADN o ARN recombinantes. Como se usa en este documento, una molécula de ADN o ARN recombinante es una molécula de ADN o ARN que se ha sometido a manipulación molecular in vitro. Los procedimientos para generar dichas moléculas se conocen bien (véase, por ejemplo, Sambrook et al, 1989, anteriormente).

La invención proporciona además un sistema de huésped-vector que comprenden una molécula de ADN recombinante que contiene un polinucleótido descrito en este documento en una célula huésped procarionota o eucariota adecuada. Los ejemplos de células huésped eucariotas adecuadas incluyen una célula de levadura, una célula vegetal, o una célula animal, tal como una célula de mamífero o una célula de insecto (por ejemplo, una célula infectable por baculovirus tal como una célula Sf9). Los ejemplos de células de mamífero adecuadas incluyen diversas líneas celulares de cáncer, otras líneas celulares transfectables o transducibles, incluyendo aquellas células de mamífero usadas de forma rutinaria para la expresión de proteínas recombinantes (por ejemplo, células COS, CHO, 293, 293T y similares). Más particularmente, un polinucleótido que codifica una BCR-ABL mutante descrito en este documento puede usarse para generar proteínas o fragmentos de las mismas usando cualquier número de sistemas de huésped vector usados de forma rutinaria y conocidos ampliamente en la técnica. Las líneas celulares que comprende los polipéptidos BCR-ABL y los polinucleótidos de BCR-ABL descritos en este documento se proporcionan en este documento.

Las proteínas descritas por los genes descritos en este documento, o por fragmentos de los mismos, tienen diversos usos, incluyendo, por ejemplo, generar anticuerpos y en procedimientos para identificar ligandos y otros agentes (por ejemplo moléculas pequeñas tales como 2-fenilpirimidinas) y constituyentes celulares que se unen a un producto génico. Los anticuerpos generados contra una proteína de BCR-ABL mutante o fragmento de la misma son útiles para ensayos de diagnóstico y de pronóstico, metodologías de formación de imágenes (incluyendo, particularmente, formación de imágenes de cáncer), y procedimientos terapéuticos en la gestión de cánceres humanos caracterizados por la expresión de una proteína descrita en este documento, incluyendo, por ejemplo, cáncer de los linajes linfoides. Se contemplan diversos ensayos inmunológicos útiles para la detección de proteínas descritas en este documento, incluyendo, por ejemplo, diversos tipos de radioinmunoensayos, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), ensayos inmunofluorescentes ligados a enzimas (ELIFA), procedimientos inmunocitoquímicos, y similares. Dichos anticuerpos pueden marcarse y usarse como reactivos de formación de imágenes inmunológicas capaces de detectar células de leucemia (por ejemplo, en procedimientos radiogammagráficos de formación de imágenes).

Están disponibles una amplia gama de sistemas huésped vector adecuados para la expresión de proteínas mutantes o fragmentos de las mismas están disponibles, véase por ejemplo, Sambrook et al., 1989, anteriormente; *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, anteriormente). Los vectores para la expresión en mamíferos incluyen, por ejemplo, pcDNA 3.1 myc-His-tag (Invitrogen) y el vector retroviral pSR.alpha.tkneo (Muller et al., 1991, MCB 11: 1785). Usando estos vectores de expresión, los polipéptidos descritos en este documento pueden expresarse preferiblemente en líneas celulares, incluyendo por ejemplo CHO COS, 293, 293T, rat-1, 3T3 etc. Los sistemas huésped vector descritos en este documento son útiles para la producción de una proteína mutante o fragmento de la misma. Dichos sistemas huésped-vector pueden emplearse para estudiar las propiedades funcionales de las proteínas.

La presente invención describe anticuerpos que pueden unirse específico con los polipéptidos descritos en este documento. El término “anticuerpo” se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, composiciones de anticuerpos con especificidad polipeptídica, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, anticuerpos quiméricos, de cadena sencilla, y humanizados, así como fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, y Fv), siempre que muestren la actividad biológica deseada. Los anticuerpos pueden marcarse para su uso en ensayos biológicos (por ejemplo, marcas de radioisótopos, marcas fluorescentes) para ayudar en la detección del anticuerpo.

Los anticuerpos que se unen a polipéptidos mutantes pueden prepararse usando, por ejemplo, polipéptidos intactos o fragmentos que contienen péptidos pequeños de interés, que pueden prepararse de forma recombinante para su uso como antígeno inmunizante. El polipéptido u oligopéptido usando para inmunizar a un animal puede obtenerse de la transición de ARN o sintetizarse químicamente, y pueden estar conjugados a una proteína portadora, si se

desea. Los portadores usados habitualmente que están acoplados químicamente a péptidos incluyen, por ejemplo, albúmina de suero bovino (BSA), hemocianina de lapa californiana (KLH), y tiroglobulina. El péptido acoplado se usa a continuación para inmunizar al animal (por ejemplo, un ratón, una rata, o un conejo).

5 La expresión “determinante antigénico” se refiere a esa parte de una molécula que establece contacto con un anticuerpo particular (es decir, un epítipo). Cuando se usa una proteína o un fragmento de una proteína para inmunizar a un animal huésped, numerosas regiones de la proteína pueden inducir la producción de anticuerpos que se unen específicamente a una región dada o estructura tridimensional en la proteína; cada una de estas regiones o estructuras se denomina como un determinante antigénico. Un determinante antigénico puede competir con el antígeno intacto (es decir, el inmunógeno usado para desencadenar la respuesta inmunitaria) por la unión a un anticuerpo.

10 La frase “se une específicamente a” se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de una diana en presencia de una población heterogénea de otras entidades biológicas. Por lo tanto, en condiciones de ensayo designadas, la región de unión especificada se une preferentemente a una diana particular y no se une en una cantidad significativa a otros componentes presentes en una muestra de ensayo. La unión específica a una diana en dichas condiciones puede requerir un resto de unión que se selecciona por su especificidad por una diana particular. Pueden usarse diversos formatos de ensayo para seleccionar regiones de unión que son específicamente reactivas con un analito particular. Típicamente una reacción específica o selectiva será al menos dos veces señal o ruido de fondo y más típicamente más de 10 veces de fondo. Para fines de la presente invención, compuestos, por ejemplo moléculas pequeñas, pueden considerarse por su capacidad para unirse específicamente a mutantes descritos en este documento.

25 Una “Mutación de BCR-ABL resistente a imatinib” se refiere a una mutación específica en la secuencia de aminoácidos de BCR-ABL que otorga a las células que expresan dicha mutación resistencia al tratamiento con imatinib. Como se describen en este documento dichas mutaciones pueden incluir mutaciones en la posición T315I de BCR-ABL. Mutaciones adicionales que pueden hacer a una proteína BCR-ABL al menos parcialmente resistente a imatinib pueden incluir, por ejemplo, E279K, F359C, F359I, L364I, L387M, F486S, D233H, T243S, M244V, G249D, G250E, G251S, Q252H, Y253F, Y253H, E255K, E255V, V256L, Y257F, Y257R, F259S, K262E, D263G, K264R, S265R, V268A, V270A, T272A, Y274C, Y274R, D276N, T277P, M278K, E279K, E282G, F283S, A288T, A288V, M290T, K291R, E292G, I293T, P296S, L298M, L298P, V299L, Q300R, G303E, V304A, V304D, C305S, C305Y, T306A, F311L, I314V, T315L E316G, F317L, M318T, Y320C, Y320H, G321E, D325H, Y326C, L327P, R328K, E329V, Q333L, A337V, V339G, L342E, M343V, M343T, A344T, A344V, I347V, A350T, M351T, E352A, E352K, E355G, K357E, N358D, N358S, F359V, F359C, F359I, I360K, I360T, L364H, L364I, E373K, N374D, K378R, V379I, A380T, A380V, D381G, F382L, L387M, M388L, T389S, T392A, T394A, A395G, H396K, H396R, A399G, P402T, T406A, S417Y y F486S, además de las mutaciones descritas en este documento que incluyen N49S, N53S, C100R, S126P, E138G, N146S, I242T, K271R, E292V, L324Q, V338M, M351A y M458T.

35 Una “mutación de BCR-ABL resistente a N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida” se refiere a una mutación específica en la secuencia de aminoácidos de BCR-ABL que otorga a las células que expresan dicha mutación resistencia al tratamiento con N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida. Como se describen en este documento dichas mutaciones pueden incluir las mutaciones N49S, N53S, C100R, S126P, E138G, N146S, I242T, K271R, E292V, L324Q, V338M, M351A y M458T. Mutaciones adicionales que hacen a una proteína BCR-ABL al menos parcialmente resistente a N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida incluyen, por ejemplo, T315I.

“CML resistente a imatinib” se refiere a una CML en la que las células implicadas en CML son resistentes al tratamiento con imatinib. Generalmente esto es el resultado de una mutación en BCR-ABL.

45 “CML intolerante a imatinib” se refiere a una CML en la que el individuo que tiene la CML es intolerante al tratamiento con imatinib, es decir, los efectos secundarios tóxicos y/o perjudiciales de imatinib superan a los efectos terapéuticos beneficiosos.

**Procedimiento de detección de BCR-ABL mutante**

50 La invención describe procedimientos de cribado de una muestra biológica de un individuo en busca de la presencia de al menos una mutación en la secuencia de quinasa BCR-ABL, así como procedimientos para identificar una célula que expresa quinasa BCR-ABL mutante.

Los procedimientos de identificación de la secuencia de aminoácidos y ácido nucleico de un polinucleótido BCR-ABL o polipéptido BCR-ABL de tipo silvestre o mutante se conocen en la técnica. Se contemplan técnicas de biología molecular convencionales para determinar de forma precisa una mutación de BCR-ABL en las células de un individuo dado.

55 Pueden usarse anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a una quinasa BCR-ABL mutante que puede usarse en la identificación de uno o más de los mutantes de BCR-ABL descritos en este documento. En este documento se contemplan anticuerpos que se unen específicamente a una quinasa BCR-ABL mutante descrita en

este documento y que no se unen (o se unen débilmente) a proteína o polipéptidos de BCR-ABL de tipo silvestre. Los anticuerpos anti-quinasa BCR-ABL mutante incluyen, por ejemplo, anticuerpos monoclonales y policlonales así como fragmentos que contienen el dominio de unión al antígeno y/o una o más regiones determinantes complementarias de estos anticuerpos.

- 5 Para algunas aplicaciones, puede ser deseable generar anticuerpos que reaccionan específicamente con una proteína quinasa BCR-ABL mutante particular y/o un epítipo en un dominio estructural particular. Por ejemplo, los anticuerpos útiles para fines de diagnóstico pueden ser aquellos que reaccionan con un epítipo en una región mutada de la proteína BCR-ABL como se expresa en células de cáncer. Por ejemplo, anticuerpos que se unen específicamente a una quinasa BCR-ABL mutante F3171 y/o T315A. Dichos anticuerpos pueden generarse usando la proteína quinasa BCR-ABL mutante descrita en este documento, o usando péptidos obtenidos de diversos dominios de la misma como inmunógeno.

10 Los anticuerpos para quinasa BCR-ABL mutante descritos en este documento pueden ser particularmente útiles en estrategias terapéuticas, ensayos de diagnóstico y pronóstico y metodologías de formación de imágenes para cáncer (por ejemplo, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, Leucemia linfoblástica aguda positiva para el cromosoma Filadelfia (Ph+ ALL, GIST)). Análogamente, dichos anticuerpos pueden ser útiles en el diagnóstico y/o pronóstico de otros cánceres, en la medida en que dicha quinasa BCR-ABL mutante también es expresada o sobreexpresada en otros tipos de cáncer. La invención describe diversos ensayos inmunológicos útiles para la detección y cuantificación de proteínas y polipéptidos de quinasa BCR-ABL mutante. Dichos ensayos generalmente comprenden uno o más anticuerpos para quinasa BCR-ABL mutante capaces de reconocer y unirse a una proteína de quinasa BCR-ABL mutante, según sea apropiado, y puede realizarse en diversos formatos de ensayo inmunológico bien conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, diversos tipos de radioinmunoensayos, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), ensayos inmunofluorescentes ligados a enzimas (ELIFA), y similares. Además, procedimientos de formación de imágenes inmunológicas capaces de detectar células de cáncer también son descritos por la invención incluyendo, por ejemplo, procedimientos de formación de imágenes que usan anticuerpos para quinasa BCR-ABL mutante marcados. Dichos ensayos pueden usarse clínicamente en la detección, monitorización y pronóstico de cánceres.

15 Por consiguiente, la presente invención describe procedimientos de ensayo en busca de la presencia de un polipéptido BCR-ABL mutante descrito en este documento. A modo de ejemplo solamente, en algunas realizaciones, un anticuerpo generado contra el fragmento, u otro resto de unión capaz de unirse específicamente al analito diana, está inmovilizado sobre un sustrato sólido para formar un primer complejo y una muestra de ensayo biológica de un paciente se pone en contacto con la molécula unida. Después de un periodo de incubación adecuado, durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo anticuerpo-secundario, un segundo anticuerpo marcado con una molécula informadora capaz de producir una señal detectable se añade a continuación y se incuba, permitiendo suficiente tiempo para la formación de un complejo terciario. Cualquier material sin reaccionar se retira por lavado, y la presencia del complejo terciario se determina mediante observación de una señal producida por la molécula informadora. Los resultados pueden ser cualitativos, mediante simple observación de la señal visible o pueden ser cuantificados mediante comparación con una muestra de control que contiene cantidades conocidas de hapteno. Las variaciones de este ensayo incluyen un ensayo simultáneo, en el que tanto la muestra como el anticuerpo marcado se añaden simultáneamente al anticuerpo unido, o un ensayo inverso en el que el anticuerpo marcado y la muestra a ensayar se combinan primero, se incuban y a continuación se añaden simultáneamente al anticuerpo unido. Estas técnicas son bien conocidas por los especialistas en la técnica, y la posibilidad de variaciones será fácilmente evidente.

20 Por "molécula informadora", como se usa en la presente memoria descriptiva, se entiende una molécula que, por su naturaleza química, produce una señal analíticamente identificable que permite la detección de anticuerpo unido al antígeno. La detección puede ser cualitativa o cuantitativa. La molécula informadora usada más habitualmente en este tipo de ensayo son moléculas que contienen enzimas, fluoróforos o radionúclidos (es decir radioisótopos).

25 El sustrato sólido es típicamente vidrio o un polímero, siendo los polímeros utilizados más habitualmente celulosa, poloacrilamida, nylon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno. Los soportes sólidos pueden estar en forma de tubos, perlas, discos o microplacas, o cualquier otra superficie adecuada para realizar un inmunoensayo. Los procesos de unión son bien conocidos en la técnica y generalmente consisten en reticular, unir covalentemente o adsorber físicamente la molécula al portador insoluble.

30 Los perfiles de expresión de quinasas BCR-ABL mutantes pueden usarse como marcadores de diagnóstico para estados de enfermedad. El estatus de los productos génicos de quinasa BCR-ABL mutante en muestras de pacientes pueden analizarse mediante diversos protocolos que son bien conocidos en la técnica incluyendo los siguientes tipos de ensayo no limitantes: procedimientos de determinación del genotipo sin PCR, procedimientos homogéneos de etapa única, detección homogénea con polarización por fluorescencia, pirosecuenciación, sistema de chip de ADN basado en "Marca", procedimientos a base de perlas, química de colorante fluorescente, ensayos de determinación del genotipo basados en espectrometría de masas, ensayos de genotipo TaqMan, ensayos de genotipo invasor, ensayos de genotipo microfluidico, análisis inmunohistoquímico, las diversas técnicas de transferencia de Northern incluyendo hibridación in situ, análisis de RT-PCR (por ejemplo en muestras micro-diseccionadas de captura con láser), análisis de transferencia de western, análisis de matriz tisular y cualesquiera

otros procedimientos conocidos en la técnica o descritos en cualquier otra parte en este documento.

Los siguientes procedimientos de determinación de genotipo no limitantes están específicamente abarcados por la presente invención: Landegren, U., Nilsson, M. & Kwok, P. *Genome Res* 8, 769-776 (1998); Kwok, P., *Pharmacogenomics* 1, 95-100 (2000); Gut, L, *Hum Mutat* 17, 475-492 (2001); Whitcombe, D., Newton, C. & Little, S., *Curr Opin Biotechnol* 9, 602-608 (1998); Tillib, S. & Mirzabekov, A., *Curr Opin Biotechnol* 12, 53-58 (2001); Winzeler, E. et al., *Science* 281, 1194-1197 (1998); Lyamichev, V. et al., *Nat Biotechnol* 17, 292-296 (1999); Hall, J. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8272-8277 (2000); Mein, C. et al., *Genome Res* 10, 333-343 (2000); Ohnishi, Y. et al., *J Hum Genet* 46, 471-477 (2001); Nilsson, M. et al., *Science* 265, 2085-2088 (1994); Baner, J., Nilsson, M., Mendel-Hartvig, M. & Landegren, U., *Nucleic Acids Res* 26, 5073-5078 (1998); Baner, J. et al., *Curr Opin Biotechnol* 12, 11-15 (2001); Hatch, A., Sano, T., Misasi, J. & Smith, C., *Genet Anal* 15, 35-40 (1999); Lizardi, P. et al., *Nat Genet* 19, 225-232 (1998); Zhong, X., Lizardi, P., Huang, X., Bray-Ward, P. & Ward, D., *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3940-3945 (2001); Faruqi, F. et al. *BMC Genomics* 2, 4 (2001); Livak, K., *Gnet Anal* 14, 143-149 (1999); Marras, S., Kramer, F. & Tyagi, S., *Genet Anal* 14, 151-156 (1999); Ranade, K. et al., *Genome Res* 11, 1262-1268 (2001); Myakishev, M., Khripin, Y., Hu, S. & Hamer, D., *Genome Res* 11, 163-169 (2001); Beaudet, L., Bedard, J., Breton, B., Mercuri, R. & Budarf, M., *Genome Res* 11, 600-608 (2001); Chen, X., Levine, L. & PY, K., *Genome Res* 9, 492-498 (1999); Gibson, N. et al., *Clin Chem* 43, 1336-1341 (1997); Latif, S., Bauer-Sardina, L., Ranade, K., Livak, K. & PY, K., *Genome Res* 11, 436- 440 (2001); Hsu, T., Law, S., Duan, S., Neri, B. & Kwok, P., *Clin Chem* 47, 1373- 1377 (2001); Alderborn, A., Kristofferson, A. & Hammerling, U., *Genome Res* 10, 1249-1258 (2000); Ronaghi, M., Uhlen, M. & Nyren, P., *Science* 281, 363, 365 (1998); Ronaghi, M., *Genome Res* 11, 3-11 (2001); Pease, A. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5022-5026 (1994); Southern, K, Maskos, U. & Elder, J., *Genomics* 13, 1008-1017 (1993); Wang, D. et al., *Science* 280, 1077-1082 (1998); Brown, P. & Botstein, D., *Nat Genet* 21, 33-37 (1999); Cargill, M. et al. *Nat Genet* 22, 231-238 (1999); Dong, S. et al., *Genome Res* 11, 1418-1424 (2001); Halushka, M. et al., *Nat Genet* 22, 239-247 (1999); Hacia, J., *Nat Genet* 21, 42-47 (1999); Lipshutz, R., Fodor, S., Gingeras, T. & Lockhart, D., *Nat Genet* 21, 20-24 (1999); Sapolsky, R. et al., *Genet Anal* 14, 187-192 (1999); Tsuchihashi, Z. & Brown, P., *J Virol* 68, 5863 (1994); Herschlag, D., *J Biol Chem* 270, 20871-20874 (1995); Head, S. et al., *Nucleic Acids Res* 25, 5065-5071 (1997); Nikiforov, T. et al., *Nucleic Acids Res* 22, 4167-4175 (1994); Syvanen, A. et al., *Genomics* 12, 590-595 (1992); Shumaker, J., Metspalu, A. & Caskey, C., *Hum Mutat* 7, 346-354 (1996); Lindroos, K., Liljedahl, U., Raitio, M. & Syvanen, A., *Nucleic Acids Res* 29, E69-9 (2001); Lindblad-Toh, K. et al., *Nat Genet* 24, 381-386 (2000); Pastinen, T. et al., *Genome Res* 10, 1031- 1042 (2000); Fan, J. et al., *Genome Res* 10, 853-860 (2000); Hirschhorn, J. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12164-12169 (2000); Bouchie, A., *Nat Biotechnol* 19, 704 (2001); Hensel, M. et al., *Science* 269, 400-403 (1995); Shoemaker, D., Lashkari, D., Morris, D., Mittmann, M. & Davis, R. *Nat Genet* 14, 450-456 (1996); Gerry, N. et al., *J Mol Biol* 292, 251-262 (1999); Ladner, D. et al., *Lab Invest* 81, 1079-1086 (2001); Iannone, M. et al. *Cytometry* 39, 131-140 (2000); Fulton, R., McDade, R., Smith, P., Kienker, L. & Kettman, J. J., *Clin Chem* 43, 1749-1756 (1997); Armstrong, B., Stewart, M. & Mazumder, A., *Cytometry* 40, 102-108 (2000); Cai, H. et al., *Genomics* 69, 395 (2000); Chen, J. et al., *Genome Res* 10, 549-557 (2000); Ye, F. et al. *Hum Mutat* 17, 305-316 (2001); Michael, K., Taylor, L., Schultz, S. & Walt, D., *Anal Chem* 70, 1242-1248 (1998); Steemers, F., Ferguson, J. & Walt, D., *Nat Biotechnol* 18, 91-94 (2000); Chan, W. & Nie, S., *Science* 281, 2016-2018 (1998); Han, M., Gao, X., Su, J. & Me, S., *Nat Biotechnol* 19, 631-635 (2001); Griffin, T. & Smith, L., *Trends Biotechnol* 18, 77-84 (2000); Jackson, P., Scholl, P. & Groopman, J., *Mol Med Today* 6, 271-276 (2000); Haff, L. & Smirnov, L., *Genome Res* 7, 378-388 (1997); Ross, P., Hall, L., Smirnov, I. & Haff, L., *Nat Biotechnol* 16, 1347-1351 (1998); Bray, M., Boerwinkle, E. & Doris, P. *Hum Mutat* 17, 296-304 (2001); Sauer, S. et al., *Nucleic Acids Res* 28, E13 (2000); Sauer, S. et al., *Nucleic Acids Res* 28, E100 (2000); Sun, X., Ding, H., Hung, K. & Guo, B., *Nucleic Acids Res* 28, E68 (2000); Tang, K. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10016-10020 (1999); Li5 J. et al., *Electrophoresis* 20, 1258-1265 (1999); Little, D., Braun, A., O'Donnell, M. & Koster, H., *Nat Med* 3, 1413-1416 (1997); Little, D. et al. *Anal Chem* 69, 4540-4546 (1997); Griffin, T., Tang, W. & Smith, L., *Nat Biotechnol* 15, 1368-1372 (1997); Ross, P., Lee, K. & Belgrader, P., *Anal Chem* 69, 4197-4202 (1997); Jiang-Baucom, P., Girard, J., Butler, J. & Belgrader, P., *Anal Chem* 69, 4894-4898 (1997); Griffin, T., Hall, J., Prudent, J. & Smith, L., *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6301-6306 (1999); Kokoris, M. et al., *Mol Diagn* 5, 329-340 (2000); Jurinke, C, van den Boom, D., Cantor, C. & Koster, H. (2001); y/o Taranenko, N. et al., *Genet Anal* 13, 87-94 (1996).

Las sondas y cebadores pueden diseñarse para ser específicos para dicho análisis de mutaciones y pueden obtenerse de la secuencia de BCR-ABL de tipo silvestre, segmentos y secuencias complementarias de la misma.

Adicionalmente, la invención describe ensayos para la detección de polinucleótidos de quinasa BCR-ABL mutante en una muestra biológica, tales como preparaciones celulares, y similares. Una serie de procedimientos para amplificar y/o detectar la presencia de polinucleótidos de quinasa BCR-ABL mutante se conocen bien en la técnica y pueden emplearse en la práctica de este aspecto de la invención.

En algunas realizaciones, un procedimiento para detectar un ARNm de quinasa BCR-ABL mutante en una muestra biológica comprende producir ADNc de la muestra mediante transcripción inversa usando al menos un cebador; amplificar el ADNc producido de este modo usando polinucleótidos de quinasa BCR-ABL mutante como cebadores sentido y antisentido para amplificar ADNc de quinasa BCR-ABL mutantes en su interior; y detectar la presencia del ADNc de quinasa BCR-ABL mutante amplificado. Cualquier número de combinaciones de sondas sentido y antisentido apropiadas pueden diseñarse a partir de las secuencia de nucleótidos proporcionadas por una quinasa BCR-ABL mutante y usarse para este fin.

La invención también describe ensayos para detectar la presencia de una proteína de quinasa BCR-ABL mutante en una muestra biológica. Los procedimientos para detectar una proteína de quinasa BCR-ABL mutante también son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, inmunoprecipitación, análisis inmunohistoquímico, análisis de transferencia de Western, ensayos de unión molecular, ELISA, ELIFA y similares. Por ejemplo, en una realización, un procedimiento de detección de la presencia de una proteína de quinasa BCR-ABL mutante en una muestra biológica comprende poner en contacto en primer lugar a la muestra con un anticuerpo para BCR-ABL, un fragmento del mismo reactivo con quinasa BCR-ABL mutante, o una proteína recombinante que contiene una región de unión al antígeno de un anticuerpo para quinasa BCR-ABL mutante; y a continuación detectar la unión de la proteína de quinasa BCR-ABL mutante en la muestra a éste.

También se describen procedimientos para identificar una célula que expresa quinasa BCR-ABL mutante. En una realización, un ensayo para identificar una célula que expresa un gen de quinasa BCR-ABL mutante comprende detectar la presencia de ARNm de BCR-ABL mutante en la célula. Los procedimientos para la detección de ARNm particulares en células se conocen bien e incluyen, por ejemplo, ensayos de hibridación usando sondas de ADN complementarias (tales como hibridación in situ usando ribosondas de quinasa BCR-ABL mutante marcadas, transferencia de Northern y técnicas relacionadas) y diversos ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (tales como RT-PCR usando cebadores complementarios específicos para una quinasa BCR-ABL mutante, y otros procedimientos de detección de tipo amplificación, tales como, por ejemplo, ADN ramificado, SISBA, TMA y similares).

Los procedimientos de detección descritos en este documento también incluyen procedimientos para identificar posiciones de aminoácidos en el polipéptido BCR-ABL que pueden otorgar resistencia al menos parcial a un inhibidor de tirosina quinasa. Los procedimientos pueden comprender las etapas de crear un co-cristal del polipéptido con el inhibidor de BCR-ABL, e identificar las posiciones de aminoácidos del polipéptido que está en contacto, se une, establece una interfaz, o interactúa con el inhibidor de BCR-ABL. Los procedimientos de creación de estructuras cristalinas se conocen en la técnica y pueden incluir, por ejemplo, el uso de cristalografía de rayos X para determinar la estructura cristalina (Véase, por ejemplo, Tokarski et al., Cancer Res (2006), 66(11), 5790-5797) En algunas realizaciones, los aminoácidos de contacto o de la interfaz estarán en las posiciones 248, 299, 315 y/o 317. En algunas realizaciones, los aminoácidos de contacto o de la interfaz estarán en las posiciones 244, 248, 255, 290, 299, 313, 315, 316, 317, 318, 320, 321 y/o 380.

#### Kits

Para su uso en las aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas descritas o sugeridas anteriormente, también son proporcionados kits por la invención. Dichos kits pueden comprender, por ejemplo, un medio portador que está compartimentalizado para albergar en estrecho confinamiento uno o más medios de recipiente tales como viales, tubos y similares, comprendiendo cada uno de los medios de recipiente uno de los elementos separados a usar en el procedimiento. Por ejemplo, uno de los medios de recipiente puede comprender un kit de detección de cariotipo para realizar análisis del cariotipo.

El kit de la invención típicamente comprenderá el recipiente descrito anteriormente y uno o más otros recipientes que comprenden materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas, e insertos en el envase con instrucciones para su uso. Una etiqueta puede estar presente en el recipiente para indicar que la composición se usa para una terapia o aplicación no terapéutica específica, y también puede indicar recomendaciones para uso in vivo o in vitro, tales como las descritas anteriormente.

Los kits útiles para poner en práctica procedimientos terapéuticos descritos en este documento también pueden contener un compuesto que es capaz de inhibir una quinasa BCR-ABL y/o quinasas BCR-ABL mutantes. Está específicamente contemplado por la invención un kit que comprende una combinación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi)etil]-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida o sal, hidrato o solvato de la misma, y un agente estabilizante de tubulina (por ejemplo, paclitaxol, epotilona, taxano, etc.); una combinación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi)etil]-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida o sal, hidrato o solvato de la misma, y un inhibidor de farnesil transferasa; una combinación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi)etil]-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida o sal, hidrato o solvato de la misma, y otro inhibidor de proteína tirosina quinasa, tal como, imatinib, AMN107, PD180970, GGP76030, AP23464, SKI 606, NS-187 y/o AZD0530; una mayor dosis y/o régimen de frecuencia de dosificación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi)etil]-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida o sal, hidrato o solvato de la misma, con respecto a un régimen de tratamiento adecuado para dichas otras formas de dicha quinasa BCR-ABL (por ejemplo, de tipo silvestre); y cualquier otra combinación o régimen de dosificación que comprende N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi)etil]-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida o sal, hidrato o solvato de la misma descrito en este documento, útil en el tratamiento de mamíferos que padecen un trastorno asociado a BCR-ABL, incluyendo trastorno asociado a BCR-ABL mutante. Por ejemplo, kits útiles en la identificación de una quinasa BCR-ABL mutante en un paciente mamífero (por ejemplo, un ser humano) que padece un cáncer que es completa o parcialmente resistente a, o ha desarrollado resistencia completa o parcial a, N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi)etil]-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida o sal, hidrato o solvato de la misma, imatinib, u otro inhibidor de proteína tirosina quinasa y donde dichos kits también comprenden una cantidad



terapéuticamente eficaz de la combinación o dosis o régimen de dosificación aumentado, se contemplan en este documento.

Además, los kits pueden incluir materiales instructivos que contienen indicaciones (es decir, protocolos) para la puesta en práctica de los procedimientos de esta invención. Aunque los materiales instructivos comprenden típicamente materiales escritos o impresos, no se limitan a estos. Cualquier medio capaz de almacenar dichas instrucciones y comunicarlas a un usuario final está contemplado por esta invención. Dichos medios incluyen, aunque no se limitan a medios de almacenamiento electrónicos (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips, y similares), medios ópticos (por ejemplo, CD ROM), y similares. Dichos medios pueden incluir direcciones de páginas de Internet que proporcionan dichos materiales instructivos.

- 5
- 10 El kit también puede comprender, por ejemplo, un medio para obtener una muestra biológica de un individuo. Los medios para obtener muestras biológicas de individuos son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, catéteres, jeringas y similares, y no se describen en detalle en este documento.

Para su uso en las aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas descritas o sugeridas anteriormente, la invención también proporciona kits. Dichos kits pueden comprender, por ejemplo, un medio portador que está compartimentalizado para albergar en confinamiento estrecho uno o más medios de recipiente tales como viales, tubos, y similares, comprendiendo cada uno de los medios de recipiente uno de los elementos separados a usar en el procedimiento. Por ejemplo, uno de los medios de recipiente puede comprender una sonda que está o puede estar marcada de forma detectable. Dicha sonda puede ser un anticuerpo o polinucleótido específico para una proteína de quinasa BCR-ABL mutante o un gen o mensaje de quinasa BCR-ABL mutante, respectivamente. Cuando el kit utiliza hibridación de ácido nucleico para detectar el ácido nucleico diana, el kit también puede tener recipientes que contienen nucleótidos para la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana y/o un recipiente que comprende un medio informador, tal como una proteína de unión a biotina, tal como avidina o estreptavidina, unida a una molécula informadora, tal como una marca enzimática, fluorescente o de radioisótopo.

- 15
- 20 El kit de la invención comprenderá típicamente el recipiente descrito anteriormente y uno o más recipientes más que comprenden materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas e insertos en el envase con instrucciones de uso. Una etiqueta puede estar presente en el recipiente para indicar que la composición se usa para una terapia o aplicación no terapéutica específica, y también pueden indicar recomendaciones para uso in vivo o in vitro, tales como los descritos anteriormente.

El kit de la invención comprenderá típicamente el recipiente descrito anteriormente y uno o más recipientes más que comprenden materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas e insertos en el envase con instrucciones de uso. Una etiqueta puede estar presente en el recipiente para indicar que la composición se usa para una terapia o aplicación no terapéutica específica, y también pueden indicar recomendaciones para uso in vivo o in vitro, tales como los descritos anteriormente.

- 25
- 30 Los kits útiles para poner en práctica procedimientos terapéuticos descritos en este documento también pueden contener un compuesto que es capaz de inhibir una quinasa BCR-ABL mutante. Está específicamente contemplado por la invención un kit que comprende una combinación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida o sal, hidrato o solvato de la misma, y un agente estabilizante de tubulina (por ejemplo, pacitaxol, epotilona, taxano, etc.); una combinación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida o sal, hidrato o solvato de la misma, y un agente estabilizante de tubulina (por ejemplo, pacitaxol, epotilona, taxano, etc.); una combinación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida o sal, hidrato o solvato de la misma, y otro inhibidor de proteína tirosina quinasa, tal como, imatinib, AMN107, PD180970, GGP76030, AP23464, SKI 606, NS-187 y/o AZD0530; una mayor dosis y/o régimen de frecuencia de dosificación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida o sal, hidrato o solvato de la misma, con respecto a un régimen de tratamiento adecuado para dichas otras formas de dicha quinasa BCR-ABL (por ejemplo, de tipo silvestre); y cualquier otra combinación o régimen de dosificación que comprende N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida o sal, hidrato o solvato de la misma descrito en este documento, útil en el tratamiento de mamíferos que padecen un trastorno asociado a BCR-ABL, incluyendo trastorno asociado a BCR-ABL mutante. Por ejemplo, kits útiles en la identificación de una quinasa BCR-ABL mutante en un paciente mamífero (por ejemplo, un ser humano) que padece un cáncer que es completa o parcialmente resistente a, o ha desarrollado resistencia completa o parcial a, N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida o sal, hidrato o solvato de la misma, imatinib, u otro inhibidor de proteína tirosina quinasa y donde dichos kits también comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de la combinación o dosis o régimen de dosificación aumentado, se contemplan en este documento.
- 35
- 40
- 45
- 50

Además, los kits pueden incluir materiales instructivos que contienen indicaciones (es decir, protocolos) para la puesta en práctica de los procedimientos de esta invención. Aunque los materiales instructivos comprenden típicamente materiales escritos o impresos, no se limitan a estos. Cualquier medio capaz de almacenar dichas instrucciones y comunicarlas a un usuario final está contemplado por esta invención. Dichos medios incluyen, aunque no se limitan a medios de almacenamiento electrónicos (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips y similares), medios ópticos (por ejemplo, CD ROM), y similares. Dichos medios pueden incluir direcciones de páginas de Internet que proporcionan dichos materiales instructivos.

- 55
- 60 El kit también puede comprender, por ejemplo, un medio para obtener una muestra biológica de un individuo. Los medios para obtener muestras biológicas de individuos son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, catéteres,

jeringas y similares, y no se describen en detalle en este documento.

La presente invención como se define en las reivindicaciones no está limitada en alcance por las realizaciones descritas en este documento, que pretenden ser ilustraciones únicas de aspectos individuales de la invención, y cualesquiera que son funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la invención. Diversas modificaciones a los modelos y procedimientos de la invención, además de las descritas en este documento, serán evidentes para los especialistas en la técnica a partir de las anteriores descripción y enseñanzas, y se pretende análogamente que entren dentro del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones.

Los siguientes ejemplos representativos contienen información, ejemplificación y guía adicionales importantes que pueden adaptarse a la puesta en práctica de esta invención en sus diversas realizaciones y sus equivalentes. Estos ejemplos pretenden ayudar a ilustrar la invención, y no pretenden, ni debe interpretarse que, limitan su alcance.

## REFERENCIAS

1. Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999; 340(17): 1330-40.
2. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 2001; 344(14): 1038-42.
3. Ottmann OG, Druker BJ, Sawyers CL, et al. A phase 2 study of imatinib in patients with relapsed or refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoid leukemias. *Blood* 2002; 100(6): 1965-71.
4. Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E, et al. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood* 2002; 99(10): 3530-9.
5. Talpaz M, Silver RT, Druker BJ, et al. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood* 2002; 99(6): 1928-37.
6. Silver RT, Talpaz M, Sawyers CL, et al. Four years follow-up of 1027 patients with late chronic phase (L-CP), accelerated phase (AP), or blast crisis (BC) chronic myeloid leukemia (CML) treated with imatinib in three large Phase II trials. *Blood* 2004; 104(11a): 10a (Resumen 23).
7. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 2001; 293(5531): 876-80.
8. Donato NJ, Wu JY, Stapley J, et al. BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood* 2003; 101(2): 690-8.
9. Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, et al. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2002; 2(2): 117-25.
10. Branford S, Rudzki Z, Walsh S, et al. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. *Blood* 2002; 99(9): 3472-5.
11. Shah NP, Tran C, Lee FY, Chen P, Norris D, Sawyers CL. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science* 2004; 305(5682): 399-401.
12. O'Hare T, Walters DK, Stoffregen EP, et al. In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer Res* 2005; 65(11): 4500-5.
13. Lombardo LJ, Lee FY, Chen P, et al. Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J Med Chem* 2004; 47(27): 6658-61.
14. Burgess M, Shah N, Skaggs B, Lee F, Sawyers C. Comparative analysis of two BCR-ABL small molecule inhibitors reveals overlapping but distinct mechanisms of resistance. *Blood* 2004; 104(11): 160a (Resumen 552).
15. Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* 2000; 289(5486): 1938-42.
16. Tokarski J, Newitt J, Lee F, et al. The crystal structure of Abl kinase with BMS-354825, a dual SRC/ABL kinase inhibitor. *Blood* 2004; 104(11): 160a (Resumen 553).
17. Cancer Therapy Evaluation Program. Common Terminology Criteria for Adverse Events. Versión 3.0: National Cancer Institute. 12 de diciembre de 2003.
18. Lowell CA. Src-family kinases: rheostats of immune cell signaling. *Mol Immunol* 2004; 41(6-7): 631-43.
19. Yamamoto M, Kakahana K, Kurosu T, Murakami N, Miura O. Clonal evolution with inv(11)(p15q22) and NUP98/DDX10 fusion gene in imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 157(2): 104-8.
20. Mellingerhoff IK, Wang MY, Vivanco I, et al. Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med* 2005; 353(19): 2012-
21. Pao W, Miller VA, Politi KA, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* 2005; 2(3): e73.
22. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2005; 352(8): 786-92.
23. Antonescu CR, Besmer P, Guo T, et al. Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation. *Clin Cancer Res* 2005; 11(11): 4182-90.

24. Wardelmann E, Thomas N, Merkelbach-Bruse S, et al. Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumours caused by multiple KIT mutations. *Lancet Oncol* 2005; 6(4): 249-51.

25. T. R. J. Evans, J. A. Morgan, A. D. van den Abbeele, et al., Phase I dose-escalation study of the SRC and multi-kinase inhibitor BMS-354825 in patients (pts) with GIST and other solid tumors *J Clin Oncol* (Resúmenes de la Reunión) 2005 23: 3034.

## Ejemplos

### Ejemplo 1 - procedimientos usados en el ensayo clínico de aumento de la dosis para evaluar dasatinib en pacientes con cml avanzada o ph+all

#### Pacientes del estudio

10 Pacientes de >14 años de edad con AP, BC, o Ph+ ALL con resistencia primaria o adquirida o intolerancia a terapia con imatinib (después de recibir al menos 400 mg al día) eran seleccionables. Los pacientes se clasificaron como que tenían BC si tenían >30% de blastocitos en sangre periférica o médula ósea o infiltrados extramedulares de células leucémicas (diferentes del bazo o del hígado). Los pacientes se clasificaron como que tenían AP si no cumplían algún criterio para BC, pero cumplían cualquiera de los siguientes criterios: >15% a <30% de blastocitos en sangre periférica o médula ósea; >20% de basófilos en sangre periférica o médula ósea; >30% de blastocitos más promielocitos (pero <30% de blastocitos) en sangre periférica o médula ósea; o un número de plaquetas <100.000 células/mm<sup>3</sup> no relacionado con la terapia. Los pacientes de Ph+ ALL tenían >30% de linfoblastos en sangre periférica o médula ósea sin prueba previa de CML de fase crónica. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito de acuerdo con las regulaciones institucionales, antes de la participación en el estudio.

20 La resistencia hematológica primaria a imatinib se definió como el fallo para volver a la fase crónica después de 3 meses de tratamiento con imatinib o avance de la enfermedad en 3 meses desde el inicio del tratamiento con imatinib. La resistencia hematológica adquirida se definió como avance de la enfermedad después de obtener una respuesta hematológica (definida a continuación y en la Tabla suplementaria 1) sostenida durante 3 meses. Los pacientes se consideraron intolerantes a imatinib si habían interrumpido la terapia con imatinib debido a toxicidad no hematológica de cualquier grado.

#### Diseño del estudio

30 Este estudio piloto de aumento de la dosis de etiqueta abierta se diseñó para ensayar la seguridad y la actividad anti-leucémica de dasatinib en pacientes resistentes o intolerantes a imatinib con Ph+ CML o Ph+ ALL. La dosis de partida de 35 mg tomada por vía oral, dos veces al día (BID) se seleccionó en base a los datos de seguridad disponibles de un estudio de fase I en pacientes de CML de fase crónica que se realizó simultáneamente. Las cohortes posteriores se trataron con 50 mg, 70 mg, 90 mg ó 120 mg BID. Se permitió el aumento de la dosis en un paciente. Un ciclo de tratamiento se definió como 4 semanas (28 días). Las modificaciones de la dosis se realizaron en base a sucesos adversos hematológicos y no hematológicos. El protocolo del estudio fue aprobado por las Juntas de Revisión Institucional en UCLA y el MD Anderson Cancer Center.

#### 35 Evaluación de la seguridad y la toxicidad

Los pacientes se evaluaron mediante examen físico, estado general, signos vitales y ECG con 12 derivaciones en el punto de partida. Los sucesos adversos (hematológicos y no hematológicos) se evaluaron a través del estudio y se graduaron de acuerdo con los criterios *National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events* (NCI-CTCAE) Versión 3.0 (17). Los recuentos de sangre completa y las analíticas químicas de suero se realizaron dos veces a la semana durante los 3 primeros meses y a continuación cada 2 semanas durante 3 meses, y cada 6 semanas durante el resto del estudio.

#### Evaluación de la respuesta

45 Las respuestas hematológicas (HR) se valoraron como principal, secundaria o sin respuesta (Tabla suplementaria 1). La respuesta hematológica principal (HR principal) incluye dos subgrupos, denominados sin pruebas de leucemia (NEL) y HR completa (CHR), en base a si se consiguió una recuperación completa de los recuentos de sangre periférica. La CHR se definió como: blastocitos en médula ósea  $\leq$  5% y recuento de leucocitos (WBC)  $\leq$  límites superiores institucionales de la normalidad (ULN); recuento de neutrófilos absolutos (ANC)  $\geq$  1000 células/mm<sup>3</sup>; plaquetas  $\geq$  100.000 células/mm<sup>3</sup>; sin blastocitos ni promielocitos en sangre periférica; <5% de mielocitos más metamielocitos en sangre periférica; y basófilos < 20%. La NEL se definió como: blastocitos en médula ósea  $\leq$ 5%, sin blastocitos ni promielocitos en sangre periférica, WBC  $\leq$  ULN institucional, basófilos en sangre periférica < 20%, ANC  $\geq$  500/mm<sup>3</sup> < 1000/mm<sup>3</sup>, y plaquetas  $\geq$  20.000/mm<sup>3</sup> < 100.000/mm<sup>3</sup>. La HR secundaria se definió como: blastocitos >5% y <15% en la médula ósea o la sangre periférica, <30% de blastocitos más promielocitos en la médula ósea y sangre periférica, basófilos  $\leq$  20% y ninguna enfermedad extramedular diferente de de bazo o hígado. Las respuestas se confirmaron si persistían durante 4 semanas.

55 La morfología y la citogenética de la médula ósea se evaluaron cada 3 meses para la determinación de la respuesta citogenética (CyR). El grado de la CyR se definió en base al porcentaje de células Ph+ en metafase en la médula

ósea: CyR completa (CCyR), 0%; CyR parcial (PCyR), 1-35%; CyR secundaria, 36-65%; CyR mínima, 66-95%; sin CyR, 96-100%.

5 Se consideraba que cualquier paciente con una HR principal o secundaria que posteriormente no consiguió cumplir los criterios durante un periodo de 2 semanas tenía una enfermedad en avance. Se consideraba que los pacientes con AP habían avanzado si desarrollaban BC. Se consideraba que los pacientes con BC o Ph+ ALL habían avanzado si tenían un aumento del porcentaje de blastocitos en sangre periférica o médula ósea a pesar de al menos 4 semanas de tratamiento.

#### **Análisis del estatus mutacional**

10 Se recogieron muestras de sangre de forma prospectiva para el análisis de mutaciones de BCR-ABL antes del primer tratamiento. Adicionalmente, el estatus mutacional se re-evaluó en algunos pacientes en el momento del avance de la enfermedad. Los análisis mutacionales de punto de partida de AU se realizaron como se ha descrito anteriormente y se realizaron en un laboratorio central (9). También se determinaron los cariotipos de cada paciente.

#### **Farmacocinética/Farmacodinámica**

15 La farmacocinética del plasma (PK) se determinó los días 1 y 8 del primer ciclo de tratamiento y el día 1 del segundo ciclo de tratamiento. La evaluación de la farmacodinámica (PD) se realizó mediante análisis de la fosforilación de CRKL o SRC en muestras de sangre periférica (7) obtenidas en el punto de partida, a continuación a 4, 8 y 24 horas después de la dosis el día 1.

#### **Ejemplo 2 - procedimientos para evaluar si un paciente tiene un cariotipo cromosómico complejo**

20 En la técnica se conocen una serie de procedimientos para analizar cariotipos cromosómicos. Los siguientes procedimientos no limitantes son abarcados por la presente invención: los procedimientos descritos en Aoun et al., *Can. Gen. and Cyto.* 154: 138-143 (2004); Brazier et al., *Blood* 100(2): 435-41 (2002); Espinoza et al., *Cancer Gen. and Cyto.*, 157: 175-7 (2005); Heller et al., *Int. J. Oncol.*, 24(1):127-36 (2004); Giehl et al., *Leukemia* 19: 1192-1197 (2005); Oudat et al., *Arch. Path. Lab. Medicine*, 125: 437- 439 (2001); Speicher et al. *Nat Genet.* 12(4): 368-75 (1996); y Schröck et al, *Science*; 273 (5274): 494 (1996); todo el contenido de cada una de estas referencias se incorporan por la presente como referencia en su totalidad en este documento.

25 Se proporciona un ejemplo no limitante de cómo puede realizarse dicho análisis de determinación del cariotipo. En resumen, muestras de sangre del paciente se cultivan durante 24-48 horas a 37°C en medio CHANG (Irvine Scientific, Irvine, CA), y a continuación se realiza determinación del cariotipo convencional usando procedimientos de tinción Giemsa o Wright para cromosomas metafásicos, y a continuación se analizan los cromosomas.

30 Se proporciona otro ejemplo no limitante. En resumen, aproximadamente 1 ml de sangre pueden cultivarse en 5 ml de medio RPMI 1640 que contenía el 0,25% p/v de ampicilina, el 0,01% p/v de estreptomycin, el 20 % v/v de suero fetal bovino, 100 ml de fitohemaglutinina y 300 ml de concanavalina A. La mezcla se incubó a continuación a 37°C durante 96 horas (Seabright 1971; Meevatee 1988).

#### **Preparación de linfocitos de sangre periférica y cromosoma**

35 Una cantidad de 100 ml de solución colcemid (0,2 mg/ml) se añade a la mezcla anterior, que a continuación se incubó adicionalmente a temperatura ambiente (30 ± 1°C) durante 30 minutos. La mezcla se centrifuga a 1200 rpm durante 5 minutos.

40 El sobrenadante se retira y a continuación se añadieron 5 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) a las células. La mezcla se centrifuga a 1200 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se retira y a continuación se añadieron 5 ml de solución hipotónica (KCl 0,075 M) para hinchar y lisar las células. La mezcla se centrifuga a 1200 rpm durante 5 minutos. Las células se fijan con 5 ml de fijador Carnoy [metanol/ácido acético (3:1)] y se centrifugan a 1200 rpm durante 5 minutos. La etapa de fijación se repite dos veces. Las células resultantes se mantienen a 4 ± 1°C para bandedo y tinción de cromosomas (Ida y Kyo 1980; Meevatee 1988).

#### **Preparación de bandedo G y tinción de cromosomas**

45 Aproximadamente un mililitro de fijador Carnoy se añade a las células. La mezcla se vierte sobre un portaobjetos limpio y se seca al aire. El portaobjetos se calienta a 90°C y a continuación se sumerge en el 0,25% p/v de soluciones de tripsina durante 15 segundos, se lava con PBS y se seca al aire. El portaobjetos se sumerge en el 10% p/v de Giemsa en solución de tampón fosfato de Sorenson (pH 7) durante 40 minutos y seguido de aclarado con agua destilada (Uwa y Ojima 1981).

#### **Análisis cromosómico**

50 Los portaobjetos de los cromosomas se examinan usando un microscopio óptico (Zeiss Axioskop, Alemania) a 1.000 aumentos con el programa Matrox inspector, versión 2.1. Las metafases de los cromosomas se clasifican, se fotografían y se cuentan. Las metafases representativas se imprimen en papel de alto contraste y los cariotipos se

organizan de acuerdo con la morfología cromosómica, el centrómero, el tamaño y el brazo (Meevatee 1988).

### Ejemplo 3 - Procedimientos ejemplares para detectar mutaciones de quinasa BCR-ABL

N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)4-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida e imatinib son dos potentes inhibidores de quinasa BCR-ABL que son eficaces en el tratamiento de CML y tumores sólidos. En este documento se proporcionan terapias de combinación ejemplares y regímenes de dosificación que serán útiles en el tratamiento de cánceres que son resistentes a agentes inhibidores de tirosina quinasa, tales como imatinib y otros inhibidores de quinasa, y que incluyen específicamente cánceres que implican una o más mutaciones en la quinasa BCR-ABL.

Un aspecto significativo de esta terapia de combinación es la detección de las mutaciones en la quinasa BCR-ABL. Sin una quinasa BCR-ABL mutante de la presente invención está presente en un paciente, esto indica un individuo que puede ser seleccionado para terapia de combinación, o regímenes de dosificación más agresivos (por ejemplo, dosis superiores y/o más frecuentes), o una combinación de régimen de dosificación agresivo y terapia de combinación. Además, si se detecta una quinasa BCR-ABL mutante específica, la cantidad de cualquiera o de ambos inhibidores puede aumentar o reducirse para potenciar el efecto terapéutico del régimen.

Existen varios procedimientos que pueden usarse para detectar una quinasa BCR-ABL mutante en pacientes de cáncer, particularmente pacientes de CML. Estos incluyen procedimientos para detectar polinucleótidos de quinasa BCR-ABL y proteínas de quinasa BCR-ABL, así como procedimientos para identificar células que expresan quinasa BCR-ABL. La detección de cierta quinasa BCR-ABL mutante en un paciente sería diagnóstico de que dichos pacientes son o se volverán al menos parcialmente resistentes a terapia con imatinib o terapia con N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida. Como se describe en detalle a continuación, el estatus de los productos génicos de quinasa BCR-ABL en muestras de pacientes pueden analizarse mediante diversos protocolos bien conocidos en la técnica incluyendo, por ejemplo, análisis inmunohistoquímicos, las diversas técnicas de transferencia de Northern incluyendo hibridación in situ, análisis de RT-PCR (por ejemplo en muestras micro-disecionadas de captura por láser), análisis por transferencia de western, análisis de matrices tisulares, análisis de micromatrices, procedimientos de determinación del genotipo, y procedimientos de espectroscopía de masas.

En la técnica se conocen procedimientos de identificación del ácido nucleico y el aminoácido de una quinasa BCR-ABL mutante.

Una estrategia experimental es usar PCR para amplificar una región del transcrito de BCR-ABL usando cebadores específicos para BCR y ABL, y secuenciar el fragmento de PCR directamente, o subclonar este producto y secuenciar varios clones independientes en ambas direcciones. Esta estrategia permite cuantificar fluctuaciones en diferentes clones del mismo paciente a lo largo del tiempo. Las metodologías típicas para dichos protocolos se proporcionan a continuación.

Pueden obtenerse muestras de sangre de pacientes incluidos en ensayos clínicos en el tratamiento de CML. El ARN se extrae a continuación usando TriAgent o TriAzol. La síntesis de ADNc se realiza usando MMTV transcriptasa inversa. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realiza para amplificar el ADNc, usando cebadores CM10 (5'-GAAGCTTCTCCCTGACATCCGT-3') (SEC ID N° 3) y 3' Abl Long KD (5'-CCCCACGGACGCCTTGTTCCTCCAG-3') (SEC ID N° 4). El fragmento resultante se liga a continuación en pBluescript II KS+ digerido con Eco RV. Los transformantes bacterianos se siembran en medios que contienen ampicilina y X-gal. Diez colonias blancas por ADNc, por ejemplo, se inoculan en los medios y el ADN miniprecitado se aísla. La secuenciación de cada clon se realiza a continuación usando los cebadores M13 directo universal (CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC; SEC ID N° 5) y M13 inverso (AGCGGATAACAATTTACACAGGA; SEC ID N° 6). Una mutación puede considerarse presente si se detectó en ambas cadenas de al menos dos clones independientes por paciente.

Como alternativa, los anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a quinasa BCR-ABL mutante pueden usarse para detectar la presencia de una quinasa BCR-ABL mutante en una muestra. En primer lugar, la quinasa BCR-ABL mutante puede generarse mediante mutagénesis dirigida. Las líneas celulares que expresan estas isoformas de quinasa BCR-ABL mutante se crearán a continuación. A continuación, se producirán anticuerpos contra isoformas de quinasa BCR-ABL mutante. La expresión de la quinasa BCR-ABL y sus isoformas mutantes se documentará mediante análisis de transferencia de Western.

Específicamente, la mutagénesis dirigida puede usarse para crear las mutaciones de quinasa BCR-ABL (QuickChange Kit, Stratagene, La Jolla, CA) y todas las mutaciones se confirmarán mediante secuenciación bidireccional (O'Farrell, A. M., et al., Blood, 101: 3597-3605 (2003)). Se realiza transducción retroviral y se generan líneas celulares Ba/F3 que expresan de forma estable isoformas de quinasa BCR-ABL mutante mediante selección doble para resistencia a G418 y crecimiento independiente de IL-3 (Yee, K. W., et al., Blood, 100: 2941-2949 (2002); Yee, K. W., et al. Blood, 104: 4202-4209 (2004); Tse, K. F., et al., Leukemia, 14: 1766-1776 (2000); Schittenhelm, M. M., et al., manuscrito presentado (2005)). Las transfecciones transitorias de líneas celulares de hámster chino CHO-K1 con quinasa BCR-ABL de tipo silvestre ("WT") o isoformas mutantes se realizan usando un ensayo de lipofección

(LipofectAMINE-kit adquirido de Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células se tratan con N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida 24 horas después de la transfección (Heinrich, M. C, et al. *Journal of Clinical Oncology*, 21: 4342-4349 (2003)). Como alternativa, las células pueden tratarse con cualquiera de las combinaciones indicadas en este documento, o usando mayores niveles de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida.

Un anticuerpo policlonal de conejo anti-quinasa BCR-ABL, un anticuerpo de ratón anti-STAT3 (ambos de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), y anticuerpo (policlonal) de conejo anti-AKT (Cell Signaling Technology, Beverly MA) y un anticuerpo monoclonal de conejo anti-quinasa MAP 1/2 (Erk 1/2) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) pueden usarse a una dilución de 1:5000 a 1:2000. Anticuerpos anti-fosfotirosina BCR-ABL (Tyr568/570 y Tyr703), un anticuerpo anti-fosfotreonina/tirosina MAP quinasa (Thr202/Tyr204), un anticuerpo anti-fosfotreonina (Thr308) y uno anti-fosfoserina (Ser473) AKT, un anticuerpo anti-fosfotirosina (Tyr705) STAT3 y un anticuerpo anti-fosfotirosina inespecífico (clon pY20) se usan a diluciones de 1:100 a 1:2000 (todos de Cell Signaling Technology, Beverly MA). Anticuerpo de cabra anti-ratón y anticuerpo de cabra anti-conejo conjugados a peroxidasa se usarán a diluciones de 1:5000 y 1:10.000 respectivamente (BioRad; Hercules, CA). El reactivo de inmunoprecipitación Protein A/G más-Agarosa puede adquirirse de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Imatinib, N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida, un agente estabilizante de tubulina (por ejemplo, paclitaxol, epotilona, taxano, etc.), y otros agentes útiles en combinación con N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida, se disuelven en DMSO para crear soluciones madre 10 mM y se almacenan a -20°C.

Los ensayos de transferencia de Western pueden realizarse de la siguiente manera.  $\sim 5 \times 10^7$  células se exponen a concentraciones variables de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida y se cultivan durante 90 minutos a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Los sedimentos celulares se lisan con 100-150 µl de tampón de lisis de proteína (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, NP-40 al 1%, desoxicolato al 0,25% con inhibidores añadidos aprotinina, AEBSF, leupeptina, pepstatina, ortovanadato sódico y piruvato sódico). 500-2000 microgramos de proteína de lisados celulares se usan para experimentos de inmunoprecipitación y 75-200 microgramos de proteína de lisados celulares se usan para el análisis de proteínas de sangre completa mediante análisis de inmunotransferencia de western como se ha descrito anteriormente en Hoatlin, M. E., et al., *Blood*, 91: 1418-1425 (1998).

En algunos contextos, puede ser deseable amplificar una región específica en quinasa BCR-ABL tal como uno de los dominios funcionales descritos en este documento. Por ejemplo, la región correspondiente al bolsillo de unión a ATP y el dominio de bucle de activación de BCR-ABL es crítica para la selectividad de imatinib y es la región que se sabe que alberga las mutaciones más resistentes a imatinib e inhibitoras de proteína tirosina quinasa. La secuenciación de esta región puede revelar de la forma más eficaz el perfil clínico de CML de los pacientes y, por lo tanto, la terapia de combinación y/o el régimen de dosificación apropiado.

Sin embargo, en resumen, el ARN se extrae de sangre periférica purificada o células de médula ósea con TriReagent-LS (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, Ohio). El ARN total se somete a RT-PCR usando el mismo protocolo y cebadores que se han descrito anteriormente. Los productos de PCR se clonan en el vector de clonación pCR2.1 TA (Invitrogen, Carlsbad, Calif). Ambas cadenas se secuencian con el cebador 5' M13 inverso y el M13 directo para el fragmento, en un secuenciador de ADN automatizado ABI prism 377 (PE Applied Biosystems, Foster City, Calif). A continuación se realiza el análisis de secuencia usando el algoritmo de alineamiento ClustalW). Cualquier mutación detectada se confirma a continuación mediante análisis del ADN genómico. En resumen, el ADN genómico se extrae de médula ósea purificada o células de sangre periférica con el kit QiaAMP Blood Mini Kit (Qiagen, Inc., Valencia, Calif.) usando cebadores específicos a secuencias de intrón que flanquean ambos lados de la ubicación de la mutación de interés. Los productos de PCR se clonan y se secuencian.

Procedimientos adicionales de detección de quinasa BCR-ABL mutantes se describen en O'Hare et al. (*Cancer Research*, 65(11): 4500-5 (2005).

#### **Ejemplo 4 - Procedimiento ejemplar de evaluación del potencial de la terapia de combinación**

La combinación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida e imatinib puede estudiarse en modelos en ratón de enfermedad dependiente de BCR-ABL resistente a imatinib o resistente al inhibidor de proteína tirosina quinasa. Una serie de dichos experimentos farmacodinámicos ayudará a determinar el régimen de dosificación óptimo para diferentes isoformas de BCR-ABL mutante in vivo. Los experimentos farmacodinámicos se conocen bien en la técnica y un especialista en la técnica apreciaría fácilmente que dichos experimentos pueden modificarse para alterar las condiciones existentes, según sea aplicable. En resumen, a ratones inmunodeficientes graves combinados se les inyecta por vía intravenosa células Ba/F3 que expresan diferentes isoformas de BCR-ABL de tipo silvestre o mutantes así como el gen de luciferasa de luciérnaga. Se espera que ratones no tratados que albergan células Ba/F3 que expresan BCR-ABL no mutantes o mutantes resistentes a imatinib desarrollen enfermedad agresiva, con infiltración en hígado y esplénica masiva, que típicamente da como resultado la muerte. Para evaluar la capacidad de la terapia de combinación, o un régimen de dosificación modificado, de inhibir BCR-ABL in vivo, se evaluará la actividad de quinasa BCR-ABL en lisados de esplenocitos preparados en diversos puntos temporales después de la administración de una única dosis

diferente de 0, 0,5, 1, 5, y 10 micromoles por litro de combinación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida e imatinib mediante introducción mediante sonda oral. La fosforilación de la proteína adaptadora CRKL, un conocido sustrato de BCR-ABL (T. Oda et al, J. Biol. Chem. 269, 22925 (1994)), se monitorizará para calibrar la eficacia de la terapia de combinación. En base a una serie de dichos experimentos farmacodinámicos, una dosis apropiada de la combinación se seleccionará para estudios de eficacia. A continuación, los ratones se documentarán mediante formación de imágenes de bioluminiscencia antes y después de la dosificación. En base a una serie de dichos experimentos farmacodinámicos, el régimen de dosificación y/o la terapia de combinación óptimas pueden identificarse. A los ratones se les administran dosis de combinación o vehículo en solitario mediante introducción mediante sonda durante 2 semanas, comenzando 3 días después de la inyección de células Ba/F3, y la carga de enfermedad se evalúa a continuación mediante formación de imágenes mediante bioluminiscencia. Se espera que todos los ratones tratados con vehículo desarrollen enfermedad en avance. Por el contrario, se espera que los ratones tratados con combinación que albergan BCR-ABL no mutante o las mutaciones clínicamente comunes resistentes a imatinib e inhibidor de proteína tirosina quinasa descritas en este documento desarrollen menos o no desarrollen enfermedad en avance. También se espera que diferentes regímenes de dosificación óptimos se identifiquen para diferentes isoformas de BCR-ABL. Dicha diferencia de dosificación puede tenerse en consideración en el tratamiento de pacientes con una mutación o mutaciones de BCR-ABL conocidas.

#### **Ejemplo 5 - Procedimiento ejemplar de evaluación de la seguridad y la eficacia de terapia de combinación de proteína tirosina quinasa y/o regímenes de dosificación modificados**

Descubrimientos previos han demostrado que tanto N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida como imatinib son altamente selectivos para células hematopoyéticas leucémicas frente a normales (B. J. Druker et al, Nature Med. 2. 561 (1996) y N. P. Shah et al, Science 305. 399 (2004)). Dicha alta selectividad demuestra la alta seguridad y eficacia de estos inhibidores, y la eficacia esperada de su combinación. Para evaluar la eficacia de la combinación sobre progenitoras de médula ósea humana, los compuestos se ensayan in vitro en ensayos de unidad formadora de colonias (CFU). Una serie de concentraciones de combinación de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida e imatinib, u otras combinaciones descritas en este documento, se aplican a progenitoras de médula ósea aisladas de voluntarios sanos y de pacientes de CML con enfermedad sensible a imatinib (BCR-ABL no mutante) o resistente a imatinib. Además, las colonias de eritroides formadores de blastocitos (BFU-E) y de granulocito-monocito CFU (GM) de muestra de médula ósea de paciente de CML se analizarán mediante análisis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar la sensibilidad de selección por el crecimiento de progenitores normales raras presentes en estas muestras de médula leucémica. En resumen, la médula ósea se recoge de sujetos clínicos. Células mononucleadas purificadas en Ficoll-Hypaque, congeladas viables se recogen y se cultivan durante una noche en medio de Iscove suplementado con suero fetal de ternero al 10%, 1-glutamina, pen-estrep, y factor de células madre (100 µg/ml) a una densidad de  $5 \times 10^5$ /ml. Después de 24 horas, las células viables se cuantifican y se siembran en medio Methocult (Cell Signal Technologies, Beverly, MA) a  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$  células por placa en presencia de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida 5 nM o vehículo. Los experimentos se realizan por triplicado. El día 11, se cuantificarán la unidad formadora de blastocitos eritroides (BFU-E) y las unidades formadoras de colonias de granulocitos-macrófagos (CFU-GM). El día 14, las colonias se aislarán con la punta de una pipeta, y el ARN se aislará usando un kit Qiagen Rneasy. Un cebador complementario a la región de ABL aproximadamente 200 nucleótidos aguas abajo de la unión del ARNm de BCR-ABL (5'-CGGCATTGCGGGACACAGGCCCATGGTACC; SEC ID N° 7) se hibrida con ARN purificado. El ADNc se sintetiza usando transcriptasa inversa del virus de leucemia Moloney de ratón (MMLV), y sometiendo a 40 ciclos de PCR usando un cebador de BCR (5'-TGACCAACTCGTGTGTGAAACT; SEC ID N° 8) o uno de ABL de tipo la 5' (GGGGAATTCGCCACCATGTTGGAGATCTGCCTGA; SEC ID N° 9) como control para la calidad del ARN.

#### **Ejemplo 6 - Procedimientos ejemplares para la medición de la actividad de quinasa BCR-ABL mediante el contenido de fosfotirosina de Crkl**

La capacidad de una terapia de combinación o régimen de dosificación más agresivo de la presente invención para superar eficazmente la resistencia a N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida o imatinib, para inhibir la actividad de BCR-ABL, o para inhibir la actividad de BCR-ABL mutante, puede usarse el contenido de fosfotirosina de Crkl, una proteína adaptadora que es fosforilada de forma específica y constitutiva por BCR-ABL en células con CML (véase, por ejemplo J. ten Hoeve et al., Blood 84, 1731 (1994); T. Oda et al, J. Biol. Chem. 269, 22925 (1994); y G. L. Nichols et al., Blood 84, 2912 (1994)). El contenido de fosfotirosina de Crkl ha demostrado medirse de forma reproducible y cuantitativa en muestras clínicas. Crkl se une a BCR-ABL directamente y juega un papel funcional en la transformación de BCR-ABL uniendo la señal de quinasa a rutas efectoras aguas abajo (véase, por ejemplo K. Senechal et al., J. Bio. Chem. 271, 23255 (1996)). Una vez fosforilada, Crkl migra con movilidad alterada en geles de SDS-PAGE y puede cuantificarse usando densitometría. Sawyers et al han demostrado que la fosforilación de Crkl en células del paciente con CML primarias se inhibía de una manera dependiente de la dosis cuando se expone a STI-571 y se correlaciona con la desfosforilación de BCR-ABL. Del mismo modo, también se ha mostrado que la fosforilación de Crkl se inhibía de manera dependiente de la dosis cuando se expone a N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-2-

metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida (no se muestran los datos). Por lo tanto, dicho ensayo de Crkl permitirá una evaluación de la actividad enzimática de la proteína BCR-ABL de una forma reproducible, cuantitativa y será un medio útil de evaluación de la capacidad de una terapia de combinación o régimen de dosificación más agresivo de la presente invención para superar eficazmente la resistencia a imatinib, para inhibir la actividad de BCR-ABL, o para inhibir la actividad de BCR-ABL mutante.

En resumen, las células se lisan en tampón Triton X-100 al 1% con inhibidores de proteasa y fosfatasa (véase, por ejemplo A. Goga et al., Cell 82, 981 (1995)). Cantidades iguales de proteínas, según lo determinado mediante el ensayo de proteínas BioRad DC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.), se separan mediante SDS-PAGE, se transfieren a nitrocelulosa y se inmunotransfieren con anticuerpo para fosfotirosina (4G10, Upstate Biotechnologies, Lake Placid, N.Y.), Anticuerpo para Abl (pex5, (véase, por ejemplo A. Goga et al., Cell 82, 981 (1995)), anticuerpo para  $\beta$ -actina (Sigma Chemicals, St. Louis, Mo.) o antisuero de Crkl (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Las bandas inmunorreactivas se visualizan mediante ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ.). Se obtienen varias exposiciones para asegurar un intervalo lineal de intensidad de la señal. Las exposiciones óptimas se cuantifican mediante densitometría usando el software ImageQuant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, Calif.).

#### **Ejemplo 7 - Procedimientos para examinar la amplificación del gen de BCR-ABL en células de mamífero**

Se proporciona un procedimiento adicional de evaluación de la capacidad de una terapia de combinación o régimen de dosificación más agresivo de la presente invención para superar eficazmente la resistencia a imatinib, para inhibir la actividad de BCR-ABL, o para inhibir la actividad de BCR-ABL mutante. Específicamente, pueden realizarse experimentos de hibridación in situ fluorescente de doble color (FISH) para determinar si la amplificación génica de BCR-ABL disminuye eficazmente. Esto último se basa en la apreciación en la técnica de que se observa amplificación de BCR-ABL en pacientes resistentes a imatinib y resistentes al inhibidor de proteína tirosina quinasa. En resumen, se preparan células en interfase y metafase (véase, por ejemplo E. Abruzzese et al, Cancer Genet. Cytogenet. 105, 164 (1998)) y se examinaron usando la sonda de translocación de color doble Identificadora Específica de Locus (LSI) de BCR-ABL (Lysis, Inc., Downers Grove, 111.). La caracterización citogenética y por FISH de las extensiones de metafase puede observarse para evaluar si está presente un cromosoma Ph- duplicado invertido con amplificación intersticial del gen de fusión de BCR-ABL.

Como alternativa, puede usarse análisis de PCR cuantitativa del ADN genómico obtenido de pacientes para evaluar si está presente la amplificación génica de BCR-ABL. En resumen, puede extraerse ADN genómico de médula ósea purificada o células de sangre periférica con el kit QiaAMP Blood Mini Kit (Qiagen, Inc., Valencia, Calif.). 10 ng de ADN genómico total se someten a análisis por PCR en tiempo real con el sistema iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.). Un fragmento de ADNc de 361 pb que incluye el exón 3 de ABL se amplifica usando dos cebadores (5'-GCAGAGTCAGAATCCTTCAG-S' (SEC ID N° 10) y 5'-TTTGTA AAAAGGCTGCCCGGC-3' (SEC ID N° 11)) que son específicos para las secuencias de los intrones 5' y 3' del exón 3 de ABL, respectivamente. Un fragmento de ADNc de 472 pb de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se amplifica usando dos cebadores (5'-TTCACCACCATGGAGAAGGC-3' (SEC ID N° 12) y 5'-CAGGAAATGAGCTTGACAAA-3' (SEC ID N° 13)) que son específicos para secuencias en el exón 5 y el exón 8 de GAPDH, respectivamente. Las veces de aumento en el número de copias de ABL puede determinarse calculando la diferencia entre los números de ciclo umbral de ABL y GAPDH para cada muestra (DCt). Puede usarse un control como muestra de referencia, el DCt de cada muestra puede restarse del DCt de control para determinar el D(DCt). Las veces de aumento se calculan a continuación como 2-D(DCt).

#### **Ejemplo 8 - Procedimientos aceptados en la técnica para medir propiedades enzimológicas y biológicas de mutantes de BCR-ABL**

Diversos ensayos para medir las propiedades enzimológicas de proteína quinasas tales como Abl se conocen en la técnica, por ejemplo los descritos en Konopka et al., Mol Cell Biol. Noviembre de 1985; 5(11): 3116-23; Davis et al., Mol Cell Biol, enero de 1985; 5(1): 204-13; y Konopka et al., Cell. Jul. 1, 1984; 37(3): 1035-42 cuyos contenidos se incorporan en este documento como referencia. Usando dichos ensayos el especialista en la técnica puede medir las propiedades enzimológicas de proteína quinasas BCR-ABL mutantes y evaluar la capacidad de una terapia de combinación o régimen de dosificación más agresivo de la presente invención para superar eficazmente la resistencia a imatinib, para inhibir la actividad de BCR-ABL, o para inhibir la actividad de BCR-ABL mutante.

Diversos bioensayos para medir las actividades transformantes de proteína quinasas tales como Abl se conocen en la técnica, por ejemplo los descritos en Lugo et al., Science. 2 de marzo de 1990; 247(4946): 1079-82; Lugo et al., Mol Cell Biol. Marzo de 1989; 9(3): 1263-70; Klucher et al., Blood. 15 de mayo de 1998; 91(10): 3927-34; Renshaw et al., Mol Cell Biol. Marzo de 1995; 15(3): 1286-93; Sitard et al., Blood. 15 de marzo de 1994; 83(6): 1575-85; Laneuville et al., Cancer Res. Mar. 1, 1994; 54(5): 1360-6; Laneuville et al., Blood. 1 de octubre 1992; 80(7): 1788-97; Mandanas et al., Leukemia. Agosto de 1992; 6(8): 796-800; y Laneuville et al., Oncogene. Febrero de 1991; 6(2): 275-82 cuyos contenidos se incorporan en este documento como referencia. Usando dichos ensayos el especialista en la técnica puede medir el fenotipo de proteína quinasas BCR-Abl mutantes.

Procedimientos adicionales se describen en O'Hare et al. (Cancer Research, 65(11): 4500-5 (2005), que se incorpora por la presente como referencia en su totalidad.



TABLA 1

Características de partida				
	AP-CML n=11	MBC-CML n=23	LBC-CML/ Ph+ ALL n=10	Total N=44
Varón - n (%)	3 (27)	14 (61)	9 (90)	26 (59)
Mujer - n (%)	8 (73)	9 (39)	1 (10)	18 (41)
Edad - años				
Mediana	63	53	50	53
Intervalo	40-73	30-70	15-73	15-73
Recuento de leucocitos - células/mm <sup>3</sup>				
Mediana	20,6	20,5	11,6	19,6
Intervalo	1,3-107,7	0,3-117,3	1,2-197,6	0,3-197,6
Recuento de plaquetas - células/mm <sup>3</sup>				
Mediana	279	39	40,5	42,5
Intervalo	4-1710	7-1057	22-375	4-1710
Historial de enfermedad				
Duración de la enfermedad - meses				
Mediana	67	44	26	46
Intervalo	22-139	5-216	9-70	5-216
Antes de CHR con imatinib-n(%)	8 (73)	15 (65)	9 (90)	32 (73)
Antes de CHR en imatinib-n(%)	4 (36)	5 (22)	3 (30)	12 (27)
Historial del tratamiento				
Antes de BMT - n (%)	0 (0)	5 (22)	5 (50)	10 (23)
Antes de la quimioterapia - n (%)	4 (36)	15 (65)	9 (90)	18 (64)
Resistente a imatinib - n (%)	9 (82)	22 (96)	9 (90)	40 (91)
Intolerante a imatinib - n (%)	2 (18)	1 (4)	1 (10)	4 (9)
Máximo antes de la dosis de imatinib - n (%)				
400-600 mg/día	4 (36)	10 (43)	3 (30)	17 (39)
>600 mg/día	7 (64)	13 (57)	7 (70)	27 (61)
Estatus de mutación de BCR-ABL - n (%)	8 (73)	13 (57)	6 (60)	27 (61)

**TABLA 2A**  
**Mielosupresión en estudio**

	Grado 3			Grado 4		
	AP (N=11)	MBC (N=23)	LBC/Ph+ALL (N=10)	AP-CML (N=11)	MBC (N=23)	LBC/Ph+ALL (N=10)
ANC $\phi$	3 (27)	2 (9)	2 (20)	6 (55)	20 (87)	6 (60)
Plaquetas*	3 (27)	2 (9)	0	6 (55)	17 (74)	7 (70)

$\phi$  El pretratamiento de la neutropenia de grado 3/4 se produjo en el 18% de AP, el 30% de MBC y el 20% de LBC/Ph+ALL

\* El pretratamiento de la trombocitopenia de grado 3/4 se produjo en el 27% de AP, el 60% de MBC y el 70% de LBC/Ph+ALL

**TABLA 2B**  
**Sucesos adversos no hematológicos significativos**

5

	Grado 1-4			Grado 3-4		
	AP (N=11)	MBC (N=23)	LBC/ ALL (N=10)	AP (N=11)	MBC (N=23)	LBC/ ALL (N=10)
Diarrea	5 (45)	5 (22)	2 (20)	-	1 (4)	-
Vómitos	1 (9)	2 (9)	1 (10)	-	-	-
Náusea	1 (9)	4 (17)	1 (10)	-	-	-
Hemorragia rectal	-	2 (9)	-	-	2 (9)	-
Efusión pleural	-	8 (35)	2 (20)	-	3 (13)	-
Edema periférico	3 (27)	5 (22)	1 (10)	-	-	-
Edema periorbital	1 (9)	2 (9)	1 (10)	-	-	-
Efusión pericárdica	-	3 (13)	-	-	2 (9)	-
Edema generalizado	1 (9)	-	1 (10)	-	-	-
Disnea/edema pulmonar	3 (27)	2 (9)	1 (10)	-	2 (9)	-
Sarpullido	5 (45)	2 (9)	1 (10)	-	-	-
Eritema	3 (27)	1 (4)	-	-	-	-
Dolor de cabeza	3 (27)	1 (4)	-	-	-	-
Síndrome de lisis tumoral	-	2 (9)	-	-	2 (9)	-

\* Las anomalías de laboratorio se presentan en la Tabla suplementaria 3

TABLA 3

Respuesta al tratamiento				
	AP-CML n=11	MBC-CML n=23	LBC-CML/ Ph+ ALL n=10	Total N=44
Respuesta hematológica				
HR principal	9 (81)	14 (61)	8 (80)	31 (70)
CHR	5 (45)	8 (35)	7 (70)	20 (45)
NEL	4 (16)	6 (26)	1 (10)	11 (25)
HR secundaria	-	4 (17)	-	4 (9)
Respuesta citogenética				
CyR global	4 (36)	12 (52)	9 (90)	2 (57)
CyR principal	3 (27)	8 (35)	8 (80)	19 (43)
CCyR	2 (18)	6 (26)	3 (30)	11 (25)
PCyR	1 (9)	2 (9)	5 (50)	8 (18)
CyR secundaria	-	2 (9)	1 (10)	3 (7)
CyR mínima	1 (9)	2 (9)	-	3 (7)
<p>La HR principal se define como blastocitos en médula ósea &lt;5% y tiene dos subgrupos: CHR y NEL. CHR = respuesta hematológica completa (&lt;5% de blastos en médula ósea y vuelta de la sangre periférica a parámetros normales): NEL = sin pruebas de leucemia (igual que la CHR, pero sin recuperación hematopoyética de los parámetros de la sangre periférica).</p> <p>CyR = respuesta citogenética; CCyR = CyR completa (0% de Ph+); PCyR = CyR parcial (1-35% de Ph+). CyR global = CCyR + PCyR + CyR secundaria + CyR mínima.</p> <p>Un paciente de LBC/pH+ALL tenía una PCyR con 3/30 metafases de Ph+ después de 4 semanas de dasatinib pero tenía un 91% de blastocitos en la médula ósea</p>				

## TABLA SUPLEMENTARIA 1

## Criterios de respuesta hematológica

## 5 I. Respuesta hematológica principal (HR principal)

## a) Respuesta hematológica completa (CHR)

- 1) WBC  $\leq$  ULN institucional
- 2) ANC  $\geq$  1000/mm<sup>3</sup>
- 3) Plaquetas  $\geq$  100.000/ mm<sup>3</sup>
- 10 4) Sin blastocitos ni promielocitos en sangre periférica
- 5) blastocitos de médula ósea  $\leq$  5%
- 6) < 5% de mielocitos más metamielocitos en sangre periférica
- 7) Basófilos en sangre periférica < 20%
- 8) Sin implicación extramedular (incluyendo sin hepatomegalia ni esplenomegalia)

## 15 b) Sin pruebas e leucemia (NEL)

- 1) WBC  $\leq$  ULN institucional
- 2) Sin blastocitos ni promielocitos en sangre periférica
- 3) blastocitos de médula ósea  $\leq$  5%
- 4) < 5% de mielocitos más metamielocitos en sangre periférica
- 20 5) Basófilos en sangre periférica < 20%
- 6) Sin implicación extramedular (incluyendo sin hepatomegalia ni esplenomegalia)
- 7) Al menos uno de los siguientes: (i) 20.000/mm<sup>3</sup>  $\leq$  Plaquetas < 100.000/mm<sup>3</sup>; (ii) 500/mm<sup>3</sup>  $\leq$  ANC >

1000/mm<sup>3</sup>

**II. Respuesta hematológica secundaria (HR secundaria)**

5

- 1) < 15% de blastocitos en médula ósea y en sangre periférica
- 2) > 30% de blastos más promielocitos en médula ósea y > 30% de blastos más promielocitos en sangre periférica
- 3) < 20% de basófilos en sangre periférica
- 4) Sin implicación extramedular diferente del bazo y el hígado

**TABLA SUPLEMENTARIA 2**

10

**Parámetros hematológicos de partida antes del tratamiento con dasatinib**

	Grado 3			Grado 4		
	AP	MBC	LBC/Ph+ALL	AP-CML	MBC	LBC/Ph+ALL
	(N=11)	(N=23)	(N=10)	(N=11)	(N=23)	(N=10)
ANC	1 (9)	3 (13)	1 (10)	1 (9)	4 (17)	1 (10)
Plaquetas	1 (9)	7 (30)	5 (50)	2 (18)	7 (30)	2 (20)
Hgb	0	6 (26)	0	0	0	0

**TABLA SUPLEMENTARIA 3**

**Anormalidades de laboratorio independientemente de la relación con el tratamiento**

	Grado 1-4			Grado 3-4		
	AP	MBC	LBC/ ALL	AP	MBC	LBC/ ALL
	(N=11)	(N=23)	(N=10)	(N=11)	(N=23)	(N=10)
AST elevada	7 (64)	13 (57)	9 (90)		2 (7)	
ALT elevada	8 (73)	13 (57)	7 (70)	1 (9)	2 (7)	
Bilirrubina total elevada	2 (18)	10 (43)	5 (50)		4 (17)	
Creatinina elevada	2 (18)	12 (52)	6 (60)			
Hipocalcemia	8 (73)	21 (91)	7 (70)	2 (18)	6 (26)	3 (30)
Hipomagnesemia	5 (45)	26 (70)	3 (30)		1 (4)	

15

**TABLA SUPLEMENTARIA 4**

**Datos del paciente individual**

Número de paciente	Razón para la interrupción de imatinib	Mejor respuesta hematológica en dasatinib	Mejor respuesta citogenética en dasatinib	Mutaciones pretratamiento Número de clones positivos/clones totales examinados
AP-1	resistente	CHR	ninguna	Ninguna
AP-2	resistente	CHR	ninguna	M351T 6/10 M351A 1/10
AP-3	resistente	ninguna	ninguna	T351I 8/10
AP-4	resistente	CHR	CCyR	G250E 5/8 G250E/E450G 1/8 G250E/E453G 1/8
AP-5	intolerante	NEL	mínima	Y253H 1/11

(Continuación)

Número de paciente	Razón para la interrupción de imatinib	Mejor respuesta hematológica en dasatinib	Mejor respuesta citogenética en dasatinib	Mutaciones pretratamiento Número de clones positivos/clones totales examinados
AP-6	intolerante	NEL	ninguna	Ninguna
AP-7	resistente	CHR	parcial	Ninguna
AP-8	resistente	ninguna	ninguna	T351I 10/10
AP-9	resistente	NEL	ninguna	E355G 6/10 E355G/L324Q 1/10 L324Q 3/10
AP-10	resistente	NEL	CCyR	E279K 3/11 V379I 5/11 V379I/F317I/M351T 1/11
AP-11	resistente	CHR	ninguna	G250E/E138G/I242T/K271R/V338M 3/12 G250E/E138G/I242T/K271R 1/12 G250E/I242T/K271R/V338M/N146S 1/12 N146S otra 7/12
MBC-1	resistente	CHR	secundaria	Ninguna
MBC-2	resistente	CHR	secundaria	V379I 9/10
MBC-3	resistente	CHR	CCyR	Ninguna
MBC-4	resistente	ninguna	ninguna	M244V 1/11
MBC-5	resistente	CHR	CCyR	M351T 10/10
MBC-6	resistente	NEL	ninguna	Ninguna
MBC-7	resistente	CHR	CCyR	G250E 1/10 D276G 1/10
MBC-8	resistente	CHR	CCyR	Ninguna
MBC-9	resistente	secundaria	mínima	G250E 11/11
MBC-10	resistente	secundaria	ninguna	Ninguna
MBC-11	resistente	ninguna	ninguna	F486S 1/11
MBC-12	intolerante	NEL	ninguna	Ninguna
MBC-13	resistente	ninguna	ninguna	F359V 1/10
MBC-14	resistente	secundaria	ninguna	E255V 10/12 E292V 2/12
MBC-15	resistente	NEL	CCyR	F359V 9/12 F359V/Q252R 1/12 L273M 2/12
MBC-16	resistente	secundaria	secundaria	Ninguna
MBC-17	resistente	CHR	CCyR	N49S 2/11
MBC-18	resistente	CHR	parcial	G250E 8/11 G250E/S126P 2/12 G250E/F486S 1/12
MBC-19	resistente	NEL	ninguna	M244V/L364I 5/11 M244V/L364I/N53S 2/11 M244V/L364I/M458T 1/11 L364I/M458T 1/11 L364I 2/11
MBC-20	resistente	NEL	mínima	Ninguna
MBC-21	resistente	NEL	parcial	Ninguna
MBC-22	resistente	ninguna	ninguna	F359V 9/10
MBC-23	resistente	ninguna	ninguna	Ninguna
LBC-1	resistente	CHR	parcial	C100R 2/10 F486S 1/10
LBC-2	resistente	CHR	parcial	E355G 10/10
LBC-3	resistente	CHR	parcial	Ninguna
LBC-4	resistente	CHR	CCyR	Ninguna
LBC-5	intolerante	CHR	CCyR	Ninguna
ALL-1	resistente	ninguna	parcial	Y253H 3/11 inserto de RN en 293-294 8/11
ALL-2	resistente	CHR	parcial	M244V 1/11

(Continuación)

Número de paciente	Razón para la interrupción de imatinib	Mejor respuesta hematológica en dasatinib	Mejor respuesta citogenética en dasatinib	Mutaciones pretratamiento Número de clones positivos/clones totales examinados
ALL-3	resistente	CHR	CCyR	Y253H 9/10 Y253H/Q252R 1/10
ALL-4	resistente	ninguna	ninguna	E255K 3/12
ALL-5	resistente	NEL	Secundaria	ninguna

Se señalan mutaciones si están presentes en al menos 2/10 clones en el mismo paciente. Las mutaciones señaladas anteriormente en la bibliografía por otorgar resistencia a imatinib se señalaron si se detectaba al menos un clon.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para determinar la sensibilidad de un individuo con un trastorno asociado a BCR-ABL al tratamiento con N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, que comprende:

5 cribar una muestra biológica de dicho individuo en busca de la presencia de un cariotipo complejo; en el que la presencia de dicho cariotipo es indicativa de que el individuo es al menos parcialmente resistente a terapia con N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma,  
 10 en el que un cariotipo complejo es un cariotipo que incluye anomalías cromosómicas además de la presencia de un cromosoma Filadelfia.

2. Un procedimiento de determinación de un régimen de tratamiento para un individuo que padece un trastorno asociado a BCR-ABL que comprende:

15 determinar si una muestra biológica obtenida del individuo tiene un cariotipo complejo, en el que la presencia de dicho cariotipo es indicativa de que el paciente es al menos parcialmente resistente a terapia con N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma; y

20 recomendar la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, al individuo  
 en el que un cariotipo complejo es un cariotipo que incluye anomalías cromosómicas además de la presencia de un cromosoma Filadelfia.

3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la tiazolcarboxamida, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma se administra a una dosificación superior a 70 mg dos veces al día si se determina que la muestra biológica tiene un cariotipo complejo.

25 4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la tiazolcarboxamida, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma se administra en combinación con una segunda terapia para tratar el trastorno asociado a proteína tirosina quinasa en el individuo.

30 5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la segunda terapia es un agente estabilizante de tubulina, un inhibidor de farnesil transferasa, un inhibidor de Rab-GGTasa, un inhibidor de BCR-ABL T315I, un segundo inhibidor de proteína tirosina quinasa, o una combinación de los mismos.

6. El uso de un kit en la determinación de una estrategia de tratamiento para un individuo con un trastorno asociado a BCR-ABL, comprendiendo el kit:

un medio para determinar si una muestra biológica obtenida de dicho individuo tiene un cariotipo complejo,  
 35 en el que dicha estrategia de tratamiento comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma,  
 en el que un cariotipo complejo es un cariotipo que incluye anomalías cromosómicas además de la presencia de un cromosoma Filadelfia.

7. Un kit que comprende:

40 un medio para determinar si una muestra biológica obtenida de dicho individuo tiene un cariotipo complejo; y una cantidad terapéuticamente eficaz de N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma,  
 en el que un cariotipo complejo es un cariotipo que incluye anomalías cromosómicas además de la presencia de un cromosoma Filadelfia.

45

Tiempo hasta la recaída para sujetos con una respuesta hematológica

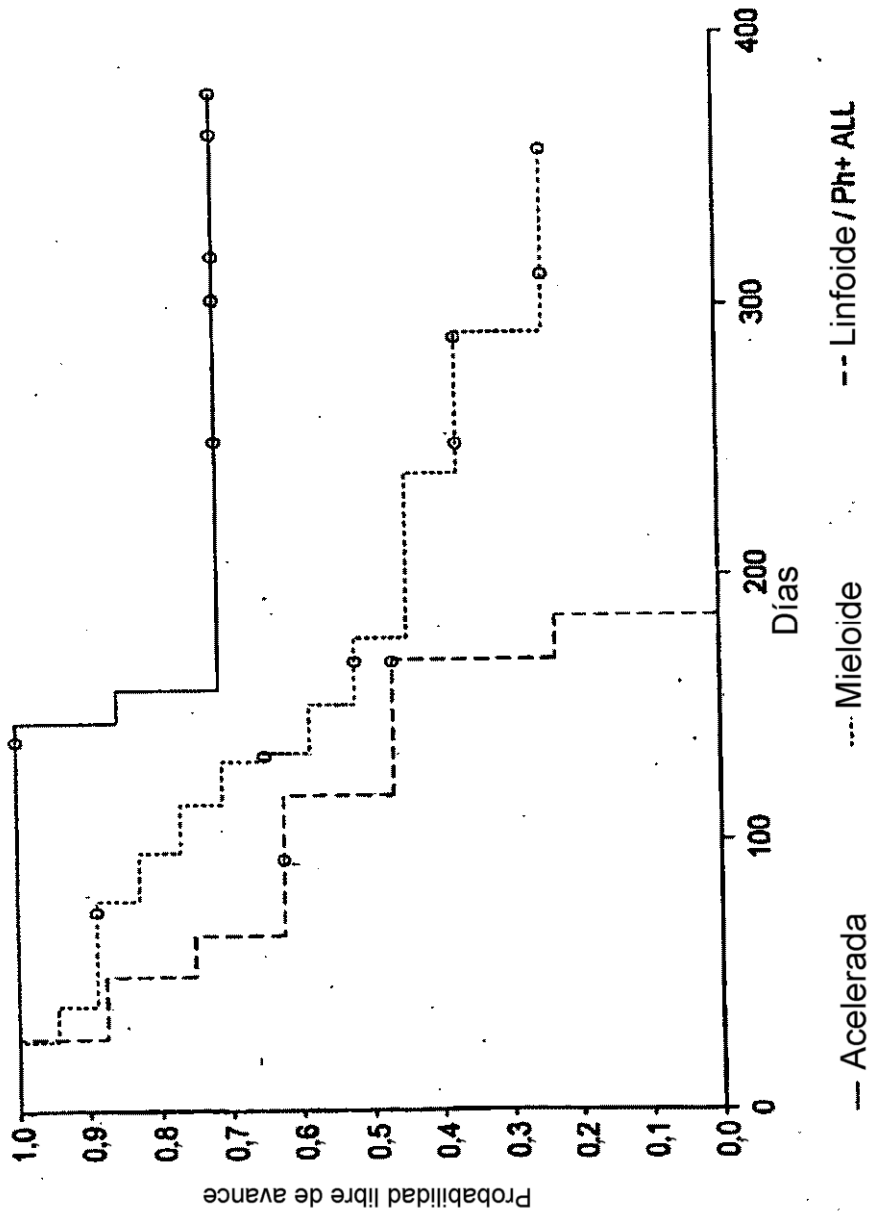
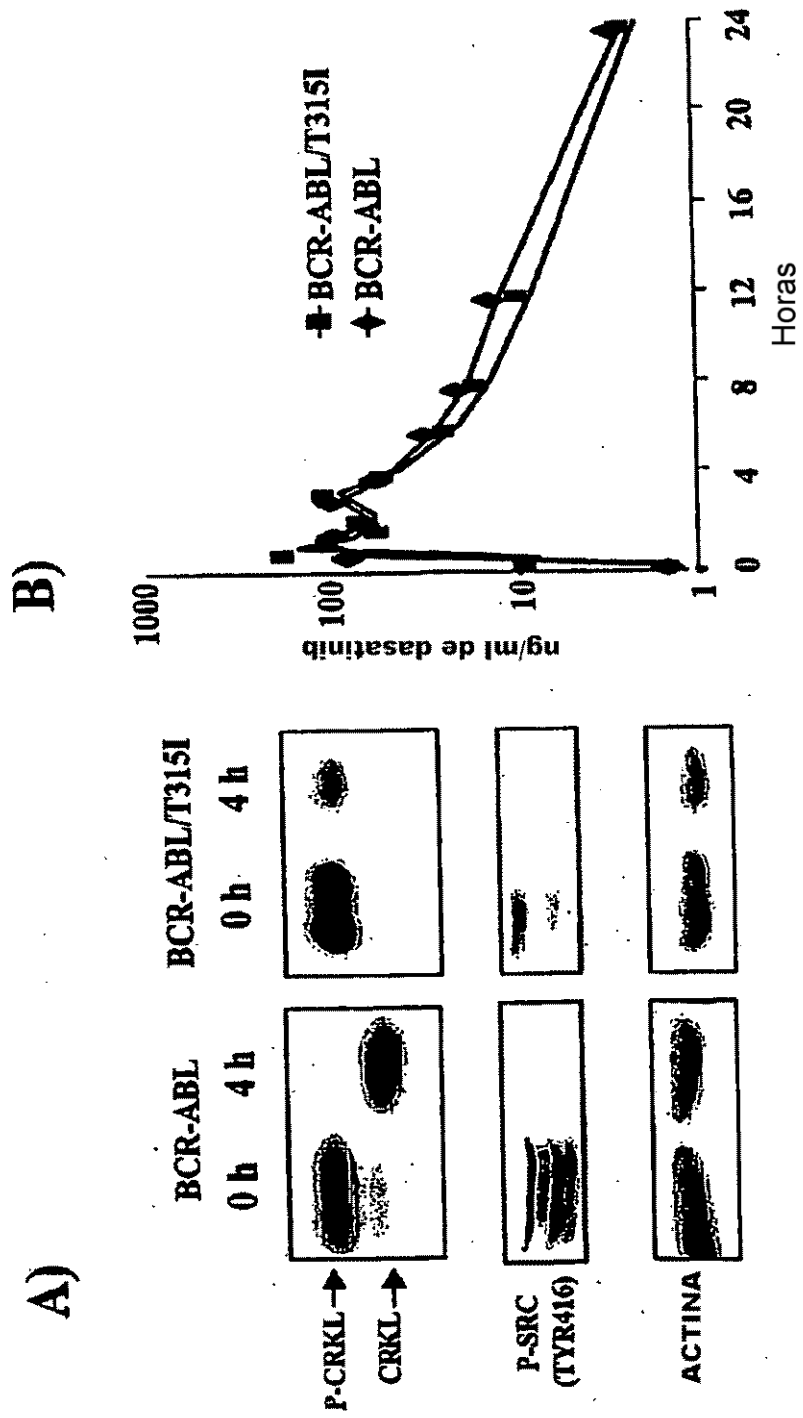
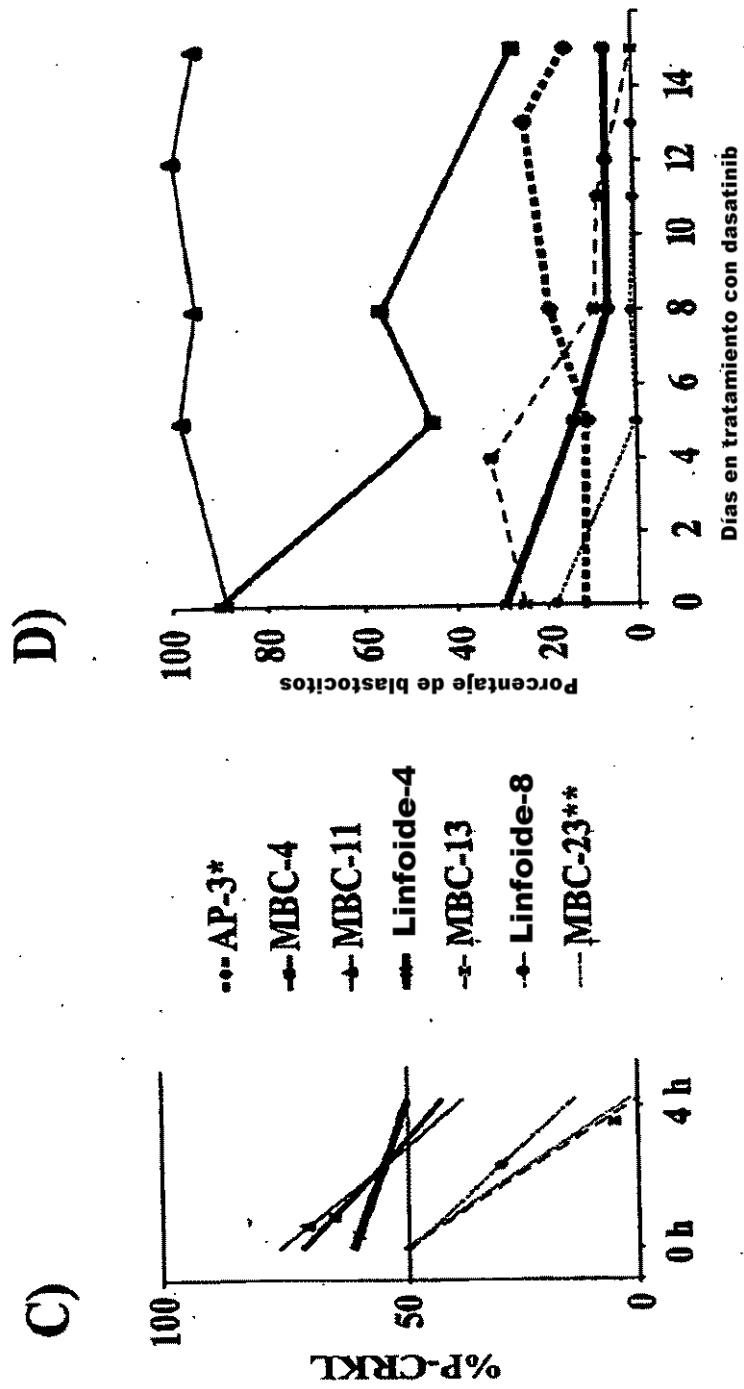


FIG. 1





**FIG. 2-1**



**FIG. 2-2**

FIG. 3A

1	ATGTTGGAGATCTGCCTGAAGCTGGTGGGCTGCAAAATCCAAGAAGGGGCTGTCTCTCGTCC	60
1	M L E I C L K L V G C K S K K G L S S S	20
61	TCCAGCTGTTATCTGGAAGAAGCCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGACTTTGAGCCTCAG	120
21	S S C Y L E E A L Q R P V A S D F E P Q	40
121	GGTCTGAGTGAAGCCGCTCGTTGGAAGTCCAAGGAAAACCTTCTCGCTGGACCCAGTGAA	180
41	G L S E A A R W N S K E N L L A G P S E	60
181	AATGACCCCAACCTTTTCCTTGCAGCTGTATGATTTTGTGGCCAGTGGAGATAACACTCTA	240
61	N D P N L F V A L Y D F V A S G D N T L	80
241	AGCATAACTAAAGGTGAAAAGCTCCGGGTCTTAGGCTATAATCACAATGGGGAATGGTGT	300
81	S I T K G E K L R V L G Y N H N G E W C	100
301	GAAGCCCAACCAAAAATGCCAAGGCTGGGTCCCAAGCAACTACATCACGCCAGTCAAC	360
101	E A Q T K N G Q G W V P S N Y I T P V N	120
361	AGTCTGGAGAAACACTCCTGGTACCATGGGCCTGTGTCCCGCAATGCCGCTGAGTATCCG	420
121	S L E K H S W Y H G P V S R N A A E Y P	140
421	CTGAGCAGCGGATCAATGGCAGCTTCTTGGTGGCGTGAGAGTGAGAGCAGTCCTAGCCAG	480
141	L S S G I N G S F L V R E S E S S P S Q	160
481	AGGTCCATCTCCTGAGATACGAAGGGAGGGTGTACCATTACAGGATCAACACTGCTTCT	540
161	R S I S L R Y E G R V Y H Y R I N T A S	180
541	GATGGCAAGCTCTACGTCTCCTCCGAGAGCCGCTTCAACACCCTGGCCGAGTTGGTTCAT	600
181	D G K L Y V S S E S R F N T L A E L V H	200
601	CATCATTCAACGGTGGCCGACGGGCTCATCACCACGCTCCATTATCCAGCCCCAAAGCGC	660
201	H H S T V A D G L I T T L H Y P A P K R	220
661	AACAAGCCCACTGTCTATGGTGTGTCCCCCAACTACGACAAGTGGGAGATGGAACGCACG	720
221	N K P T V Y G V S P N Y D K W E M E R T	240
721	GACATCACCATGAAGCACAAAGCTGGGCGGGGGCCAGTACGGGGAGGTGTACGAGGGCGTG	780
241	D I T M K H K L G G G Q Y G E V Y E G V	260
781	TGGAAGAAATACAGCCTGACGGTGGCCGTTGAAGACCTTGAAGGAGGACACCATGGAGGTG	840
261	W K K Y S L T V A V K T L K E D T M E V	280
841	GAAGAGTTCTTGAAGAAGCTGCAGTCATGAAAGAGATCAAACACCCTAACCTAGTGCAG	900
281	E E F L K E A A V M K E I K H P N L V Q	300

FIG. 3B

901	CTCCTTGGGGTCTGCACCCGGGAGCCCCCGTTCTATATCATCACTGAGTTCATGACCTAC	960
301	L L G V C T R E P P F Y I I T E F M T Y	320
961	GGGAACCTCCTGGACTACCTGAGGGAGTGCAACCCGGCAGGAGGTGAACGCCGTTGGTCTG	1020
321	G N L L D Y L R E C N R Q E V N A V V L	340
1021	CTGTACATGGCCACTCAGATCTCGTCAGCCATGGAGTACCTAGAGAAGAAAACTTCATC	1080
341	L Y M A T Q I S S A M E Y L E K K N F I	360
1081	CACAGAGATCTTGCTGCCCGAAACTGCCTGGTAGGGGAGAACCCTTGGTGAAGGTAGCT	1140
361	H R D L A A R N C L V G E N H L V K V A	380
1141	GATTTTGGCCTGAGCAGGTTGATGACAGGGACACCTACACAGCCCATGCTGGAGCCAAG	1200
381	D F G L S R L M T G D T Y T A H A G A K	400
1201	TTCCCATCAAATGGACTGCACCCGAGAGCCTGGCCTACAAAGTTCTCCATCAAGTCC	1260
401	F P I K W T A P E S L A Y N K F S I K S	420
1261	GACGCTCGGGCATTGGAGTATTGCTTTGGGAAATTGCTACCTATGGCATGTCCCCTTAC	1320
421	D V W A F G V L L W E I A T Y G M S P Y	440
1321	CCGGGAATTGACCGTTCCAGGTGTATGAGCTGCTAGAGAAGGACTACCGCATGAAGCGC	1380
441	P G I D R S Q V Y E L L E K D Y R M K R	460
1381	CCAGAAGGCTGCCCAGAGAAGGTCTATGAACTCATGCGAGCATGTTGGCAGTGGAAATCC	1440
461	P E G C P E K V Y E L M R A C W Q W N P	480
1441	TCTGACCGGCCCTCCTTTGCTGAAATCCACCAAGCCTTTGAAACAATGTTCCAGGAATCC	1500
481	S D R P S F A E I H Q A F E T M P Q E S	500
1501	AGTATCTCAGACGAAAGTGGAAAAGGAGCTGGGAAAACAAGGCGTCCGTTGGGGCTGTGACT	1560
501	S I S D E V E K E L G K Q G V R G A V T	520
1561	ACCTTGCTGCAGGCCCCAGAGCTGCCACCAAGACGAGGACCTCCAGGAGAGCTGCAGAG	1620
521	T L L Q A P E L P T K T R T S R R A A E	540
1621	CACAGAGACACCACTGACGTGCCTGAGATGCCTCACTCCAAGGGCCAGGGAGAGAGCGAT	1680
541	H R D T T D V P E M P H S K G Q G E S D	560
1681	CCTCTGGACCATGAGCCTGCCGTGTCTCCATTGCTCCCTCGAAAAGAGCGAGGTCCCCCG	1740
561	P L D H E P A V S P L L P R K E R G P P	580
1741	GAGGGCGGCTGAATGAAGATGAGCGCCTTCTCCCCAAGACAAAAGACCAACTTGTTC	1800
581	E G G L N E D E R L L P K D K K T N L F	600

FIG. 3C

1801	AGCGCCTTGATCAAGAAGAAGAAGAAGACAGCCCCAACCCCTCCCAAACGCAGCAGCTCC	1860
601	S A L I K K K K K T A P T P P K R S S S	620
1861	TCCGGGAGATGGACGGCCAGCCGGAGCGCAGAGGGGCCGGGAGGAAGAGGGCCGAGAC	1920
621	F R E M D G Q P E R R G A G E E E G R D	640
1921	ATCAGCAACGGGGCACTGGCTTTACCCCTTGACACAGCTGACCCAGCCAAGTCCCCA	1980
641	I S N G A L A F T P L D T A D P A K S P	660
1981	AAGCCCAGCAATGGGGCTGGGGTCCCCAATGGAGCCCTCCGGGAGTCCGGGGCTCAGGC	2040
661	K P S N G A G V P N G A L R E S G G S G	680
2041	TTCGGTCTCCCCACCTGTGGAAGAAGTCCAGCAGCTGACCAGCAGCCGCTAGCCACC	2100
681	F R S P H L W K K S S T L T S S R L A T	700
2101	GGCGAGGAGGAGGGCGGTGGCAGCTCCAGCAAGCGCTTCCTGCGCTCTTGCTCCGTCTCC	2160
701	G E E E G G G S S S K R F L R S C S V S	720
2161	TGCGTTCCCCATGGGGCCAAGGACACGGAGTGGAGGTGAGTCAGTCAGCTGCGCTCGGGACTTG	2220
721	C V P H G A K D T E W R S V T L P R D L	740
2221	CAGTCCACGGGAAGACAGTTTACTCGTCCACATTTGGAGGGCACAAAAGTGAGAAGCCG	2280
741	Q S T G R Q F D S S T F G G H K S E K P	760
2281	GCTCTGCCTCGGAAGAGGGCAGGGGAGAACAGGTCTGACCAGGTGACCCGAGGCACAGTA	2340
761	A L P R K R A G E N R S D Q V T R G T V	780
2341	ACGCCTCCCCCAGGCTGGTGAAAAAGAANTGAGGAAGCTGCTGATGAGGTCTTCAAAGAC	2400
781	T P P P R L V K K N E E A A D E V F K D	800
2401	ATCATGGAGTCCAGCCCGGGCTCCAGCCCGCCCAACCTGACTCCAAAACCCCTCCGGCGG	2460
801	I M E S S P G S S P P N L T P K P L R R	820
2461	CAGGTACCGTGGCCCCCTGCCTCGGGCCTCCCCACAAGGAAGAAGCCTGGAAAGGCAGT	2520
821	Q V T V A P A S G L P H K E E A W K G S	840
2521	GCCTTAGGGACCCCTGCTGCAGCTGAGCCAGTGACCCCCACCAGCAAAGCAGGCTCAGGT	2580
841	A L G T P A A A E P V T P T S K A G S G	860
2581	GCACCAAGGGGCACCAGCAAGGGCCCCGCGAGGAGTCCAGAGTGAGGAGGCACAAGCAC	2640
861	A P R G T S K G P A E E S R V R R H K H	880
2641	TCCTCTGAGTCGCCAGGGAGGGACAAGGGAAATGTCCAAGCTCAAACCTGCCCCGCCG	2700
881	S S E S P G R D K G K L S K L K P A P P	900

FIG. 3D

2701	CCCCACCAGCAGCCTCTGCAGGGAAGGCTGGAGGAAAGCCCTCGCAGAGGCCCGGCCAG	2760
901	P P P A A S A G K A G G K P S Q R P G Q	920
2761	GAGGCTGCCGGGAGGCACTCTTGGGCGCAAAGACAAAAGCCACGAGTCTGGTTGATGCT	2820
921	E A A G E A V L G A K T K A T S L V D A	940
2821	GTGAACAGTGACGCTGCCAAGCCAGCCAGCCGGCAGAGGGCCTCAAAAAGCCCGTGCTC	2880
941	V N S D A A K P S Q P A E G L K K P V L	960
2881	CCGGCCACTCCAAAGCCACACCCCGCCAGCCGTCGGGGACCCCATCAGCCAGCCCCC	2940
961	P A T P K P H P A K P S G T P I S P A P	980
2941	GTCCCTTTCCACGTTGCCATCAGCATCCTCGGCCTTGGCAGGGGACCAGCCGCTCTTC	3000
981	V P L S T L P S A S S A L A G D Q P S S	1000
3001	ACTGCCTTTCACCTCTCATATCAACCCGAGTGTCTCTTCGGAAAACCCGCCAGCCTCCA	3060
1001	T A F I P L I S T R V S L R K T R Q P P	1020
3061	GAGCGGGCCAGCGGCGCCATCACCAAGGGCGTGTCTTGGACAGCACCGAGGGCTGTGC	3120
1021	E R A S G A I T K G V V L D S T E A L C	1040
3121	CTCGCCATCTCTGGGAACCTCGAGCAGATGGCCAGCCACAGCGCAGTGCTGGAGGCCGGC	3180
1041	L A I S G N S E Q M A S H S A V L E A G	1060
3181	AAAAACCTCTACAGTTCTGCGTGAGCTATGTGGATTCCATCCAGCAAATGAGGAACAAG	3240
1061	K N L Y T F C V S Y V D S I Q Q M R N K	1080
3241	TTTGCCCTCCGAGAGGCCATCAACAAACTGGAGAATAATCTCCGGGAGCTTCAGATCTGC	3300
1081	F A F R E A I N K L E N N L R E L Q I C	1100
3301	CCGGCGTCAGCAGGCAGTGGTCCGGCGGCCACTCAGGACTTCAGCAAGCTCCTCAGTTCG	3360
1101	P A S A G S G P A A T Q D F S K L L S S	1120
3361	GTGAAGGAAATCAGTGACATAGTGCAGAGGTAG	3393
1121	V K E I S D I V Q R	1130