

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 377**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/517** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**G01N 33/569** (2006.01)  
**G01N 33/574** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.08.2010 PCT/US2010/046142**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.02.2011 WO11022633**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2010 E 10810654 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.06.2016 EP 2467140**

54 Título: **Lapatinib para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

**24.02.2010 US 307569 P**  
**21.08.2009 US 235947 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.11.2016**

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)**  
**Lichtstrasse 35**  
**4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**BING, NAN;**  
**BRILEY, LINDA, PERRY;**  
**BUDDE, LAURA, R.;**  
**COX, CHARLES, J. y**  
**SPRAGGS, COLIN, F.**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 589 377 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

Lapatinib para el tratamiento del cáncer

Campo de la invención

5 La invención se refiere a métodos para el tratamiento del cáncer con lapatinib, o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, marcadores genéticos útiles en dicho tratamiento y métodos y reactivos para detectar dichos marcadores genéticos.

Antecedentes de la invención

10 Las señales de seguridad hepática, incluyendo la alanina aminotransferasa (ALT) y la bilirrubina total (TBL) son controladas rutinariamente durante los ensayos clínicos de fármacos nuevos y/o la administración de fármacos comercializados, para determinar los perfiles de seguridad. Puede ocurrir hepatotoxicidad si un paciente experimenta ALT (>3x) y/o TBL (>2x) por encima de los límites superiores de normales (ULN). La farmacogenética puede aportar información sobre los mecanismos de la hepatotoxicidad.

Se requieren métodos de tratamiento de pacientes con perfiles farmacogenéticos que no los hagan susceptibles a hepatotoxicidad con compuestos farmacéuticos.

15 Sumario de la invención

Se proporcionan métodos para el tratamiento del cáncer en un ser humano, que comprenden administrar por lo menos una dosis de lapatinib, o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, a un ser humano, en el que dicho ser humano no tiene uno o más polimorfismos alélicos seleccionados de: HLA-DQA1\*0201, HLA-DQB1\*0202 y HLA-DRB1\*0701.

20 Breve descripción de las Figuras

FIGURA 1: Diseño general del estudio para el análisis de dos etapas de identificación exploratoria de la asociación del marcador, seguida por confirmación del marcador previamente especificado en conjuntos de datos independientes usando análisis de caso-control de ALT.

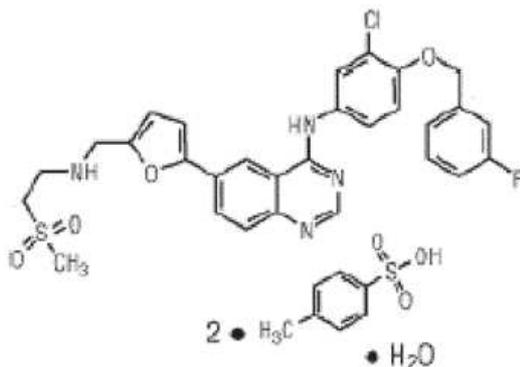
25 FIGURA 2: Proporción de sujetos portadores de *HLA-DQA1\*0201* según el estatus de caso-control de ALT de la cohorte exploratoria y confirmatoria.

FIGURA 3: Incidencia acumulada de ALT >3x ULN en subconjuntos de portadores y no portadores de *HLA-DQA1\*0201* del grupo de tratamiento con lapatinib más letrozol, en comparación con el grupo de tratamiento de solo letrozol en la cohorte confirmatoria.

Descripción detallada

30 El lapatinib es un inhibidor de tirosina quinasa. La tirosina quinasa está asociada por lo menos con dos oncogenes, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el EGFR humano de tipo 2 (Her2/neu). La sobreexpresión de HER2/neu puede ser la responsable de algunos tipos de cáncer de mama de alto riesgo en las mujeres, o puede estar correlacionada con los mismos. Entre otras actividades, el lapatinib reduce las células madre del cáncer de mama que causan el tumor. Un aspecto del mecanismo de acción de lapatinib es que inhibe procesos de señalización del receptor uniéndose a la cavidad de unión de ATP del dominio de proteína quinasa de EGFR/HER2, impidiendo la autofosforilación y subsiguiente activación del mecanismo de señalización.

35 El lapatinib es una molécula pequeña y es un miembro de la clase de inhibidores de la quinasa 4-anilinoquinazolina. En su forma comercializada actualmente, el lapatinib se presenta como un monohidrato de la sal ditosilato, con el nombre químico bis(4-metilbencenosulfonato) de N-(3-cloro-4-[[3-fluorofenil]metil]oxi}fenil)-6-[5-({[2-metilsulfonil]etil]amino}metil)-2-furanil]-4-quinazolinamina monohidratado. Tiene la fórmula molecular  $C_{29}H_{26}ClFN_4O_4S$  ( $C_7H_8O_3S$ )<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O y un peso molecular de 943,5 Dalton. El ditosilato de lapatinib monohidratado tiene la siguiente estructura química:



Se desvelan lapatinib, sal o composiciones farmacéuticamente aceptables del mismo, y composiciones que comprenden lapatinib y usos, por ejemplo en la patentes de Estados Unidos 6.391.874, 6.828.320, 6.727.256, 6.713.485 y 7.157.466. Lapatinib está disponible en el mercado como TYKERB® y TYVERB®.

## 5 HLA

El complejo HLA de los seres humanos (complejo mayor de histocompatibilidad o MHC) es un grupo de genes ligados localizados en el cromosoma 6, que también es conocido como la región MHC. El complejo HLA se ha dividido clásicamente en tres regiones: las regiones de clase I, II y III (Klein J. en: Gotze D, ed. "The Major Histocompatibility System in Man and Animals", Nueva York: Springer-Verlag, 1976:339-378). Los HLA de clase I comprenden la proteína transmembrana (cadena pesada) y una molécula de beta-2-microglobulina. Las proteínas transmembrana de clase I son codificadas por los locus HLA-A, HLA-B y HLA-C. Una función de las moléculas de HLA de clase I es presentar péptidos antigénicos (que incluyen, por ejemplo, antígenos de proteínas virales) a los linfocitos T. Actualmente se reconocen tres isoformas de las moléculas de MHC de clase II, designadas como HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP. Las moléculas de MHC de clase II son heterodímeros compuestos de una cadena alfa y una cadena beta; diferentes cadenas alfa y beta son codificadas por subconjuntos de genes A y genes B, respectivamente. Se han reconocido varios haplotipos de HLA-DR y difieren en cuanto a la organización y número de genes DRB presentes en cada haplotipo de DR; se han descrito múltiples genes DRB: Bodmer et al., Eur. J. Immunogenetics 24:105 (1997); Andersson, Frontiers in Bioscience 3:739 (1998).

La región MHC presenta un alto polimorfismo; se han descrito más de 1200 alelos genotípicos de HLA-B; véase por ejemplo Schreuder et al., Human Immunology 60: 1157-1181 (1999); Bodmer et al., European Journal of Immunogenetics 26: 81-116 (1999). A pesar del número de alelos en los locus HLA-A, HLA-B y HLA-C, el número de haplotipos observados en las poblaciones es menor que el esperado matemáticamente. Algunos alelos tienden a ocurrir juntos en el mismo haplotipo, en lugar de estar segregados aleatoriamente. Esta asociación se denomina desequilibrio de ligamiento (LD) y se puede cuantificar por medio de métodos que son conocidos (véase por ejemplo Devlin y Risch, Genomics 29:311 (1995); BS Weir, "Genetic Data Analysis II", Sinauer Associates, Sunderland, MD (1996)).

Los productos codificados por los locus HLA polimórficos son tipificados comúnmente mediante métodos serológicos para pruebas de histocompatibilidad de trasplante y transfusión y terapia de componente sanguíneo. La tipificación serológica se basa en las reacciones entre los sueros caracterizados y los productos del gen HLA. Las técnicas conocidas para realizar análisis de histocompatibilidad incluyen microlinfocitotoxicidad y citometría de flujo. La microlinfocitotoxicidad estándar para la tipificación del antígeno HLA, determina el perfil del antígeno HLA de los linfocitos de un sujeto usando un panel de antisuero de HLA bien caracterizado. Algunos alelos de HLA están bien caracterizados y se conocen los métodos serológicos para detectarlos; véase, por ejemplo, "ASHI Laboratory Manual", cuarta edición, American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (2000); Hurley et al., Tissue Antigens 50:401 (1997).

Más recientemente se han desarrollado métodos para el análisis de polimorfismos del HLA a nivel genético. Los métodos de tipificación de HLA no serológicos incluyen el uso del polimorfismo de longitud de fragmento de restricción de ADN (RFLP; véase por ejemplo Erlich, patente US-4.582.788 (1986)) u oligonucleótidos marcados, para identificar secuencias de ADN específicas de HLA. Estos métodos pueden detectar polimorfismos localizados en la secuencia codificadora o no codificadora del genoma; véase, por ejemplo, Bidwell et al, Immunology Today 9:18 (1988), Angelini et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:4489 (1986); Scharf et al., Science, 233:1076 (1986); Cox et al., Am. J. Hum. Gen., 43:954 (1988); Tiercy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:198 (1988) y Tiercy et al., Hum. Immunol. 24:1 (1989). El proceso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (véase, por ejemplo, la patente US-4.683.202, 1987) permite la amplificación del ADN genómico y se puede usar para procedimientos de tipificación de HLA; véase, por ejemplo, Saiki et al., Nature 324:163 (1986); Bugawan et al., J. Immunol. 141:4024 (1988);

Gillensten et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:7652 (1988). Véase también, por ejemplo, Ennis et al., PNAS USA 87:2833 (1990); Petersdorf et al., Tissue Antigens 46: 77 (1995); Girdlestone et al., Nucleic Acids Research 18:6702 (1990); Marcos et al., Tissue Antigens 50:665 (1997); Steiner et al., Tissue Antigens 57:481 (2001); Madrigal et al., J. Immunology 149:3411 (1992).

5 MICA v MICB

El gen relacionado con la cadena de clase I de MHC (HLA) A (MICA), y el gen relacionado con la cadena de MHC de clase I (HLA) B (MICB) pertenecen a una familia de genes multicopia localizados en la región del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I, cerca del gen HLA-B. Están localizados dentro de una región de ligamiento en el cromosoma 6p alrededor de HLA-B.

10 Se ha descrito que el MICA es altamente polimórfico. Powell et al., Mutation Research 432:47 (2001), describieron la ocurrencia de polimorfismos de un solo nucleótido en MICA en varios grupos étnicos. Se han descrito que los polimorfismos en MICA están asociados con varias enfermedades, aunque en algunos casos la asociación fue atribuible a desequilibrio de ligamiento con los genes HLA; véase, por ejemplo, Salvarani et al., J Rheumatol 28:1867 (2001); González et al., Hum Immunol 62:632 (2001); Seki et al., Tissue Antigens 58:71 (2001).

15 Se han descrito varias formas polimórficas de MICB (véase por ejemplo Visser et al., Tissue Antigens 51:649 (1998); Kimura et al., Hum Immunol 59:500 (1998); Ando et al., Immunogenetics 46:499 (1997); Fischer et al., Eur J Immunogenet 26:399 (1999)).

20 Como es bien sabido en Genética, las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos relacionadas obtenidas de diferentes fuentes para el mismo gen, pueden variar tanto en el esquema de numeración como en la secuencia precisa. Tales diferencias se pueden deber a los esquemas de numeración, la variabilidad inherente de secuencia dentro del gen y/o errores de secuenciación. Por consiguiente, será entendido por los expertos en la materia que la referencia aquí a un sitio polimórfico particular por número (por ejemplo HLA-DR), incluye los sitios polimórficos que corresponden en secuencia y localización dentro del gen, aunque se utilicen diferentes esquemas de numeración/nomenclatura para describirlos.

25 Como se usa en la presente memoria, la "hepatotoxicidad" inducida por fármaco se refiere a una ALT elevada más de 3 veces (>3x el límite superior de lo normal (ULN)), ya sea sola y/o con bilirrubina total (TBL) elevada más de 2 veces (>2x ULN), al mismo tiempo, en el mismo ser humano u otras características clínicas causadas por daño del hígado.

30 Como se usa en la presente memoria, "humano", "sujeto humano", "sujeto" y "paciente", se pueden usar indistintamente para dar a entender cualquier ser humano.

35 La administración de lapatinib, o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo a un sujeto (o "tratamiento" de un sujeto con lapatinib) comprende métodos y vías de administración como las que se conocen en la técnica. Los regímenes terapéuticos recomendados (dosis y posologías, concentraciones plasmáticas) de lapatinib y las sales o composiciones farmacéuticamente aceptables del mismo, son conocidos. Como se usa en la presente memoria, la administración de lapatinib, o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, no se limita al tratamiento del cáncer de la mama, sino que incluye su uso médico para otras afecciones susceptibles de tratamiento con lapatinib o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo.

40 Como se usa en la presente memoria, la administración de un inhibidor de quinasa farmacéutico a un sujeto, comprende la administración de una cantidad eficaz del agente farmacéutico a un sujeto en necesidad del mismo. La dosis de un agente farmacéutico se puede determinar de acuerdo con los métodos conocidos y aceptados en las ciencias farmacéuticas, y puede ser determinada por los expertos en la materia.

Como se usa en la presente memoria, el "alelo de HLA" se refiere a uno o más de los siguientes alelos: HLA-DQA1\*0201, HLA-DQB1\*0202, HLA-DRB1\*0701 y otros marcadores en desequilibrio de ligamiento con estos alelos.

45 Como se usa en la presente memoria, "genotipificación" de un sujeto (o ADN u otra muestra biológica) para determinar un alelo polimórfico de un gen(es), significa detectar qué formas alélicas o polimórficas del gen(es) o productos de expresión génica (por ejemplo ARNhn, ARNm o proteína) están presentes o ausentes en un sujeto (o una muestra). También se puede usar ARN o proteína relacionados expresados de dicho gen para detectar la variación polimórfica. Como es bien conocido en la técnica, un individuo puede ser heterocigótico u homocigótico para un alelo particular. Pueden existir más de dos formas alélicas, por lo tanto, puede haber más de tres posibles genotipos. Para los fines de la presente invención, "genotipificación" incluye la determinación de los alelos de HLA usando técnicas serológicas adecuadas como se conoce en la técnica. Como se usa en la presente memoria, un alelo puede ser "detectado" cuando se han descartado otras variantes alélicas posibles; por ejemplo, cuando se encuentra que una posición de ácido nucleico especificado no es ni adenina (A), ni timina (B), ni citosina (C), se

puede concluir que está presente guanina (G) en esa posición (es decir, es “detectada” o “diagnosticada” G en un sujeto). Las variaciones de secuencia se pueden detectar directamente (por ejemplo por secuenciación) o indirectamente (por ejemplo por medio de análisis de polimorfismo de longitud de un fragmento de restricción o detección de la hibridación de una sonda de secuencia conocida o polimorfismo de conformación de cadena de referencia) o usando otros métodos conocidos.

Como se usa en la presente memoria, un “subconjunto genético” de una población consiste en aquellos miembros de la población que tienen un genotipo particular. En el caso de un polimorfismo bialélico, una población se puede dividir potencialmente en tres subconjuntos: homocigótico para el alelo 1 (1,1), heterocigótico (1,2) y homocigótico para el alelo 2 (2,2). Una “población” de sujetos se puede definir usando varios criterios, por ejemplo, los individuos tratados con lapatinib o individuos con cáncer.

Como se usa en la presente memoria, un sujeto que está “predispuesto a” o “en mayor riesgo de” una respuesta fenotípica particular basada en la genotipificación, presentará más probablemente ese fenotipo que un individuo con un genotipo diferente en el locus polimórfico diana. Cuando la respuesta fenotípica se basa en un polimorfismo multialélico, o en la genotipificación de más de un gen, el riesgo relativo puede diferir entre los múltiples genotipos posibles.

Un alelo se refiere a una forma específica de una secuencia genética (tal como un gen) dentro de una célula, una muestra, un individuo o dentro de una población, difiriendo la forma específica de las otras formas del mismo gen en la secuencia de por lo menos uno, y frecuentemente más de uno, sitios variantes dentro de la secuencia del gen. Las secuencias de estos sitios variantes que difieren entre los diferentes alelos se denominan “variantes”, “polimorfismos” o “mutaciones”. En general, se usa el polimorfismo para referirse a variantes que tienen una frecuencia de por lo menos 1 % en una población, mientras que el término mutación se usa generalmente para variantes que ocurren con una frecuencia menor de 1 % en una población. En organismos diploides como los seres humanos, en cada localización cromosómica específica autosómica o “locus”, un individuo posee dos alelos, un primer alelo heredado de un progenitor y un segundo alelo heredado del otro progenitor, por ejemplo, uno de la madre y uno del padre. Un individuo es “heterocigótico” en un locus si tiene dos alelos diferentes en el locus. Un individuo es “homocigótico” en un locus si tiene dos alelos idénticos en ese locus.

Un polimorfismo puede comprender uno o más cambios de base, una inserción, una repetición o una delección. Un locus polimórfico puede ser tan pequeño como un par de bases. Los marcadores polimórficos incluyen polimorfismos de longitud de fragmento de restricción, número variable de repeticiones en tándem (VNTR), regiones hipervariables, minisatélites, repeticiones de dinucleótido, repeticiones de trinucleótido, repeticiones de tetranucleótido, repeticiones de secuencia simple y elementos de inserción tales como Alu. La primera forma alélica identificada se designa arbitrariamente como la forma de referencia y las otras formas alélicas se designan como alelos alternativos o variantes. La forma alélica que ocurre más frecuentemente en una población seleccionada algunas veces se denomina la forma de tipo silvestre. El alelo más frecuente también puede ser denominado el alelo mayor y el alelo menos frecuente el alelo menor. Los organismos diploides pueden ser homocigóticos o heterocigóticos para las formas alélicas. Un polimorfismo dialélico tiene dos formas. Un polimorfismo trialélico tiene tres formas. Un polimorfismo entre dos ácidos nucleicos puede ocurrir naturalmente o puede ser causado por exposición o contacto con agentes químicos, enzimas u otros agentes, o exposición a agentes que dañan a los ácidos nucleicos, por ejemplo radiación ultravioleta, mutágenos o carcinógenos.

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) son posiciones en las cuales aparecen dos bases alternativas con una frecuencia apreciable (>1 %) en la población humana y son el tipo más común de variación genética humana. Aproximadamente el 90 % de todos los polimorfismos del genoma humano son SNP. Los SNP son posiciones de una sola base en el ADN en el cual existen diferentes alelos o nucleótidos alternativos, en una población. Un individuo puede ser homocigótico o heterocigótico para un alelo en cada posición de SNP. En algunos casos un SNP se puede denominar “cSNP” para denotar que la secuencia de nucleótidos que contiene el SNP es una secuencia codificadora de aminoácido. Como se usan en la presente memoria, las referencias a SNP y genotipos de SNP incluyen SNP individuales y/o haplotipos, que son grupos de SNP que generalmente son heredados juntos. Los haplotipos pueden tener correlaciones más fuertes con enfermedades u otros efectos fenotípicos en comparación con los SNP individuales y, por lo tanto, pueden proporcionar mayor precisión diagnóstica en algunos casos (Stephens et al. Science 293, 489-493, 20 de julio de 2001).

Los SNP causativos son aquellos SNP que producen alteraciones en la expresión génica o en la expresión, estructura y/o función de un producto génico y, por lo tanto, son los más predictivos de un posible fenotipo clínico. Una de estas clases incluye SNP que están dentro de las regiones de genes que codifican un producto de polipéptido, es decir, cSNP. Estos SNP pueden tener como resultado una alteración de la secuencia de aminoácidos del producto de polipéptido (es decir, cambios de codón no sinónimos) y dar lugar a la expresión de una proteína defectuosa u otra proteína variante. Además, en el caso de mutaciones sin sentido, un SNP puede llevar a la terminación prematura de un producto de polipéptido. Los SNP causativos no necesariamente tienen que ocurrir en las regiones codificadoras; los SNP causativos pueden ocurrir, por ejemplo, en cualquier región genética que pueda afectar finalmente a la expresión, estructura y/o actividad de la proteína codificada por un ácido nucleico. Tales

- regiones genéticas incluyen, por ejemplo, las implicadas en la transcripción, tales como SNP en dominios de unión del factor de transcripción, SNP en regiones promotoras, en áreas implicadas en el procesamiento de transcrito, tales como SNP en los límites intrón-exón que pueden causar empalme defectuoso o SNP en secuencias de la señal del procesamiento de ARNm, tales como las regiones de señal de poliadenilación. Algunos SNP que no son SNP causativos, no obstante, están en estrecha asociación con una secuencia causante de enfermedad y, por lo tanto, se segregan con la misma. En esta situación, la presencia de un SNP se correlaciona con la presencia de la enfermedad, o predisposición a la enfermedad, o un mayor riesgo de desarrollarla. Estos SNP, aunque no son causativos, no obstante también son útiles para el diagnóstico, cribado de predisposición a la enfermedad y otros usos tales como, sin limitación, predicción de la hepatotoxicidad, como se describe en la presente invención.
- 5
- 10 Un estudio de asociación de un SNP y un trastorno específico o una predisposición a un acontecimiento de seguridad implica determinar la presencia o frecuencia del alelo de SNP en muestras biológicas de individuos con el trastorno o predisposición a un acontecimiento de seguridad de interés y comparar la información con la de los controles (es decir, individuos que no tienen el trastorno o experimentan el mismo acontecimiento de seguridad).
- 15 Un SNP puede ser cribado en muestras de tejido afectado o en cualquier muestra biológica obtenida de un individuo y compararse con muestras de control y seleccionarse por su mayor (o menor) ocurrencia en una afección patológica específica. Una vez que se establece una asociación estadísticamente significativa entre uno o más SNP y una afección patológica (u otro fenotipo) de interés, entonces opcionalmente la región alrededor del SNP se puede cribar exhaustivamente para identificar el locus/secuencia genética causante (por ejemplo, SNP/mutación, gen, región reguladora causante, etc.) que influye en la afección o fenotipo patológico.
- 20 Los ensayos clínicos han mostrado que la respuesta del paciente al tratamiento con agentes farmacéuticos muchas veces es heterogénea. Existe la necesidad continua de mejorar el diseño y la terapia de agentes farmacéuticos. A este respecto, se pueden usar SNP para identificar a los pacientes más adecuados para una terapia con agentes farmacéuticos particulares (esto se denomina frecuentemente "farmacogenómica"). De modo similar, los SNP se pueden usar para excluir a pacientes de cierto tratamiento debido a la mayor probabilidad del paciente de desarrollar efectos secundarios tóxicos, o la probabilidad de no responder al tratamiento. La farmacogenómica también se puede usar en la investigación farmacéutica para ayudar al proceso de desarrollo y selección de fármacos (Linder et al. (1997), *Clinical Chemistry*, 43, 254; Marshall (1997), *Nature Biotechnology*, 15, 1249; solicitud de patente internacional WO 97/40462, Spectra Biomedical y Schafer et al. (1998), *Nature Biotechnology*, 16, 3).
- 25
- 30 Se han desarrollado varias técnicas para la detección de mutaciones basándose en los principios del análisis de hibridación. Por ejemplo, en la prueba de extensión del cebador, la región de ADN que abarca el nucleótido de interés se amplifica por medio de PCR, o cualquier otra técnica de amplificación adecuada. Después de la amplificación, un cebador se hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana, en la que el último nucleótido del extremo 3' del cebador hibrida inmediatamente en dirección 5' con la posición de nucleótido de la secuencia diana que se va a analizar. El cebador hibridado es extendido por un solo nucleótido trifosfato marcado. Después se detecta el nucleótido incorporado.
- 35
- La secuencia de cualquier ácido nucleico que incluye un gen o producto de PCR o un fragmento o porción de los mismos, se puede determinar mediante cualquier método conocido (por ejemplo, secuenciación química o secuenciación enzimática). "Secuenciación química" del ADN puede denotar métodos tales como los de Maxam y Gilbert (1977) (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:560), en los cuales el ADN se escinde aleatoriamente usando reacciones individuales específicas de base. "Secuenciación enzimática" del ADN puede indicar métodos tales como los de Sanger (Sanger, et al., (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463).
- 40
- La biología molecular, microbiología y las técnicas de ADN recombinante convencionales, que incluyen técnicas de secuenciación, son muy conocidas para los expertos en la materia. Tales técnicas se explican detalladamente en la literatura; véase por ejemplo Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (en lo sucesivo "Sambrook, et al., 1989"); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volúmenes I y II (D. N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1985)); *Transcription And Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds. (1984)); *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed. (1986)); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, (1986)); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F. M. Ausubel, et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994)
- 45
- 50
- El ensayo de afinidad de ácido péptido nucleico (APN) es un derivado de los ensayos de hibridación tradicionales (Nielsen et al, *Science* 254:1497-1500 (1991); Egholm et al, *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895-1897 (1992); James et al, *Protein Science* 3:1347-1350 (1994)). Los APN son imitaciones de ADN estructural que imitan las reglas de apareamiento de bases de Watson-Crick y se usan en ensayos de hibridación de ADN estándar. Los APN presentan una mayor especificidad en los ensayos de hibridación porque una discordancia APN/ADN es mucho más desestabilizadora que una discordancia ADN/ADN y las cadenas de APN/ADN complementarias forman enlaces más fuertes que las cadenas de ADN/ADN complementarias.
- 55

Se han desarrollado micromatrices de ADN para detectar variaciones genéticas y polimorfismos (Taton et al., Science 289:1757-60, 2000; Lockhart et al., Nature 405:827-836 (2000); Gerhold et al., Trends in Biochemical Sciences 24:168-73 (1999); Wallace, R. W., Molecular Medicine Today 3:384-89 (1997); Blanchard y Hood, Nature Biotechnology 149:1649 (1996)). Las micromatrices de ADN son fabricadas por medio de robótica de alta velocidad sobre sustratos de vidrio o nylon, y contienen fragmentos de ADN con identidad conocida ("la sonda"). Las micromatrices se usan para comparación de fragmentos de ADN conocidos y desconocidos ("la diana") basándose en las reglas tradicionales de apareamiento de bases.

La prueba de truncamiento de proteína (PTT) también se usa comúnmente para detectar polimorfismos genéticos (Roest et al., Human Molecular Genetics 2:1719-1721, (1993); Van Der Luit et al., Genomics 20:1-4 (1994); Hogervorst et al., Nature Genetics 10: 208-212 (1995)). Normalmente en la PTT, el gen de interés se amplifica por PCR, se somete a transcripción/traducción *in vitro*, se purifica y se analiza por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida.

El "análisis genético" (también denominado cribado genético), como se usa en la presente memoria, se refiere al análisis de una muestra biológica de un sujeto para determinar el genotipo de un sujeto y se puede utilizar para determinar si el genotipo del sujeto comprende alelos que causan o que aumentan la susceptibilidad a un fenotipo particular (o que están en desequilibrio de ligamiento con el alelo(s) que causa o aumenta la susceptibilidad a ese fenotipo).

El "desequilibrio de ligamiento" se refiere a la tendencia de alelos específicos de diferentes sitios genómicos de ocurrir juntos más frecuentemente de lo que sería esperado por azar. Los alelos en locus dados están en completo equilibrio si la frecuencia de un conjunto particular de alelos (o haplotipo) es el producto de sus frecuencias poblacionales individuales. Una medida usada comúnmente de desequilibrio de ligamiento es r:

$$r = \frac{\hat{\Delta}_{AB}}{\sqrt{(\tilde{\pi}_A + \hat{D}_A)(\tilde{\pi}_B + \hat{D}_B)}}$$

donde

$$\tilde{\pi}_A = \tilde{p}_A(1-\tilde{p}_A), \tilde{\pi}_B = \tilde{p}_B(1-\tilde{p}_B), \hat{D}_A = \tilde{P}_{AA} - \tilde{p}_A^2, \hat{D}_B = \tilde{P}_{BB} - \tilde{p}_B^2$$

$$\hat{\Delta}_{AB} = \frac{1}{n}n_{AB} - 2\tilde{p}_A\tilde{p}_B$$

$nr^2$  tiene una distribución de chi cuadrado aproximada con 1 grado de libertad para marcadores bialélicos. Los locus que presentan una r tal que  $nr^2$  es mayor de 3,84, lo que corresponde a una estadística de chi- cuadrada significativa al nivel de 0,05, se consideran en desequilibrio de ligamiento (BS Weir, 1996, "Genetic Data Analysis II" Sinauer Associates, Sunderland, MD).

En otra alternativa, una medida normalizada del desequilibrio de ligamiento puede ser definida como:

$$D'_{AB} = \begin{cases} \frac{D_{AB}}{\min(p_A p_B, p_a p_b)}, & D_{AB} < 0 \\ \frac{D_{AB}}{\min(p_A p_b, p_a p_B)}, & D_{AB} > 0 \end{cases}$$

El valor de la D' tiene un intervalo de -1,0 a 1,0. Cuando el valor D' absoluto estadísticamente significativo para los dos marcadores no es menos de 0,3, se consideran en desequilibrio de ligamiento

Como se usa en la presente memoria, la frase "un genotipo de HLA" se refiere a un genotipo que incluye uno de los alelos de HLA para HLA-DQA1, HLA-DQB1 o HLA-DRB1, que incluyen HLA-DQA1\*0201, HLA-DQB1\*0202 y HLA-DRB1\*0701.

Como se usa en la presente memoria, la palabra "haplotipo" se refiere a un conjunto de alelos de HLA estrechamente ligados presentes en un cromosoma que tienden a ser heredados juntos. La combinación DRB1\*0701, DQB1\*0202, DQA1\*0201 de genotipos de HLA es referida como el haplotipo DR7-DQ2. Un genotipo de HLA puede ser identificado detectando la presencia de un alelo de HLA, o detectando un marcador genético conocido que está en desequilibrio de ligamiento con un alelo de HLA. Un genotipo se refiere a la variación en una posición definida en un solo gen, por ejemplo 1,2 1,2 2,2. DQA1, DQB1 y DRB1 son genes y proteínas distintos. Las

combinaciones de, por ejemplo, DQA1\*0201 y DQB1\*0202 o DRB1\*0701 serían un haplotipo.

Como se usa en la presente memoria, la determinación de un genotipo “multilocus” (conocido también como un haplotipo) se refiere a la detección en un individuo de los alelos presentes en más de un locus. Se puede cribar genéticamente a un sujeto para determinar la presencia o ausencia tanto de un alelo de HLA (por ejemplo, un alelo HLA-DQA1\*0201, HLA-DQB1\*0202 o HLA-DRB1\*0701) como de otro alelo, por ejemplo, un alelo de HLA diferente o un alelo diferente de HLA.

Como se usa en la presente memoria, el proceso para detectar un alelo o polimorfismo incluye, pero no se limita a, métodos serológicos y genéticos. El alelo o polimorfismo detectado puede estar implicado funcionalmente en la afección del fenotipo de un individuo, o puede ser un alelo o polimorfismo que está en desequilibrio de ligamiento con un polimorfismo/alelo funcional. Los polimorfismos/alelos son evidenciados en el ADN genómico de un sujeto, pero también pueden ser detectables de las secuencias de ARN, ADNc o proteína transcritas o traducidas de esta región, como será evidente para los expertos en la materia.

Se ha encontrado que los alelos, polimorfismos o marcadores genéticos que están “asociados” con hepatotoxicidad a un inhibidor de quinasa tal como lapatinib, o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, están sobre-representados en frecuencia en poblaciones de sujetos tratados que experimentan hepatotoxicidad, en comparación con poblaciones de sujetos tratados que no experimentan hepatotoxicidad, o en comparación con la población general.

Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos de tratamiento del cáncer en un humano, que comprenden administrar por lo menos una dosis de lapatinib o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo a un ser humano, en el que dicho ser humano no tiene, o se le ha diagnosticado que no tiene, uno o más polimorfismos alélicos seleccionados del grupo de: HLA-DQA1\*0201, HLA-DQB1\*0202 y HLA- DRB1\*0701. En algunos casos el ser humano está libre de por lo menos dos polimorfismos seleccionados del grupo de: HLA-DQA1\*0201, HLA- DQB1\*0202 y HLA-DRB1\*0701. En algunos casos el ser humano también está libre de un polimorfismo seleccionado de rs12153855 y rs17207923 que residen en el gen TNXB. En algunos casos el ser humano también está libre de un polimorfismo HLA-BM403. En algunos casos el ser humano también está libre de la variante del síndrome de Gilbert, UGT1A1\*28.

La presente invención proporciona varios métodos de tratamiento usando los marcadores de HLA. Por ejemplo, los seres humanos con algunos marcadores de HLA se pueden excluir del tratamiento con lapatinib. Los pacientes se pueden analizar y se puede registrar su estatus de alelo de HLA antes de iniciar el tratamiento. Un paciente puede iniciar el tratamiento con lapatinib, si el paciente experimenta subsiguientemente elevación de ALT y/o hepatotoxicidad, se puede usar la información genética para dirigir el manejo del paciente. Por ejemplo, sin restricción, si un paciente tiene ALT >3x y se encuentra el alelo de HLA especificado, el tratamiento se puede suspender. Sin embargo, si ALT >3x y los polimorfismos genéticos de HLA están ausentes, el tratamiento puede continuar. En algunas circunstancias se pueden usar umbrales de ALT mas altos (por ejemplo, >4x, >5x, o más altos). Los alelos de HLA que son parte de esta invención se utilizan para guiar a un médico a proporcionar tratamiento. Por lo tanto, incluso un paciente que es susceptible de hepatotoxicidad con respecto a lapatinib, puede iniciar el tratamiento con lapatinib vigilando las señales de seguridad hepática. Si las señales de seguridad hepática aumentan, la dosis de tratamiento de lapatinib del paciente se puede reducir, terminar o suspender.

Como se usa en la presente memoria, la palabra “tratamiento” incluye administrar un fármaco a un sujeto humano para el alivio, curación o prevención de una enfermedad, y también la provisión de dicho fármaco a una persona administrando el fármaco. La palabra “tratamiento” también incluye determinar la hepatotoxicidad o riesgo de experimentar hepatotoxicidad en un ser humano, o el genotipo o fenotipo de HLA (por ejemplo un biomarcador de la presente invención), y administrar una composición que comprende un fármaco de acuerdo con un método de la presente invención y además incluye proveer un servicio (por ejemplo, análisis en laboratorio central) para realizar dichos pasos de evaluación, o proveer un reactivo (por ejemplo, nucleótidos, polipéptidos, cebadores, sondas, anticuerpos) o kit útil para una persona que realiza dichos pasos, para realizar dichos pasos. De esta manera, la palabra “tratamiento” también incluye proporciona información útil para tomar una decisión para la administración de un fármaco o una manera de administrar un fármaco, tal como por ejemplo información acerca de, o derivada de, la realización de dichos pasos de evaluación, que incluye por ejemplo la información sobre lapatinib o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con los métodos de la presente invención. La palabra “tratamiento” incluye, además, administrar lapatinib o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con un método descrito en su ficha técnica, o cualquier corrección de la misma.

En otra realización de la presente invención el lapatinib o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a dicho ser humano como una monoterapia. En otra realización, el lapatinib o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo se coadministra con al menos otro agente anticanceroso. Al menos se puede seleccionar otro agente anticanceroso, sin limitarse a, uno o más del grupo de: trastuzumab, capecitabina, paclitaxel, carboplatino, pazopanib y letrozol.

Como se usa en la presente memoria, el término “coadministración” o “coadministrar” y variaciones gramaticales de los mismos significan administración simultánea o cualquier modo de administración secuencial separada de lapatinib, o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, y un ingrediente o ingredientes activos adicionales que incluyen, sin limitación, quimioterapia y radioterapia. Además, el término principio o principios activos, como se usa en la presente memoria, incluye cualquier compuesto o agente terapéutico conocido o que muestre propiedades ventajosas cuando se administra a un paciente en necesidad de tratamiento. Además, no importa si los compuestos se administran en la misma forma farmacéutica, por ejemplo, un compuesto se puede administrar por inyección y otro compuesto se puede administrar por vía oral. La coadministración de dichos compuestos puede ser simultánea o casi al mismo tiempo (por ejemplo en el transcurso de la misma hora), o puede ser en el transcurso de varias horas o días uno de otro. Por ejemplo, un primer compuesto se puede administrar una vez a la semana, mientras que un segundo compuesto se coadministra diariamente. Adicionalmente, el principio o principios activos adicionales se pueden administrar para cualquier afección, enfermedad o trastorno, que incluyen, sin limitación, cáncer y/o efectos secundarios del tratamiento del cáncer y/o manifestaciones del cáncer.

Como se usa en la presente memoria, un agente “anticanceroso” incluye, pero no se limita a, cualquier agente que incluye, pero no se limita a, un agente quimioterapéutico que tiene actividad contra un tumor susceptible. Ejemplos de dichos agentes se pueden encontrar en “Cancer Principles and Practice of Oncology” de V.T. Devita y S. Hellman (editores), 6a edición (15 de febrero de 2001), Lippincott Williams & Wilkins Publishers. Una persona con conocimientos medios en la materia será capaz de distinguir qué combinaciones de agentes serían útiles basándose en las características particulares de los fármacos y el cáncer implicado. Los agentes anticancerosos útiles en la presente invención incluyen, sin limitación, agentes anti-microtúbulo, tales como diterpenoides y alcaloides de la vinca; complejos de coordinación de platino; agentes alquilantes tales como mostazas de nitrógeno, oxazafosforinas, alquilsulfonatos, nitrosoureas y triazenos; agentes antibióticos como antraciclina, actinomicinas y bleomicinas; inhibidores de la topoisomerasa II tales como epipodofilotoxinas; antimetabolitos tales como análogos de purina y pirimidina y compuestos antifolato; inhibidores de la topoisomerasa I, tales como camptotecinas; hormonas y análogos hormonales; inhibidores de la ruta de transducción de señal; inhibidores de la angiogénesis de tirosina quinasa no receptor; agentes inmunoterapéuticos; agentes proapoptóticos; e inhibidores de la señalización del ciclo celular. También, como se entiende en la técnica, los fármacos comercializados disponibles se describen en su prospecto junto con los métodos de administración de dichos fármacos.

Los agentes anti-microtúbulo o antimetabólicos son agentes activos específicos de fase contra los microtúbulos de las células tumorales durante la fase M o de mitosis del ciclo celular. Los ejemplos de agentes antimicrotúbulo incluyen, sin limitación, diterpenoides y alcaloides de la vinca. Los diterpenoides, que se derivan de fuentes naturales, son agentes anticancerosos específicos de fase que operan en las fases G<sub>2</sub>/M del ciclo celular. Ejemplos de diterpenoides incluyen, sin limitación, paclitaxel y su análogo docetaxel.

El paclitaxel, 5β,20-epoxi-1,2α,4,7β,10β,13α-hexa-hidroxitax-11-en-9-ona, 4,10-diacetato, 2-benzoato, 13-éster con (2R,3S)-N-benzoil-3-fenilisoserina, es un producto diterpeno natural aislado del árbol tejo del pacífico *Taxus brevifolia* y está disponible comercialmente como una solución inyectable TAXOL®. Es un miembro de la familia de los terpenos de taxano. El docetaxel, (2R,3S)-N-carboxi-3-fenilisoserina, N-*tert*-butil-éster, 13-éster con 5β-20-epoxi-1,2α,4,7β,10β,13α-hexahidroxitax-11-en-9-ona, 4-acetato, 2-benzoato, trihidratado, está disponible comercialmente como una solución inyectable como TAXOTERE®.

Los alcaloides de la vinca son agentes antineoplásicos específicos de fase derivados de la planta vinca común. Ejemplos de alcaloides de la vinca incluyen, sin limitación, vinblastina, vincristina y vinorelbina. La vinblastina, sulfato de vincalécoblastina, está disponible comercialmente como VELBAN® como una solución inyectable. La vincristina, sulfato de 22-oxo-vincalécoblastina, está disponible comercialmente como ONCOVIN® como una solución inyectable. La vinorelbina, 3',4'-dideshidro-4'-desoxi-C'-norvincalécoblastina [sal R-(R\*,R\*)-2,3-dihidrobutanodioato (1:2)], disponible comercialmente como una solución inyectable de tartrato de vinorelbina (NAVELBINE®) es un alcaloide de la vinca semisintético.

Los complejos de coordinación de platino son agentes anticancerosos no específicos de fase que son interactivos con el ADN. Ejemplos de complejos de coordinación de platino incluyen, sin limitación, cisplatino y carboplatino. El cisplatino, cis-diaminadicloplatino, está disponible comercialmente como PLATINOL® como una solución inyectable. El carboplatino, diamina [1,1-ciclobutano-dicarboxilato(2-)-O,O']-platino, está disponible comercialmente como PARAPLATIN® como una solución inyectable.

Los agentes alquilantes son agentes anticancerosos no específicos de fase y fuertes electrófilos. Normalmente los agentes alquilantes forman enlaces covalentes por alquilación con el ADN, por medio de porciones nucleófilas de la molécula de ADN, tales como grupos amino, sulfhidrilo, hidroxilo, carboxilo e imidazol. Esta alquilación altera la función del ácido nucleico lo que conduce a la muerte celular. Ejemplos de agentes alquilantes incluyen, sin limitación, mostazas de nitrógeno tales como ciclofosfamida, melfalán y clorambucilo; sulfonatos de alquilo tales como busulfán; nitrosoureas tales como carmustina y triazenos tales como dacarbazina.

La ciclofosfamida, 2-óxido de 2-[bis(2-cloroetil)amino]tetrahidro-2H-1,3,2-oxazafosforina monohidratado, está

disponible comercialmente como una solución inyectable o comprimidos como CYTOXAN®. El melfalán, 4-[bis(2-cloroetil)amino]-L-fenilalanina, está disponible comercialmente como una solución inyectable o comprimidos como ALKERAN®. El clorambucilo, ácido 4-[bis(2-cloroetil)amino]bencenobutanoico está disponible comercialmente como LEUKERAN®. El busulfán, dimetanosulfonato de 1,4-butanodiol, está disponible comercialmente como MYLERAN® comprimidos. La carmustina, 1,3-[bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea, está disponible comercialmente en viales individuales de material liofilizado como BiCNU®. La dacarbazina, 5-(3,3-dimetil-1-triazeno)-imidazol-4-carboxamida, está disponible comercialmente en viales individuales de material como DTIC-Dome®.

Los agentes anticancerosos antibióticos son agentes no específicos de fase, que se unen o se intercalan en el ADN. Ejemplos de agentes anticancerosos antibióticos incluyen, sin limitación, actinomicinas como dactinomicina, antrociclinas como daunorrubicina y doxorrubicina y bleomicinas. La dactinomicina, también conocida como actinomicina D, está disponible comercialmente en forma inyectable como COSMEGEN®. La daunorrubicina, clorhidrato de (8S-cis)-8-acetil-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi- $\alpha$ , -L-lixo-hexopiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-1-metoxi-5,12 naftacendiona, está disponible comercialmente en una forma liposómica inyectable como DAUNOXOME®, o inyectable como CERUBIDINE®. La doxorrubicina, clorhidrato de (8S,10S)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi- $\alpha$ -L-lixo-hexopiranosil)oxi]-8-glicololil, 7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-1-metoxi-5,12 naftacendiona, está disponible comercialmente en forma inyectable como RUBEX® o ADRIAMYCIN RDF®. La bleomicina, una mezcla de antibióticos de glicopéptido citotóxico aislados de una cepa de *Streptomyces verticillus*, está disponible comercialmente como BLENOXANE®.

Los inhibidores de la topoisomerasa II incluyen, sin limitación, epipodofilotoxinas. Ejemplos de epipodofilotoxinas incluyen, sin limitación, etopósido y tenipósido. El etopósido, 4'-desmetil-epipodofilotoxina 9[4,6-O- (R)-etiliden- $\beta$ -D-glucopiranosido], está disponible comercialmente en solución inyectable o cápsulas como VEPESID® y es conocido comúnmente como VP-16. El tenipósido, 4'-desmetil-epipodofilotoxina 9[4,6-O-(R)-teniliden- $\beta$ -D-glucopiranosido], está disponible comercialmente en solución inyectable como VUMON®, y es conocido comúnmente como VM-26.

Los agentes neoplásicos antimetabolitos son agentes anticancerosos específicos de fase que actúan en la fase S (síntesis de ADN) del ciclo celular, inhibiendo la síntesis del ADN o inhibiendo la síntesis de bases de purina o pirimidina y limitando así la síntesis del ADN. Consecuentemente, la fase S no procede y sobreviene la muerte celular. Ejemplos de agentes antineoplásicos antimetabolitos incluyen, sin limitación, fluorouracilo, metotrexato, citarabina, mercaptopurina, tioguanina y gemcitabina. El 5-fluorouracilo, 5-fluoro-2,4-(1H,3H)pirimidindiona, está disponible comercialmente como fluorouracilo. La citarabina, 4-amino-1- $\beta$ -D- arabinofuranosil-2(1H)-pirimidinona, está disponible comercialmente como CYTOSAR-U® y es conocida comúnmente como Ara-C. La mercaptopurina, 1,7-dihidro-6H-purina-6-tiona monohidratada, está disponible comercialmente como PURINETHOL®. La tioguanina, 2-amino-1,7-dihidro-6H-purina-6-tiona, está disponible comercialmente como TABLOID®. Otros análogos de purina incluyen pentostatina eritrohidroxinoniladenina, fosfato de fludarabina y cladribina. La gemcitabina, monoclorhidrato de 2'-desoxi-2',2,-difluorocitidina, ((isómero  $\beta$ ), está disponible comercialmente como GEMZAR®. El metotrexato, ácido N-[4[[[(2,4-diamino-6-pteridinil)metil]metilamino]benzoil]-L-glutámico, está disponible comercialmente como metotrexato sódico.

La capecitabina, pentil[1-(3,4-dihidroxi-5-metil-tetrahidrofuran-2-il)-5-fluoro-2-oxo-1H-pirimidin-4-il]aminometanoato, es un agente quimioterapéutico administrado oralmente usado en el tratamiento del cáncer metastásico de mama y colorrectal y está disponible como XELODA®. La capecitabina es un profármaco que es convertido enzimáticamente en 5-fluorouracilo en el tumor, en donde inhibe la síntesis de ADN y retarda el crecimiento del tejido de tumor.

Las camptotecinas, que incluyen camptotecina y derivados de camptotecina, están disponibles o se encuentran en desarrollo como inhibidores de la topoisomerasa I. El irinotecán HCl, clorhidrato de (4S)-4,11-dietil-4-hidroxi-9-[(4-piperidinopiperidino)carboniloxi]-1H-pirano[3',4',6,7]-indolizino[1,2-b]quinolin-3,14(4H,12H)-diona, está disponible comercialmente en solución inyectable como CAMPTOSAR®. El topotecán HCl, (S)-10-[(dimetilamino)metil]-4-etil-4,9-dihidroxi-1H-pirano[3',4',6,7]-indolizino[1,2-b]quinolin-3,14-(4H,12H)-diona monoclorhidrato, está disponible comercialmente en solución inyectable como Hycamtin®.

Otros agentes anticancerosos incluyen inhibidores de la ruta de transducción de señal, que son aquellos inhibidores que bloquean o inhiben un proceso químico que evoca un cambio intracelular. Como se usa en la presente memoria, este cambio es la proliferación o diferenciación celular. Los inhibidores de transducción de señal incluyen inhibidores de tirosina quinasas receptores, tirosinas quinasas no receptores, bloqueadores del dominio SH2/SH3, serina/treonina quinasas, fosfatidilinositol-3 quinasas, señalización mio-inositol y oncogenes Ras. Varias tirosina quinasas de proteína catalizan la fosforilación de residuos tirosilo específicos en varias proteínas implicadas en la regulación del crecimiento celular. Dichas tirosina quinasas de proteína pueden ser clasificadas ampliamente como quinasas receptores o no receptores.

Las tirosina quinasas receptores son proteínas transmembrana que tienen un dominio de unión al ligando extracelular, un dominio de transmembrana y un dominio de tirosina quinasa. Las tirosina quinasas receptores están implicadas en la regulación del crecimiento celular y generalmente se denominan receptores del factor de crecimiento. La activación inapropiada o descontrolada de muchas de estas quinasas, es decir, la actividad

aberrante del receptor del factor de crecimiento de quinasa, por ejemplo la sobreexpresión o mutación, se ha visto que tiene como resultado el crecimiento celular descontrolado. Por consiguiente, la actividad aberrante de estas quinastas se ha asociado con crecimiento de tejido maligno. Consecuentemente, los inhibidores de dichas quinastas proveerían métodos de tratamiento del cáncer. Los receptores del factor de crecimiento incluyen, por ejemplo, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFr), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFr), erbB2, erbB4, receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFr), tirosina quinasa con dominios de homología del factor de crecimiento epidérmico y similar a inmunoglobulina (TIE-2), receptor del factor de crecimiento de insulina 1 (IGF1), factor estimulador de colonia de macrófagos (cfms), BTK, ckit, cmet, receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), receptores de Trk (TrkA, TrkB y TrkC), receptores de efrina (eph) y el protooncogén RET. Varios inhibidores de receptores del crecimiento están en desarrollo e incluyen antagonistas de ligandos, anticuerpos, inhibidores de tirosina quinasa y oligonucleótidos antisentido. Los receptores del factor de crecimiento y agentes que inhiben la función del receptor del factor de crecimiento se describen, por ejemplo, en Kath, John C., Exp. Opin. Ther. Patents (2000) 10(6):803-818; Shawver et al DDT Vol 2, No. 2, febrero de 1997 y Lofts, F. J. et al, "Growth factor receptors as targets, New Molecular Targets for Cancer Chemotherapy", ed. Workman, Paul y Kerr, David, CRC Press 1994, Londres.

Las tirosina quinastas que no son quinastas receptores de factor de crecimiento se denominan tirosina quinastas no receptores. Las tirosina quinastas no receptores para uso en la presente invención, que son dianas o dianas potenciales de fármacos anticancerosos, incluyen cSrc, Lck, Fyn, Yes, Jak, cAbl, FAK (quinasa de adhesión focal), tirosina quinasa de Brutons y Bcr-Abl. Estas quinastas no receptores y los agentes que inhiben la función de las tirosina quinastas no receptores se describen en Sinh, S. y Corey, S.J. (1999) Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research 8 (5): 465-80 y Bolen, J.B., Brugge, J.S., (1997) Annual Review Of Immunology, 15: 371-404.

Los bloqueadores del dominio SH2/SH3 son agentes que alteran la unión del dominio SH2 o SH3 en una variedad de enzimas o proteínas adaptadoras que incluyen la subunidad p85 de PI3-K, la familia de quinastas Src, moléculas adaptadoras (Shc, Crk, Nck, Grb2) y Ras-GAP. Los dominios SH2/SH3 como dianas para los fármacos anticancerosos se describen en Smithgall, T.E. (1995), Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. 34(3) 125-32.

Los inhibidores de serina/treonina quinastas incluyen bloqueadores de la cascada de la MAP quinasa, que incluyen bloqueadores de quinastas Raf (rafk), quinasa regulada por mitógeno o extracelular (MEK), y quinastas reguladas extracelulares (ERK) y bloqueadores de miembros de la familia de quinasa C que incluyen bloqueadores de PKC (alfa, beta, gamma, épsilon, mu, lambda, iota, zeta). La familia de quinastas Ikb (IKKa, IKKb), la familia de quinastas PKB, miembros de la familia de quinastas akt y quinastas receptoras TGF beta. Tales serina/treonina quinastas y sus inhibidores se describen en Yamamoto, T., Taya, S., Kaibuchi, K., (1999), Journal of Biochemistry, 126 (5) 799-803; Brodt, P, Samani, A., y Navab, R. (2000), Biochemical Pharmacology, 60. 1101-1107; Massague, J., Weis-Garcia, F. (1996) Cancer Surveys, 27:41-64; Philip, P.A., y Harris, A.L. (1995), Cancer Treatment and Research, 78:3-27; Lackey, K. et al Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters (10), 2000, 223-226; patente US-6.268.391; y Martinez-lacaci, L., et al, Int. J. Cancer (2000), 88(1), 44-52.

Los inhibidores de proteína quinasa disponibles comercialmente incluyen, sin limitación, bevacizumab, cetuximab, imatinib, trastuzumab, gefitinib, ranibizumab, pegaptanib, sorafenib, dasatinib, sunitinib, erlotinib, nilotinib, lapatinib, pazopanib y panitumumab. El bevacizumab, es un anticuerpo monoclonal humanizado que reconoce y bloquea el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A) y está disponible como AVASTIN®. El cetuximab es un anticuerpo quimérico de ratón/humano que reconoce el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y está disponible como ERBITUX®. El imatinib, 4-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]-N-[4-metil-3-[(4-piridin-3-ilpirimidin-2-il)amino]fenil]benzamida, está disponible como GLEEVEC® o GLIVEC®. El trastuzumab es un anticuerpo monoclonal de ratón humanizado que interfiere con el receptor HER2/neu conocido también como Erb2 y está disponible comercialmente como HERCEPTIN®. El gefitinib, N-(3-cloro-4-fluoro-fenil)-7-metoxi-6-(3-morfolin-4-ilpropoxi)quinazolin-4-amina, es un inhibidor de EGFR disponible como IRESSA. El ranibizumab es un fragmento de anticuerpo monoclonal (Fab) derivado del mismo anticuerpo murino original que bevacizumab (AVASTIN®) y está disponible como LUCENTIS®. El sorafenib, 4-[4-[[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]carbamoilamino]fenoxi]-N-metil-piridin-2-carboxamida, está comercializado como NEXAVAR®. El dasatinib, N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2- metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazol carboxamida monohidratada, está disponible como SPRYCEL®. El erlotinib, N-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)-quinazolin-4-amina, está disponible como TARCEVA®. El nilotinib, 4-metil-N- [3-(4-metil-1-H-imidazol-1-il)-5-(trifluorometil)fenil]-3-[(4-piridin-3-ilpirimidin-2-il)-amino]benzamida, es un inhibidor de BCR-ABL y está disponible como TASIGNA®. El pazopanib, 5-[[4-[(2,3-dimetil-2H-indazol-6-il)metilamino]-2-pirimidinil]amino]-2-metilbenzolsulfonamida, es un inhibidor de VEGFR que está disponible comercialmente como VOTRIENT®. El panitumumab es un anticuerpo monoclonal completamente humano específico para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (conocido también como receptor de EGF, EGFR, ErbB-1 y HER1 en seres humanos) y está comercializado como VECTIBIX®.

Las hormonas y análogos hormonales son compuestos útiles para el tratamiento del cáncer en los cuales existe una relación entre las hormonas y el crecimiento y/o la ausencia del desarrollo del cáncer. Ejemplos de hormonas y análogos hormonales útiles en el tratamiento del cáncer incluyen, sin limitación, adrenocorticosteroides tales como

prednisona y prednisolona, que son útiles en el tratamiento del linfoma maligno y la leucemia aguda en niños; aminoglutetimida y otros inhibidores de la aromatasa tales como anastrozol, letrozol, vorazol y exemestano, útiles en el tratamiento del carcinoma adrenocortical y carcinoma de mama dependiente de hormona que contiene receptores de estrógenos; progestinas tales como acetato de megestrol, útiles en el tratamiento del cáncer de mama dependiente de hormonas y el carcinoma endometrial; estrógenos, andrógenos y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, acetato de ciproterona y 5 $\alpha$ -reductasas, tales como finasterida y dutasterida, útiles en el tratamiento del carcinoma prostático y la hipertrofia prostática benigna; antiestrógenos tales como tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno, yodoxifeno y también moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERMS) como los que se describen en las patentes US-5.681.835, US-5.877.219 y US-6.207.716, útiles en el tratamiento del carcinoma de mama dependiente de hormonas y otros tipos de cáncer susceptible y la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y análogos de la misma, que estimulan la liberación de la hormona luteinizante (LH) y/o la hormona estimuladora de folículo (FSH) para el tratamiento del carcinoma prostático, por ejemplo, agonistas y antagonistas de LHRH como acetato de goserelina y luprolida. El letrozol, 4-[(4-cianofenil)-(1,2,4-triazol-1-il)metil]benzonitrilo, es un inhibidor de la aromatasa oral no esteroideo para el tratamiento del cáncer de mama sensible a hormonas después de cirugía y está disponible como FEMARA®.

En otra realización más, el ser humano muestra una hepatotoxicidad que es significativamente menor estadísticamente cuando se administra lapatinib, o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, en comparación con un ser humano que tiene por lo menos un polimorfismo seleccionado del grupo de: HLA-DQA1\*0201, HLA-DQB1\*0202 y HLA-DRB1\*0701. En otro aspecto, el ser humano no muestra una elevación significativa de ALT y/o TBL después de la administración de por lo menos una dosis de lapatinib o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunos casos un sujeto humano puede ser seropositivo para DQ2.2, lo que puede servir como una indicación del polimorfismo de HLA-DQA1\*0201, HLA-DQB1\*0202.

En otra realización más de la presente invención se proporcionan métodos para cribar sujetos humanos como una herramienta auxiliar para predecir la hepatotoxicidad por la administración de lapatinib, o la administración de una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprenden determinar si un sujeto tiene un genotipo de HLA asociado con un mayor riesgo de hepatotoxicidad por lapatinib, o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, en comparación con el riesgo esperado en la población general, en el que la presencia de dicho genotipo de HLA indica que el sujeto tiene mayor riesgo de experimentar hepatotoxicidad por lapatinib o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunos casos, los métodos comprenden tratar a dicho sujeto con un régimen terapéutico de lapatinib cuando el sujeto no está en mayor riesgo de hepatotoxicidad por lapatinib, o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunos casos, el genotipo de HLA se selecciona del grupo de: HLA-DQA1\*0201, HLA-DQB1\*0202 y HLA-DRB1\*0701. Además, algunos métodos comprenden correlacionar la detección de un alelo HLA-DQA1\*0201, HLA-DQB1\*0202, HLA-DRB1\*0701 y/o HLA-BM403 con un mayor riesgo de experimentar hepatotoxicidad por lapatinib, o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo. Algunos métodos también comprenden determinar si un sujeto humano tiene un genotipo rs12153855 y/o rs17207923 en TNXB, y correlacionar ese genotipo con un mayor riesgo de experimentar hepatotoxicidad por lapatinib. En algunos casos el sujeto humano puede tener polimorfismos tanto HLA-DQA1\*0201 como HLA-DQB1\*0202 y/o puede ser DQ2.2 seropositivo. Los péptidos de HLA de clase II forman proteínas heterodiméricas en donde las combinaciones DQA1/DQB1 y DRA/DRB1 crean distintos sitios de unión al antígeno (Jones EY, et al Nature Reviews: Immunology 2006; 6; 271-282). El HLA-DRA es funcionalmente monomérico y no se puede obtener más discriminación de marcador evaluando combinaciones alélicas específicas. En cambio, tanto DQA1\*0201 como DQB1\*0202 son poliméricos. Normalmente DQA1\*0201 forma isoformas de haplotipo cis con DQB1\*0202(DQ2.2) o DQB1\*0303 (DQ9.2), mientras que una isoforma DQ2.2 trans puede ser creada por un individuo portador de DQ9.2 y DQ2.5 (DQB1\*0201/DQA1\*0501) (Fallang et al, Nature Immunology 2009; 10; 1096- 1102). Por lo tanto, los presentes autores investigaron los alelos que contribuyen al serotipo DQ2.2, que comprende DQA1\*0201 como el péptido  $\alpha$ , con DQB1\*0201, \*0202 y \*0204 (designado como DQB1\*0201g) como péptidos  $\beta$  cis o trans (Jones EY et al Nature Reviews: Immunology 2006; 6; 271-282), sobre la elevación de ALT en el estudio confirmatorio.

En otra realización se proporcionan métodos de tratamiento de un sujeto humano en necesidad de tratamiento con lapatinib, o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, comprendiendo el método:

- determinar el genotipo del ser humano en las regiones HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRB1 y/o HLA-B del cromosoma 6; y
- administrar lapatinib o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo a dicho ser humano, si no es detectado el alelo polimérico en un gen HLA.

En algunos casos el gen HLA es un gen HLA de clase II. El alelo polimérico se selecciona del grupo de: HLA-DQA1\*0201, HLA-DQB1\*0202 y and HLA-DRB1\*0701 y opcionalmente el ser humano tiene por lo menos un alelo polimérico adicional. En algunos casos el ser humano también tiene por lo menos un genotipo polimérico en TNXB, seleccionado de: rs12153855 y rs 17207923.

También se proporcionan métodos para prescribir lapatinib o una sal o composición farmacéuticamente aceptable

del mismo a un sujeto humano, al que se le ha diagnosticado una afección susceptible de tratamiento con lapatinib, o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprenden:

- 5 determinar si el sujeto humano tiene un genotipo HLA que ha sido asociado con un mayor riesgo de hepatotoxicidad, en comparación con el riesgo en la población general, y  
 cuando se determina que dicho sujeto humano no tiene un genotipo que ha sido asociado con un mayor riesgo de hepatotoxicidad, prescribir un tratamiento con lapatinib o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo a dicho sujeto.

10 El genotipo HLA que ha sido asociado con un mayor riesgo de hepatotoxicidad se selecciona del grupo de: HLA-DQA1\*0201, HLA-DQB1\*0202 y HLA-DRB1\*0701. Adicionalmente, el ser humano puede tener el genotipo HLA-B\*4403.

Los métodos de genotipificación o determinación del genotipo HLA incluyen, sin limitación, métodos que detectan la presencia de la secuencia de ADN alélico.

También se proporcionan métodos de administración de lapatinib, o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, para reducir la incidencia de hepatotoxicidad, que comprenden:

- 15 a partir de una población inicial de sujetos humanos que tienen una afección susceptible de tratamiento con lapatinib o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, seleccionar una población de tratamiento que tiene un menor porcentaje de sujetos humanos con un alelo polimórfico en HLA en comparación con la población inicial y  
 20 administrar lapatinib o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, a dicha población de tratamiento;

con lo cual se reduce la incidencia de hepatotoxicidad en la población de tratamiento en comparación con la incidencia de hepatotoxicidad cuya ocurrencia sería de esperar en la población inicial.

- 25 También se proporcionan métodos de identificación de un sujeto humano en mayor riesgo de experimentar una reacción de hipersensibilidad a un régimen terapéutico de lapatinib o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprenden:

realizar una técnica de genotipificación en una muestra biológica de dicho sujeto humano para determinar si el genotipo HLA del sujeto incluye un alelo seleccionado de HLA-DQA1\*0201, HLA-DQB1\*0202 o HLA-DRB1\*0701;

detectar un alelo HLA-DQA1\*0201, HLA-DQB1\*0202 y/o HLA-DRB1\*0701 y

- 30 correlacionar la detección de un alelo HLA-DQA1\*0201, HLA-DQB1\*0202 y/o HLA-DRB1\*0701 con un mayor riesgo de experimentar hepatotoxicidad por un régimen terapéutico de lapatinib o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, en comparación con el riesgo si no fuera detectado el alelo HLA-DQA1\*0201, HLA-DQB1\*0202 y/o HLA-DRB1\*0701.

- 35 Además, también se puede identificar un sujeto con mayor riesgo de hepatotoxicidad por lapatinib por genotipificación de dicho sujeto para HLA-B\*4403 y/o un polimorfismo en TXNB, y correlacionando ese genotipo con un mayor riesgo de hepatotoxicidad.

Las muestras biológicas para el análisis de uno o más polimorfismos se pueden seleccionar del grupo de proteínas, nucleótidos, vesículas o componentes celulares, suero, células, sangre, componentes de la sangre, orina y saliva. El análisis de los polimorfismos se puede realizar mediante varias técnicas conocidas en la técnica y/o descritas en la presente memoria.

- 40 Otra realización más proporciona métodos para el tratamiento de un sujeto humano con lapatinib, o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene o que se ha diagnosticado que tiene cáncer de mama que sobreexpresa Her2 y/o amplificación de HER2 y ha recibido terapia anterior que incluye uno o más de: una antraciclina, un taxano y trastuzumab, y que no tiene, o que se ha diagnosticado que no tiene, uno o más polimorfismos alélicos seleccionados del grupo de: HLA-DQA1 \*0201, HLA-DQB1\*0202 y HLA-DRB1\*0701.

- 45 Otra realización proporciona métodos que comprenden una etapa de genotipificación del HLA en un sujeto humano tratado con lapatinib o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, con problemas de seguridad hepática y opcionalmente proporcionar una etapa de continuar el tratamiento con lapatinib o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, controlando la seguridad de dicho sujeto, sujeto que no tiene o se ha diagnosticado que no tiene, uno o más polimorfismos alélicos seleccionados del grupo de: HLA-DQA1\*0201, HLA-DQB1\*0202, and HLA-DRB1 \*0701. En otra realización más de la invención, el "alelo polimórfico" incluye uno o más  
 50

alelos dentro de un gen, un alelo sustituto o marcador para un alelo dentro de dicho gen, un alelo o marcador sobre el cromosoma humano 6 que está en el espacio de aproximadamente 6 megapares de bases de dicho gen o en la región MHC y un alelo o marcador que está en desequilibrio de ligamiento con un alelo o marcador en dicho gen, en el que dicho gen puede ser uno o más de HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRB1, HLA-B y UGT1A1.

- 5 Los métodos de la divulgación se pueden usar con sujetos humanos a los que se les ha diagnosticado o que padecen cualquier cáncer, que incluye sin limitación, un cáncer que es susceptible a la inhibición de EGFR, erbB-2 o Akt, y también formas tanto primarias como metastásicas de cáncer de la cabeza y cuello, mama, pulmón, colon, ovario y próstata. Los métodos también se pueden usar para cualquier sujeto humano que está siendo tratado con lapatinib.
- 10 La invención también proporciona métodos de tratamiento del cáncer en un ser humano, que comprenden administrar por lo menos una dosis de lapatinib o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo a dicho ser humano; controlar el nivel de ALT y/o bilirrubina total (TBL) en dicho ser humano; genotipificación de dicho ser humano para uno o más polimorfismos alélicos seleccionados del grupo de: HLA-DQA1\*0201, HLA-DQB1\*0202 y HLA-DRB1\*0701, si dicho ser humano muestra una elevación de dicha ALT mayor de 3,0x ULN y/o dicha
- 15 bilirrubina total es mayor de 1,5x ULN hasta aproximadamente 2x ULN o más. Este método comprende, además, administrar por lo menos una segunda dosis de lapatinib a dicho ser humano si dicho humano no tiene uno o más polimorfismos alélicos seleccionados del grupo de: HLA-DQA1\*0201, HLA-DQB1\*0202 y HLA-DRB1\*0701. La señal de seguridad hepática tal como ALT y/o TBL se puede medir usando técnicas muy conocidas en muestras que incluyen sangre, suero y plasma. En algunos casos el ser humano padece cáncer de mama. En los seres humanos
- 20 que no tienen por lo menos uno de los siguientes polimorfismos: HLA-DQA1\*0201, HLA-DQB1\*0202 y HLA-DRB1\*0701, pero que muestran señales de seguridad hepática elevadas, las señales de seguridad hepática como ALT y TBL se pueden seguir controlando mientras el sujeto humano permanece en tratamiento con el fármaco. Si estos u otras señales de seguridad hepática permanecen elevadas por encima de 3,0x ULN, entonces el tratamiento con lapatinib se puede interrumpir o suspender hasta que las señales de seguridad hepática retornen al intervalo
- 25 normal. El tratamiento con lapatinib se puede reiniciar.

La invención también provee la administración de lapatinib o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo a un ser humano, que comprende:

- (a) administrar por lo menos una primera dosis de lapatinib;
- (b) controlar por lo menos una señal de seguridad hepática en dicho ser humano;
- 30 (c) genotipificación de dicho humano para uno o más polimorfismos alélicos seleccionados del grupo de: HLA-DQA1\*0201, HLA-DQB1\*0202 y HLA-DRB 1\*0701, si dicha señal de seguridad hepática se eleva después de recibir por lo menos una dosis de lapatinib; y
- (d) administrar por lo menos una segunda dosis de lapatinib a dicho ser humano si el ser humano no tiene ninguno de los polimorfismos de la etapa (c). En algunos aspectos, la señal de seguridad hepática se selecciona de ALT y
- 35 TBL. En otros aspectos, el ser humano padece cáncer de mama. La ALT se puede elevar por encima de 3,0 x ULN y/o la TBL se puede elevar en dicho ser humano por encima de 1,5 x ULN o por encima de 2,0 ULN después de por lo menos una dosis de lapatinib. Estas señales de seguridad hepática pueden no elevarse hasta que se haya administrado más de una dosis de lapatinib a dicho ser humano. Se puede hacer un control periódico de las señales de seguridad hepática y la genotipificación se puede hacer después de que la señal de seguridad hepática se haya
- 40 elevado por encima del intervalo normal para esa señal de seguridad hepática. Las señales de seguridad hepática tales como ALT pueden no elevarse hasta 3,0 x ULN después de una sola dosis de lapatinib o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, pero pueden aumentar después de dos o más dosis de lapatinib. Como se entiende en la técnica, las señales de seguridad hepática pueden no elevarse en un ser humano que recibe terapia independientemente de los polimorfismos de HLA después de solo una dosis de terapia. En
- 45 algunos casos, la elevación de la señal de seguridad hepática puede ser gradual y puede no ocurrir durante una semana, un mes o hasta 100 días o más después del inicio de la terapia. De esta manera, las señales de seguridad hepática como ALT se pueden controlar a intervalos y la genotipificación solo se producirá después de alcanzar la señal de seguridad hepática un nivel particular.

- El lapatinib puede aumentar los niveles séricos de bilirrubina total (TBL). Se hizo una investigación farmacogenética post-hoc de las elevaciones de TBL inducidas por lapatinib en pacientes que participaron en ensayos clínicos de
- 50 AMBC (cáncer de mama avanzado y/o metastásico) y recibieron lapatinib en monoterapia o en combinación con varias quimioterapias (véase arriba). Los estudios mostraron que el genotipo (TA)7/(TA)7 de UGT1A1 UGT1A1\*28/\*28, que confiere una susceptibilidad genética subyacente al síndrome de Gilbert) puede aumentar los niveles séricos de bilirrubina total (TBL) durante el tratamiento con el fármaco. En este análisis, el genotipo
- 55 (TA)7/(TA)7 se asoció con un aumento estadísticamente significativo del riesgo de hiperbilirrubinemia inducida por lapatinib con respecto a los genotipos (TA)6/(TA)6 y (TA)6/(TA)7. Adicionalmente, el predominio del genotipo UGT1A1 (TA)7/(TA)7 que conduce a hiperbilirrubinemia difiere de acuerdo con la raza/etnicidad. De esta manera, en

un aspecto de la presente invención se proporcionan métodos para administrar lapatinib a un ser humano, en el que dicho ser humano está libre de un genotipo (TA)<sup>7</sup>/(TA)<sub>7</sub> de UGT1A1. Adicionalmente, un ser humano que muestra un aumento de los niveles totales de bilirrubina después de la administración de por lo menos una dosis de lapatinib, se puede analizar para determinar la bilirrubina fraccionada mediante un análisis de sangre. Los métodos de análisis de bilirrubina fraccionada son muy conocidos en la técnica. En un sujeto que tiene una elevación de ALT superior a 3xULN y que tiene por lo menos un genotipo seleccionado de HLA-DQA1\*0201, HLA-DQB1\*0202 y/o HLA DRB1\*0701, el sujeto se puede analizar adicionalmente para determinar la bilirrubina fraccionada.

Los inventores establecieron que existe una correlación entre el genotipo de HLA de un individuo (particularmente de clase II) y el riesgo de experimentar hepatotoxicidad después de la administración de lapatinib o después de la administración de una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo. Por consiguiente, la invención proporciona un método para evaluar el riesgo relativo de un individuo de desarrollar hepatotoxicidad, que incluye la genotipificación de ese individuo en los genes HLA para determinar si el genotipo del individuo lo coloca en un mayor riesgo de hepatotoxicidad. Los individuos que tienen un genotipo de HLA que ha sido asociado previamente con una mayor incidencia de hepatotoxicidad (en comparación con la incidencia de hepatotoxicidad en los sujetos con genotipos alternativos) están en mayor riesgo de hepatotoxicidad.

Los presentes métodos de cribado comprenden la genotipificación del sujeto para los genes HLA, particularmente los genes HLA de clase II, que incluye detectar la presencia o ausencia de HLA-DQA1\*0201, HLA-DQB1\*0202, HLA-DRB1\*0701 y/o HLA-B\*4403.

En vista de la presente divulgación, será evidente para los expertos en la materia cómo determinar genotipos adicionales que están asociados con un mayor riesgo de hepatotoxicidad. Se conocen varias formas alélicas de los genes HLA y los métodos de tipificación de los genes HLA son conocidos en la técnica. Conforme se detecten polimorfismos adicionales en los genes HLA humanos, la tipificación de dichos polimorfismos se puede basar en los métodos conocidos. Por consiguiente, se puede tipificar una población de sujetos que han recibido lapatinib, o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, y correlacionar el genotipo de HLA con la ocurrencia de hepatotoxicidad. En un método alternativo, se pueden genotipificar solo aquellos sujetos que han experimentado hepatotoxicidad y en donde se conoce el predominio de un alelo de HLA en una población de control emparejada (no hepatotóxica), determinar si el alelo está sobre-representado en la población hepatotóxica, indicando que está asociado con hepatotoxicidad. Como será evidente para el experto en la materia, la detección de un alelo de HLA se puede realizar tipificando marcadores genéticos que se sabe que están en desequilibrio de ligamiento con el alelo/polimorfismo del HLA diana. Preferiblemente, dichos marcadores están en desequilibrio de ligamiento sustancial, más preferiblemente los marcadores están en completo desequilibrio de ligamiento.

Será evidente para los expertos en la materia que, como existen múltiples genotipos de HLA, el riesgo relativo de hepatotoxicidad puede variar entre los múltiples genotipos. Por ejemplo, en un método de cribado multi-locus en donde se encuentran más de dos genotipos, se puede determinar que el riesgo relativo es más alto para un genotipo, el más bajo para otro, e intermedio en otros. El "mayor riesgo" puede ser comparado con el riesgo en una población que no ha sido estratificada por genotipo (una población general), o si se identifica adicionalmente, el "mayor riesgo", es en comparación con el riesgo esperado en otro genotipo definido.

La presencia de un genotipo predeterminado particular que está asociado con un mayor riesgo de hepatotoxicidad, por lo tanto, indica una mayor probabilidad de que el individuo muestre el fenotipo asociado (hepatotoxicidad) con respecto a los sujetos con uno o más genotipos alternativos. El genotipo raramente será absolutamente predictivo, es decir, cuando una población con un cierto genotipo presenta una incidencia alta de un fenotipo asociado, no todos los individuos con ese genotipo mostrarán el fenotipo. Similarmente, algunos individuos con un genotipo diferente pueden presentar el mismo fenotipo. Sin embargo, será evidente para los expertos en la materia que la genotipificación de un sujeto como se describe en la presente memoria será una herramienta auxiliar para predecir el riesgo de un sujeto de sufrir hepatotoxicidad por tratamiento con lapatinib, o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo y, por lo tanto, ayudará a tomar las decisiones de tratamiento. Los presentes métodos, además, pueden comprender administrar lapatinib o una sal o composición farmacéuticamente del mismo a los sujetos después del cribado de los sujetos cuando el riesgo de hepatotoxicidad se considera aceptable; la decisión del tratamiento final se basará en otros factores además del análisis genético (como será evidente para el experto en la materia), que incluyen el estado de salud general del sujeto y el resultado esperado del tratamiento.

Los alelos polimórficos se pueden detectar determinando la secuencia de polinucleótidos del ADN o detectando la secuencia correspondiente en los transcritos de ARN del gen polimórfico, o cuando el polimorfismo de ácido nucleico produce un cambio en la proteína codificada, detectando dichos cambios en la secuencia de aminoácidos en las proteínas codificadas; utilizando cualquier técnica adecuada conocida en la técnica. Los polinucleótidos utilizados para la tipificación generalmente son ADN genómico o un fragmento de polinucleótido derivado de una secuencia de polinucleótido genómico, tal como por ejemplo de una biblioteca hecha usando material genómico del individuo (por ejemplo, una biblioteca de ADNc). El polimorfismo se puede detectar con un método que comprende poner en contacto una muestra de polinucleótido o proteína de un individuo con un agente de unión específica para el

5 polimorfismo y determinar si el agente se une al polinucleótido o proteína, en donde la unión indica que está presente el polimorfismo. El agente de unión también se puede unir a nucleótidos y aminoácidos flanqueantes sobre uno o los dos lados del polimorfismo, por ejemplo, por lo menos 2, 5, 10, 15 o más nucleótidos o aminoácidos flanqueantes en total o en cada lado. Cuando la presencia del polimorfismo se determina en un polinucleótido, se puede detectar en la forma de doble cadena, pero normalmente se detecta en la forma de una sola cadena.

10 El agente de unión puede ser un polinucleótido (de una sola cadena o de doble cadena) normalmente con una longitud de por lo menos 10 nucleótidos, por ejemplo por lo menos 15, 20, 30 o más nucleótidos. Un agente polinucleótido que se usa en el método generalmente se unirá al polimorfismo de interés, y la secuencia flanqueante, de una manera específica de secuencia (por ejemplo, se hibridan de acuerdo con el apareamiento de bases de Watson-Crick) y de esta manera normalmente tiene una secuencia que es parcialmente o totalmente complementaria a la secuencia del polimorfismo y a la región flanqueante. El agente de unión puede ser una molécula estructuralmente similar a los polinucleótidos que comprenden unidades capaces de participar en el apareamiento de bases de Watson-Crick (tales como análogos de purina o pirimidina, ácidos péptido nucleicos o derivados de ARN tales como ácidos nucleicos cerrados (LNA)). El agente puede ser una proteína, normalmente con una longitud de por lo menos 10 aminoácidos, tal como por ejemplo por lo menos 20, 30, 50 o 100 o más aminoácidos. El agente puede ser un anticuerpo (que incluye un fragmento de dicho anticuerpo que es capaz de unirse al polimorfismo).

20 En una realización de los presentes métodos se usa un agente de unión como una sonda. La sonda se puede marcar o puede ser susceptible de marcarse indirectamente. La detección del marcaje se puede usar para detectar la presencia de la sonda sobre (unida a) el polinucleótido o proteína del individuo. La unión de la sonda al polinucleótido o proteína se puede usar para inmovilizar la sonda o el polinucleótido o proteína (y de esta manera separarlo de una composición o solución).

25 En otra realización de la divulgación, el polinucleótido o proteína del individuo se inmoviliza sobre un soporte sólido y después se pone en contacto con la sonda. Después se detecta la presencia de la sonda inmovilizada en el soporte sólido (mediante su unión al polimorfismo), ya sea directamente detectando un marcaje sobre la sonda o indirectamente poniendo en contacto la sonda con una porción que se une a la sonda. En el caso de detectar un polimorfismo de polinucleótido, el soporte sólido generalmente es de nitrocelulosa o nylon. En el caso de un polimorfismo de proteína, el método se puede basar en un sistema ELISA.

30 Los presentes métodos se pueden basar en un ensayo de ligación de oligonucleótido en el cual se usan dos sondas de oligonucleótidos. Estas sondas se unen a zonas adyacentes sobre el polinucleótido que contienen el polimorfismo, permitiendo (después de la unión) que las dos sondas se ligan entre sí por medio de una enzima ligasa apropiada. Sin embargo, las dos sondas únicamente se unirán a un polinucleótido que contiene el polimorfismo (de una manera que permite la ligación) y, por lo tanto, la detección del producto ligado se puede usar para determinar la presencia del polimorfismo.

35 En una realización, la sonda se usa en un sistema basado en análisis de heterodúplex para detectar polimorfismos. En dicho sistema, cuando la sonda se une a una secuencia de polinucleótido que contiene el polimorfismo, forma un heterodúplex en el sitio en donde ocurre el polimorfismo (es decir, no forma una estructura de doble cadena). Dicha estructura heterodúplex se puede detectar usando una enzima que es específica de una sola cadena o de doble cadena. Normalmente la sonda es una sonda de ARN y la enzima usada es ARNasa H, que escinde la región de heterodúplex, permitiendo así la detección del polimorfismo por medio de la detección de los productos de escisión.

40 El método se puede basar en el análisis de desapareamiento por escisión química fluorescente, que se describe por ejemplo en "PCR Methods and Applications", 3:268-71 (1994) y Proc. Natl. Acad. Sci. 85:4397-4401 (1998).

45 En una realización, el agente polinucleótido es capaz de actuar como un iniciador para una reacción de PCR solo si se une a un polinucleótido que contiene el polimorfismo (es decir, una sistema de PCR específico de secuencia o de alelo). De esta manera, un producto de PCR solo será producido si el polimorfismo está presente en el polinucleótido del individuo y la presencia del polimorfismo es determinada mediante la detección del producto de PCR. La región del cebador que es complementaria al polimorfismo está en el extremo 3' del cebador o cerca del mismo. En una realización de este sistema, el agente polinucleótido se unirá a la secuencia de tipo silvestre pero no actuará como un cebador para una reacción de PCR.

50 El método puede ser un sistema basado en el polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP). Esto se puede usar si la presencia del polimorfismo en el polinucleótido crea o destruye un sitio de restricción que es reconocido por una enzima de restricción. De esta manera, el tratamiento de un polinucleótido que tiene dicho polimorfismo producirá diferentes productos en comparación con la correspondiente secuencia de tipo silvestre. De esta manera, se puede usar la detección de la presencia de productos particulares de digestión de restricción para determinar la presencia del polimorfismo.

5 La presencia del polimorfismo se puede determinar basándose en el cambio que la presencia del polimorfismo supone para la movilidad del polinucleótido o proteína durante la electroforesis en gel. En el caso de un polinucleótido se puede usar el análisis de polimorfismo de conformación de una sola cadena (SSCP). Esta técnica mide la movilidad del polinucleótido de una sola cadena en un gel desnaturizante en comparación con el polinucleótido de tipo silvestre correspondiente; la detección de una diferencia de movilidad indica la presencia del polimorfismo. La electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE) es un sistema similar en donde el polinucleótido se somete a electroforesis a través de un gel con un gradiente desnaturizante; una diferencia de movilidad comparada con el polinucleótido de tipo silvestre correspondiente indica la presencia del polimorfismo.

10 La presencia del polimorfismo puede determinarse usando un colorante fluorescente y un ensayo de PCR basado en un agente de extinción, tal como el sistema de detección de PCR TAQMAN™. En otro método de detección del polimorfismo, se determina la secuencia de un polinucleótido que comprende la región polimórfica a través de la región que contiene el polimorfismo para determinar la presencia del polimorfismo.

15 Otras técnicas de detección adecuadas para uso en los presentes métodos serán evidentes para los versados en los métodos de detección, identificación y/o distinción de polimorfismos. Dichas técnicas de detección incluyen, sin limitación, secuenciación directa; uso de "balizas moleculares" (sondas de oligonucleótidos que fluorescen por hibridación, útiles en la PCR de fluorescencia de tiempo real; véase, por ejemplo, Marras, et al, Genet Anal 14:151 (1999)); detección electroquímica (reducción u oxidación de bases o azúcares de ADN, véase la patente US-5.871.918 de Thorp, et al); amplificación en círculo rodante (véase por ejemplo, Gusev et al, Am J Pathol 159:63 (2001)); un método de detección no basado en PCR de Third Wave Technologies (Madison, WI) INVADER® (véase, por ejemplo, Lieder, Advance for Laboratory Managers, 70 (2000)).

Por consiguiente, en los presentes métodos se puede utilizar cualquier técnica de detección adecuada conocida.

25 Como se usa en la presente memoria, la "determinación" del genotipo de un sujeto no requiere la realización de una técnica de genotipificación cuando previamente se ha genotipificado al sujeto y se dispone de los resultados de la prueba genética previa; por consiguiente, la genotipificación de un sujeto incluye la referencia a análisis genéticos previamente realizados.

La presente divulgación también proporciona una prueba predictiva (de cuidado de paciente) o kit de prueba. Dicha prueba ayudará al uso terapéutico de compuestos farmacéuticos que incluyen los inhibidores de tirosina quinasa tales como lapatinib, basándose en asociaciones predeterminadas entre el genotipo y/o la respuesta fenotípica al compuesto farmacéutico. Dicha prueba puede tener diferentes formatos, que incluyen:

30 (a) una prueba que analiza ADN o ARN para determinar la presencia de alelos y/o polimorfismos predeterminados. Un kit de prueba apropiado puede incluir uno o más de los siguientes reactivos o instrumentos: una enzima capaz de actuar sobre un polinucleótido (normalmente una polimerasa o enzima de restricción), tampones adecuados para los reactivos de enzimas, cebadores de PCR que se unen a las regiones que flanquean el polimorfismo, un control positivo o negativo (o ambos), y un aparato de electroforesis en gel. El producto puede utilizar una de las tecnologías de chip descritas en el estado de la técnica. El kit de prueba incluiría instrucciones impresas o legibles en máquina  
35 indicando la correlación entre la presencia de un genotipo específico y la probabilidad de que un sujeto tratado con un compuesto farmacéutico específico experimente una reacción de hipersensibilidad;

40 (b) una prueba que analiza materiales derivados del cuerpo del sujeto, tales como proteínas o metabolitos, que indica la presencia de un polimorfismo o alelo predeterminado. Un kit de prueba apropiado puede comprender una molécula, aptámero, péptido o anticuerpo (que incluye un fragmento de anticuerpo), que se une específicamente a una región polimórfica predeterminada (o una región específica que flanquea el polimorfismo). Adicionalmente, el kit puede comprender uno o más reactivos o instrumentos adicionales (como se conocen en la técnica). El kit de prueba también incluiría instrucciones impresas o legibles en máquina indicando la correlación entre la presencia de un polimorfismo o genotipo específico y la probabilidad de que un sujeto tratado con un análogo de nucleósido sintético  
45 específico experimente una reacción de hipersensibilidad.

También son realizaciones de la divulgación iniciadores, sondas, anticuerpos y otros reactivos de detección específicos para detectar los polimorfismos HLA-DQA1\*0201, HLA-DQB1\*0202, HLA-DRB1\*0701, HLA-B\*4403, TNXB rs12153855 y/o rs17207923 y/o UGT1A1\*28 y también kits o envases que comprenden por lo menos uno de estos reactivos.

50 Los especímenes biológicos adecuados para el análisis son los que comprenden células y ADN e incluyen, sin limitación, sangre o componentes de la sangre, manchas de sangre seca, orina, frotis bucales y saliva. Las muestras adecuadas para análisis serológico de HLA son muy conocidas en la técnica.

La presente invención también proporciona el uso de lapatinib, o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, para el tratamiento del cáncer en un ser humano, en donde dicho ser humano no tiene uno o

más polimorfismos alélicos seleccionados del grupo de: HLA-DQA1\*0201, HLA-DQB1\*0202 y/o HLA DRB1\*0701. En un aspecto, la invención proporciona el uso de lapatinib, o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en un ser humano, en el que dicho ser humano se genotipifica para determinar un polimorfismo en HLA, y se le administra lapatinib o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, si dicho humano no tiene polimorfismos alélicos seleccionados del grupo de: HLA-DQA1\*0201, HLA-DQB1\*0202 y/o HLA-DRB1\*0701. Los métodos de la presente invención se pueden usar en la fabricación de kits y medicamentos para el tratamiento con lapatinib, o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo. También se entiende que los métodos de la presente invención describen varios usos del lapatinib o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 La invención se describe adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos no limitativos.

### Ejemplos

Los datos generales usados para los ejemplos 1A-1C que se dan más abajo se tomaron de las mismas muestras de varias pruebas clínicas. Los datos se analizaron y los resultados se confirmaron mediante varios análisis que se muestran abajo. En los siguientes ejemplos se usó lapatinib o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo. La forma comercial de lapatinib se comercializa actualmente en la forma de la sal ditosilato monohidratada (Tykerb/Tyverb).

#### Ejemplo 1A: Investigación farmacogenética de las señales de seguridad hepatoiliar asociadas con lapatinib

En esta investigación farmacogenética se usaron datos clínicos y ADN de la línea germinal recogidos durante la realización de trece ensayos clínicos aleatorizados que evaluaron lapatinib en el tratamiento del AMBC. Los protocolos de ensayo clínico fueron revisados y aprobados por Comités de Ética Independientes o los Consejos de Revisión Institucionales. Se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes para la investigación farmacogenética, además del consentimiento del paciente para participar en los estudios clínicos. Se usó una estrategia de dos etapas para la identificación exploratoria de la asociación de marcadores genéticos, seguida por confirmación del marcador previamente especificado en conjuntos de datos independientes, para identificar asociaciones genéticas con elevación de ALT durante el tratamiento en sujetos caso y control. Para el análisis exploratorio, se reunieron los resultados de doce ensayos que evaluaron lapatinib como monoterapia o como componente de varias combinaciones de quimioterapia. De estos pacientes, 901 recibieron tratamiento con lapatinib y estuvieron disponibles para hacer la selección de caso y control de ALT.

Los sujetos de caso y control de ALT tratados con lapatinib se seleccionaron de las cohortes de exploración (n=901) y confirmación (n=374). Los casos de ALT se definieron como pacientes tratados con lapatinib que tenían una medición basal de ALT dentro del intervalo normal ( $<1 \times \text{ULN}$ ) y una o más mediciones de ALT durante el tratamiento  $>3 \times \text{ULN}$  durante el curso de tratamiento. Los controles de ALT eran pacientes expuestos a lapatinib durante por lo menos 13 semanas, que tenían mediciones basales de ALT y todas sus mediciones de ALT durante el tratamiento dentro del intervalo normal. La cohorte exploratoria incluyó 37 casos de ALT y 286 controles y la cohorte confirmatoria incluyó 24 casos de ALT y 154 controles.

#### Objetivo

El objetivo de este estudio farmacogenético confirmatorio fue investigar si las variantes genéticas previamente especificadas estaban asociadas con las elevaciones de ALT y/o TBL observadas durante el tratamiento en el grupo de tratamiento con ditosilato de lapatinib monohidratado más letrozol.

Usando los alelos de HLA, genes candidatos DILI y la plataforma de ensayo del genoma completo Illumina 1M, los análisis exploratorios identificaron variantes genéticas asociadas significativamente con la elevación de ALT o TBL. Para el fenotipo de ALT, se identificaron asociaciones nominalmente significativas para 58 variantes distintas e incluyeron tres alelos de HLA de clase II (HLA-DRB 1\*0701, -DQA1\*0201, -DQB1\*0202) y un alelo HLA de clase I (HLA-B\*4403) y un SNP en TNXB (A-8829G, rs12153855). Para el fenotipo TBL, un resultado clave fue la asociación de la variante del síndrome de Gilbert UGT1A1\*28 con la elevación de TBL. Este ejemplo resume los resultados de un análisis confirmatorio usando datos clínicos y genéticos del grupo de tratamiento con ditosilato de lapatinib monohidratado más letrozol. Para el análisis confirmatorio, se usó un solo ensayo de fase III que evalúa lapatinib más letrozol frente a letrozol solo, como una terapia de primera línea para el cáncer de mama metastásico positivo para el receptor de hormonas posmenopáusicas, del que se disponía después de terminar el análisis exploratorio. De los pacientes que recibieron lapatinib más letrozol, 374 pacientes (57 %) dieron su consentimiento y estuvieron disponibles para la selección de caso y control de ALT.

#### Metodología

Los análisis estadísticos usados para esta investigación indicaron lo siguiente. Los dos fenotipos que fueron

5 evaluados fueron los valores máximos de bioquímica hepática para ALT y TBL durante el tratamiento, con respecto al límite superior normal. Estos fenotipos se evaluaron mediante un análisis de caso-control y de rasgo cuantitativo, mientras que las asociaciones clave se examinaron cualitativamente en los casos combinados ALT/TBL. Los casos de ALT y TBL se definieron como las elevaciones máximas durante el tratamiento  $>3x$  ULN y  $>1,5x$  ULN, respectivamente y los sujetos de control se definieron como ALT o TBL máximas durante el tratamiento  $<1x$  ULN. Adicionalmente, todos los casos y controles tuvieron ALT y TBL normales en el basal ( $\leq 1x$ ULN) y los controles habían estado sometidos a por lo menos trece semanas de tratamiento. Se dispuso de datos clínicos para estos fenotipos de aproximadamente 370 pacientes con una muestra de ADN adecuada, completamente consentida.

10 Se ensayaron un total de 1003 pruebas de confirmación que fueron específicas para criterios de valoración previos (ALT/TBL), población de sujetos (todos los sujetos/sujetos europeos) y métodos de análisis (QTA o caso-control). Estas pruebas de confirmación ensayadas comprendieron 999 pruebas de 833 SNP únicos y 4 pruebas de 4 alelos de HLA. Se obtuvieron con éxito los genotipos disponibles para el análisis y se hicieron pruebas en 719 SNP únicos (860 pruebas) y los 4 alelos de HLA de interés (4 pruebas).

#### Resultados

15 Para ALT, seis marcadores genéticos alcanzaron asociación en las pruebas de confirmación a un nivel de  $p < 0,01$ . HLA-DQA1\*0201 alcanzó significancia de confirmación ajustada según Bonferroni ( $p = 4,6 \times 10^{-5}$ ). Los marcadores de asociación confirmados adicionales con  $p < 0,01$  fueron HLA-DQB1\*0202 y HLA-DRB1\*0701 (ambos  $p = 2 \times 10^{-4}$ ), dos SNP en TNXB (rs12153855,  $p = 2 \times 10^{-4}$  y rs17207923,  $p = 7 \times 10^{-3}$ ) y un SNP en HNF1A (rs1169288,  $p = 7 \times 10^{-3}$ ). Aunque no alcanzó significancia a  $p < 0,01$ , el siguiente resultado más significativo fue HLA-B\*4403 ( $p = 0,013$ ). Los alelos de HLA y SNPs de TNXB están localizados en la misma región MHC del cromosoma 6, y probablemente reflejan un alto grado de correlación, lo que es sugestivo de una sola señal. Esta hipótesis es apoyada por un análisis condicional para HLA-DQA1\*0201, con los otros cinco marcadores genéticos asociados, que se convierten en no significativos ( $p > 0,05$ ) después de un ajuste para HLA-DQA1\*0201 en el modelo. HNF1A está localizado en el cromosoma 12 y no se correlaciona con las otras señales principales. Para HLA-DQA1\*0201, 17/24 (71 %) de los casos ALT en comparación con 32/154 (21 %) de los controles llevan por lo menos un alelo \*0201 y producen una razón de probabilidad de 9,26 (intervalo de confianza exacto de 95 %: 3,26-28,34), cuando se clasifican los que llevan una o dos copias del alelo \*0201 como el grupo de riesgo. Como marcador predictivo de la elevación de ALT entre los sujetos casos y todos los sujetos no casos, HLA-DQA1\*0201 tuvo PPV 0,18 y NPV 0,97 (intervalo de confianza exacto de 95 %: 0,11-0,27 y 0,95-0,99, respectivamente).

30 Para TBL, 21 marcadores alcanzaron asociación confirmada a  $p < 0,01$ ; sin embargo, ninguno alcanzó un nivel de significancia ajustado según Bonferroni. De estas variantes, 18 están localizadas en el locus UGT1. El marcador del polimorfismo de la repetición TA7 de UGT1A1 del síndrome de Gilbert (UGT1A1\*28) no muestra asociación significativa con TBL cuando se evaluaba usando todos los genotipos detectados como clases separadas en el modelo genotípico (TA5/TA5, TA5/TA6, TA6/TA6, TA6/TA7, TA7/TA7 y TA7/TA8). Sin embargo, la significancia se alcanzó ( $p < 0,01$ ) para el SNP UGT1A1 muy correlacionado (rs887829), y también cuando el polimorfismo de la repetición TA se evaluó para determinar solamente los tres genotipos de repetición de TA comunes (TA6/TA6, TA6/TA7 y TA7/TA7), retirando 4 sujetos del análisis que eran portadores de las otras tres clases raras de genotipo. Siete de 21 (33 %) casos de TBL en comparación con 9/226 (4 %) de los controles llevaban el genotipo TA7/TA7. Se alcanzó una razón de probabilidad de 12,06 (intervalo de confianza exacto de 95 %: 3,23-42,16) cuando se clasificaron los que llevaban dos copias de los alelos TA7 como el grupo de riesgo. UGT1A1\*28 estaba asociado significativamente tanto con la TBL basal como con el log10 de TBL máxima en todos los sujetos. En general, estos datos siguen siendo concordantes con un efecto de UGT1A1\*28 del síndrome de Gilbert sobre TBL.

45 Para los casos combinados de ALT/TBL con basal restringido (valores de ALT y TBL  $< 1x$  ULN en el basal), 6/6 eran portadores de los alelos HLA-DQA1\*0201 y -DRB1\*0701 y 5/6 eran portadores de HLA-DQB1\*0202. El genotipo TA7/TA7 UGT1A1 era portado por 1/6. Para los casos combinados de ALT/TBL con basal no restringido (valores de ALT y/o TBL  $> 1x$  ULN en el basal), 4/6 eran portadores del genotipo TA7/TA7 UGT1A1, y 1/6 era portador de los alelos HLA-DQA1\*0201, -DQB1\*0202 y -DRB1\*0701.

#### Conclusiones

50 Usando el grupo de tratamiento de ditosilato de lapatinib más letrozol de EGF30008, los análisis confirmaron los marcadores genéticos previamente especificados para la elevación de ALT: HLA-DQA1\*0201/-DQB1\*0202/-DRB1\*0701. Aunque no se confirmó estadísticamente a un nivel de significancia ajustado según Bonferroni, la asociación de UGT1A1\*28 con elevación de TBL aislada en este análisis fue concordante con un efecto del síndrome de Gilbert.

55 **Ejemplo 1B: Resultados de la investigación farmacogenética exploratoria de las señales de seguridad hepatobiliar asociadas con lapatinib usando métodos de genes candidatos**

## Introducción

En estudios clínicos se han observado elevaciones aisladas en la alanina aminotransferasa (ALT) sérica y elevaciones de bilirrubina total (TBL) en pacientes que reciben lapatinib. Este estudio farmacogenético exploratorio investigó la asociación de polimorfismos de genes candidatos con criterios de valoración de elevación de ALT y TBL. Este estudio utilizó pacientes expuestos a ditosilato de lapatinib monohidratado (como monoterapia o en combinaciones con otras terapias), con datos clínicos disponibles y una muestra de ADN adecuada completamente consentida disponible de doce ensayos clínicos de cáncer de mama avanzado y metastásico tratado con ditosilato de lapatinib monohidratado.

## Objetivo

El objetivo de este estudio farmacogenético exploratorio fue investigar si las variantes genéticas seleccionadas estaban asociadas con las elevaciones de ALT y TBL durante el tratamiento observadas en estos estudios.

## Metodología

Los análisis estadísticos usados para esta investigación indicaron lo siguiente. Los dos fenotipos que fueron evaluados fueron los valores máximos de la bioquímica hepática durante el tratamiento para ALT y TBL con respecto al límite superior normal. Estos fenotipos se evaluaron separadamente en análisis de caso-control y rasgo cuantitativo, y conjuntamente en un análisis combinado de caso-control. Los casos de ALT y TBL se definieron como elevaciones máximas durante el tratamiento de  $3x$  ULN y  $>1,5x$  ULN, respectivamente y los sujetos de control se definieron como ALT o TBL máxima durante el tratamiento de  $\leq 1x$  ULN. Se disponía de datos clínicos de aproximadamente 950 pacientes con una muestra adecuada completamente consentida para estos fenotipos. Después de terminar el control de calidad de la genotipificación del sujeto, quedaron un total de 947 pacientes para los análisis farmacogenéticos de por lo menos una variante genética. Debido a la diferencia en la incidencia de las elevaciones de ALT en comparación con otros tratamientos, los pacientes tratados con la combinación de ditosilato de lapatinib monohidratado - pazopanib de VEG20007 se excluyeron de este análisis primario.

Se utilizó un enfoque de gen candidato de aproximadamente 300 genes, que incluyó lo siguiente: 1) 25 genes seleccionados basándose en la ruta del mecanismo de lapatinib y ADME: (CYP, UGT y genes transportadores de fármaco). 2) Como la comprensión genética del daño hepático inducido por fármaco es limitada, también se evaluó un panel extenso de daño hepático inducido por fármaco (DILI), desarrollado por GSK consultando expertos en hígado externos. Este panel DILI está comprendido por aproximadamente 6500 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en 270 regiones de gen, derivadas de los mecanismos postulados implicados en la fisiopatología de DILI. En los dos enfoques se investigó la variación genética en cada región de gen usando SNP de etiqueta seleccionados del proyecto internacional HapMap y/o cobertura de SNP de alta densidad, que consiste en todos los SNP funcionales con una correlación genotipo-fenotipo previamente registrada. 3) También se evaluaron los genes de HLA (genotipos de 4 dígitos de HLA-A, -B, -C, -DPB1, -DQA, -DQB1 y -DRB1, genotipos de 2 dígitos de -DRB3, -DRB4 y -DRB5), puesto que los ejemplos publicados tienen implicado un componente inmunitario en el daño hepático causado por otros fármacos. La evaluación de los genes de HLA se enfocó sobre un subconjunto del número total de pacientes que consiste en todos los casos de ALT (n=47) y controles emparejados (n=47).

## Resultados

Para el fenotipo TBL, 125 variantes de 66 regiones del gen se asociaron significativamente ( $p < 0,01$ ) con elevación de TBL por QTA (N~900) y/o análisis de caso-control (~60 casos y ~395 controles). De estas variantes, 31 eran de una región del gen, el clúster UGT1A@. Un resultado clave fue la asociación de la variante del síndrome de Gilbert UGT1A1\*28 con elevación de TBL, significativa tanto para QTA ( $1,25 \times 10^{-5}$ , n=899) como para los análisis de caso (N=60) y control (N=396) ( $p = 1,04 \times 10^{-5}$ ). Treinta y cinco por ciento de los casos de TBL fueron del genotipo TA7/TA7 y 82 % de los casos de TBL tenían por lo menos un alelo TA7, en comparación con 5 % y 48 %, respectivamente, de los controles. Los pacientes homocigóticos para la variante UGT1A1\*28 tuvieron una razón de probabilidad (IC 95 %) de 10,7 (5,3-21,6) de ser más un caso que un control, en comparación con los otros genotipos.

Para el fenotipo ALT, 51 variantes de 34 regiones del gen se asociaron significativamente ( $p < 0,01$ ) con elevación de ALT por QTA (n~900) y/o análisis de caso-control (~35 casos y ~285 controles). En el análisis de HLA, dos señales genéticas se asociaron significativamente ( $p < 0,05$ ) con elevación de ALT en el análisis de caso-control emparejado (47 casos y 47 controles): HLA-DRB1\*0701 (junto con otras variantes de HLA correlacionadas con este alelo) y HLA-B\*4403. El HLA-DRB1\*0701 se asoció significativamente con elevación de ALT ( $p = 0,014$ ), con una razón de probabilidad (IC 95 %) de 4,4 (1,6-12,0) en el caso de ser portador de HLA-DRB1\*0701 en comparación con todos los otros alelos HLA-DRB1 observados. Un caso de ALT tuvo el genotipo HLA-DRB1\*0701/\*0701 y 40 % de los casos de ALT tuvieron por lo menos una copia del alelo HLA-DRB1\*0701, a diferencia de cero y 13 % respectivamente de los controles. El HLA-B\*4403 se asoció significativamente con elevación de ALT ( $p = 0,033$ ), con una razón de probabilidad (IC 95 %) de 4,0 (1,1-14,3) en el caso de ser portador de HLA-B\*4403 en comparación

con todos los otros alelos HLA-B observados. El 23 % de los casos de ALT llevaban una copia del alelo HLA-B\*4403 (no se observaron sujetos que llevaran dos copias), en comparación con 6 % respectivamente de los controles.

Para casos combinados de ALT y TBL, 20 variantes de 15 regiones del gen se asociaron significativamente ( $p < 0,01$ ) con el criterio de valoración de caso-control combinado (~9 casos y ~225 controles). Para los marcadores clave, 5/13 casos de ALT/TBL combinado fueron homocigotos TA7/TA7 de 20 UGT1A1\*28 (38 %) y 4/13 casos de ALT/TBL combinado tuvieron por lo menos uno de los alelos de HLA significativos anteriormente descritos (31 %).

**Ejemplo 1C: Análisis en dos etapas de la identificación exploratoria de la asociación del marcador, seguido por confirmación del marcador previamente especificado en conjuntos de datos independientes usando análisis de caso-control de ALT**

10 Antecedentes: El lapatinib es un inhibidor de la tirosina quinasa de HER2/EGFR aprobado para el tratamiento del cáncer de mama avanzado o metastásico (AMBC) que sobreexpresa HER2. Se han observado acontecimientos hepatobiliares graves en una pequeña proporción de pacientes de AMBC tratadas con lapatinib. Se hizo una investigación farmacogenética en dos etapas de la elevación de ALT en pacientes de AMBC tratadas con lapatinib en un ensayo clínico.

15 Métodos: La identificación exploratoria del marcador evaluó *HLA* (10 genes), genes candidatos (299 genes, 7426 SNP) y cribado del genoma completo (1M SNP) en 37 casos con ALT >3x el límite superior normal (ULN) y 286 controles con ALT <1x ULN. Los marcadores que alcanzaron umbrales de asociación previamente especificados se llevaron a un conjunto de datos confirmatorio independiente de 24 casos de ALT y 155 controles.

20 Resultados: De 58 variantes asociadas con una elevación de ALT >3x ULN en el conjunto de datos exploratorio, cuatro excedieron el umbral de significancia preestablecido en el análisis confirmatorio. Estas variantes residen en el mismo locus genómico de MHC e incluyen *HLA-DQA1\*0201*, que alcanzó significancia en la prueba corregida múltiple. En el estudio confirmatorio, la presencia del alelo *DQA1\*0201* se observó en el 71 % de los casos de ALT, en comparación con el 21 % de los controles, con una razón de probabilidad de 9,0 (3,2-27,4). Como un predictor de riesgo a la seguridad hepática (casos de ALT contra ausencia de casos), *DQA1\*0201* tuvo valores predictivos negativos y positivos de 0,97 (0,95-0,99) y 0,17 (0,10-0,26), respectivamente.

25 Conclusiones: Estos resultados apoyan la intervención de mecanismos inmunitarios en la hepatotoxicidad causada por el lapatinib. Una prueba basada en la presencia del alelo *DQA1\*0201* puede mitigar el riesgo a la seguridad hepática durante el tratamiento con lapatinib en mujeres con AMBC.

Introducción

30 El lapatinib (Tykerb®/Tyverb®) es un inhibidor doble de la tirosina quinasa de HER2/ErbB2 y EGFR/ErbB1 aprobado para uso oral en combinación con capecitabina, para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama avanzado o metastásico (AMBC) cuyos tumores sobreexpresan HER2/ErbB2 y que han recibido terapia previa que incluye una antraciclina, un taxano y trastuzumab (Finn RS, et al. J Clin Oncol 2009; 27: 3908-3915). El lapatinib también es activo como un agente único y en combinación con otros agentes quimioterapéuticos y hormonales en pacientes con  
35 cáncer de mama metastásico HER2/ErbB2 positivo (Di Leo, A., et al. J Clin Oncol, 2008; 26, 5544-5552 y Johnston S, et al. J Clin Oncol 2009; 27; 5538-5546) y cáncer de mama inflamatorio (Christofanilli M, et al. Breast Cancer Res Treat 2006; 100: 5S). Además, están en marcha grandes ensayos clínicos para evaluar la monoterapia de lapatinib en la etapa temprana del cáncer de mama adyuvante (Moy B y Goss PE. Clin Breast Cancer 2007; 7: 489-492). Una extensa experiencia clínica con lapatinib ha mostrado un perfil de seguridad aceptable en el contexto de la terapia  
40 del cáncer de mama (Di Leo, A., et al. J Clin Oncol, 2008; 26, 5544-5552 y Geyer, CE, et al. N Engl J Med 2006; 355: 2733-2743). Sin embargo, se han observado elevaciones aisladas en transaminasas séricas (que incluyen alanina aminotransferasa, ALT) y bilirrubina total (TBL) y valores anómalos de laboratorio graves de elevación de ALT de grado 3 ("Common Toxicity Criteria for Adverse Events", v4.0) y se han acontecimientos de la regla de Hy en 1,6 % en 0,2 % de las pacientes de cáncer que reciben lapatinib (Moy, B, et al. J Clin Oncology 2009; 27, 15S (Supl. A1043)). Se ha descrito elevación de transaminasas y TBL en el suero y acontecimientos aislados de  
45 hepatotoxicidad con otros inhibidores de tirosina quinasa (Loriot Y, et al. Nature Clinical Practice Oncology (2008)).

Los valores anómalos de la bioquímica hepática se consideran señales de seguridad del daño hepático (Mann, R y Andrews, E, (eds), "Pharmacovigilance" (Wiley and Sons Ltd, Chichester), 2006), y pueden ser causa de suspensión del tratamiento con el consiguiente control deficiente de la enfermedad en las pacientes con cáncer. Una mejor comprensión de los mecanismos de la hepatotoxicidad puede permitir una mejor interpretación y manejo de las  
50 pacientes que presentan estas señales. Estudios recientes han identificado fuertes asociaciones entre polimorfismos específicos del Antígeno Leucocitario Humano (HLA) dentro del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) y hepatotoxicidad en diversos tratamientos con indicaciones no relacionadas. Estas incluyen amoxicilina-clavulanato (*HLA-DRB1\*1501*, O'Donohue, J, et al., Gut 2000; 47: 717-720), quimioterapia antituberculosa (*HLA-DQB1\*0201*, Sharma, SK, et al. Am J Resp Crit Care 2002; 166:916-919), ticlopidina (*HLA-A\*3303*, Hirata K., et al. The

Pharmacogenomics Journal 2008; 8:29- 33), ximelagatran (*HLA-DRB1\*0701*, Kindmark, A., et al. Pharmacogenomics Journal, 2007; 1-10), flucloxacilina (*HLA-B\*5701*, Daly A, flucloxacilina; et al. Nature Genetics 2009; 41:816-819) y lumaricoxib (*HLA-DRB1\*1501*, Wright TM., trabajo presentado en el 9º Congreso Anual sobre Hepatotoxicidad de la FDA/PhRMA/AASLD, marzo de 2009). La recogida prospectiva de ADN de la línea germinal durante los ensayos clínicos con lapatinib en pacientes con cáncer de mama permitió en la presente investigación farmacogenética identificar variantes que pueden servir como predictores de pacientes con alto riesgo de daño hepático asociado al lapatinib.

Métodos

Pacientes v características de los ensayos clínicos

En esta investigación farmacogenética se usaron datos clínicos y ADN de la línea germinal recogidos durante la realización de trece ensayos clínicos aleatorizados que evaluaron lapatinib para el tratamiento del AMBC. Los protocolos de ensayo clínico fueron revisados y aprobados por Comités de Ética Independientes o los Consejos de Revisión Institucionales. Se obtuvo el consentimiento informado de las pacientes para la investigación farmacogenética, además del consentimiento de la paciente para participar en los estudios clínicos.

Se usó una estrategia de dos etapas para la identificación exploratoria de la asociación de marcadores genéticos, seguida por confirmación del marcador previamente especificado en conjuntos de datos independientes, para identificar asociaciones genéticas de sujetos caso de elevación de ALT durante el tratamiento y sujetos control. Para el análisis exploratorio, se combinaron los datos clínicos disponibles a 16 de abril de 2008 de doce ensayos que evaluaron lapatinib como monoterapia o como componente de varias combinaciones quimioterapéuticas. La población por intención de tratar (ITT) combinada de estos estudios fue de 2198 pacientes y 1336 (61 %) dieron su consentimiento para la investigación farmacogenética. Un total de 901 pacientes recibieron tratamiento con lapatinib y estuvieron disponibles para la selección de caso y control de ALT. Para el análisis confirmatorio, se usó un solo ensayo de fase III que evalúa lapatinib más letrozol frente a letrozol solo, como una terapia de primera línea para el cáncer de mama metastásico positivo para el receptor hormonal posmenopáusico (Johnston S, et al. J Clin Oncol 2009; 27; 5538-5546), que estuvo disponible después de terminar el análisis exploratorio. Este estudio tuvo una población ITT de 1286 sujetos y 772 (60 %) dieron su consentimiento para la investigación farmacogenética. De las pacientes que recibieron lapatinib más letrozol, 374 pacientes (57 %) dieron su consentimiento y estuvieron disponibles para la selección de caso y control de ALT. Las características clínicas de estos subconjuntos de estudios genéticos se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Características clínicas de las poblaciones exploratorias y confirmatorias farmacogenéticas

	<b>Población del estudio farmacogenético exploratorio</b>	<b>Población del estudio farmacogenético confirmatorio</b>
<b>Tipo de enfermedad</b>	Cáncer de mama avanzado localmente y metastásico (12 ensayos)	Cáncer de mama metastásico positivo para receptor hormonal posmenopáusico (1 ensayo)
<b>Total N (todas mujeres)</b>	901 <sup>1</sup>	374 <sup>2</sup>
<b>Edad (años): Media (DE)</b>	52,2 (11,0)	63,5 (9,9)
<b>Grupos de ascendencia informados por datos clínicos y genéticos</b>	Europea (N = 620, 68,8 %)	Europea (N = 301, 80,5 %)
	Hispanos (N = 103, 11,4 %)	Hispanos (N = 42, 11,2 %)
	India-Pakistaní (N = 52, 5,8 %)	Paquistaní (N = 8, 2,1 %)
	Tunecina (N = 33, 3,7 %)	Negro (N = 8, 2,1 %)
	Asiática (N = 29, 3,2 %)	Asiática (N = 5, 1,3 %)
	Negra (N = 21, 2,3 %)	Tunecina (N = 3, 0,8 %)
	Ninguno - Valores atípicos (N = 24, 2,7 %)	Ninguno - Valores atípicos (N = 5, 1,3 %)
	Ninguno - Información del genotipo inadecuada (N = 19,2.1 %)	Ninguno - Información del genotipo inadecuada (N = 2, 0,5 %)
<b>Metástasis en hígado (N, %)</b>	343 (38,1 %)	88 (23,5 %)
<b>Tratamiento con lapatinib<sup>3</sup></b>	Monoterapia (N = 363)	Combinación: letrozol
	Combinación: paclitaxel (N = 218)	(N=374)

	<b>Población del estudio farmacogenético exploratorio</b>	<b>Población del estudio farmacogenético confirmatorio</b>
	Combinación: capecitabina (N = 146)	
	Combinación: trastuzumab (N = 146)	
	Combinación: paclitaxel + carboplatino (N = 3)	
	Combinación: paclitaxel + carboplatino + trastuzumab (N = 4)	
	Combinación: paclitaxel + trastuzumab (n = 21)	
<b>ALT basal xULN: Media(DE)/Mediana</b>	0,75 (0,76)/0,52	0,64 (0,53)/0,49
<b>TBL basal xULN: Media(DE)/Mediana</b>	0,47 (0,32)/0,40	0,45 (0,22)/0,40
<b>ALP basal xULN: Media(DE)/Mediana</b>	1,0 (0,91)/0,75	0,99 (0,69)/0,81
<b>ALT máxima durante el tratamiento xULN: Media(DE)/Mediana</b>	1,29 (1,96)/0,80	1,53 (1,97)/0,91
<b>TBL máxima durante el tratamiento xULN: Media(DE)/Mediana</b>	0,88 (1,08)/0,68	0,93 (1,48)/0,76
<b>ALP máxima durante el tratamiento xULN: Media(DE)/Mediana</b>	1,34(1,40)/0,91	1,57 (1,55)/1,08
<b>ALT máxima durante el tratamiento &gt;3 xULN (N, %)</b>	66 (7,3 %)	35 (9,4 %)
<b>ALT máxima durante el tratamiento &gt;5 xULN (N, %)</b>	24 (2,7 %)	19 (5,1 %)
<b>ALT máxima durante el tratamiento &gt;8 xULN (N, %)</b>	9 (1,0 %)	9 (2,4 %)
<sup>1</sup> Para el análisis exploratorio, se combinaron los datos clínicos de doce ensayos disponibles a 16 de abril de 2008. <sup>2</sup> Para el análisis confirmatorio se usó un solo ensayo de fase III, que estuvo disponible después de terminar el análisis exploratorio. <sup>3</sup> Los sujetos con datos farmacogenéticos de VEG20007 que recibieron la combinación de lapatinib más pazopanib (n=46) se excluyeron de este análisis ya que se observó que esta combinación produce una incidencia más alta de elevación de ALT que las otras combinaciones o la monoterapia con lapatinib. Las pacientes tratadas con monoterapia de lapatinib de VEG20007 (n=44) se incluyeron en este análisis y comprenden parte del número total de sujetos (n=901).		

El diseño general del estudio se muestra en la Figura 1. Los sujetos de caso y control de ALT tratados con lapatinib se seleccionaron de las cohortes exploratoria (n=901) y confirmatoria (n=374). Los casos de ALT se definieron como pacientes tratadas con lapatinib que tenían mediciones basales de ALT dentro del intervalo normal ( $\leq 1 \times \text{ULN}$ ) y una o más mediciones de ALT  $> 3 \times \text{ULN}$  durante el transcurso del tratamiento. Los controles de ALT eran pacientes expuestas a lapatinib durante al menos 13 semanas, que tenían sus mediciones de ALT basales y durante el tratamiento dentro del intervalo normal. El estudio exploratorio incluyó 37 casos de ALT y 286 controles, y el estudio confirmatorio incluyó 24 casos de ALT y 154 controles. Las características clínicas de estos subconjuntos de caso y control se describen en la Tabla 2. Como control negativo para la elevación de ALT inducida por lapatinib, las pacientes tratadas solo con letrozol del estudio de confirmación se genotipificaron para los alelos confirmados. De las pacientes que recibieron letrozol solo, 340 pacientes (55 %) estaban disponibles para la selección de caso y control ALT, proporcionando 11 casos y 159 controles para el análisis de control sin lapatinib.

Tabla 2. Datos demográficos de casos y controles del estudio exploratorio y confirmatorio

	Casos de ALT del estudio exploratorio	Controles de ALT del estudio exploratorio	Casos de ALT del estudio confirmatorio	Casos de ALT del estudio confirmatorio
<b>Tipo de enfermedad</b>	Cáncer de mama avanzado localmente y metastásico (12 ensayos)	Cáncer de mama avanzado localmente y metastásico (12 ensayos)	Cáncer de mama metastásico positivo para receptor hormonal posmenopáusico (1 ensayo)	Cáncer de mama metastásico positivo para receptor hormonal posmenopáusico (1 ensayo)
<b>Total N (todas mujeres)</b>	37	286	24	155
<b>Edad (años): Media (DE)</b>	50,9 (9,9)	52,8 (10,6)	65,5 (9,0)	64,4 (9,7)
<b>Grupos ascendencia informadas por clínica y genética de Datos</b>	Europeos (N = 26) No europeos (N = 8)	Europeos (N = 196) No europeos (n = 79)	Europeos (N = 21) No europeos (N = 3)	Europeos (N = 123) No europeos (n = 28)
<b>Tratamiento con lapatinib</b>	Ninguno <sup>1</sup> (N = 3) Monoterapia (N = 14) Terapia de combinación (N = 23)	Ninguno <sup>1</sup> (N = 11) Monoterapia (N = 105) Terapia de combinación (N = 181)	Ninguno <sup>1</sup> (N = 0)  Terapia de combinación (N = 24)	Ninguno <sup>1</sup> (N = 4)  Terapia de combinación (N = 155)
<b>ALT basal xULN: Media(DE)/Mediana</b>	0,51 (0,21)/0,49	0,43(0,18)/0,40	0,45(0,21)/0,41	0,43(0,18)/0,40
<b>ALT máxima durante el tratamiento xULN: Media(DE)/Mediana</b>	6,47(6,57)/4,70	0,59(0,21)/0,59	6,50(3,73)/4,96	0,66(0,19)/0,65
<sup>1</sup> Valores atípicos o información de genotipo inadecuada				

## Características de los pacientes y de los ensayos clínicos

5 En esta investigación farmacogenética se usaron datos clínicos y ADN de la línea germinal recogidos durante la realización de trece ensayos clínicos aleatorizadas de doble ciego que evaluaron lapatinib para el tratamiento del AMBC (como se muestra en la Tabla 3). Los protocolos de ensayo clínico fueron revisados y aprobados por Comités de Ética Independientes o los Consejos de Revisión Institucionales. Se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes para la investigación farmacogenética, además del consentimiento del paciente para participar en los ensayos clínicos.

10 Tabla 3. Ensayos clínicos usados en esta investigación farmacogenética

Estudio/Tratamiento	Enrolados <sup>1</sup>	Estudios farmacogenéticos consentidos <sup>1</sup>	Lapatinib recibido y con datos clínicos válidos de LFT y ADN adecuado <sup>1</sup>	Sujetos analizables (post-CC) <sup>2</sup>
Lapatinib + Trastuzumab	54		35	27
Lapatinib + Capecitabina	408		256	142
Lapatinib + Paclitaxel	49		41	36
Lapatinib	154		64	46
Lapatinib + Carboplatino + Paclitaxel con o sin Trastuzumab	13		9	7

Estudio/Tratamiento	Enrolados <sup>1</sup>	Estudios farmacogenéticos consentidos <sup>1</sup>	Lapatinib recibido y con datos clínicos válidos de LFT y ADN adecuado <sup>1</sup>	Sujetos analizables (post-CC) <sup>2</sup>
Lapatinib + Paclitaxel + Trastuzumab	33	21	21	21
Lapatinib con o sin Trastuzumab	296	203	185	185
Lapatinib	242	147	120	120
Lapatinib + Paclitaxel	57	43	40	40
Lapatinib	138	95	93	91
Lapatinib + Paclitaxel	580	320	145	142
Lapatinib con o sin Pazopanib	174	102	90	90
	<b>2198</b>	<b>1363</b>	<b>954</b>	<b>947</b>
Lapatinib más letrozol frente a letrozol	<b>1286</b>	<b>702</b>	<b>468</b>	<b>371</b>

Se usó una estrategia de dos etapas para la identificación exploratoria de la asociación de marcadores genéticos, seguida por confirmación del marcador previamente especificado en conjuntos de datos independientes, para identificar asociaciones genéticas entre sujetos con caso de elevación de ALT durante el tratamiento y sujetos de control. Para la cohorte exploratoria se combinaron los datos de doce ensayos que evaluaron lapatinib como monoterapia o como componente de varias combinaciones quimioterapéuticas. La población por intención de tratar (ITT) combinada de estos estudios fue de 2198 sujetos y 1336 (61 %) dieron su consentimiento para la investigación farmacogenética. Un total de 901 pacientes recibieron tratamiento con lapatinib y estuvieron disponibles para la selección de caso y control de ALT. Después de terminar el análisis exploratorio estuvo disponible para la cohorte confirmatoria un solo ensayo que evalúa lapatinib más letrozol frente a letrozol solo, como una terapia de primera línea para el cáncer de mama metastásico positivo para el receptor hormonal posmenopáusico (Johnston S, et al. J Clin Oncol 2009; 27; 5538-5546). Este estudio tuvo una población ITT de 1286 sujetos y 772 (60 %) dieron su consentimiento para la investigación farmacogenética. De las pacientes que recibieron lapatinib más letrozol, 371 pacientes (57 %) dieron su consentimiento y estuvieron disponibles para la selección de caso y control de ALT. Las características clínicas de estos subconjuntos de estudios genéticos se describen en la Tabla 1 anterior.

#### Mediciones de bioquímica hepática

Las mediciones de ALT, TBL y fosfatasa alcalina (ALP) fueron realizadas por laboratorios institucionales locales. Estos valores se convirtieron en la unidad "límite superior normal" (ULN) dividiendo los valores de laboratorio por el límite superior de los valores normales, específico del laboratorio institucional.

#### 20 Genotipificación

El ADN de la línea germinal se extrajo de sangre periférica (kit de ADN sanguíneo (QiAmp DNA Blood Kit, Qiagen, Valencia, CA). Este estudio evaluó genes candidatos y cribado del genoma completo, realizados en paralelo, para detectar señales de asociación caso-control en la cohorte exploratoria. Los genes de *HLA* de clase I y II (siete genes a una resolución de 4 dígitos y tres genes a 2 dígitos) fueron tipificados por Laboratory Corporation of America (Burlington, NC) e Histogenetics (Ossining, NY), o en GSK usando la prueba de tipificación LABType® SSO Typing Test (One Lambda, Canoga Park, CA). Además, se genotipificaron genes candidatos que comprenden 850 polimorfismos en 29 genes implicados en disposición metabólica de lapatinib y la ruta de transducción de señal de EGFR y 6560 SNP en 270 genes de un panel hecho a la medida de genes relacionados con daño hepático inducido por fármaco (DILI) (plataforma GoldenGate o plataforma Infinium iSelect, Illumina, San Diego, CA). También se genotipificó por cribado del genoma completo en la plataforma Illumina Human 1M-Duo (Expression Analysis, Durham, NC).

Para el control de calidad, los sujetos se evaluaron individualmente para determinar el rendimiento en cada plataforma de genotipificación y para consistencia de género. Los marcadores de cada plataforma se evaluaron para determinar el rendimiento individual en todos los sujetos. Los datos de genotipo de las muestras de control se compararon para determinar la concordancia con datos de herencia internos y/o del dominio público. Se compararon los genotipos de muestras duplicadas y se observó que eran concordantes.

#### Análisis estadístico

Para todas las variantes, la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) se probó separadamente tanto en los conjuntos de datos exploratorios como los confirmatorios, usando una prueba exacta en el grupo étnico con el tamaño de muestra más grande (sujetos con ascendencia europea). Ninguna de las variantes confirmadas se desvió significativamente del HWE en los conjuntos exploratorio o confirmatorio.

5 Para el estudio exploratorio, se hizo un análisis inicial GWAS usando regresión logística, efectuada en PLINK (Purcell S, et al. American Journal of Human Genetics 2007; 81, 559-575), usando la opción de prueba genotípica cuando se observaban tres clases de genotipos, o la opción de prueba aditiva cuando solo se observaron dos clases de genotipos. Los marcadores que pasaron el cribado inicial del GWAS y los conjuntos de marcadores de DILI/CG y HLA se analizaron con un método de regresión logística penalizada (SAS Institute Inc., Cary, NC, EE. UU.), que  
10 funciona mejor que la regresión logística estándar cuando los números de control de caso son bajos (Heinze G. "A comparative investigation of methods for logistic regression with separated or nearly separated data", Statistics in Medicine 2006; 25: 4216-4226). Además del término de genotipo, todos los modelos incluyeron xULN de ALT basal, grupo de tratamiento (para el estudio exploratorio) y un número suficiente de componentes principales para  
15 contrarrestar una posible confusión por la estructura de la población. Los componentes principales se obtuvieron de EIGENSOFT (Patterson N, et al. PLoS Genetics 2006; 2: e190), usando los sujetos del estudio y fundadores de HapMap.

Se requirieron marcadores genéticos seleccionados para la confirmación para obtener umbrales predefinidos de valores de p en el análisis exploratorio de  $p \leq 0,05$  para marcadores de HLA,  $p \leq 0,01$  para marcadores de genes candidatos y  $p \leq 10^{-4}$  para SNP de cribado del genoma completo. Para marcadores confirmados a  $p \leq 0,01$ , se  
20 evaluaron las mediciones de utilidad clínica potencial. Se designó un alelo o genotipo(s) que confirió un mayor riesgo de elevación de ALT y este se comparó con alelos/genotipos sin riesgo y se calculó la razón de probabilidad (OR), el valor predictivo positivo (PPV) y el valor predictivo negativo (NPV).

## Resultados

### Características de los pacientes

25 Las poblaciones del estudio genético exploratorio y confirmatorio fueron similares para el AMBC, pero con diferencias en cuanto a edad, incidencia de metástasis hepáticas y diferentes regímenes de tratamiento (como se muestra en las Tablas 1 y 2). En el estudio confirmatorio se enrolaron pacientes con cáncer de mama metastásico positivo para el receptor de hormona posmenopáusico, lo que reflejaba la edad media más avanzada de las  
30 pacientes de este estudio. Las pacientes con ascendencia europea fueron los grupos más predominantes y las mediciones de la función hepática basal y máxima durante el tratamiento fueron similares en ambos conjuntos de datos.

En la cohorte exploratoria, usando todos los sujetos que recibieron lapatinib y que tenían una medición basal y al menos una medición de ALT máxima durante el tratamiento, se hizo un análisis de regresión lineal monovariante para identificar los factores asociados con ALT máxima durante el tratamiento. La ALT basal fue un predictor  
35 significativo de la elevación de ALT máxima durante el tratamiento ( $p < 0,001$ ), mientras que no lo fueron la edad, el tratamiento, la metástasis hepáticas ni la etnicidad autoinformada.

### Análisis exploratorio y confirmatorio de la asociación genética

Un total de 58 variantes genéticas únicas cumplieron con los umbrales para significancia estadística nominal con elevación de ALT según el análisis de caso-control, y se seleccionaron para análisis ulterior en el estudio  
40 confirmatorio. De los 58 marcadores exploratorios preseleccionados, se encontró que 4 estaban asociados significativamente con elevación de ALT en el estudio confirmatorio ( $p \leq 0,01$ ) según el análisis de caso y control. Las cuatro variantes confirmadas residen en el mismo locus genómico de MHC (Tabla 4) e incluyen *HLA-DQA1\*0201*, *DQB1\*0202* y *DRB1\*0701* más un SNP en *TNXB* (rs12153855). La asociación más significativa fue para *HLA-DQA1\*0201* ( $p = 8,0 \times 10^{-5}$ ) que excedía una corrección de prueba múltiple estricta en el conjunto de datos  
45 confirmatorio (Bonferroni  $0,05/58 = 8,0 \times 10^{-4}$ ). Esta se considera conservativa dado que algunas de las pruebas confirmatorias realizadas están entre los marcadores muy correlacionados. La proximidad genómica y la correlación entre estos polimorfismos concuerdan con una sola señal de asociación. Esto fue apoyado por un análisis de regresión condicional jerárquico, en donde después de ajustar para *DQA1\*0201* o *DRB1\*0701*, las tres variantes restantes se convirtieron en no significativas ( $p > 0,05$ , véase la Tabla 5). La descripción se enfocará más sobre  
50 *DQA1\*0201* pero los resultados para *DRB1\*0701* son similares (véase la Tabla 4).

Tabla 4. Análisis de caso-control de ALT de los 4 marcadores preseleccionados y confirmados de la región MHC/HLA

Variante	Alelo o genotipo de riesgo	Estudio exploratorio				Estudio confirmatorio			
		Portadores: Casos	Portadores: Controles	Razón de probabilidad <sup>1</sup>	Valor P	Portadores: Casos	Portadores: Controles	Razón de probabilidad <sup>1</sup>	Valor P
DQA1 *0201	*0201 <sup>2</sup>	14/35 (40 %)	58/283 (20 %)	2,6 (1,1, 5,7)	0,03	17/24 (71 %)	33/155 (21 %)	9,0 (3,2, 27,4)	8,0 x10 <sup>-5</sup>
TNXB rs121538 55	CC/CT	12/34 (35 %)	47/281 (17 %)	2,7 (1,1, 6,2)	0,01	15/24 (63 %)	29/155 (19 %)	7,2 (2,6, 20,5)	0,0002
DQB1 *0202	*0202 <sup>2</sup>	13/35 (37 %)	47/281 (17 %)	2,9 (1,3, 6,6)	0,007	15/24 (63 %)	30/155 (19 %)	6,9 (2,5, 19,6)	0,0003
DRB1 *0701	*0701 <sup>2</sup>	14/35 (40 %)	59/283 (21 %)	2,5 (1,1, 5,6)	0,04	16/24 (67 %)	35/155 (23 %)	6,9 (2,5, 19,9)	0,0004

<sup>1</sup>Razón de probabilidad de caso-control con intervalos de confianza exactos de 95 %  
<sup>2</sup>El alelo sin riesgo representa todos los otros alelos de cuatro dígitos observados en el gen de HLA de interés

Tabla 5. Análisis de condicionamiento de marcadores de HLA/MHC en el estudio confirmatorio que sugiere una sola señal de asociación

Marcador de condicionamiento	Marcador de prueba			
	DQA1*0201	TNXB rs12153855	DQB1*0202	DRB1*0701
HLA-DQA1*0201	<b>8,0x10<sup>-5</sup></b>	0,07	>0,10	>0,10
TNXB rs12153855	0,02	<b>0,0002</b>	0,01	0,09
HLA-DQB1*0202	0,05	0,007	<b>0,0003</b>	>0,10
HLA-DRB1*0701	>0,10	0,05	>0,10	<b>0,0004</b>

Los valores p genotípicos dados son condicionales sobre la variante de la primera columna. Los resultados de SNP individuales figuran en la diagonal en negrita.

Evaluación adicional de HLA-DQA1\*0201

5 La Figura 2 compara distintos datos de asociación de caso- control de ALT para DQA1\*0201. En el estudio exploratorio, 40 % (14/35) de los casos, en comparación con 20 % (58/283) de los controles, llevaban por lo menos un alelo DQA1\*0201, mientras que en el estudio confirmatorio, 71 % (17/24) de los casos, en comparación con 21 % (33/155) de los controles, eran portadores de DQA1\*0201. Cuando la presencia del alelo DQA1\*0201 se clasificó como el grupo de riesgo en casos y controles, la razón de probabilidad del estudio exploratorio fue de 2,6 (1,1-5,7), en comparación con 9,0 (3,2-27,4) en el estudio confirmatorio. Hay que señalar que las muestras exploratorias se extrajeron de doce estudios de diferentes terapias de combinación; cinco de los estudios eran en el contexto de resistencia al tratamiento y el tamaño de la muestra fue relativamente pequeño, mientras que las muestras confirmatorias se extrajeron de un solo estudio grande de tratamiento de primera línea (véase la Tabla 1). Por lo tanto, la señal de asociación más fuerte en el estudio confirmatorio se podría atribuir a una menor influencia de factores de confusión y exposición previa menos reciente a la quimioterapia.

El estudio confirmatorio también ofreció un medio para evaluar la especificidad del efecto de lapatinib por evaluación del grupo de solo letrozol en el mismo ensayo. En el grupo de tratamiento comparador de solo letrozol, la presencia de DQA1\*0201 fue similar en los casos de ALT (3/11, 27 %) y los controles (40/159, 25 %). En el estudio confirmatorio, para los pacientes tratados con lapatinib más letrozol, la Figura 3 muestra que los portadores de DQA1\*0201 tenían una incidencia acumulada más alta de elevación de ALT que los no portadores. En comparación, para las pacientes tratadas solo con letrozol, la incidencia acumulada no difiere entre los portadores y no portadores de DQA1\*0201. Esto sugiere que la asociación de DQA1\*0201 era específica para la elevación de ALT inducida por lapatinib.

Como un marcador predictivo de elevación de ALT inducida por lapatinib (>3x ULN) entre sujetos casos y todos los sujetos no casos, DQA1\*0201 tuvo un NPV de 0,97 (0,95-0,99), pero tuvo un PPV bajo de 0,17 (0,10-0,26). La asociación de DQA1\*0201 y el rendimiento del marcador se mantuvieron para umbrales de caso ALT más estrictos, con OR más alto, aumentando el NPV hacia la unidad, mientras que el PPV disminuyó (véase la Tabla 6).

Tabla 6. Características de rendimiento de portador y no portador de HLA- DQA1\*0201, con umbrales crecientes de ALT (>3, 5. 8 x ULN) para casos y no casos en la cohorte confirmatoria.

		Casos de ALT >3 xULN	Casos de ALT >5 xULN	Casos de ALT >8 xULN
HLA-DQA1*0201	Casos	17	9	6
Portador	No casos	82	90	93
HLA-DQA1*0201	Casos	7	3	1
No portador	No casos	268	272	274
	OR (IC)	7,9 (3,0, 23,3)	9,1 (2,2, 52,8)	17,7 (2,1, 816)
	PPV (IC)	0,17 (0,10, 0,26)	0,09 (0,04, 0,17)	0,06 (0,02, 0,13)
	NPV(IC)	0,97 (0,95, 0,99)	0,99 (0,97, 0,9977)	0,9964 (0,98, 0,9999)

Una señal clave de seguridad hepática es la observación de elevaciones simultáneas de ALT ( $\geq 3x$  ULN) y TBL ( $\geq 2x$  ULN), en combinación con la ausencia de hallazgos iniciales de colestasis (ALP  $< 2x$  ULN), lo que puede reflejar un extenso daño del hepatocito y deterioro de la capacidad metabólica hepática. Tales individuos afectados se definen como los casos de la regla de Hy y tienen un alto riesgo de daño hepático grave, insuficiencia hepática y muerte (Bjornsson E. Clin Pharmac Ther 2006; 79: 521-528). Se identificaron 15 casos de acontecimientos adversos hepatobiliares (predefinidos en el protocolo del estudio como ALT  $> 3x$  y TBL  $> 1,5x$  ULN, independientemente de la ALT basal) en el grupo de lapatinib más letrozol del estudio confirmatorio, incluyendo dos pacientes adjudicados por los expertos en hígado como probables casos de la regla de Hy (véase la Tabla 7). Once de estos 15 casos proporcionaron ADN, de los cuales seis llevaban el alelo *DQA1* \*0201 (incluido el caso disponible de la regla de Hy). Para los 5 sujetos restantes, que eran no portadores, todos tuvieron ALT basal elevada y cuatro tenían metástasis hepáticas antes del tratamiento.

Tabla 7. Características genéticas y clínicas de acontecimientos adversos hepatobiliares predefinidos en el estudio confirmatorio

Categoría de AA hepático	ADN disponible	Portador de <i>DQA1</i> *0201	ALT basal elevada	Metástasis hepáticas en el basal
<b>Probable DILI y ley de Hy</b>	Sí	Sí	No	No
	No	Desconocido	No	No
<b>ALT &gt; 3x</b>				
<b>TBL &gt; 1,5x</b>				
<b>ALP &lt; 2x</b>				
	Sí	Sí	No	No
	Sí	Sí	No	No
	Sí	Sí	No	Sí
	Sí	Sí	No	Sí
	No	Desconocido	No	No
	No	Desconocido	No	No
<b>ALT &gt; 3x</b>				
<b>TBL &gt; 1,5x</b>				
	Sí	Sí	No	Sí
	Sí	No	Sí	Sí
	Sí	No	Sí	Sí
	Sí	No	Sí	Sí
	Sí	No	Sí	Sí
	Sí	No	Sí	No
	No	Desconocido	No	No
Estos individuos cumplen con una definición de protocolo de estudio predefinida de eventos hepatobiliares de ALT $> 3x$ y TBL $> 1,5x$ ULN, sin considerar el ALT basal, Además, dos casos se consideraron como casos probables de DILI y de la regla de Hy después de una adjudicación por un panel de expertos en hígado.				

Los péptidos de HLA de clase II forman proteínas heterodiméricas en donde las combinaciones *DQA1/DQB1* y *DRA/DRB1* crean distintos sitios de unión al antígeno (Jones EY, et al. Nature Reviews: Immunology 2006; 6; 271-282). El *HLA-DRA* es funcionalmente monomórfico y no se puede obtener más discriminación de marcador evaluando combinaciones alélicas específicas. Por el contrario, tanto *DQA1*\*0201 como *DQB1*\*0202 son polimórficos. Por lo tanto se investigaron los alelos que contribuyen al serotipo DQ2.2 (Fallang. et al, Nature Immunology 2009; 10; 1096-1102), que comprende *DQA1*\*0201 como péptido  $\alpha$ , con *DQB1*\*0201, \*0202 y \*0204 (designados como *DQB1*\*0201g) como péptidos  $\beta$  cis o trans (Jones EY, et al. Nature Reviews: Immunology 2006; 6; 271-282), por elevación de ALT en el estudio confirmatorio. Cuando se comparan con *DQA1*\*0201 solo, las combinaciones de alelos *DQA1*\*0201/*DQB1*\*0201g se mantuvieron en 71 % (17/24) de casos de ALT, pero se redujeron de 23 % 15 (82/350) a 19 % (67/348) en los no casos (véase la Tabla 8), dando como resultado mejoras modestas en OR, NPV y PPV.

Tabla 8. Comparación de las características de rendimiento de portador y no portador del alelo *HLA-DQA1\*0201* solo frente a combinaciones de alelos *DQA1\*0201/DQB1\*0201g* (que corresponden al serotipo DQ2.2) con casos de ALT (>3x ULN) y no casos en el estudio confirmatorio

		<i>DQA1*0201</i> Casos de ALT >3x ULN	<i>DQA1*0201/DQB1*0201g</i> Casos de ALT >3x ULN
<b>Portador HLA</b>	Casos	17	17
	No casos	82	67
<b>No portador HLA</b>	Casos	7	7
	No casos	268	281
<b>OR (IC)</b>		7,9 (3,0, 23,3)	10,2 (3,8, 30,0)
<b>PPV (IC)</b>		0,17 (0,10, 0,26)	0,20 (0,12, 0,30)
<b>NPV (IC)</b>		0,975 (0,948, 0,990)	0,976 (0,951, 0,990)

5 Notificaciones previas han sugerido que diferentes fármacos pueden causar diferentes tipos de daño hepático basados en las proporciones ALT/ALP (Danan G, et al. J Clin Epidemiol 1993; 46: 1323-1330). La amoxicilina y la flucloxacilina exhiben daño colestático (O'Donohue, J, et al, Gut 2000; 47: 717-720 y Daly A, et al, Nature Genetics 2009; 41: 816-819), mientras que ximelagatrán y lumiracoxib presentan daño hepatocelular (Kindmark, A, et al. Pharmacogenomics Journal, 2007; 1-10, y Wright TM, MHC II Haplotype marker for lumiracoxib injury, presentado en el 9º Congreso Anual sobre Hepatotoxicidad de la FDA/PhRMA/AASLD, marzo de 2009). Los casos de ALT del tratamiento con lapatinib mostraron proporciones que fueron predominantemente hepatocelulares y mixtas más que colestáticas y la presencia del alelo *DQA1\*0201* fue más alta en los casos de daño hepatocelular y mixto que en los casos de daño colestático (véase la Tabla 9).

15 Tabla 9. Tipos de daño hepático y estatus de *HLA-DQA1\*0201* observados en los casos de ALT en el momento de su elevación máxima de ALT

Tipo de daño	Casos de ALT del estudio exploratorio con datos de HLA disponibles		Casos de ALT del estudio confirmatorio con datos de HLA disponibles	
	N	N portadores de <i>DQA1*0201</i> (%)	N	N portadores de <i>DQA1*0201</i> (%)
<b>Colestático</b>	4	1 (25 %)	3	0
<b>Mixto</b>	10	4 (40 %)	9	7 (78 %)
<b>Hepatocelular</b>	21	9 (43 %)	12	10 (83 %)

El tipo de daño hepático se basa en proporciones de ALP/ALT determinadas en el momento de ALT máxima (22). Proporciones bajas de ALP/ALT ( $R \leq 2$ ) se definen como colestáticas, proporciones altas ( $R \geq 5$ ) como hepatocelulares, y proporciones entre 2 y 5 se consideran de daño mixto.

## Discusión

20 Este estudio ha identificado y confirmado asociaciones entre elevaciones de ALT inducidas por lapatinib y los alelos de MHC de clase II muy correlacionados *HLA-DQA1\*0201*, *DRB1\*0701* y *DQB1\*0202*. La asociación estadística más fuerte se observó para *DQA1\*0201*, que tiene una magnitud de efecto genético grande concordante con las observaciones en otros estudios de seguridad farmacológica (Nelson MR, et al. Pharmacogenomics Journal 2009; 923-33). En el estudio confirmatorio, la comparación de la presencia del alelo *DQA1\*0201* entre los casos y los controles y las diferencias en la incidencia acumulada de la elevación de ALT, sugirieron que la eliminación de los portadores de *DQA1\*0201* reduciría la tasa de elevación de ALT en las pacientes tratadas con lapatinib más letrozol en más de dos tercios, hasta un nivel comparable al de las pacientes tratadas con letrozol solo.

30 La función de los alelos de HLA en la susceptibilidad a las señales de seguridad hepática y la hepatotoxicidad, concuerda con las observaciones previas en el uso de fármaco posterior a la comercialización (O'Donohue, J, et al, Gut 2000; 47: 717-720 y Daly A, et al, Nature Genetics 2009; 41: 816-819) y durante los ensayos clínicos (Kindmark, A, et al. Pharmacogenomics Journal, 2007; 1-10, y Wright TM, MHC II Haplotype marker for lumiracoxib injury, presentado en el 9º Congreso Anual sobre Hepatotoxicidad de la FDA/PhRMA/AASLD, marzo de 2009). Un estudio previamente publicados que investigó la elevación de ALT inducida por ximelagatran también identificó una asociación de *DRB1\*0701* y *DQA1\*02* (Kindmark, A, et al. Pharmacogenomics Journal, 2007; 1-10). No ha surgido

un patrón constante de las asociaciones de HLA en estos diferentes estudios, estando implicados alelos de HLA tanto de clase I como de clase II y diferentes haplotipos de MHC. Los presentes hallazgos difieren de los haplotipos de *HLA* previamente descritos para flucloxacilina (Daly A, et al, *Nature Genetics* 2009; 41: 816-819), amoxicilina (O'Donohue, J, et al, *Gut* 2000; 47: 717-720) y lumiracoxib (Wright TM, MHC II Haplotype marker for lumiracoxib injury, presentado en el 9º Congreso Anual sobre Hepatotoxicidad de la FDA/PhRMA/AASLD, marzo de 2009). Además, aunque se produce solo una modesta mejora en el rendimiento del marcador, la asociación con los alelos de *HLA* que forman el serotipo DQ2.2 favoreció un papel causativo de este heterodímero específico.

Las asociaciones de HLA con la elevación de ALT inducida por lapatinib sugieren la activación del sistema inmunitario adaptativo para causar una reacción de hipersensibilidad tardía (Andrade RJ, et al. *Hepatology*, 2004; 38, 1603-1612, y Kaplowitz N. *Nature Reviews: Drug Discovery* 2005; 4; 489-499). Pueden surgir respuestas inmunitarias adaptativas inducidas por el fármaco porque los fármacos o sus metabolitos se unen covalentemente a proteínas para formar haptenos, que son reconocidos por proteínas de HLA específicas y que tienen como resultado la activación inmunitaria determinada por linfocitos T y daño inflamatorio del tejido. Un trabajo previo describió la producción microsómica hepática de un metabolito de lapatinib reactivo, potencialmente capaz de formar un hapteno (Zhu Y, Lau YY, Djuric SW; *In vitro* metabolic activation of lapatinib in human and rat liver microsomes, presentado en el 15º Congreso Norteamericano de ISSX, 12-16 de octubre de 2008). No se han identificado las especies de proteína que son la diana de la formación del hapteno lapatinib/metabolito, pero un candidato sería la CYP3A4 hepática, responsable del metabolismo oxidativo del lapatinib (Moy B y Goss PE, *The Oncologist*, 2007; 12: 756-765). Un hapteno de este tipo podría explicar la diana del hígado, descrito previamente para CYP2D6 en la hepatitis autoinmunitaria de tipo 2 (Manns et al., *J Clin Invest* 1989; 83; 1066-1072, y Lohr H, et al. *Clin Exp Immunol* 1991; 84: 297-302) y para CYP3A4 en el daño biliar inducido por flucloxacilina (Lakehal F, et al. *Chem Res Toxicol* 2001; 14, 694-701).

El tamaño de la muestra del conjunto de datos exploratorio se maximizó para aumentar la detección de la señal de asociación genética combinando los datos de doce ensayos clínicos disponibles. Este enfoque incluyó pacientes de múltiples estudios, localizaciones geográficas, diferentes regímenes de tratamiento y respuesta al tratamiento, y pueden incluir variables de confusión que diluyen la señal genética específica de lapatinib. Es notable que en este estudio se obtuvieran asociaciones genéticas confirmadas de selecciones de HLA clásico y genes candidatos de DILI y no del GWAS 1M; sin embargo, se reconoce que el gran número de SNP que comprende el GWAS necesitó un umbral de significancia más estricto para la selección exploratoria del marcador. Estudios previos con tamaños de muestra de caso más grandes y en diferentes contextos de enfermedad, han utilizado con éxito GWAS para identificar asociaciones de MHC con hepatotoxicidad y fenotipos de ALT (Daly A, et al. *Nature Genetics* 2009; 41: 816-819, y Wright TM. MHC II Haplotype marker for lumiracoxib injury, presentado en el 9º Congreso Anual sobre Hepatotoxicidad de la FDA/PhRMA/AASLD, marzo de 2009).

La evaluación retrospectiva de la elevación de ALT en el estudio confirmatorio sugiere que el análisis basado en *HLA-DQA1\*0201* podría reducir la incidencia de los casos de elevación de ALT hasta una similar a la observada en el tratamiento del AMBC con letrozol solo. La determinación del estatus del alelo *HLA-DQA1\*0201* de las pacientes también puede dar información sobre las opciones para su manejo clínico en este contexto patológico tan complicado. Aunque muestra valores predictivos negativos convenientemente altos de riesgo de hepatotoxicidad, la aplicación de una prueba basada en la presencia del alelo *DQA1\*0201* tendría una tasa alta de falsos positivos de elevación de ALT y hepatotoxicidad. Esto es porque la proporción de portadores que desarrollan daño hepático asociado con lapatinib es baja en comparación con las frecuencias de este alelo en la población de estudio.

## Ejemplo 2: Métodos de tratamiento

Una paciente o un grupo de pacientes en necesidad de tratamiento con lapatinib pueden recibir por lo menos una dosis de lapatinib o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo. Esta dosis se puede administrar sola o en combinación con otro fármaco, que incluye, sin limitación, otro agente anticanceroso. Se pueden analizar algunas señales de seguridad hepática en cada paciente, tanto antes como después de administrar lapatinib. Tales señales de seguridad hepática incluirían, sin limitación, alanina aminotransferasa (ALT) y/o bilirrubina total (TBL). Si se observa que la ALT y/o TBL u otras señales de seguridad hepática están elevadas en una paciente, por ejemplo si se observa que ALT >3,0 x ULN, entonces la paciente puede ser analizada genéticamente para determinar uno o más de los siguientes polimorfismos: *HLA-DQA1\*0201*, *HLA-DQB1\*0202*, *HLA-DRB1\*0701* y/o *HLA-BM403* u otros polimorfismos en fuerte desequilibrio de ligamiento con éstos. Si la paciente no tiene uno o más de estos polimorfismos, entonces la paciente puede recibir por lo menos una dosis adicional de lapatinib. Si la paciente sí tiene uno o más de estos polimorfismos, entonces, de acuerdo con el criterio médico, la paciente puede no recibir dosis adicionales de lapatinib, o la paciente puede seguir con la terapia de lapatinib controlando además las señales de seguridad hepática. Como es entendido en la técnica, las señales de seguridad hepática se pueden analizar periódicamente durante el transcurso del tratamiento usando las pruebas clínicas conocidas en la técnica. Las pruebas hepáticas se pueden hacer después de cada dosis, o a intervalos de tiempo regulares independientemente de cuando se hace la administración, que incluyen sin limitación, diariamente, semanalmente o mensualmente. Como también es entendido en la técnica, la continuación del tratamiento con lapatinib es una determinación clínica. Si una paciente muestra un aumento de ALT por encima de 3x ULN y tiene un polimorfismo seleccionado de *HLA-*

## ES 2 589 377 T3

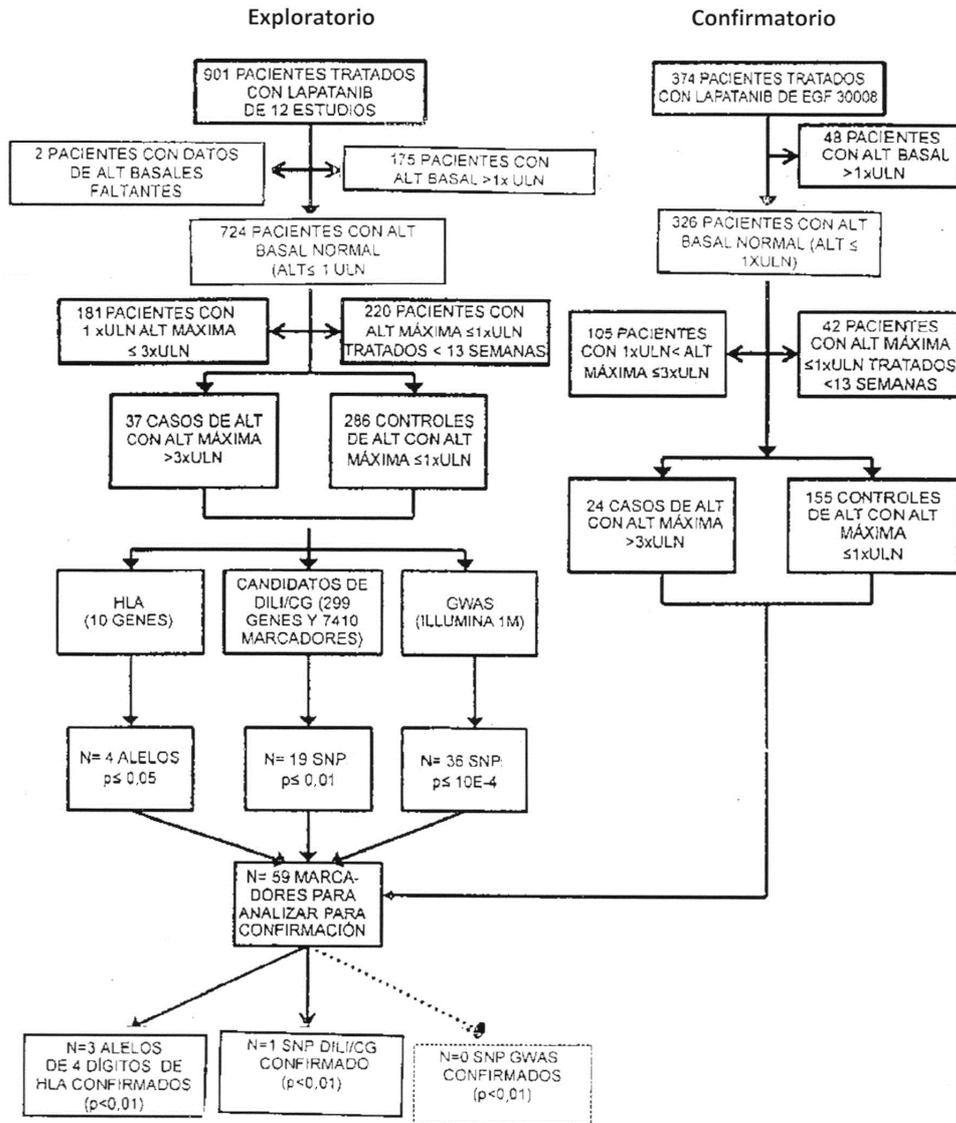
DQA1\*0201, HLA-DQB1 \*0202 y/o HLA-DRB 1\*0701, se puede suspender el tratamiento con lapatinib, se puede administrar terapia alternativa y/o la dosis de lapatinib o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo se puede reducir, o se puede suspender y luego reiniciar.

## REIVINDICACIONES

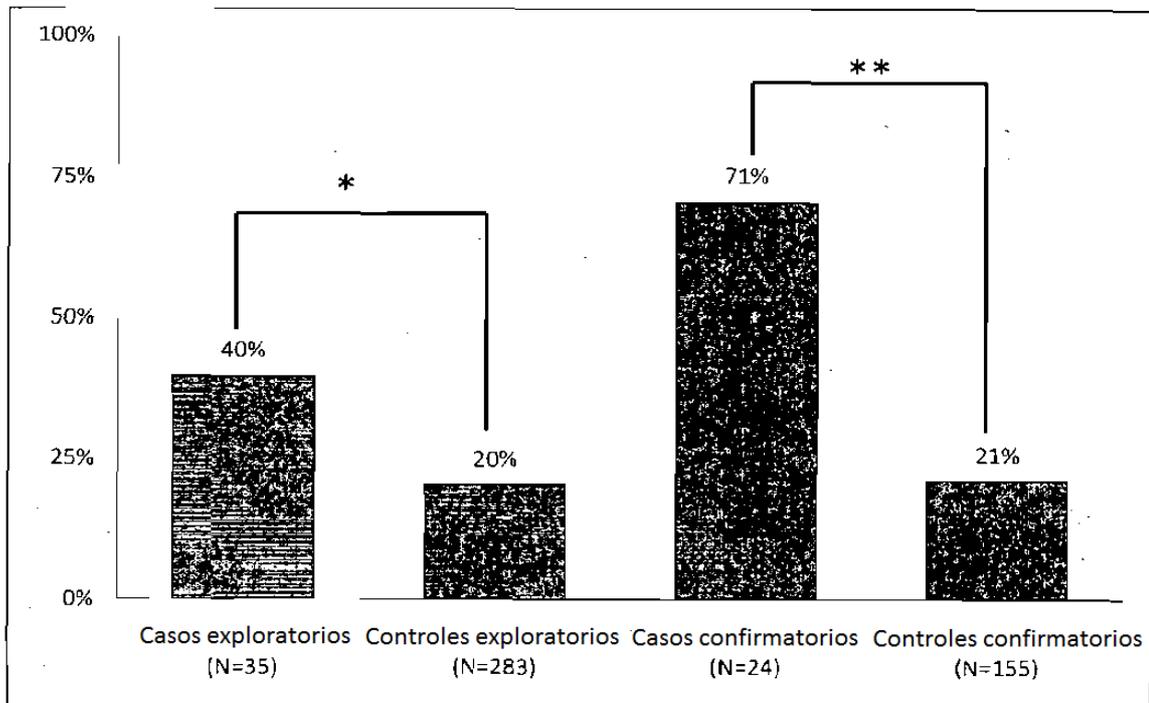
1. Lapatinib, o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de un ser humano del cáncer, en el que no se identifica que dicho ser humano posea uno o más polimorfismos alélicos seleccionados del grupo de: HLA-DQA1\*0201, HLA-DQB1\*0202 y/o HLA-DRB1\*0701.
- 5 2. Lapatinib, o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de un ser humano del cáncer de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se determina que dicho ser humano no tiene al menos dos polimorfismos seleccionados del grupo de: HLA-DRB1\*0701, HLA-DQA1\*0201 y/o HLA-DQB1\*0202.
- 10 3. Lapatinib, o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de un ser humano del cáncer de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho lapatinib, o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, se coadministra con al menos un otro agente anticanceroso.
4. Lapatinib, o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de un ser humano del cáncer de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho al menos otro agente anticanceroso se selecciona del grupo de: trastuzumab, capecitabina, paclitaxel, carboplatino, pazopanib y letrozol.
- 15 5. Lapatinib, o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de una población de sujetos humanos que padecen cáncer, en el que dicha población de tratamiento se selecciona de una población de partida de sujetos humanos que padecen cáncer y tiene un porcentaje reducido de sujetos con un alelo polimórfico en HLA seleccionado del grupo de HLA-DQA1\*0201, HLA-DQB1\*0202 y HLA-DRB1\*0701 en comparación con la población de partida.
- 20 6. Lapatinib, o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de un ser humano que padece cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que también se determina que dicho ser humano no contiene los polimorfismos y/o genotipos en TNXB rs12153855 y/o rs17207923.
- 25 7. Un método de cribado en un sujeto humano que padece cáncer como una ayuda en la predicción de la hepatotoxicidad inducida por lapatinib, o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende determinar si el ser humano tiene un genotipo HLA seleccionado del grupo de: HLA-DQA1\*0201, HLA-DQB1\*0202 y HLA-DRB1\*0701, en el que la presencia de un tal genotipo HLA indica que el sujeto humano tiene un mayor riesgo de hepatotoxicidad inducida por lapatinib, o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, en comparación con el riesgo esperado en la población general.
- 30 8. El método de acuerdo con la reivindicación 7 que comprende además correlacionar la detección de un alelo HLA-DQA1\*0201, HLA-DQB1\*0202 y/o HLA-DRB1\*0701 con un mayor riesgo de experimentar hepatotoxicidad inducida por lapatinib, o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 7 o la reivindicación 8 que comprende además determinar si dicho sujeto tiene un genotipo en HLA-B\*4403 y/o TNXB, rs12153855 y/o rs17207923.
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, que comprende además determinar si dicho sujeto es DQ2.2. seropositivo.
- 35 11. Un método de identificación de un sujeto humano que padece cáncer con un mayor riesgo de hepatotoxicidad inducida por un régimen terapéutico de lapatinib, o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende:
- a. realizar una técnica de genotipificación en una muestra biológica de dicho sujeto humano para determinar si el genotipo HLA del sujeto incluye un alelo seleccionado de HLA-DQA1\*0201, HLA-DQB1\*0202 o HLA-DRB1\*0701;
- 40 b. detectar un alelo HLA-DQA1\*0201, HLA-DQB1\*0202 y/o HLA-DRB1\*0701 y
- c. correlacionar la detección de un alelo HLA-DQA1\*0201, HLA-DQB1\*0202 y/o HLA-DRB1\*0701 con un mayor riesgo de experimentar hepatotoxicidad inducida por un régimen terapéutico de lapatinib o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, en comparación con el riesgo si no fuera detectado el alelo HLA-DQA1\*0201, HLA-DQB1\*0202 y/o HLA-DRB1\*0701.
- 45 12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho ser humano tiene los dos polimorfismos HLA-DQA1\*0201 y HLA-DQB1\*0202.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 12 que comprende además la realización de

- 5 una técnica de genotipificación de una muestra biológica de dicho sujeto humano para determinar si el sujeto tiene los genotipos en TNXB rs12153855 y/o rs17207923 y correlacionar la detección de un genotipo en TNXB rs12153855 y/o rs17207923 con un mayor riesgo de experimentar una hepatotoxicidad inducida por un régimen terapéutico de lapatinib, o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, en comparación con el riesgo si no se detectaron los genotipos en TNXB rs12153855 y/o rs17207923.
14. Lapatinib, o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de un ser humano del cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que se determina que dicho ser humano es DQ2 0.2. seropositivo.
- 10 15. Lapatinib, o una sal o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de un ser humano que padece cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o 14, o un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, en el que el cáncer es cáncer de mama.

FIGURA 1: Diseño global del estudio



**FIGURA 2: Proporción de sujetos portadores de *HLA-D1A1\*0201* según el estatus de caso-control de ALT de los estudios exploratorio y confirmatorio**



HLA-DQA1\*0201 está asociado significativamente con estatus de caso-control de ALT después de controlar por ALT basal, tratamiento (en el estudio exploratorio) y estimaciones de la ascendencia.

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,0001$ .

**FIGURA 3:** Incidencia acumulada de ALT >3x ULN en subconjuntos de portadores y no portadores de *HLA-DQA1\*0201* del grupo de tratamiento con lapatinib más letrozol, en comparación con el grupo de tratamiento de solo letrozol en la cohorte confirmatoria.

