

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 782**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.08.2016 PCT/US2016/047140**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.02.2017 WO17031101**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.08.2016 E 16757791 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 3277842**

54 Título: **Métodos para tratar pacientes con cáncer a partir de inhibidores de la farnesiltransferasa**

30 Prioridad:

17.08.2015 US 201562206194 P
15.09.2015 US 201562218927 P
13.10.2015 US 201562241019 P
18.03.2016 US 201662310582 P
09.08.2016 US 201662372662 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.02.2020

73 Titular/es:

KURA ONCOLOGY, INC. (100.0%)
3033 Science Park Road, Suite 220
San Diego, CA 92121, US

72 Inventor/es:

GUALBERTO, ANTONIO y
SCHOLZ, CATHERINE ROSE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 741 782 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

Métodos para tratar pacientes con cáncer a partir de inhibidores de la farnesiltransferasa

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de la biología molecular y la biología del cáncer. En este documento se proporcionan métodos para utilizar ciertos genes relacionados inmunológicamente como biomarcadores para predecir la sensibilidad clínica y la respuesta terapéutica al tratamiento con un inhibidor de la farnesiltransferasa en un sujeto que tiene cáncer. Además, se describe en este documento un kit para llevar a cabo estos métodos.

Antecedentes de la invención

10 La estratificación de las poblaciones de pacientes para mejorar la tasa de respuesta terapéutica es cada vez más valiosa en el tratamiento clínico de los pacientes con cáncer. Los inhibidores de la farnesiltransferasa (FTI) son agentes terapéuticos que encuentran utilidad en el tratamiento de cánceres, como la leucemia, el linfoma y ciertos tumores sólidos. Sin embargo, los pacientes responden de manera diferente a los tratamientos con FTI. Por lo tanto, los métodos para predecir la capacidad de respuesta de un paciente con cáncer respecto a un tratamiento con FTI, o los métodos para seleccionar pacientes para un tratamiento con FTI presentan aún necesidades no satisfechas. Los métodos y las composiciones de la presente invención satisfacen estas necesidades y proporcionan otras ventajas relacionadas.

15 Shi Yuquan et al. (The Prostate, vol. 62, nº 1, 2005, páginas 69-82) describe que los inhibidores de la farnesiltransferasa (FTI) pueden mejorar la eliminación de los tumores de próstata con H-Ras activado. Junto con la ausencia de una mayor toxicidad aguda para el intestino normal, estos resultados implican que el tratamiento con FTI debe estudiarse más como un posible adyuvante a la radioterapia en el tratamiento de cánceres abdominales con la señalización Ras activada.

20 Yao et al. (Carcinogenesis, vol. 27, nº 2006, páginas 1420-1431) describen que el tratamiento con FTI L-744,832 o FTI-277 redujo la supervivencia clonogénica de las células tumorales de próstata que expresan H-ras oncogénicas después de la irradiación. Las vías de señalización PI3-quinasa/Akt y MAPK fueron reguladas a la baja por las FTI en estas células. El tratamiento con FTI redujo la hipoxia tumoral y también redujo la expresión de MMP-9 en tumores con H-ras mutante activado. Según Yao et al. FTIs pueden mejorar la eliminación de tumores de próstata con H-Ras activado.

25 Misso et al. (Journal of Cellular Physiology, vol. 228, nº 1, 2013, páginas 130-141) describen que la combinación sinérgica del FTI tipifarnib y de docetaxel determina las condiciones apoptológicas sinérgicas. Al mismo tiempo, la combinación modula la expresión de los componentes del complejo multichaperona que participa en la regulación de la estabilidad de los miembros de la vía mediada por ras. Misso et al. describen que la actividad antiproliferativa de la geldanamicina depende del estado de activación de HSP90 y que es fuertemente sinérgica cuando se añade en combinación con tipifarnib, pero no con docetaxel, en células que sobre-expresan HSP90 e incluso más en células con mayor actividad de HSP90.

30 X Chen et al. (Oncogene, vol. 33, nº 47, 2013, páginas 5442-5449) utilizaron ratones con un alelo Hras^{G12V} knock-in para dilucidar los primeros eventos después de la activación de Hras, y evaluar la eficacia terapéutica de la inhibición de la farnesiltransferasa. El FTI SCH66336 bloquea la farnesilación HRAS y la deslocaliza de la membrana plasmática. NRAS y KRAS no se ven afectados, ya que alternativamente se prenilan. Cuando se prueba en líneas que albergan mutaciones HRAS, NRAS o KRAS, SCH66336 deslocalizado, inhibe la señalización e inhibe, preferentemente, el crecimiento sólo de las líneas del mutante de HRAS. El tratamiento con SCH66336 también indujo una regresión casi completa de papilomas de ratones knock-in con Hras^{G12V} tratados con TPA.

35 El documento WO 2015/164862 describe composiciones y métodos para el tratamiento de cánceres dirigidos por Hras. La administración de un inhibidor de la farnesiltransferasa, por ejemplo, tipifarnib, solo o en combinación con un inhibidor de MEK, puede reducir el tamaño del tumor y el crecimiento tumoral en cánceres como el cáncer de tiroides mal diferenciado (PDTC) y el cáncer de tiroides anaplásico (ATC).

Sumario de la invención

40 En el presente documento se proporciona un compuesto para su uso en un método de tratamiento de un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) en un sujeto, en el que el compuesto es tipifarnib y en el que el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de tipifarnib a dicho sujeto, en el que dicho HNSCC se encuentra en una etapa avanzada, metastásica, recidivante o refractaria y en el que dicho HNSCC es el virus del papiloma humano (VPH)-negativo.

En algunas realizaciones, la mutación H-Ras de dichos sujetos comprende una sustitución de aminoácido ácido en un codón seleccionado del grupo formado por G12, G13 y Q61.

- 5 En algunas realizaciones, el método comprende determinar la presencia de la mutación de H-Ras en una muestra de dicho sujeto. En otra realización, dicha muestra es un tejido de biopsia o una biopsia tumoral. En una realización, dicha mutación H-Ras está determinada por un método seleccionado del grupo que consiste en secuenciación, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), micromatriz de ADN, espectrometría de masas (MS), ensayo de polimorfismo de nucleótido único (SNP), cromatografía líquida de alta resolución desnaturalizante (DHPLC) y ensayo de polimorfismo de longitud del fragmento de restricción (RFLP).
- En algunas realizaciones, tipifarnib se administra a una dosis de 1-1000 mg/kg de peso corporal o el tipifarnib se administra a una dosis de 600 mg dos veces al día o a una dosis de 900 mg dos veces al día.
- En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra dos veces al día.
- 10 En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra durante un período de uno a siete días. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra en los días 1-7 y 15-21 de un ciclo de tratamiento de 28 días.
- En otra realización, el tipifarnib se administra durante al menos 3 ciclos o durante al menos 6 ciclos.
- En otra realización, dicho ciclo de tratamiento continúa hasta por 12 meses. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra a una dosis de 900 mg dos veces al día en los días 1-7 y 15-21 de un ciclo de tratamiento de 28 días.
- 15 En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra antes, durante o después de la irradiación.
- En algunas realizaciones, el método comprende además administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente activo o una terapia de cuidado de apoyo. En otra realización, dicho segundo agente activo se selecciona del grupo que consiste en un agente hipometilante de ADN, un anticuerpo terapéutico que se une específicamente a un antígeno canceroso, un factor de crecimiento hematopoyético, una citoquina, un antibiótico, un inhibidor de cox-2, un agente inmunomodulador, una globulina anti-timocitos, un agente inmunosupresor, y un derivado corticosteroide o farmacológico de éste o en el que dicho segundo agente activo es un anticuerpo anti-PD1 o anticuerpo anti-PDL1.
- 20 También se describen en este documento métodos para la selección de la población de pacientes con cáncer para el tratamiento con una FTI. Los métodos se basan, en parte, en el descubrimiento de que el genotipo y el nivel de expresión de ciertos genes inmunológicos se pueden utilizar para predecir la capacidad de respuesta de un paciente con cáncer a un tratamiento con FTI.
- En algunos ejemplos, un FTI se utiliza en métodos para el tratamiento del cáncer en un sujeto que incluye (a) genotipificar con KIR el sujeto, en el que el sujeto es portador de KIR2DS2 o KIR2DS5, y (b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del FTI al sujeto. En algunos ejemplos, el sujeto es un portador de KIR2DS2. En algunos ejemplos, el sujeto es un portador de KIR2DS5. En algunos ejemplos, el sujeto es un portador de KIR2DS2 y KIR2DS5.
- 30 En algunos ejemplos, los métodos incluyen además genotipificar con HLA el sujeto antes de administrar el tratamiento con FTI al sujeto, donde el sujeto es portador de HLA-C2. En algunos ejemplos, el sujeto es un portador de KIR2DS2 y HLA-C2.
- 35 En algunos ejemplos, el genotipado con KIR de un sujeto incluye determinar la presencia de un gen KIR en una muestra del sujeto. En algunos ejemplos, la muestra es una muestra de sangre. En algunos ejemplos, la muestra es una muestra de médula ósea. En algunos ejemplos, la muestra consiste en células mononucleares de sangre periférica (PBMC). En algunos ejemplos, la muestra consiste en células asesinas naturales (NK) enriquecidas.
- En algunos ejemplos, el genotipado con KIR se realiza mediante secuenciación, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), micromatriz de ADN, espectrometría de masas (MS), ensayo de polimorfismo de nucleótido único (SNP), ensayo de inmunotransferencia o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). En un ejemplo, el genotipado con KIR se realiza por PCR. En un ejemplo, el genotipado con KIR se realiza por micromatriz de ADN. En un ejemplo, el genotipado con KIR se realiza mediante un ensayo de inmunotransferencia o ELISA.
- 40 En algunos ejemplos, se utiliza un FTI en los métodos para el tratamiento del cáncer en un sujeto que incluyen (a) determinar el nivel de expresión de un biomarcador seleccionado del grupo formado por KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 y GZMM en una muestra del sujeto, donde (i) el nivel de expresión de KIR2DS2 en la muestra es mayor que un nivel de expresión de referencia de KIR2DS2; (ii) el nivel de expresión de KIR2DL2 en la muestra es inferior a un nivel de expresión de referencia de KIR2DL2; (iii) el nivel de expresión de KIR2DS5 en la muestra es superior a un nivel de referencia de KIR2DS5; (iv) el nivel de expresión de KIR2DL5 en la muestra es inferior a un nivel de expresión de referencia de KIR2DL5; o (v) el nivel de expresión de GZMM en la muestra es mayor que un nivel de expresión de referencia de GZMM; o cualquier combinación de los mismos; y (b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de FTI al sujeto.
- 45 En algunos ejemplos, se utiliza un FTI en métodos para el tratamiento del cáncer en un sujeto que incluyen (a) determinar los niveles de expresión de KIR2DS2 y KIR2DL2, o de KIR2DS5 y KIR2DL5 en una muestra del sujeto,
- 50

en la que (i) la relación entre el nivel de expresión de KIR2DS2 y el nivel de expresión de KIR2DL2 en la muestra es superior a una relación de referencia; o (ii) la relación entre el nivel de expresión de KIR2DS5 y el nivel de expresión de KIR2DL5 en la muestra es superior a una relación de referencia; y (b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de FTI al sujeto.

5 En algunos ejemplos, la muestra es una muestra de sangre. En algunos ejemplos, la muestra es una muestra de médula ósea. En algunos ejemplos, la muestra consiste en células mononucleares de sangre periférica (PBMC). En algunos ejemplos, la muestra consiste en células NK enriquecidas. En algunos ejemplos, las células NK se expanden in vitro.

10 En algunos ejemplos, determinar el nivel de expresión de un biomarcador incluye determinar el nivel de proteína del biomarcador. Los métodos para determinar el nivel proteico de un biomarcador pueden ser un enfoque de inmunohistoquímica (IHC), un ensayo inmunotransferencia, citometría de flujo (FACS) o ELISA. En algunos ejemplos, el nivel de proteína de un biomarcador se mide por ELISA.

15 En algunos ejemplos, la determinación del nivel de expresión de un biomarcador incluye determinar el nivel de ARNm del biomarcador. Los métodos para determinar el nivel de ARNm de un biomarcador pueden ser qPCR, RT-PCR, RNA-seq, análisis por micromatriz, SAGE, la técnica MassARRAY o FISH. En algunos ejemplos, el nivel de ARNm de un biomarcador se mide por qPCR o RT-PCR.

20 En algunos ejemplos, el sujeto es un paciente con cáncer. En algunos ejemplos, el sujeto tiene un cáncer hematológico. En algunos ejemplos, el sujeto tiene un tumor sólido. El tumor sólido puede ser un tumor benigno o un cáncer. En algunos otros ejemplos, el sujeto tiene una condición premaligna. El cáncer hematológico puede ser leucemia mieloide aguda (LMA), síndrome mielodisplásico (SMD), leucemia mielomonocítica crónica (CMML), linfoma natural de células asesinas (linfoma NK), leucemia de células asesinas naturales (leucemia NK), linfoma cutáneo de células T (CTCL), linfoma de células T periféricas (PTCL) o leucemia mieloide crónica (LMC). En algunos ejemplos, el paciente es un paciente con SMD. El paciente con SMD puede tener un SMD de riesgo muy bajo, SMD de bajo riesgo, SMD de riesgo intermedio o SMD de alto riesgo. En algunos ejemplos, el paciente es un paciente con SMD de menor riesgo, que puede tener un SMD de riesgo muy bajo, SMD de bajo riesgo, SMD de riesgo intermedio. En algunos ejemplos, el paciente es un paciente con LMA. En algunos ejemplos, el paciente con LMA está con inducción post-remisión o post-trasplante. En algunos ejemplos, el paciente con LMA es mayor de 60 años o no es apto para la inducción de la remisión.

30 En algunos ejemplos, el FTI se utiliza en métodos para seleccionar a un paciente con cáncer para un tratamiento con FTI que incluye (a) genotipificar con KIR al sujeto, donde el sujeto es portador de KIR2DS2 o KIR2DS5, y (b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI al sujeto. En algunos ejemplos, los métodos incluyen a) genotipificar con KIR al sujeto, donde el sujeto es portador de KIR2DS2 o KIR2DS5, b) genotipificar con HLA al sujeto, donde el sujeto es portador de HLA-C2 y (c) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de la FTI al sujeto. En algunos ejemplos, el sujeto es portador de KIR2DS2 y HLA-C2.

35 En algunos ejemplos, un FTI se utiliza en los métodos de selección de un paciente oncológico para un tratamiento con FTI, incluyendo (a) determinar el nivel de expresión de un biomarcador seleccionado del grupo formado por KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 y GZMM en una muestra del sujeto, en el que (i) el nivel de expresión de KIR2DS2 en la muestra es superior a un nivel de expresión de referencia de KIR2DS2; (ii) el nivel de expresión de KIR2DL2 en la muestra es inferior a un nivel de expresión de referencia de KIR2DL2; (iii) el nivel de expresión de KIR2DS5 en la muestra es superior a un nivel de expresión de referencia de KIR2DS5; (iv) el nivel de expresión de KIR2DL5 en la muestra es inferior a un nivel de expresión de referencia de KIR2DL5; o (v) el nivel de expresión de GZMM en la muestra es mayor que un nivel de expresión de referencia de GZMM; o cualquier combinación de los mismos; y (b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del FTI al sujeto.

45 En algunos ejemplos, un FTI se utiliza en métodos para seleccionar a un paciente oncológico para un tratamiento con FTI que incluye (a) determinar los niveles de expresión de KIR2DS2 y KIR2DL2, o de KIR2DS5 y KIR2DL5 en una muestra del sujeto, en la que (i) la proporción del nivel de expresión de KIR2DS2 respecto al nivel de expresión de KIR2DL2 en la muestra es mayor que una relación de referencia; o (ii) la relación entre el nivel de expresión de KIR2DS5 y el nivel de expresión de KIR2DL5 en la muestra es superior a una relación de referencia; y (b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI al sujeto.

50 En un ejemplo, los métodos para tratar SMD en un sujeto incluyen (a) genotipificar KIR del sujeto, en el que el sujeto es portador de KIR2DS2 o KIR2DS5, y (b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de tipifarnib al sujeto. Los métodos pueden incluir además genotipificar con HLA al sujeto, en el que el sujeto es un portador de HLA-C2. En algunos ejemplos, el sujeto es un portador de KIR2DS2 y HLA-C2. En algunos ejemplos, el MDS es un MDS de menor riesgo.

55 En este documento se describen métodos para la selección de una población de pacientes con cáncer para su tratamiento con un FTI según el estado de mutación Ras. En algunos ejemplos, en este documento se describen métodos para predecir la capacidad de respuesta de un paciente de cáncer frente a un tratamiento con FTI según el

estado de mutación Ras en una muestra del paciente. En algunos ejemplos, se describen en este documento métodos para el tratamiento del cáncer en un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI.

5 En algunos ejemplos, se describe en este documento un FTI para su uso en métodos para el tratamiento de un cáncer en un sujeto que incluye (a) determinar la presencia o ausencia de una mutación Ras en una muestra del sujeto, donde la mutación Ras incluye una mutación K-Ras o una mutación N-Ras y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del FTI al sujeto si se determina que la muestra carece de la mutación K-Ras o la mutación N-Ras.

10 En algunos ejemplos, los métodos incluyen determinar la presencia o ausencia de una sustitución de aminoácidos en un codón seleccionado de un grupo formado por G12, G13 y Q61 de K-Ras. En algunos ejemplos, los métodos incluyen determinar la presencia o ausencia de una sustitución de aminoácidos en un codón seleccionado de un grupo formado por G12, G13 y Q61 de N-Ras.

15 En algunos ejemplos, al paciente se le administra un tratamiento con FTI si se determina que la muestra no tiene sustitución de aminoácidos en G12, G13 y Q61 de K-Ras, y tampoco tiene sustitución de aminoácidos en G12, G13 y Q61 de N-Ras. En algunos ejemplos, se administra al paciente un tratamiento FTI si se determina que la muestra no tiene ninguna mutación de K-Ras o ninguna mutación N-Ras. En algunos ejemplos, al paciente se le administra un tratamiento FTI si se determina que la muestra tiene K-Ras natural y N-Ras natural.

20 El sujeto es un paciente con cáncer. En algunos ejemplos, el sujeto tiene un cáncer hematológico. En algunos ejemplos, el sujeto tiene un tumor sólido. El tumor sólido puede ser un tumor benigno o un cáncer. En algunos otros ejemplos, el sujeto tiene una afección premaligna. El cáncer hematológico puede ser leucemia mielomonocítica crónica (CMML), neoplasia mieloproliferativa (MPN), síndrome mielodisplásico (SMD), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mielomonocítica juvenil (CMML), leucemia mieloide crónica (LMC), linfoma de células asesinas naturales (linfoma NK), leucemia de células asesinas naturales (leucemia NK), linfoma cutáneo de células T (CTCL) o linfoma periférico de células T (PTCL). En algunos ejemplos, el paciente es un paciente con CMML. En algunos ejemplos, el paciente es un paciente con SMD. En algunos ejemplos, el paciente es un paciente con LMA.

25 En algunos ejemplos, se describe en este documento el tipifarnib para su uso en métodos para el tratamiento de CMML en un sujeto (a) determinar la presencia o ausencia de una mutación K-Ras en una muestra del sujeto y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de tipifarnib al sujeto si se determina que la muestra tiene k-Ras natural.

30 En algunos ejemplos descritos en este documento el tipifarnib es para su uso en métodos para el tratamiento de CMML en un sujeto (a) determinando la presencia o ausencia de una mutación N-Ras en una muestra del sujeto y, posteriormente, (b) administrando una cantidad terapéuticamente efectiva de tipifarnib al sujeto si se determina que la muestra tiene N-Ras natural.

35 En este documento se describen métodos para la selección poblacional de pacientes con cáncer para su tratamiento con un FTI según la presencia de una mutación H-Ras. En algunos ejemplos en este documento se describen métodos para predecir la capacidad de respuesta de un paciente con cáncer frente a un tratamiento con FTI, métodos para la selección de una población de pacientes con cáncer para un tratamiento con FTI, y métodos para el tratamiento del cáncer en un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un FTI, según la presencia de una mutación H-Ras en una muestra del paciente.

40 En algunos ejemplos, se describe en este documento un FTI para su uso en métodos para el tratamiento de un cáncer en un sujeto que incluye (a) determinar la presencia o ausencia de una mutación H-Ras en una muestra del sujeto y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de FTI al sujeto si se determina que la muestra tiene una mutación H-Ras. En algunos ejemplos, la mutación H-Ras puede ser una sustitución de aminoácidos en G12, G13 y Q61 de H-Ras.

45 En algunos ejemplos, se describe en este documento un FTI para su uso en métodos para el tratamiento de un cáncer en un paciente que incluye (a) determinar la presencia o ausencia de una mutación H-Ras, una mutación K-Ras, y una mutación N-Ras en una muestra del sujeto y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de FTI al sujeto si se determina que la muestra tiene una mutación H-Ras, pero no una mutación K-Ras o una mutación N-Ras. En algunos ejemplos, los métodos incluyen (a) determinar que un paciente con cáncer tiene una mutación H-Ras y un K-Ras natural y N-Ras natural y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI al sujeto. En algunos ejemplos, el FTI es el tipifarnib.

50 En algunos ejemplos, el sujeto tiene un cáncer hematológico. En algunos ejemplos, el sujeto tiene un tumor sólido. En algunos ejemplos, el cáncer es negativo para el VPH. En algunos ejemplos, el cáncer es un carcinoma hepatocelular, tumor de glándula salival, tumor tiroideo, cáncer urotelial, cáncer de mama, melanoma, cáncer gástrico, cáncer de páncreas o cáncer de pulmón. En algunas realizaciones, el cáncer es un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC). En algunos ejemplos, el cáncer es un tumor de la glándula salival. En algunos ejemplos, el cáncer es un tumor tiroideo.

En algunas realizaciones, se proporciona en este documento el tipifarnib para su uso en un método de tratamiento de un HNSCC en un sujeto basado en la presencia de una mutación H-Ras. En algunas realizaciones, el HNSCC puede ser un HNSCC negativo del VPH. En algunas realizaciones, el HNSCC puede ser HNSCC recidivante/recurrente. En algunas realizaciones, el HNSCC puede ser HNSCC metastásico. Los métodos proporcionados en este documento incluyen (a) determinar la presencia o ausencia de una mutación h-Ras en una muestra del sujeto que tiene HNSCC y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de tipifarnib al sujeto si se determina que la muestra tiene una mutación H-Ras.

En algunos ejemplos, se describe en este documento el tipifarnib para su uso en un método de tratamiento de un tumor de la glándula salival en un sujeto basado en la presencia de una mutación H-Ras. En algunos ejemplos, el tumor de la glándula salival puede ser negativo para el VPH. En algunos ejemplos, el tumor de la glándula salival puede ser un tumor avanzado de la glándula salival. En algunos ejemplos, el tumor de la glándula salival puede ser un tumor metastásico de la glándula salival. Los métodos en este documento descritos incluyen (a) determinar la presencia o ausencia de una mutación H-Ras en una muestra del sujeto que tiene un tumor de la glándula salival y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de tipifarnib al sujeto si se determina que la muestra tiene una mutación H-Ras.

En algunos ejemplos se describe en este documento un método de tratamiento de un cáncer de tiroides en un sujeto basado en la presencia de una mutación H-Ras. En algunos ejemplos, el cáncer de tiroides puede ser negativo para el VPH. En algunos ejemplos, el cáncer de tiroides puede ser un cáncer de tiroides avanzado. En algunos ejemplos, el cáncer de tiroides puede ser cáncer de tiroides metastásico. Los métodos descritos en este documento incluyen (a) determinar la presencia o ausencia de una mutación de H-Ras en una muestra del sujeto que tiene cáncer de tiroides y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de tipifarnib al sujeto si se determina que la muestra tiene una mutación H-Ras.

En algunas realizaciones, la muestra es una biopsia tumoral. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de tejido. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de sangre. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de sangre periférica. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de suero. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de médula ósea. En algunas realizaciones, la muestra consiste en células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

En algunas realizaciones, el estado de la mutación Ras se determina mediante el análisis de los ácidos nucleicos obtenidos de una muestra. En algunas realizaciones, el estado de la mutación Ras se determina mediante el análisis de las proteínas obtenidas de una muestra. En algunas realizaciones, el estado de la mutación Ras se determina mediante secuenciación, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), micromatriz de ADN, espectrometría de masas (MS), ensayo de polimorfismo de nucleótido único (SNP), cromatografía líquida de alta resolución desnaturizante (DHPLC) o ensayo de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP). En algunas realizaciones, el estado de la mutación Ras está determinado por la multiplexación de PCR. En algunas realizaciones, el estado de la mutación Ras está determinado por una secuenciación de próxima generación.

Según se describe en el presente documento, el FTI puede ser seleccionado del grupo formado por lonafarnib (SCH-66336), CP-609.754, BMS-214662, L778123, L744823, L739749, R208176, AZD3409 y FTI-277. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis de 1-1000 mg/kg de peso corporal. Según la invención, el FTI es el tipifarnib. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra a una dosis de 200-1200 mg dos veces al día ("b.i.d."). En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra a una dosis de 600 mg por vía oral. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra a una dosis de 300 mg b.i.d. por vía oral durante 3 de 4 semanas en ciclos repetidos de 4 semanas. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra a una dosis de 600 mg b.i.d. por vía oral durante 3 de 4 semanas en ciclos repetidos de 4 semanas. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra a una dosis de 900 mg b.i.d. por vía oral en semanas alternas (una semana sí, otra semana no) en ciclos repetidos de 4 semanas (días 1-7 y 15-21 de ciclos repetidos de 28 días). En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra a una dosis de 1200 mg b.i.d. por vía oral en semanas alternas (días 1-7 y 15-21 de ciclos repetidos de 28 días). En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra a una dosis de 1200 mg b.i.d. por vía oral durante los días 1-5 y 15-19 de ciclos repetidos de 28 días. En algunas realizaciones, los pacientes reciben al menos tres ciclos de tratamiento. En algunas realizaciones, los pacientes reciben al menos seis ciclos de tratamiento.

En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en este documento también incluyen administrar una segunda terapia al sujeto. La segunda terapia puede ser una radioterapia. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en este documento también incluyen administrar una segunda cantidad terapéuticamente eficaz de un agente activo secundario o una terapia de cuidados de apoyo al sujeto. En algunas realizaciones, el agente activo secundario es un agente hipometilante del ADN, un anticuerpo terapéutico que se une específicamente a un antígeno canceroso, un factor de crecimiento hematopoyético, citoquinas, agente anticancerígeno, antibiótico, inhibidor de cox-2, globulina antitumores, agente inmunosupresor, corticosteroides o un derivado farmacológicamente de los mismos. En algunas realizaciones, el agente activo secundario es un agente hipometilante del ADN, como la azacitidina o la decitabina. En algunas realizaciones, el segundo agente activo es un anticuerpo anti-PDI o un anticuerpo anti-PDLI.

En algunos ejemplos, los kits descritos en este documento para predecir la capacidad de respuesta de un paciente con cáncer frente a un tratamiento con FTI incluyen al menos un agente para el genotipado de KIR del paciente con cáncer, y un agente auxiliar, en el que se pronostica que el paciente con cáncer va a responder al tratamiento con FTI si el paciente con cáncer es portador de KIR2DS2 o KIR2DS5. Los kits pueden incluir además un agente para la genotipificación de HLA, en el que se prevé que el paciente con cáncer responda al tratamiento con FTI, si el paciente con cáncer es portador de HLA-C2.

En algunos ejemplos, los kits descritos en este documento para predecir la capacidad de respuesta de un paciente con cáncer frente a un tratamiento con FTI incluyen al menos un agente para determinar la expresión de al menos un biomarcador en una muestra del paciente con cáncer, y un agente auxiliar, donde el biomarcador se selecciona del grupo formado por KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 y GZMM; y en el que se pronostica que el paciente con cáncer responde al tratamiento con FTT si:

- (i) el nivel de expresión de KIR2DS2 en la muestra es superior a un nivel de expresión de referencia de KIR2DS2;
- (ii) el nivel de expresión de KIR2DL2 en la muestra es inferior a un nivel de expresión de referencia de KIR2DL2;
- (iii) el nivel de expresión de KIR2DS5 en la muestra es superior a un nivel de expresión de referencia de KIR2DS5;
- (iv) el nivel de expresión de KIR2DL5 en la muestra es inferior a un nivel de expresión de referencia de KIR2DL5;
- (v) el nivel de expresión de GZMM en la muestra es mayor que un nivel de expresión de referencia de GZMM;
- (vi) la relación entre el nivel de expresión de KIR2DS2 y el nivel de expresión de KIR2DL2 en la muestra es superior a una relación de referencia; o
- (vii) la relación entre el nivel de expresión de KIR2DS5 y el nivel de expresión de KIR2DL5 en la muestra es superior a una relación de referencia; o cualquier combinación de los mismos.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1A muestra la correlación de los niveles de expresión de KIR2DS5 con el resultado clínico de los pacientes con AML tratados con tipifarnib. "SD" significa "enfermedad estable"; "PD" significa "enfermedad progresiva"; "CR" significa "respuesta completa"; "HI" se refiere a "mejora hematológica". La Fig. 1B muestra la correlación de los niveles de expresión de KIR2DS5 con una supervivencia sin progresión ("PFS") de pacientes con AML tratados con tipifarnib.

La Fig. 2A muestra la correlación entre la relación entre el nivel de expresión de KIR2DS2 y el nivel de expresión de KIR2DL2 y la SLP de pacientes con AML tratados con tipifarnib. La Fig. 2B muestra la correlación entre la relación entre el nivel de expresión de KIR2DS2 y el nivel de expresión de KIR2DL2 y la supervivencia general ("OS") de los pacientes con AML tratados con tipifarnib.

Fig. 2A: Regresión de riesgos proporcionales de Cox

Parámetro	b	SE	Wald	P	Exp(b)	95% CI de Exp(b)
2DS/2DL	-7,4132	2,0012	13,7227	0,0002	0,0006	de 0,0000 a 0,0299

Fig. 2B: Regresión de riesgos proporcionales de Cox

	b	SE	Wald	P	Exp(b)	95% CI de Exp(b)
Relación 2DS2/2DL2	-5,3430	1,6871	10,0296	0,0015	0,0048	de 0,0002 a 0,1283

Las figuras 3A y 3B muestran la falta de correlación entre la relación entre el nivel de expresión de KIR2DS2 y el nivel de expresión de KIR2DL2 y el OS de los pacientes de AML tratados con agentes quimioterapéuticos sin FTI. En la Fig. 3A, los pacientes fueron tratados con dosis altas de citarabina y mitoxantrona. En la Fig. 3B, los pacientes fueron tratados con dosis altas de citarabina y mitoxantrona/quimioterapia intensa.

La Fig. 4A muestra la correlación entre la relación entre el nivel de expresión de KIR2DS5 y el nivel de expresión de KIR2DL5A y tanto la PFS como la OS de los pacientes con AML tratados con tipifarnib. La Fig. 4B muestra la falta de correlación entre la proporción del nivel de expresión de KIR2DS5 y el nivel de expresión de KIR2DL5A con OS de pacientes con AML tratados con agentes quimioterapéuticos sin FTI (citarabina y mitoxantrona).

Fig. 4A: Regresión de riesgos proporcionales de Cox

Tipifarnib/PFS	b	SE	Wald	P	Exp(b)	95% CI de Exp(b)
Relación 2DS5/2DL5A	-3,5254	1,2351	8,1480	0,0043	0,0294	de 0,0026 a 0,3272

La Fig. 5 muestra la correlación de los niveles de expresión de GZMM con el resultado clínico de los pacientes con AML tratados con tipifarnib.

5 La Fig. 6A muestra la correlación entre el nivel de expresión de GZMM y la supervivencia de los pacientes con AML tratados con tipifarnib. La Fig. 6B muestra la falta de correlación entre el nivel de expresión de GZMM con la supervivencia de pacientes con AML tratados con agentes quimioterapéuticos sin FTI (citarabina y mitoxantrona).

Fig. 6A: Regresión de riesgos proporcionales de Cox

(Tipifarnib)	b	SE	Wald	P	Exp(b)	95% CI de Exp(b)
GZMM/OS	-0,5642	0,1652	11,6675	0,0006	0,5688	de 0,4122 a 0,7850
GZMM/PFS	-0,5856	0,1809	10,4780	0,0012	0,5568	de 0,3913 a 0,7923

10 La Fig. 7A muestra la correlación de los niveles de expresión de KIR2DS2 con el resultado clínico de pacientes con AML tratados con tipifarnib. La Fig. 7B muestra la correlación específica de los niveles de expresión de KIR2DS2 con el resultado clínico de los pacientes con AML tratados con tipifarnib (panel izquierdo), pero no con agentes quimioterapéuticos sin FTI (panel derecho).

La Fig. 8 muestra la correlación entre el estado natural de N-RAS y la supervivencia prolongada sin progresión ("PFS") en pacientes con AML tratados con tipifarnib.

15 La Fig. 9 muestra la mayor tasa de respuesta frente al tratamiento con tipifarnib en pacientes con AML que tienen N-RAS natural en comparación con los que tienen N-RAS mutante.

Descripción detallada

1. Definiciones

20 Como se usa en el presente documento, los artículos "una/uno", "un" y "la/el" se refieren a uno o más de uno de los objetos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo, un biomarcador se refiere a un biomarcador o más de un biomarcador.

25 Como se usa en el presente documento, la expresión "célula NK" o "célula asesina natural" se refiere al tipo de linfocitos granulares grandes derivados de la médula ósea que comparten un progenitor común con las células T, pero que no tienen marcadores de superficie de células B o células T. Las células NK generalmente constituyen el 10-15% de todos los linfocitos circulantes. Las células NK son células defensivas de inmunidad innata que reconocen las estructuras en la superficie de las células infectadas por el virus o las células tumorales y matan estas células mediante la liberación de citotoxinas. Las células NK pueden activarse sin exposición previa al antígeno.

30 Para matar de forma selectiva a las células infectadas o a las células tumorales, las células NK deben distinguir a las células sanas de las células enfermas. La actividad citolítica de las células NK humanas se modula por la interacción de los receptores de membrana inhibidores y activadores, que se expresan en la superficie de las células NK, con las moléculas de clase I MHC (HLA), que se expresan por células que no son NK, incluidas las células tumorales, o las células de un receptor de trasplante de médula ósea. Los receptores tipo inmunoglobulina de las células asesinas (KIR; o CD158), que se mapean en el cromosoma 19q13.4.3-5, constituyen una familia de receptores de unión a MHC-I (HLA-A, -B, -C) que regulan el umbral de activación de las células NK (Valiante et al. Immunity 7: 739-751 (1997)).

35 En los seres humanos, el complejo HLA de clase I tiene aproximadamente 2000 kb de longitud y contiene aproximadamente 20 genes. Dentro de la región de clase I existen genes que codifican las moléculas de MHC de clase I óptimamente caracterizadas designadas como HLA-A, HLA-B y HLA-C. Además, hay genes de clase I no clásicos que incluyen HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-H, HLA-J y HLA-X, así como una nueva familia conocida como MIC. Mientras que HLA-A y -B desempeñan algún papel, las interacciones entre KIR y las moléculas de HLA-C predominan en la prevención de que las células NK sean atacadas por las células autólogas sanas (Colonna et al. PNAS, 90: 1200-12004 (1993); Moesta AK et al., Front Immunol. 3:336 (2012)).

45 El gen HLA-C tiene múltiples alelos, incluidos HLA-C1 y HLA-C2, basados en la presencia de asparagina o lisina en la posición del aminoácido 80 en la proteína madura (Mandelboim et al. 1996). Además, HLA-C1 contiene un resto de serina conservado en la posición del aminoácido 77, mientras que una asparagina está presente en HLA-C2 en la

misma posición. Por lo tanto, se pueden distinguir al menos tres genotipos con respecto a HLA-C: aquellos que tienen tanto HLA-C1 como HLA-C2 (heterocigoto HLA-C1/HLA-C2), y aquellos que tienen HLA-C1 (homocigoto HLA-C1/HLA-C1) o HLA-C2 (homocigotos HLA-C2/HLA-C2), y aquellos que carecen tanto de HLA-C1 como de HLA-C2.

5 Como se usa en este documento, la expresión "genes KIR" se refiere a los genes que codifican los receptores KIR en las células NK. Los genes KIR se agrupan en una de las regiones más variables del genoma humano en términos de contenido de gen y polimorfismo de secuencia. Esta amplia variabilidad genera un repertorio de células NK en las que los KIR se expresan en la superficie celular de manera combinatoria. Las interacciones entre KIR y sus ligandos apropiados en las células diana dan como resultado la producción de señales positivas o negativas que regulan la función de las células NK.

10 Los genes KIR se heredan en dos haplotipos principales: A y B. El haplotipo A tiene un solo receptor activador, KIR2DS4, que está inactivado en la mayoría de la población de EE. UU. debido a una delección de 22 pb. El haplotipo B de KIR incluye 22 alelos KIR2DS2 y 16 KIR2DS5 que están presentes en ~45% y ~25% de los estadounidenses de raza blanca, respectivamente. Existe un fuerte desequilibrio de ligamiento entre KIR2DS2 (activador) y KIR2DL2 (inhibitorio). La metilación del ADN mantiene la expresión del gen KIR específico de alelo (por ejemplo, la isla CpG en el promotor KIR2DS2 se extiende desde -160 hasta +26 y tiene 6 sitios de citosina) (Moesta A K et al., *Front Immunol.* 3:336 (2012)).

20 Hasta la fecha, se han identificado al menos 14 genes KIR distintos, que son KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR3DS1. Estos genes comparten una extensa homología de secuencias. Cada gen tiene una longitud de aproximadamente 9-16 Kb, dividido en 8-9 exones que codifican el péptido señal, dos o tres dominios extracelulares, tallo, región transmembrana y cola citoplasmática. Estos genes varían con respecto a su presencia o ausencia en diferentes haplotipos KIR, creando una diversidad considerable en el número de genotipos KIR observados en la población. Por ejemplo, algunas personas pueden tener solo siete de los 14 genes KIR, mientras que otras pueden tener 12 de los 14 genes KIR. Cada gen KIR codifica un KIR inhibitorio o activador. Por ejemplo, KIR2DS2 y KIR2DS5 son ambos KIR de activación, y KIR2DL2 y KIR2DL5 son ambos KIR inhibidores. Un gen KIR particular puede tener múltiples alelos. Por ejemplo, KIR2DL5 incluye dos alelos, KIR2DL5A y KIR2DL5B. Por lo tanto, se pueden distinguir cuatro genotipos con respecto a KIR2DL5: los que tienen KIR2DL5A y KIR2DL5B, los que tienen KIR2DL5A o KIR2DL5B, y los que carecen de KIR2DL5.

30 A continuación se proporciona una secuencia de aminoácidos ejemplar y una secuencia de ácidos nucleicos codificante correspondiente de KIR2DS2 humano (GENBANK: GQ921920.1; GI: 261362473):

MSLMVVSMVCVGFLLQGAWPHEGVHRKPSLLAHPGPLVKSEETVILQC
WSDVRFEFHLLHREGKYKDTLHLIGEHDGVSKANFSIGPMMQDLAGTY
RCYGSVTHSPYQLSAPSDPLDIVITGLYEKPSLSAQPGPTVLAGESVTLSCS
SRSSYDMYHLSREGEAHERRFSAGPKVNGTFQADFPLGPATHGGTYRCF
GSFRDSPYEWSNSSDPLLVSVTGNPSNSWPSPTPESSKTGNPRHLHVLIGT
SVVKIPFTILLFFLLHRWCSNKKNAAVMDQEPAGNRTVNSEDSDEQDHQE
VSYA (SEQ ID NO:1)

ATGTCGCTCATGGTCGTCAGCATGGTGTGTGTTGGGTTCTTCTTGCTGC
AGGGGGCCTGGCCACATGAGGGAGTCCACAGAAAACCTTCCCTCCTG
GCCACCCAGGTCCCCTGGTGAAATCAGAAGAGACAGTCATCCTGCA
ATGTTGGTCAGATGTCAGGTTTGAGCACTTCCTTCTGCACAGAGAGGG
GAAGTATAAGGACACTTTGCACCTCATTGGAGAGCACCATGATGGGGT
CTCCAAGGCCAACTTCTCCATCGGTCCCATGATGCAAGACCTTGCAGG
GACCTACAGATGCTACGGTCTGTACTCACTCCCCCTATCAGTTGTCA
GCTCCCAGTGACCCTCTGGACATCGTCATCACAGGTCTATATGAGAAA
CCTTCTCTCTCAGCCCAGCCGGGCCCCACGGTTTTTGGCAGGAGAGAGC
GTGACCTTGTCTGCAGCTCCCGGAGCTCCTATGACATGTACCATCTAT
CCAGGGAGGGGGAGGCCATGAACGTAGGTTCTCTGCAGGGCCCAAG
GTCAACGGAACATTCCAGGCCGACTTTCCTCTGGGCCCTGCCACCCAC
GGAGGAACCTACAGATGCTTCGGCTCTTCCGTGACTCTCCCTATGAG
TGGTCAAACCTCGAGTGACCCACTGCTTGTTTCTGTCACAGGAAACCCT
TCAAATAGTTGGCCTTCACCCACTGAACCAAGCTCCAAAACCGGTAAC
CCCAGACACCTGCATGTTCTGATTGGGACCTCAGTGGTCAAAATCCCT
TTCACCATCCTCCTCTTCTTCTCCTTCATCGCTGGTGCTCCAACAAAA
AAAATGCTGCTGTAATGGACCAAGAGCCTGCAGGGAACAGAACAGTG
AACAGCGAGGATTCTGATGAACAAGACCATCAGGAGGTGTCATACGC
ATAA (SEQ ID NO: 2)

A continuación se proporciona una secuencia de aminoácidos ejemplar y una secuencia de ácidos nucleicos codificante correspondiente de KIR2DL2 humano (GENBANK: EU791546.1; GI: 209512828):

MSLMVVSMACVGFLLQGAWPHEGVHRKPSLLAHPGRLVKSEETVILQC
WSDVRFEHFLLHREGKFKDTLHLIGEHHDGVSKANFSIGPMMQDLAGTY
RCYGSVTHSPYQLSAPSDPLDIVITGLYEKPSLSAQPGPTVLAGESVTLSCS
SRSSYDMYHLSREGEAHECRFSAGPKVNGTFQADFP LGPATHGGTYRCF
GSFRDSPYEWSNSSDLLVSVIGNPSNSWPSPTPESSKTGNPRHLHLIGTS
VVILFILLFLLHRWCSNKKNAAVMDQESAGNRTANSEDSDEQDPQEV
YTQLNHCVFTQRKITRPSQRPKTPPTDIIVYTELPNAESRSKVVSCP

(SEQ ID NO:3)

ATGTCGCTCATGGTCGTCAGCATGGCGTGTGTTGGGTTCTTCTTGCTGC
AGGGGGCCTGGCCACATGAGGGAGTCCACAGAAAACCTTCCCTCCTG
GCCACCCAGGTCGCCTGGTGAAATCAGAAGAGACAGTCATCCTGCA
ATGTTGGTCAGATGTCAGGTTTGAGCACTTCTTCTGCACAGAGAAGG
GAAGTTTAAGGACACTTTGCACCTCATTGGAGAGCACCATGATGGGGT
CTCCAAAGCCAACTTCTCCATCGGTCCCATGATGCAAGACCTTGCAGG
GACCTACAGATGCTACGGTCTGTTACTCACTCCCCCTATCAGTTGTCA
GCTCCAGTGACCCTCTGGACATCGTCATCACAGGTCTATATGAGAAA
CCTTCTCTCTCAGCCCAGCCGGGCCCCACGGTTCTGGCAGGAGAGAGC
GTGACCTTGTCTGCAGCTCCCGGAGCTCCTATGACATGTACCATCTAT
CCAGGGAGGGGGAGGCCCATGAATGTAGGTTCTCTGCAGGGCCCAAG
GTCAACGGAACATTCCAGGCCGACTTTCTCTGGGCCCTGCCACCCAC
GGAGGAACCTACAGATGCTTCGGCTCTTCCGTGACTCTCCATACGAG
TGGTCAAACCTCGAGTGACCCACTGCTTGTCTTCTGTCATAGGAAACCCTT
CAAATAGTTGGCCTTCACCCACTGAACCAAGCTCTAAAACCGGTAACC
CCCGACACCTGCACATTCTGATTGGGACCTCAGTGGTCATCATCCTCTT
CATCCTCCTCTTCTTTCTCCTTCATCGCTGGTGCTCCAACAAAAAAT
GCTGCGGTAATGGACCAAGAGTCTGCAGGGAACAGAACAGCGAATAG
CGAGGACTCTGATGAACAAGACCCTCAGGAGGTGACATACACACAGT
TGAATCACTGCGTTTTACACAGAGAAAAATCACTCGCCCTTCTCAGA
GGCCCAAGACACCCCAACAGATATCATCGTGTACACGGAACTTCCAA
ATGCTGAGTCCAGATCCAAAGTTGTCTCCTGCCATGA (SEQ ID NO:4)

A continuación se proporciona una secuencia de aminoácidos ejemplar y una secuencia de ácidos nucleicos codificante correspondiente de KIR2DS5 humano (GENBANK: AJ181015.1; GI: 754367842):

MSLMVISMACVAFFLLQGAWPHEGFRRKPSLLAHPGPLVKSEETVILQC
WSDVMFEHFLLHREGTFNHTLRLIGEHDGVSCKGNFSIGRMTQDLAGTYR
CYGSVTHSPYQLSAPSDPLDIVITGLYEKPSLSAQPGPTVLAGESVTLSCSS
RSSYDMYHLSREGEAHERRLPAGPKVNRTFQADFPLDPATHGGTYRCFG
SFRDSPYEWKSSDPLLVSVTGNSSNSWSPTEPSSETGNPRHLHVLIGTSV
VKLPFTILLFFLLHRWCSNKKNASVMDQGPAGNRTVNREDSDEQDHQEV
SYA (SEQ ID NO:5)

ATGTCGCTCATGGTCATCAGCATGGCGTGTGTTGCGTTCCTTCTTGCTGC
AGGGGGCCTGGCCACATGAGGGATTCCGCAGAAAACCTTCCCTCCTGG
CCCACCCAGGTCCCCTGGTGAAATCAGAAGAGACAGTCATCCTGCAAT
GTTGGTCAGATGTCATGTTTGAGCACTTCCTTCTGCACAGAGAGGGGA
CGTTTAACCACACTTTGCGCCTCATTGGAGAGCACATTGATGGGGTCT
CCAAGGGCAACTTCTCCATCGGTTCGCATGACACAAGACCTGGCAGGG
ACCTACAGATGCTACGGTTCTGTTACTCACTCCCCCTATCAGTTGTCAG
CGCCCAGTGACCCTCTGGACATCGTGATCACAGGTCTATATGAGAAAC
CTTCTCTCTCAGCCCAGCCGGGCCCCACGGTTCTGGCAGGAGAGAGCG
TGACCTTGTCCTGCAGCTCCCGGAGCTCCTATGACATGTACCATCTATC
CAGGGAAGGGGAGGCCATGAACGTAGGCTCCCTGCAGGGCCCAAGG
TCAACAGAACATTCCAGGCCGACTTTCCTCTGGACCCTGCCACCCACG
GAGGGACCTACAGATGCTTCGGCTCTTTCCTGACTCTCCATACGAGT
GGTCAAAGTCAAGTGACCCACTGCTTGTTTCTGTACAGGAAACTCTT
CAAATAGTTGGCCTTCACCCACTGAACCAAGCTCCGAAACCGGTAACC
CCAGACACCTACACGTTCTGATTGGGACCTCAGTGGTCAAACCTCCCTT
TCACCATCCTCCTCTTCTTTCCTTCATCGCTGGTGCTCCAACAAAAA
AAATGCATCTGTAATGGACCAAGGGCCTGCGGGGAACAGAACAGTGA
ACAGGGAGGATTCTGATGAACAGGACCATCAGGAGGTGTCATACGCA
TAA (SEQ ID NO:6)

A continuación se proporciona una secuencia de aminoácidos ejemplar y una secuencia de ácidos nucleicos codificante correspondiente de KIR2DL5A humano (GENBANK: ABM92655.1 GI: 124245538):

MSLMVISMACVGFFLLQGAWTHEGGQDKPLLSAWPSAVVPRGGHVTLL
CRSRLGFTIFSLYKEDGVPPELYNKIFWKSILMGPVTPAHAGTYRCRGS
PRSPIEWSAPSNPLVIVVTGLFGKPSLSAQPGPTVRTGENVTLSCSSRSSFD
MYHLSREGRAHEPRLPAVPSVDGTFQADFPLGPATHGGTYTCFSSLHDS
YEWSDPSDPLLVSVTGNSSSSSSSPTEPSSKTGIRRHLLHILIGTSVA
IILFIILFFLLHCCCSNKKNAAVMDQEPAGDRTVNREDSDDQDPQEV
TYAQLDHCVFTQTKITSPSQRPKTPPTDITMYMELPNAKPRSLSPA
HKHHSQALRGSSRETTALSQNRVASSHVPAAGI

(SEQ ID NO:7)

ATGTCGCTCATGGTCATCAGCATGGCGTGTGTTGGGTTCTTCTTGCTGC
AGGGGGCCTGGACACATGAGGGTGGACAGGACAAGCCCTTGCTGTCT
GCCTGGCCCAGCGCTGTGGTGCCTCGAGGAGGACATGTGACTCTTCTG
TGTCGCTCTCGTCTTGGGTTTACCATCTTCAGTCTGTACAAAGAAGATG
GGGTGCCTGTCCCTGAGCTCTACAACAAAATATTCTGGAAGAGCATCC
TCATGGGCCCTGTGACCCCTGCACACGCAGGGACCTACAGATGTCGGG
GTTACACCCGCGCTCCCCATTGAGTGGTCGGCACCCAGCAACCCCC
TGGTGATCGTGGTCACAGGTCTATTTGGGAAACCTTCACTCTCAGCCC
AGCCGGGCCCCACGGTTCGCACAGGAGAGAACGTGACCTTGTCCTGC
AGCTCCAGGAGCTCATTGACATGTACCATCTATCCAGGGAGGGGAGG

GCCCATGAACCTAGGCTCCCTGCAGTGCCCAGCGTCGATGGAACATTC
CAGGCTGACTTTCCTCTGGGCCCTGCCACCCACGGAGGGACCTACACA
TGCTTCAGCTCTCTCCATGACTCACCTATGAGTGGTCAGACCCGAGT
GACCCACTGCTTGTTTCTGTACAGGAACTCTTCAAGTAGTTCATCTT
CACCCACTGAACCAAGCTCCAAAAGTGGTATCCGCAGACACCTGCACA
TTCTGATTGGGACCTCAGTGGCTATCATCCTCTTCATCATCCTCTTCTTC
TTTCTCCTTCATTGCTGCTGCTCCAACAAAAAGAATGCTGCTGTAATGG
ACCAAGAGCCTGCCGGGGACAGAACAGTGAACAGGGAGGACTCTGAT
GATCAAGACCCTCAGGAGGTGACATATGCACAGTTGGATCACTGCGTT
TTCACACAGACAAAAATCACTTCCCCTTCTCAGAGGCCCAAGACACCT
CCAACAGATACCACCATGTACATGGAAGTTCCAAATGCTAAGCCAAG
ATCATTGTCTCCTGCCATAAGCACACAGTCAGGCCTTGAGGGGATC
TTCTAGGGAGACAACAGCCCTGTCTCAAACCGGGTTGCTAGCTCCCA
TGTACCAGCAGCTGGAATCTGA (SEQ ID NO:8)

A continuación se proporciona una secuencia de aminoácidos ejemplar y una secuencia de ácidos nucleicos codificante correspondiente de KIR2DL5B (GENBANK: ABM92657.1 GI: 124245542):

MSLMVVSMAVGVFFLLQGAWTHEGGQDKPLLSAWPSAVVPRGGHVTL
CRSRLGFTIFSLYKEDGVPVPELYNKIFWKSILMGPVTPAHAGTYRCRGS
PRSPIEWSAPSNPLVIVVTGLFGKPSLSAQPGPTVRTGENVTLSRSSR
MYHLSREGRAHEPRLPAVPSVDGTFQADFPLGPATHGGTYTCFSSLH
YEWSDPSDLLVSVTGNSSSSSSPTEPSSKTGILRHLHILIGTSVA
IFILFFLLHCCCSNKKNAAVMDQEPAGDRTVNREDSDDQDPQEV
TYAQLDHCVFTQTKITSPSRPKTPPTDTTMYMELPNAKPRSLSPA
HKHHSQALRGSSRETALSQNRVASSHVPAAGI (SEQ ID NO:9)

ATGTCGCTCATGGTCGTCAGCATGGCGTGTGTTGGGTTCTTCTTGCTGC
AGGGGGCCTGGACACATGAGGGTGGACAGGACAAGCCCTTGCTGTCT
GCCTGGCCCAGCGCTGTGGTGCCTCGAGGAGGACATGTGACTCTTCTG
TGTCGCTCTCGTCTTGGGTTTACCATCTTCAGTCTGTACAAAGAAGATG
GGGTGCCTGTCCCTGAGCTCTACAACAAAATATTCTGGAAGAGCATCC

TCATGGGCCCTGTGACCCCTGCACACGCAGGGACCTACAGATGTCTGGG
 GTTCACACCCGCGCTCCCCATTGAGTGGTCGGCACCCAGCAACCCCC
 TGGTGATCGTGGTCACAGGTCTATTTGGGAAACCTTCACTCTCAGCCC
 AGCCGGGCCCCACGGTTCGCACAGGAGAGAACGTGACCTTGTCTCTGC
 AGCTCCAGGAGCTCATTTGACATGTACCATCTATCCAGGGAGGGGAGG
 GCCCATGAACCTAGGCTCCCTGCAGTGCCAGCGTCGATGGAACATTC
 CAGGCTGACTTTCTCTGGGCCCTGCCACCCACGGAGGGACCTACACA
 TGCTTCAGCTCTCTCCATGACTCACCTATGAGTGGTCAGACCCGAGT
 GACCCACTGCTTGTCTTCTGTCACAGGAAACTCTTCAAGTAGTTCATCTT
 CACCCACTGAACCAAGCTCCAAAACCTGGTATCCTCAGACACCTGCAC
 ATTCTGATTGGGACCTCAGTGGCTATCATCCTCTTCATCATCCTCTTCT
 TCTTTCTCCTTCATTGCTGCTGCTCCAACAAAAGAATGCTGCTGTAAT
 GGACCAAGAGCCTGCCGGGGACAGAACAGTGAACAGGGAGGACTCTG
 ATGATCAAGACCCTCAGGAGGTGACATATGCACAGTTGGATCACTGCG
 TTTTCACACAGACAAAAATCACTTCCCCTTCTCAGAGGCCCAAGACAC
 CTCCAACAGATACCACCATGTACATGGAACCTCCAATGCTAAGCCAA
 GATCATTGTCTCCTGCCCATAAGCACACAGTCAGGCCTTGAGGGGAT
 CTTCTAGGGAGACAACAGCCCTGTCTCAAACCGGGTTGCTAGCTCCC
 ATGTACCAGCAGCTGGAATCTGA (SEQ ID NO:10)

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "tipificación KIR" se refiere al procedimiento de determinar el genotipo de los genes KIR en un sujeto, incluyendo determinar la presencia o ausencia de uno o más genes o alelos KIR específicos en el genoma del sujeto. La tipificación KIR también puede incluir determinar el número de copias de uno o más genes o alelos KIR específicos en el genoma del sujeto.

Como se usa en el presente documento, la expresión "tipificación HLA" se refiere al procedimiento de determinar el genotipo de los genes HLA en un sujeto, que incluye determinar la presencia o ausencia de uno o más genes o alelos HLA específicos en el genoma del sujeto. La tipificación de HLA también incluye la determinación del número de copias de uno o más genes o alelos de HLA específicos en el genoma del sujeto.

10 La granzima M (GZMM) es una serina proteasa expresada en múltiples subgrupos de linfocitos citotóxicos. La vía de exocitosis de gránulos es el mecanismo principal a través del cual los linfocitos citotóxicos eliminan las células infectadas por los virus y las células tumorales. En esta vía, los linfocitos citotóxicos liberan gránulos que contienen la proteína perforina formadora de poros y una familia de serina proteasas conocidas como granzimas (GZM) en la sinapsis inmunológica. La formación de poros por perforina facilita la entrada de granzimas en la célula diana, donde
 15 pueden activar varias vías de muerte. Hay cinco granzimas humanas: GZMA, GZMB, GZMH, GZMK y GZMM. De las cinco GZM, GZMM es un marcador para células NK o células NKT, y GZMH es un marcador para células T citotóxicas (Poot, Cell Death and Differentiation 21: 359-368 (2014)).

A continuación se proporciona una secuencia de aminoácidos ejemplar y una secuencia de ácidos nucleicos codificante correspondiente de GZMM humano (Ref. NCBI: NM 020535.3 GI: 65508540):

MEACVSSLLVLALGALSVGSSFGTQIIGGREVIPHSRPYMASLQRNGSHLC
GGVLVHPKWVLTAAHCLAQRMAQLRLVLGLHTLDSPGLTFHIKAAIQHP
RYKPVPALENDLALLQLDGKVKPSRTIRPLALPSKRQVVAAGTRCSMAG
WGLTHQGGRLSRVLRDLQVLDTRMCNNSRFWNGSLSPSMVCLAADS
KDQAPCKGDSGGPLVCGKGRVLAVLSFSSRVCTDIFKPPVATAVAPYVS
WIRKVTGRSA (SEQ ID NO:11)

ATGGAGGCCTGCGTGTCTTCACTGCTGGTGCTGGCCCTGGGGGCCCTG
TCAGTAGGCAGCTCCTTTGGGACCCAGATCATCGGGGGCCGGGAGGTG
ATCCCCACTCGCGCCCGTACATGGCCTCACTGCAGAGAAATGGCTCC
CACCTGTGCGGGGGTGTCTGGTGACCCAAAGTGGGTGCTGACGGCT
GCCCACTGCCTGGCCCAGCGGATGGCCCAGCTGAGGCTGGTGCTGGG
GCTCCACACCCTGGACAGCCCCGGTCTCACCTTCCACATCAAGGCAGC
CATCCAGCACCCCTCGCTACAAGCCCGTCCCTGCCCTGGAGAACGACCT
CGCGCTGCTTCAGCTGGACGGGAAAGTGAAGCCCAGCCGGACCATCC
GGCCGTTGGCCCTGCCAGTAAGCGCCAGGTGGTGGCAGCAGGGACT
CGGTGCAGCATGGCCGGCTGGGGGCTGACCCACCAGGGCGGGCGCCT
GTCCCGGGTGCTGCGGGAGCTGGACCTCCAAGTGCTGGACACCCGCAT
GTGTAACAACAGCCGCTTCTGGAACGGCAGCCTCTCCCCAGCATGGT
CTGCCCTGGCGGCCGACTCCAAGGACCAGGCTCCCTGCAAGGGTGACTC
GGGCGGGCCCCTGGTGTGTGGCAAAGGCCGGGTGTTGGCCGGAGTCCT
GTCCTTCAGCTCCAGGGTCTGCACTGACATCTTCAAGCCTCCCGTGGC
CACCGCTGTGGCGCCTTACGTGTCCTGGATCAGGAAGGTCACCGGCCG
ATCGGCCTGA (SEQ ID NO:12)

5 Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un mamífero. Un sujeto puede ser un mamífero humano o no humano tal como un perro, un gato, un bovino, un equino, un ratón, una rata, un conejo o una especie transgénica de los mismos. El sujeto puede ser un paciente, o un paciente con cáncer.

10 Como se usa en este documento, el término "cáncer" o "canceroso" se refiere a la condición fisiológica en los mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, entre otros, cánceres hematológicos (por ejemplo, mieloma múltiple, linfoma y leucemia) y tumores sólidos. Como se usa en el presente documento, la expresión "condición premaligna" se refiere a una condición asociada con un mayor riesgo de cáncer, que, si no se trata, puede provocar cáncer. Una condición premaligna también puede referirse a un cáncer no invasivo que no ha progresado a una etapa agresiva e invasiva.

15 Como se usa en este documento, el término "tratar", "que trata" y "tratamiento", cuando se usa en referencia a un paciente con cáncer, se refiere a una acción que reduce la gravedad del cáncer, o retarda o retrasa la progresión del cáncer incluyendo (a) inhibir el crecimiento del cáncer, o detener el desarrollo del cáncer, y (b) provocar la regresión del cáncer, o retrasar o minimizar uno o más síntomas asociados con la presencia del cáncer.

Tal como se usa en el presente documento, el término "determinar" se refiere a usar cualquier forma de medición para evaluar la presencia de una sustancia, ya sea cuantitativa o cualitativamente. La medida puede ser relativa o absoluta. Medir la presencia de una sustancia puede incluir determinar si la sustancia está presente o ausente, o la cantidad de la sustancia.

Como se usa en este documento, el término "portador" cuando se usa en conexión con un gen se refiere a un sujeto cuyo genoma incluye al menos una copia del gen y, cuando se usa en conexión con un alelo de un gen, se refiere a un sujeto cuyo genoma incluye al menos una copia del alelo específico. Por ejemplo, un portador de KIR2DS2 se refiere a un sujeto cuyo genoma incluye al menos una copia de KIR2DS2. Si un gen tiene más de un alelo, un portador del gen se refiere a un sujeto cuyo genoma incluye al menos una copia de al menos un alelo del gen. Por ejemplo, el gen KIR2DL5 tiene dos alelos conocidos, KIR2DL5A y KIR2DL5B. Un portador de KIR2DL5A se refiere a un sujeto cuyo genoma incluye al menos una copia del alelo KIR2DL5A; un portador de KIR2DL5B se refiere a un sujeto cuyo genoma incluye al menos una copia del alelo KIR2DL5B. Un portador de KIR2DL5 se refiere a un sujeto cuyo genoma incluye al menos una copia de KIR2DL5A, KIR2DL5B, o ambos. Para otro ejemplo, un portador de HLA-C2 se refiere a un sujeto cuyo genoma incluye al menos una copia del alelo HLA-C2. El sujeto puede ser el homocigoto HLA-C2/HLA-C2, o el heterocigoto HLA-C1/HLA-C2.

Tal como se usa en el presente documento, el término "administrar", "que administra" o "administración" se refiere al acto de administrar o hacer que se administre, un compuesto o una composición farmacéutica al cuerpo de un sujeto mediante un método descrito en el presente documento o de otro modo conocido en la técnica. La administración de un compuesto o una composición farmacéutica incluye la prescripción de un compuesto o una composición farmacéutica para administrarse en el cuerpo de un paciente. Las formas de administración ejemplares incluyen formas de dosificación oral, tales como comprimidos, cápsulas, jarabes, suspensiones; formas de dosificación inyectables, tales como formas de dosificación intravenosa (IV), intramuscular (IM) o intraperitoneal (IP); transdérmica, que incluyen cremas, jaleas, polvos o parches; formas de dosificación bucal; polvos para inhalación, aerosoles, suspensiones y supositorios rectales.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" de un compuesto, cuando se usa en relación con una enfermedad o trastorno, se refiere a una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico en el tratamiento o manejo de la enfermedad o trastorno o para retrasar o minimizar uno o más síntomas asociados con la enfermedad o trastorno. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto significa una cantidad del compuesto, solo o en combinación con otras terapias, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o manejo de la enfermedad o trastorno. La expresión abarca una cantidad que mejora la terapia general, reduce o evita los síntomas, o aumenta la eficacia terapéutica de otro agente terapéutico. El término también se refiere a la cantidad de un compuesto que provoca de manera suficiente la respuesta médica o biológica de una molécula biológica (por ejemplo, una proteína, enzima, ARN o ADN), célula, tejido, sistema, animal o humano, que está siendo buscado por un investigador, veterinario, médico o clínico.

Como se usa en el presente documento, el término "muestra" se refiere a un material o mezcla de materiales que contienen uno o más componentes de interés. Una muestra de un sujeto se refiere a una muestra obtenida del sujeto, incluidas muestras de tejido biológico u origen fluido, obtenidas, conseguidas o recogidas in vivo o in situ. Se puede obtener una muestra a partir de un área de un sujeto que contiene células o tejidos precancerosos o cancerosos. Dichas muestras pueden ser, entre otras, órganos, tejidos, fracciones y células aisladas de un mamífero. Las muestras ejemplares incluyen médula ósea, sangre total, sangre parcialmente purificada, células mononucleares de sangre periférica ("PBMC") y biopsias de tejidos. Las muestras ejemplares también incluyen lisado celular, un cultivo celular, una línea celular, un tejido, tejido oral, tejido gastrointestinal, un órgano, un orgánulo, un fluido biológico, una muestra de sangre, una muestra de orina, una muestra de piel y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "biomarcador" se refiere a un gen que puede estar presente o ausente en sujetos individuales, o puede estar presente, pero expresarse diferencialmente, en sujetos individuales. La presencia de un biomarcador, incluido el nivel de expresión del biomarcador, en una muestra de un sujeto puede indicar la capacidad de respuesta del sujeto a un tratamiento particular, tal como un tratamiento con FTI.

Como se usa en el presente documento, el término "expresar" o "expresión", cuando se usa en relación con un gen, se refiere al procedimiento por el cual la información transportada por el gen se manifiesta como el fenotipo, incluida la transcripción del gen a un ARN mensajero (ARNm), la posterior traducción de la molécula de ARNm a una cadena polipeptídica y su ensamblaje en la proteína definitiva.

Como se usa en este documento, la expresión "producto de ARN del biomarcador" se refiere a un transcrito de ARN transcrito de un biomarcador, y la expresión "producto proteico del biomarcador" se refiere a una proteína o polipéptido traducido a partir de un producto de ARN de un biomarcador.

Como se usa en el presente documento, la expresión "nivel de expresión" de un biomarcador se refiere a la cantidad o acumulación del producto de expresión de un biomarcador, como, por ejemplo, la cantidad de un producto de ARN del biomarcador (el nivel de ARN del biomarcador) o la cantidad de un producto proteico del biomarcador (el nivel de proteína del biomarcador). Si el biomarcador es un gen con más de un alelo, el nivel de expresión de un biomarcador se refiere a la cantidad total de acumulación del producto de expresión de todos los alelos existentes para este gen, a menos que se especifique lo contrario. Por ejemplo, el nivel de expresión de KIR2DL5 se refiere a los niveles de expresión totales de KIR2DL5A y KIR2DL5B, a menos que se especifique lo contrario.

Como se usa en este documento, la expresión "nivel de expresión de referencia" se refiere a un nivel de expresión predeterminado de un biomarcador que se puede usar para determinar la importancia del nivel de expresión del

biomarcador en una muestra de un sujeto. Un nivel de expresión de referencia de un biomarcador puede ser el nivel de expresión del biomarcador en una muestra de un individuo sano. Un nivel de expresión de referencia de un biomarcador también puede ser un valor de corte determinado por cualquier persona con experiencia ordinaria en la técnica a través del análisis estadístico de los niveles de expresión del biomarcador en una población de muestra y la capacidad de respuesta al tratamiento de los individuos en la población de muestra. Por ejemplo, al analizar los niveles de expresión de GZMM en individuos de una población de muestra y la capacidad de respuesta de estos individuos a un tratamiento con FTI, cualquier experto en la técnica puede determinar un valor de corte como el nivel de expresión de referencia de GZMM, en el que es probable que un sujeto responda al tratamiento con FTI si el nivel de expresión de GZMM del sujeto es más alto que el nivel de expresión de referencia.

Como se usa en este documento, la expresión "capacidad de respuesta" o el término "respuesta", cuando se usan en relación con un tratamiento, se refiere a la efectividad del tratamiento para reducir o disminuir los síntomas de la enfermedad que se está tratando. Por ejemplo, un paciente con cáncer responde a un tratamiento con FTI si el tratamiento con FTI inhibe efectivamente el crecimiento del cáncer, o detiene el desarrollo del cáncer, causa la regresión del cáncer, o retrasa o minimiza uno o más síntomas asociados con la presencia del cáncer en este paciente.

La capacidad de respuesta respecto a un tratamiento particular de un paciente con cáncer puede caracterizarse como una respuesta completa o parcial. "Respuesta completa" o "CR" se refiere a una ausencia de enfermedad clínicamente detectable con normalización de estudios radiográficos previamente anormales, mediciones anormales de la médula ósea y el líquido cefalorraquídeo (LCR) o proteínas monoclonales. "Respuesta parcial" o "RP" se refiere a al menos aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de disminución en toda la carga tumoral medible (es decir, el número de células malignas presentes en el sujeto, o el volumen medido de masas tumorales o la cantidad de proteína monoclonal anormal) en ausencia de nuevas lesiones.

Cualquier persona con experiencia ordinaria en la técnica entendería que los estándares clínicos utilizados para definir CR, PR u otro nivel de respuesta del paciente a los tratamientos pueden variar para diferentes tipos de cáncer. Por ejemplo, para los cánceres hematopoyéticos, el paciente que "responde" a un tratamiento particular puede definirse como pacientes que tienen una respuesta completa (RC), una respuesta parcial (RP) o una mejoría hematológica (HI) (Lancet et al., Blood 2: 2 (2006)). La HI puede definirse como cualquier recuento de blastos en la médula ósea inferior al 5% o una reducción de los blastos en la médula ósea en al menos la mitad. Por otro lado, el paciente que "no responde" a un tratamiento particular puede definirse como pacientes que tienen una enfermedad progresiva (EP) o una enfermedad estable (SD). La enfermedad progresiva (EP) se puede definir como un aumento > 50% en la médula ósea o % de blastos circulantes desde el inicio, o nueva aparición de blastos circulantes (en al menos 2 ocasiones consecutivas). La enfermedad estable (SD) se puede definir como cualquier respuesta que no cumpla con los criterios de RC, RP, HI o EP.

Como se usa en este documento, el término "probabilidad" se refiere a la probabilidad de un evento. La expresión "es probable que un sujeto responda a un tratamiento particular cuando se cumple una condición" significa que la probabilidad de que el sujeto responda a un tratamiento particular es mayor cuando se cumple la condición que cuando no se cumple la condición. La probabilidad de responder a un tratamiento en particular puede ser mayor, por ejemplo, en un 5%, 10%, 25%, 50%, 100%, 200% o más en un sujeto que cumple una condición particular en comparación con un sujeto que no cumple con la condición. Por ejemplo, la expresión "es probable que un paciente con cáncer responda a un tratamiento con FTI cuando el sujeto es portador de KIR2DS2" significa que la probabilidad de que un sujeto responda al tratamiento con FTI es del 5%, 10%, 25%, 50%, 100%, 200% o más alta en un sujeto que es portador de KIR2DS2 en comparación con un sujeto que no es portador de KIR2DS2. Para otro ejemplo, la expresión "es probable que un sujeto responda al tratamiento con tipifarnib cuando el nivel de expresión de GZMM en una muestra del sujeto es más alto que un nivel de expresión de referencia de GZMM" significa que la probabilidad de que un sujeto responda al tratamiento con tipifarnib es 5%, 10%, 25%, 50%, 100%, 200% o más en un sujeto cuyo nivel de expresión de GZMM es más alto que un nivel de expresión de referencia de GZMM en comparación con un sujeto cuyo nivel de expresión de GZMM es menor que el nivel de expresión de referencia.

Las proteínas Ras son GTPasas que regulan la proliferación mediante la transducción de la información biológica de las señales extracelulares al núcleo. Las células de mamífero expresan tres genes ras que codifican cuatro proteínas Ras, que son H-Ras, N-Ras, K_A-Ras y K_B-Ras. K_A-Ras y K_B-Ras también se conocen generalmente como K-Ras. Las proteínas Ras existen en un estado activo, unido a GTP o inactivo, unido a GDP. Las proteínas RAS mutantes se acumulan en la conformación unida a GTP debido a una actividad GTPasa intrínseca defectuosa y/o resistencia a la inactivación por las proteínas activadoras de GTPasa (GAP). Las mutaciones que bloquean a las proteínas Ras en su estado activado por GTP unido provocan un crecimiento descontrolado y una transformación maligna. Las mutaciones de K-Ras dan como resultado sustituciones de glicina en valina en los sitios catalíticos de K-Ras, lo que conduce a la pérdida de la actividad de la GTPasa y la subsiguiente unión continua de GTP a RAS (Yokota, Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 12: 163-171 (2012)). La sustitución de otros aminoácidos, como el aspartato y la valina en el codón 12 y el aspartato en el codón 13, puede dar como resultado la proyección de cadenas laterales de aminoácidos más grandes en la bolsa de unión a GDP/GTP de la proteína que interfiere con la hidrólisis de GTP. Como resultado de esos cambios conformacionales y estructurales, la señalización de EGFR se desregula en respuesta a la activación constitutiva de la proteína K-Ras (Herrerros-Villanueva et al., Clínica Chimica Acta, 431 (2014) 21:1-220).

ES 2 741 782 T3

A continuación se proporciona una secuencia de aminoácidos ejemplar y una secuencia de ácido nucleico codificante correspondiente de la isoforma A de K-Ras humana (KA-Ras) (GENBANK: NM_033360.3 GI: 575403058):

MTEYKLVVVG AGGVGKSALT IQLIQNHFVD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET
CLLDILDTAG QEEYSAMRDQ YMRTGEGFLC VFAINNTKSF EDIHHYREQI
KRVKDSEDVP MVLVGNKCDL PSRTVDTKQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ
RVEDAFYTLV REIRQYRLKK ISKEEKTPGC VKIKKCIIM
(SEQ ID NO:13)

ATGACTGAAT ATAACTTGT GGTAGTTGGA GCTGGTGGCG TAGGCAAGAG
TGCCTTGACG ATACAGCTAA TTCAGAATCA TTTTGTGGAC GAATATGATC
CAACAATAGA GGATTCCTAC AGGAAGCAAG TAGTAATTGA TGGAGAAACC
TGTCTCTTGG ATATTCTCGA CACAGCAGGT CAAGAGGAGT ACAGTGCAAT
GAGGGACCAG TACATGAGGA CTGGGGAGGG CTTTCTTTGT GTATTTGCCA
TAAATAATAC TAAATCATTG GAAGATATTC ACCATTATAG AGAACAAATT
AAAAGAGTTA AGGACTCTGA AGATGTACCT ATGGTCCTAG TAGGAAATAA
ATGTGATTTG CCTTCTAGAA CAGTAGACAC AAAACAGGCT CAGGACTTAG
CAAGAAGTTA TGGAATTCCT TTTATTGAAA CATCAGCAA GACAAGACAG
AGAGTGGAGG ATGCTTTTTA TACATTGGTG AGGGAGATCC GACAATACAG
ATTGAAAAAA ATCAGCAAAG AAGAAAAGAC TCCTGGCTGT GTGAAAATTA
AAAAATGCAT TATAATGTAA

5 (SEQ ID NO:14)

A continuación se proporciona una secuencia de aminoácidos ejemplar y una secuencia de ácidos nucleicos codificante correspondiente de la Isoforma B de K-Ras humana (KB-Ras) (GENBANK: NM_033360.3 GI: 575403058):

MTEYKLVVVG AGGVGKSALT IQLIQNHFVD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET
CLLDILDTAG QEEYSAMRDQ YMRTGEGFLC VFAINNTKSF EDIHHYREQI
KRVKDSDDVP MVLVGNKCDL PSRTVDTKQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ
GVDDAFYTLV REIRKHKEKM SKDGKKKKKK SKTKCVIM

(SEQ ID NO: 15)

ATGACTGAAT ATAACTTGT GGTAGTTGGA GCTGGTGGCG TAGGCAAGAG
TGCCTTGACG ATACAGCTAA TTCAGAATCA TTTTGTGGAC GAATATGATC
CAACAATAGA GGATTCCTAC AGGAAGCAAG TAGTAATTGA TGGAGAAACC
TGTCTCTTGG ATATTCTCGA CACAGCAGGT CAAGAGGAGT ACAGTGCAAT
GAGGGACCAG TACATGAGGA CTGGGGAGGG CTTTCTTTGT GTATTTGCCA
TAAATAATAC TAAATCATT GAAGATATTC ACCATTATAG AGAACAAATT
AAAAGAGTTA AGGACTCTGA AGATGTACCT ATGGTCCTAG TAGGAAATAA
ATGTGATTTG CCTTCTAGAA CAGTAGACAC AAAACAGGCT CAGGACTTAG
CAAGAAGTTA TGGAATTCCT TTTATTGAAA CATCAGCAAA GACAAGACAG
GGTGTGATG ATGCCTTCTA TACATTAGTT CGAGAAATTC GAAAACATAA
AGAAAAGATG AGCAAAGATG GTAAAAAGAA GAAAAAGAAG TCAAAGACAA
AGTGTGTAAT TATGTAA

(SEQ ID NO: 16)

A continuación se proporciona una secuencia de aminoácidos ejemplar y una secuencia de ácidos nucleicos codificante correspondiente de N-Ras humana (GENBANK: NM_002524.4 GI: 334688826):

MTEYKLVVVG AGGVGKSALT IQLIQNHFVD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET
CLLDILDTAG QEEYSAMRDQ YMRTGEGFLC VFAINNSKSF ADINLYREQI
KRVKDSDDVP MVLVGNKCDL PTRTVDTKQA HELAKSYGIP FIETSAKTRQ
GVDDAFYTLV REIRQYRMKK LNSSDDGTQG CMGLPCVVM

(SEQ ID NO: 17)

ATGACTGAGT ACAAACGGT GGTGGTTGGA GCAGGTGGTG TTGGGAAAAG
CGCACTGACA ATCCAGCTAA TCCAGAACCA CTTTGTAGAT GAATATGATC
CCACCATAGA GGATTCTTAC AGAAAACAAG TGGTTATAGA TGGTCAAACC
TGTTTGTGG ACATACTGGA TACAGCTGGA CAAGAAGAGT ACAGTGCCAT
GAGAGACCAA TACATGAGGA CAGGCGAAGG CTCCTCTGT GTATTTGCCA
TCAATAATAG CAAGTCATTT GCGGATATTA ACCTCTACAG GGAGCAGATT
AAGCGAGTAA AAGACTCGGA TGATGTACCT ATGGTGCTAG TGGGAAACAA
GTGTGATTTG CCAACAAGGA CAGTTGATAC AAAACAAGCC CACGAACTGG
CCAAGAGTTA CGGGATTCCA TTCATTGAAA CCTCAGCCAA GACCAGACAG
GGTGTGAAG ATGCTTTTTA CACTGGTA AGAGAAATAC GCCAGTACCG
AATGAAAAAA CTCAACAGCA GTGATGATGG GACTCAGGGT TGTATGGGAT
TGCCATGTGT GGTGATGTAA

(SEQ ID NO: 18)

A continuación se proporciona una secuencia de aminoácidos ejemplar y una secuencia de ácidos nucleicos codificante correspondiente de H-Ras humana (GENBANK: CR536579.1 GI: 49168641):

MTEYKLVVVG AGGVGKSALT IQLIQNHFVD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET
CLLDILDTAG QEEYSAMRDQ YMRTGEGFLC VFAINNPKSF EDIHQYREQI
KRVKDSDDVP MVLVGNKCDL AARTVESRQA QDLARSYGIP YIETSAKTRQ
GVEDAFYTLV REIRQHKLRK LNPPDESGPG CMSCKCVLS

(SEQ ID NO:19)

ATGACGGAAT ATAAGCTGGT GGTGGTGGGC GCCGGCGGTG TGGGCAAGAG
TGCGCTGACC ATCCAGCTGA TCCAGAACCA CTTTGTGGAC GAATACGACC
CCACTATAGA GGATTCCTAC CGGAAGCAGG TGGTCATTGA TGGGGAGACG
TGCCTGTTGG ACATCCTGGA TACCGCCGGC CAGGAGGAGT ACAGCGCCAT
GCGGGACCAG TACATGCGCA CCGGGGAGGG CTCCTGTGT GTGTTTGCCA
TCAACAACAC CAAGTCTTTT GAGGACATCC ACCAGTACAG GGAGCAGATC

AAACGGGTGA AGGACTCGGA TGACGTGCC ATGGTGCTGG TGGGGAACAA
 GTGTGACCTG GCTGCACGCA CTGTGGAATC TCGGCAGGCT CAGGACCTCG
 CCCGAAGCTA CGGCATCCCC TACATCGAGA CCTCGGCCAA GACCCGGCAG
 GGAGTGGAGG ATGCCTTCTA CACGTTGGTG CGTGAGATCC GGCAGCACAA
 GCTGCGGAAG CTGAACCCTC CTGATGAGAG TGGCCCCGGC TGCATGAGCT
 GCAAGTGTGT GCTCTCCTGA

(SEQ ID NO:20)

Las isoformas de ras están farnesiladas. La farnesiltransferasa (FTasa) desempeña funciones cruciales en las modificaciones postraduccionales de las proteínas Ras. Una forma de interferir con la función de Ras es la inhibición de la FTasa, la enzima que enlaza un grupo isoprenilo de 15 carbonos con las proteínas Ras, por los inhibidores de la farnesiltransferasa ("FTI"). Las FTI son una clase de medicamentos contra el cáncer biológicamente activos que inhiben la farnesilación de una amplia gama de proteínas diana, incluida la Ras. Los FTI bloquean la activación de Ras a través de la inhibición de FTasa, lo que finalmente da como resultado la detención del crecimiento celular. Por lo tanto, se predijo que las FTI serían agentes terapéuticos eficaces en el tratamiento del cáncer.

El treinta por ciento de todos los cánceres humanos expresan Ras activada oncogénicamente. La alta prevalencia de Ras mutado, que se encuentra en el 30% de todos los cánceres humanos, hace de esta vía un objetivo atractivo para el desarrollo de fármacos contra el cáncer. Inicialmente, se predijo que la mutación o las mutaciones Ras, que condujeron a una ruta RAS constitutivamente activa, pueden servir como biomarcadores para la respuesta del paciente a las FTI, que se basó en la evidencia preclínica de que las FTI podían bloquear las células transformadas con RAS. (Raponi et al., Blood 111: 2589-96 (2008)). Contrariamente a la comprensión convencional, en este documento se describen los descubrimientos inesperados de que los pacientes con cáncer que tienen K-Ras y N-Ras naturales son más sensibles al tratamiento con FTI en comparación con aquellos que tienen un K-Ras o N-Ras mutante, y que la selección de pacientes con cáncer según el estado de la mutación Ras puede mejorar la tasa de respuesta general de un tratamiento con FTI, como el tratamiento con tipifarnib.

Como se usa en el presente documento, la expresión "mutación Ras" se refiere a una mutación de activación en un gen ras o proteína Ras. Una mutación Ras puede referirse a una alternancia genética en la secuencia de ADN de uno de los genes ras que resulta en la activación de la proteína Ras correspondiente, o la alteración en la secuencia de aminoácidos de una proteína Ras que resulta en su activación. Por lo tanto, la expresión "mutación Ras", como se usa en este documento, no incluye una alternancia en un gen ras que no provoque la activación de la proteína Ras, o una alternancia de una secuencia de la proteína Ras que no conduzca a su activación. En consecuencia, una muestra o un sujeto que no tenga ninguna "mutación Ras", como se usa en el presente documento, todavía puede tener una mutación en un gen ras que no afecte a la actividad de la proteína Ras o una mutación que afecte a la actividad de la proteína Ras que tiene una mutación en una proteína Ras que no afecta su actividad o una mutación que perjudica su actividad. Una muestra o un sujeto puede tener múltiples copias de un gen ras. Una muestra o un sujeto también pueden tener proteínas Ras tanto mutantes como naturales. Como se usa en este documento, una muestra o un sujeto que tiene una mutación Ras también puede tener una copia del gen ras natural y/o la proteína Ras natural. Una muestra o un sujeto que se determina que "tiene Ras natural", como se usa en este documento, se refiere a la muestra o sujeto que solo tiene el gen ras natural y la proteína Ras natural, y no la mutación Ras. En consecuencia, una muestra o un sujeto que se determina que "tiene K-Ras natural", como se usa en este documento, se refiere a la muestra o sujeto que solo tiene el gen de kras natural y la proteína K-Ras natural, y no la mutación K-Ras. Una muestra o un sujeto que se determina que "tiene N-Ras natural", como se usa en este documento, se refiere a la muestra o sujeto que solo tiene el gen de nras natural y la proteína N-Ras natural, y no la mutación N-Ras.

La proteína Ras puede ser K-Ras, N-Ras, H-Ras o cualquier combinación de las mismas. El K-Ras puede ser K_A-Ras, K_B-Ras o ambos. En algunas realizaciones, la mutación es una mutación sin sentido que bloquea la proteína Ras en su estado activado unido a GTP. En alguna realización, la mutación da como resultado una sustitución de aminoácidos en uno o más de los codones 12, 13, 61 de la proteína Ras.

En algunos ejemplos, la mutación Ras es una mutación de K-Ras. En algunos ejemplos, la mutación K-Ras es una mutación en K_A-Ras, K_B-Ras, o ambos. La mutación K-Ras puede incluir al menos una mutación en un codón seleccionado del grupo que consiste en G12, G13 y Q61 de K_A-Ras, K_B-Ras, o ambos. En algunos ejemplos, la mutación K_A-Ras puede incluir al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en las sustituciones de aminoácidos G12C, G12D, G12A, G12V, G12S, G12F, G12R, G12N, G13C, G13D, G13R, G13S, G13N, Q61 K, Q61 H, Q61 L, Q61 P, Q61 R y A146V. En algunos ejemplos, la mutación K_B-Ras puede incluir al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en las sustituciones de aminoácidos G12C, G12D, G12A, G12V, G12S, G12F, G12R, G12N, G13C, G13D, G13R, G13S, G13N, Q61 K, Q61 H, Q61 L, Q61 P, Q61 R y A146V.

En algunos ejemplos, la mutación Ras es una mutación de N-Ras. En algunos ejemplos, la mutación N-Ras puede incluir al menos una mutación en un codón seleccionado del grupo que consiste en G12, G13, G15, G60 y Q61. En algunos ejemplos, la mutación N-Ras puede incluir al menos una mutación en un codón seleccionado del grupo que consiste en G12, G13 y Q61. En algunos ejemplos, la mutación N-Ras puede incluir al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en las sustituciones de aminoácidos de G12C, G12D, G12F, G12S, G12A, G12V, G12R, G13C, G13R, G13A, G13D, G13V, G15W, G60E, Q61P, Q61L, Q61R, Q61K, Q61H y Q61E.

En algunas realizaciones, la mutación Ras es una mutación H-Ras. En algunas realizaciones, la mutación H-Ras puede incluir al menos una mutación en un codón seleccionado del grupo que consiste en G12, G13 y Q61. En algunas realizaciones, la mutación N-Ras puede incluir al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en las sustituciones de aminoácidos de G12R, G12V, G13C, G13R, Q61L y Q61R.

2. Inhibidores de la farnesiltransferasa para el tratamiento del cáncer

2.1. Inhibidores de la farnesiltransferasa

En el presente documento se describen un FTI para usarse en métodos que tratan un cáncer en un paciente con cáncer seleccionado o una población seleccionada de pacientes con cáncer. Los FTI representativos pertenecen aproximadamente a dos clases (Shen et al., *Drug Disc. Today* 20: 2 (2015)). Los FTI en la primera clase tienen el marco básico de farnesildifosfato (FPP). Por ejemplo, se informó que los análogos de FPP con un grupo de ácido malónico (Ta) eran FTI que competían con FPP (Duez, S. et al. *Bioorg. Med. Chem.* 18:543-556 (2010)). Además, los derivados que contenían imidazol unidos por un sustituyente ácido y una cadena de peptidilo también se sintetizaron como FTI bisustrato, y los inhibidores bisustrato diseñados tenían mejores afinidades que el FPP. Los FTI en la segunda clase son moléculas peptidomiméticas, que se pueden dividir en dos grupos, a saber, FTI de tiol y no tiol. Con respecto a los FTI de tiol, por ejemplo L-739749, un FTI peptidomimético selectivo muestra una potente actividad antitumoral en ratones atímicos sin toxicidad del sistema (Kohl, N. E. et al. *PNAS* 91: 9141-9145 (1994)). Además, también se desarrollaron una variedad de inhibidores de tiol, como los FTI de tripeptidilo (Lee, H-Y, et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12:1599-1602 (2002)).

Para los FTI sin tiol, los heterociclos se utilizaron ampliamente consecuentemente para sustituir el grupo tiol que contacta con el ion cinc en el sitio de unión. De acuerdo con las estructuras de los grupos farmacofóricos, los FTI sin tiol pueden dividirse en tres clases. La primera clase se caracteriza por diferentes anillos monocíclicos, como el L-778123, un FTI en ensayos clínicos de fase I para tumores sólidos y linfoma. L-778123 se une al sitio del péptido CAAX y compite con el sustrato CAAX de la farnesiltransferasa. La segunda clase está representada por tipifarnib en los ensayos de Fase III y BMS-214662 en los ensayos de Fase III, que están compuestos por diversos anillos monocíclicos y anillos bicíclicos (Harousseau et al. *Blood* 114: 1166-1173 (2009)). El inhibidor representativo de la tercera clase es lonafarnib, que es activo en tumores malignos dependientes de Ras e independientes, y ha ingresado en ensayos clínicos de Fase III para combatir carcinomas, leucemias y el síndrome mielodisplásico. Lonafarnib es un FTI con un núcleo de triciclo, que contiene un anillo central de siete miembros fusionado con dos anillos aromáticos de seis miembros.

Por lo tanto, los FTI como se describen en este documento pueden tomar una multitud de formas, pero comparten la función inhibitoria esencial de interferir o disminuir la farnesilación de proteínas implicadas en el cáncer y las enfermedades proliferativas.

Numerosas FTI incluyen las descritas en las Patentes de EE.UU. N° 5.976.851; 5.972.984; 5.972.966; 5.968.965; 5.968.952; 6.187.786; 6.169.096; 6.037.350; 6.177.432; 5.965.578; 5.965.539; 5.958.939; 5.939.557; 5.936.097; 5.891.889; 5.889.053; 5.880.140; 5.872.135; 5.869.682; 5.861.529; 5.859.015; 5.856.439; 5.856.326; 5.852.010; 5.843.941; 5.807.852; 5.780.492; 5.773.455; 5.767.274; 5.756.528; 5.750.567; 5.721.236; 5.700.806; 5.661.161; 5.602.098; 5.585.359; 5.578.629; 5.534.537; 5.532.359; 5.523.430; 5.504.212; 5.491.164; 5.420.245; y 5.238.922.

Los FTI también incluyen los descritos en Thomas et al., *Biologics* 1: 415-424 (2007); Shen et al., *Drug Disc. Today* 20:2 (2015); Appels et al., *The Oncologist* 10:565-578 (2005).

En algunos ejemplos, los FTI incluyen Arglablin (es decir, 1(R)-10-epoxi-5(S),7(S)-guaia-3(4),11(13)-dien-6,12-olida descrita en el documento WO-98/28303 (NuOncology Labs); alcohol perrílico descrito en el documento WO-99/45912 (Wisconsin Genetics); SCH-66336 (lonafarnib), es decir (+)-(R)-4-[2-[4-(3,10-dibromo-8-cloro-5,6-dihidro-11H-benzo[5,6]ciclohepta[1,2-b]piridin-11-il)]piperidin-1-il]-2-oxoetil]piperidin-1-carboxamida, descrita en la patente de EE.UU. N° 5.874.442 (Schering); L778123, es decir, 1-(3-clorofenil)-4-[1-(4-cianobencil)-5-imidazolilmetil]-2-piperazinona, descrita en el documento WO-00/01691 (Merck); L739749, es decir, el compuesto 2(S)-[2(S)-[2(R)-amino-3-mercaptopropilamino-3(S)-metil]-pentiloxi-3-fenilpropionil-metionina sulfona descrita en el documento WO-94/10138 (Merck); FTI-277, es decir, {N-[2-fenil-4-N-[2(R)-amino-3-mecaptopropilamino]benzoil]}metionato de metilo (Calbiochem); L744832, es decir, éster 1-metiletilico del ácido (2S)-2-[[[(2S)-2-[(2S,3S)-2-[(2R)-2-amino-3-mercaptopropil]amino]-3-metilpentil]oxi]-1-oxo-3-fenilpropil]amino]-4-(metilsulfonil)butanoico (Biomol International LP); CP-609.754 (Pfizer), es decir, (R)-6-[[4-clorofenil]-hidroxil-(1-metil-1-H-imidazol-5-il)-metil]-4-(3-etinilfenil)-1-metil-2-(1H)-quinolinona y (R)-6-[[4-clorofenil]-hidroxil-(3-metil-3H-imidazol-4-il)-metil]-4-(3-etinilfenil)-1-metil-2-(1H)-quinolinona; R208176 (Johnson & Johnson), es decir, JNJ-17305457, o (R)-1-(4-clorofenil)-1-[5-(3-clorofenil)

5 tetrazolo[1,5-a]quinazolin-7-il]-1-(1-metil-1H-imidazol-5-il)metanamina; AZD3409 (AstraZeneca), es decir, 2-(2-(4-fluorofenil)-5-(((2S, 4S)-4-(nicotinoiltio)pirrolidin-2-il)metil)amino)benzamido)-4-(metiltio)butanoato de (S)-isopropilo; BMS 214662 (Bristol-Myers Squibb), es decir, (R)-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmetil)-4-(2-tienilsulfonil)-1H-1,4-benzodiazapina-7-carbonitrilo, descrito en el documento WO 97/30992 (Bristol Myers Squibb) y los compuestos (A) y (B) de Pfizer descritos en los documentos WO-00/12498 y WO-00/12499.

En algunos ejemplos, los FTI son no peptidales, los agentes terapéuticos llamados "moléculas pequeñas", como son las quinolinas o los derivados de quinolina que incluyen:

7-(3-clorofenil)-9-[(4-clorofenil)-1H-imidazol-1-ilmetil]-2,3-dihidro-o-1H,5H-benzo[ij]quinolizin-5-ona,

7-(3-clorofenil)-9-[(4-clorofenil)-1H-imidazol-1-ilmetil]-1,2-dihidro-o-4H-pirrolo[3,2,1-ij]quinolina-4-ona,

10 8-[amino(4-clorofenil)(1-metil-1H-imidazol-5-il)metil]-6-(3-clorofenil)-1,2-dihidro-4H-pirrolo[3,2,1-ij]quinolin-4-ona, y

8-[amino(4-clorofenil)(1-metil-1H-imidazol-5-il)metil]-6-(3-clorofenil)-2,3-dihidro-1H,5H-benzo[ij]quinolizin-5-ona.

15 El Tipifarnib es un FTI no peptidomimético (Thomas et al., *Biologics* 1: 415-424 (2007)). Es un ((B)-6-[amino (4-clorofenil)(1-metil-1H-imidazol-5-il)metil]-4-(3-clorofenil)-1-metil-2(1H)-quinolinona) derivado de 4,6-disustituido-1-metilquinolin-2-ona que se obtuvo mediante la optimización de una quinolona principal identificada a partir de la selección de la biblioteca de compuestos. El Tipifarnib inhibe competitivamente el sitio de unión del péptido CAAX de la FTasa y es un inhibidor de la farnesilación extremadamente potente y altamente selectivo. El Tipifarnib no es una inhibición de la geranylgeranyltransferasa I. El Tipifarnib tiene un perfil de seguridad manejable como terapia de agente único, es razonablemente bien tolerado en el ser humano y requiere una dosificación de dos veces al día para obtener concentraciones plasmáticas efectivas.

20 El Tipifarnib se sintetiza mediante la condensación del anión de 1-metilimidazol con un derivado de 6-(4-clorobenzoil)quinolona, seguido de deshidratación. El intermedio de quinolona se preparó en cuatro etapas por ciclación de N-fenil-3-(3-clorofenil)-2-propenamida, acilación, oxidación y N-metilación. El Tipifarnib se identificó a partir de los programas de catabolismo de ketoconazol y ácido retinoico de Janssen como una característica estructural clave en el procedimiento de prenilación de Ras. El Tipifarnib es un potente inhibidor de la FTasa in vitro y es activo por vía oral en una variedad de modelos animales. La actividad de un solo agente de tipifarnib se observó en poblaciones de tumores no seleccionados (AML, MDS/CMML, cáncer urotelial, cáncer de mama, PTCL/CTCL), aunque un estudio clínico de fase III no demostró una mejoría en la supervivencia general.

25 En algunos ejemplos, se describe en este documento un FTI para usarse en un método para tratar el cáncer en un sujeto con una FTI o una composición farmacéutica que tiene FTI, o seleccionar un paciente con cáncer para un tratamiento con FTI. Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento contienen cantidades terapéuticamente eficaces de un FTI y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunos ejemplos, el FTI es arglabin; alcohol perrílico; lonafarnib (SCH-66336); L778123; L739749; FTI-277; L744832; R208176; BMS 214662; AZD3409; o CP-609.754. De acuerdo con la invención, el FTI es el tipifarnib.

2.2. Formulaciones

35 El FTI se puede formular en preparaciones farmacéuticas adecuadas como soluciones, suspensiones, comprimidos, comprimidos dispersables, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida o elixires, para su administración oral o en soluciones o suspensiones estériles para su administración oftálmica o parenteral, así como su preparación en parches transdérmicos e inhaladores de polvo seco. Típicamente, el FTI se formula en composiciones farmacéuticas usando técnicas y procedimientos habituales en la técnica (véase, por ejemplo, Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, Séptima edición, 1999).

En las composiciones, las concentraciones efectivas del FTI y las sales farmacéuticamente aceptables se mezclan con un portador o vehículo farmacéutico adecuado. Las concentraciones de FTI en las composiciones son efectivas para el suministro de una cantidad, tras la administración, que trata, previene o mejora uno o más de los síntomas y/o la progresión del cáncer, incluidos los cánceres hematológicos y los tumores sólidos.

45 Las composiciones pueden formularse para su administración en dosis únicas. Para formular una composición, la fracción en peso del FTI se disuelve, suspende, dispersa o se mezcla de otra manera en un vehículo seleccionado a una concentración efectiva de tal manera que la condición tratada se alivie o mejore. Los vehículos o vehículos farmacéuticos adecuados para la administración del FTI proporcionado en el presente documento incluyen cualquiera de los vehículos conocidos por los expertos en la técnica como adecuados para el modo particular de administración.

50 Además, el FTI puede formularse como el único ingrediente farmacéuticamente activo en la composición o puede combinarse con otros ingredientes activos. Las suspensiones liposómicas, que incluyen liposomas dirigidos a tejidos, tales como liposomas dirigidos a tumores, también pueden ser adecuadas como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las formulaciones de liposomas se pueden preparar como se conoce en la técnica. En

resumen, se pueden formar liposomas, como vesículas multilamelares (MLV), secando la fosfatidilcolina de huevo y la fosfatidil serina cerebral (relación molar 7:3) en el interior de un matraz. Se agrega una solución de un FTI proporcionado en el presente documento en solución salina tamponada con fosfato que carece de cationes divalentes (PBS) y se agita el matraz hasta que se dispersa la película lipídica. Las vesículas resultantes se lavan para eliminar el compuesto no encapsulado, se sedimentan por centrifugación y luego se resuspenden en PBS.

El FTI se incluye en el vehículo farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil en ausencia de efectos secundarios indeseables en el paciente tratado. La concentración terapéuticamente eficaz se puede determinar empíricamente probando los compuestos in vitro e in vivo en los sistemas descritos en este documento y luego extrapolando los mismos para las dosis para humanos.

La concentración de FTI en la composición farmacéutica dependerá de la absorción, distribución tisular, inactivación y tasas de excreción del FTI, las características fisicoquímicas del FTI, el programa de dosificación y la cantidad administrada, así como otros factores conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, la cantidad que se administra es suficiente para mejorar uno o más de los síntomas del cáncer, incluidos los cánceres hematopoyéticos y los tumores sólidos.

En ciertas realizaciones, una dosificación terapéuticamente eficaz debería producir una concentración en suero del ingrediente activo de aproximadamente 0,1 ng/ml a aproximadamente 50-100 µg/ml. En una realización, las composiciones farmacéuticas proporcionan una dosis de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 2000 mg de compuesto por kilogramo de peso corporal por día. Las formas unitarias de dosificación farmacéutica se preparan para proporcionar de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg y, en ciertas realizaciones, de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo esencial o una combinación de ingredientes esenciales por forma de unidad de dosificación.

El FTI se puede administrar de una vez, o se puede dividir en varias dosis más pequeñas para administrar en intervalos de tiempo. Se entiende que la dosis precisa y la duración del tratamiento es una función de la enfermedad que se está tratando y se puede determinar empíricamente utilizando protocolos de prueba conocidos o por extrapolación de datos de prueba in vivo o in vitro. Se debe tener en cuenta que las concentraciones y los valores de dosificación también pueden variar con la gravedad de la afección a aliviar. Debe entenderse además que para cualquier sujeto en particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de concentración establecidos en este documento son solo ejemplares y no pretenden limitar el alcance o la práctica de las composiciones reivindicadas.

Por lo tanto, las concentraciones o cantidades efectivas de uno o más de los compuestos descritos en el presente documento o sus sales farmacéuticamente aceptables se mezclan con un portador o vehículo farmacéutico adecuado para la administración sistémica, tópica o local para formar composiciones farmacéuticas. Los compuestos se incluyen en una cantidad efectiva para mejorar uno o más síntomas, o para tratar, retardar la progresión o prevenir. La concentración del compuesto activo en la composición dependerá de la absorción, distribución tisular, inactivación, tasas de excreción del compuesto activo, el programa de dosificación, la cantidad administrada, la formulación particular y otros factores conocidos por los expertos en la técnica.

Las composiciones están destinadas a ser administradas por una vía adecuada, que incluye, entre otras, la oral, parenteral, rectal, tópica y local. Para la administración oral, se pueden formular cápsulas y comprimidos. Las composiciones están en forma líquida, semilíquida o sólida y se formulan de una manera adecuada para cada vía de administración.

Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica, subcutánea o tópica pueden incluir cualquiera de los siguientes componentes: un diluyente estéril, como agua para inyección, solución salina, aceite fijo, polietilenglicol, glicerina, propilenglicol, dimetil acetamida u otros solventes sintéticos; agentes antimicrobianos, tales como alcohol bencílico y metilparabenos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico y bisulfato de sodio; agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); tampones, tales como acetatos, citratos y fosfatos; y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. Las preparaciones parenterales se pueden incluir en ampollas, lápices, jeringas desechables o viales de dosis única o múltiple de vidrio, plástico u otro material adecuado.

En los casos en que el FTI exhibe una solubilidad insuficiente, se pueden usar métodos para solubilizar compuestos. Dichos métodos son conocidos por los expertos en esta técnica e incluyen, entre otras, el uso de cosolventes, como el dimetilsulfóxido (DMSO), el uso de tensioactivos, como TWEEN®, o la disolución en bicarbonato de sodio acuoso.

Tras la mezcla o adición del(de los) compuesto(s), la mezcla resultante puede ser una solución, suspensión, emulsión o similar. La forma de la mezcla resultante depende de varios factores, incluido el modo de administración previsto y la solubilidad del compuesto en el portador o vehículo seleccionado. La concentración efectiva es suficiente para mejorar los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección tratada y puede determinarse empíricamente.

Las composiciones farmacéuticas se proporcionan para su administración en seres humanos y animales en formas de dosificación unitaria, tales como comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones parenterales y estériles y soluciones o suspensiones orales, y emulsiones de agua y aceite que contienen cantidades adecuadas de los compuestos, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los compuestos farmacéuticamente terapéuticamente activos y sus sales se formulan y administran en formas de dosificación unitaria o formas de dosificación múltiple. Las formas de dosis unitarias tal como se usan en el presente documento se refieren a unidades físicamente discretas adecuadas para sujetos humanos y animales y envasadas individualmente como se conoce en la técnica. Cada dosis unitaria contiene una cantidad predeterminada del compuesto terapéuticamente activo suficiente para producir el efecto terapéutico deseado, junto con el vehículo farmacéutico, portador o diluyente requerido. Los ejemplos de formas de dosis unitarias incluyen ampollas y jeringas y comprimidos o cápsulas envasadas individualmente. Las formas de dosis unitarias pueden administrarse en fracciones o múltiplos de las mismas. Una forma de dosis múltiple es una pluralidad de formas de dosis unitarias idénticas envasadas en un solo recipiente para ser administradas en formas de dosis unitaria segregadas. Ejemplos de formas de dosis múltiples incluyen viales, frascos de comprimidos o cápsulas o frascos de pintas o galones. Por lo tanto, la forma de dosis múltiple es un múltiplo de dosis unitarias que no se segregan en envases.

También se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el compuesto proporcionado en el presente documento, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen parches de iontoforesis, poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas, copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros como el acetato de etileno-vinilo y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas por períodos de tiempo más cortos. Cuando los compuestos encapsulados permanecen en el cuerpo durante mucho tiempo pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, lo que da como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en su estructura. Se pueden diseñar estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo de acción involucrado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es una formación de enlace S-S intermolecular a través del intercambio tio-disulfuro, la estabilización se puede lograr modificando los residuos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

Se pueden preparar formas de dosificación o composiciones que contengan ingrediente activo en el intervalo de 0,005% a 100% con el resto compuesto de un vehículo no tóxico. Para la administración oral, se forma una composición no tóxica farmacéuticamente aceptable mediante la incorporación de cualquiera de los excipientes empleados normalmente, como, por ejemplo, los grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, talco, derivados de celulosa, croscarmelosa de sodio, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio o sacarina sódica. Tales composiciones incluyen soluciones, suspensiones, comprimidos, cápsulas, polvos y formulaciones de liberación sostenida, tales como, entre otras, implantes y sistemas de administración microencapsulados, y polímeros biodegradables y biocompatibles, como colágeno, acetato de etileno y vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, poliortoésteres, ácido poliláctico, etc. Los métodos para la preparación de estas composiciones son conocidos por los expertos en la técnica. Las composiciones contempladas pueden contener aproximadamente de 0,001% a 100% de ingrediente activo, en ciertas realizaciones, aproximadamente 0,1-85% o aproximadamente 75-95%.

El FTI o las sales farmacéuticamente aceptables se pueden preparar con vehículos que protegen el compuesto frente a su eliminación rápida en el cuerpo, como formulaciones o recubrimientos de liberación prolongada.

Las composiciones pueden incluir otros compuestos activos para obtener combinaciones deseadas de propiedades. Los compuestos proporcionados en este documento, o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos como se describen en este documento, también pueden administrarse junto con otro agente farmacológico conocido en la técnica general por su valor en el tratamiento de una o más de las enfermedades o afecciones médicas referidas anteriormente en este documento, tales como las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

Las composiciones sin lactosa proporcionadas en el presente documento pueden contener excipientes que son habituales en la técnica mostradas, por ejemplo, en la Farmacopea de EE.UU. (USP) SP (XXI)/NF (XVI). En general, las composiciones sin lactosa contienen un ingrediente activo, un aglutinante/relleno y un lubricante en cantidades farmacéuticamente compatibles y farmacéuticamente aceptables. Las formas de dosificación sin lactosa, a modo de ejemplo, contienen un ingrediente activo, celulosa microcristalina, almidón pregelatinizado y estearato de magnesio.

Además, se incluyen composiciones farmacéuticas anhidras y formas de dosificación que contienen un compuesto proporcionado en el presente documento. Por ejemplo, la adición de agua (por ejemplo, 5%) es ampliamente aceptada en las técnicas farmacéuticas como un medio para simular el almacenamiento a largo plazo con el fin de determinar características como la vida útil o la estabilidad de las formulaciones a lo largo del tiempo. Véase, por ejemplo, Jens T. Carstensen, *Drug Stability: Principles & Practice*, 2ª. Ed., Marcel Dekker, NY, N.Y., 1995, pp. 379-

80. En efecto, el agua y el calor aceleran la descomposición de algunos compuestos. Por lo tanto, el efecto del agua en una formulación puede ser de gran importancia ya que la humedad se encuentra comúnmente durante la fabricación, manipulación, envasado, almacenamiento, envío y uso de formulaciones.

5 Las composiciones farmacéuticas anhidras y las formas de dosificación proporcionadas en el presente documento pueden prepararse usando ingredientes anhidros o que contienen poca humedad y condiciones de poca humedad. Las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación que comprenden lactosa y al menos un ingrediente activo que comprende una amina primaria o secundaria son anhidras si se espera un contacto sustancial con la humedad durante la fabricación, el envasado y/o el almacenamiento.

10 Una composición farmacéutica anhidra debe prepararse y almacenarse de manera que se mantenga su naturaleza anhidra. Por consiguiente, las composiciones anhidras se envasan utilizando materiales que se sabe que evitan la exposición al agua, de manera que se pueden incluir en los kits de formularios adecuados. Los ejemplos de envases adecuados incluyen, entre otros, láminas herméticamente selladas, plásticos, recipientes de dosis unitarias (por ejemplo, viales), envases de blíster y envases de tiras.

15 Las formas de dosificación farmacéutica oral son sólidos, geles o líquidos. Las formas de dosificación sólidas son comprimidos, cápsulas, gránulos y polvos a granel. Los tipos de comprimidos orales incluyen pastillas comprimidas, masticables y comprimidos que pueden ser de recubrimiento entérico, de azúcar o de película. Las cápsulas pueden ser cápsulas de gelatina dura o blanda, mientras que los gránulos y los polvos se pueden proporcionar en forma no efervescente o efervescente con la combinación de otros ingredientes conocidos por los expertos en la técnica.

20 En ciertas realizaciones, las formulaciones son formas de dosificación sólidas, tales como cápsulas o comprimidos. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante; un diluyente un agente desintegrante; un lubricante; un agente deslizante; un agente edulcorante; y un agente aromatizante.

25 Los ejemplos de aglutinantes incluyen celulosa microcristalina, goma de tragacanto, solución de glucosa, mucílago de acacia, solución de gelatina, sacarosa y pasta de almidón. Los lubricantes incluyen talco, almidón, estearato de magnesio o calcio, licopodio y ácido esteárico. Los diluyentes incluyen, por ejemplo, lactosa, sacarosa, almidón, caolín, sal, manitol y fosfato dicálcico. Los agentes deslizantes incluyen, entre otros, el dióxido de silicio coloidal. Los agentes disgregantes incluyen la croscarmelosa sódica, el glicolato de almidón sódico, el ácido algínico, el almidón de maíz, el almidón de patata, la bentonita, la metilcelulosa, el agar y la carboximetilcelulosa. Los agentes colorantes incluyen, por ejemplo, cualquiera de los tintes FD y C solubles en agua certificados aprobados, mezclas de los mismos; y tintes FD y C insolubles en agua suspendidos sobre hidrato de alúmina. Los agentes edulcorantes incluyen sacarosa, lactosa, manitol y agentes edulcorantes artificiales, como la sacarina, y cualquier número de sabores secados por pulverización. Los agentes saborizantes incluyen sabores naturales extraídos de plantas tales como frutas y mezclas sintéticas de compuestos que producen una sensación agradable, como la menta y el salicilato de metilo, entre otros. Los agentes humectantes incluyen monoestearato de propilenglicol, monooleato de sorbitán, monolaurato de dietilenglicol y polioxietileno éter laural. Los recubrimientos eméticos incluyen ácidos grasos, grasas, ceras, shellac, shellac amoníaco y acetato de celulosa ftalatos. Los recubrimientos de película incluyen hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, polietilenglicol 4000 y acetato ftalato de celulosa.

40 Cuando la forma de unidad de dosificación es una cápsula, puede contener, además del material del tipo anterior, un vehículo líquido como un aceite graso. Además, las formas unitarias de dosificación pueden contener varios otros materiales que modifiquen la forma física de la unidad de dosificación, por ejemplo, recubrimientos de azúcar y otros agentes entéricos. Los compuestos también pueden administrarse como un componente de un elixir, suspensión, jarabe, oblea, espolvoreado, goma de mascar o similares. Un jarabe puede contener, además de los compuestos activos, sacarosa como agente edulcorante y ciertos conservantes, colorantes y tintes y sabores.

45 Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluidos en las comprimidos son aglutinantes, lubricantes, diluyentes, agentes desintegrantes, agentes colorantes, agentes aromatizantes y agentes humectantes. Las comprimidos con recubrimiento entérico, debido a dicho recubrimiento entérico, resisten la acción del ácido del estómago y se disuelven o desintegran en los intestinos neutros o alcalinos. Los comprimidos recubiertos de azúcar son comprimidos prensados a los que se aplican diferentes capas de sustancias farmacéuticamente aceptables. Los comprimidos recubiertos con película son comprimidos prensados que se han recubierto con un polímero u otro revestimiento adecuado. Los comprimidos prensados múltiples son comprimidos prensados fabricados por más de un ciclo de compresión utilizando las sustancias farmacéuticamente aceptables mencionadas anteriormente. También se pueden usar en las formas de dosificación anteriores agentes colorantes. Los agentes saborizantes y edulcorantes se utilizan en comprimidos prensados, recubiertos de azúcar, comprimidos prensados múltiples y masticables. Los agentes aromatizantes y edulcorantes son especialmente útiles en la formación de comprimidos y pastillas masticables.

55 Las formas de dosificación oral líquidas incluyen soluciones acuosas, emulsiones, suspensiones, soluciones y/o suspensiones reconstituidas a partir de gránulos no efervescentes y preparaciones efervescentes reconstituidas a partir de gránulos efervescentes. Las soluciones acuosas incluyen, por ejemplo, elixires y jarabes. Las emulsiones son aceite en agua o agua en aceite.

Los elixires son preparaciones hidroalcohólicas transparentes y endulzadas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables usados en los elixires incluyen disolventes. Los jarabes son soluciones acuosas concentradas de un azúcar, por ejemplo, sacarosa, y pueden contener un conservante. Una emulsión es un sistema de dos fases en el que un líquido se dispersa en forma de pequeños glóbulos en otro líquido. Los vehículos farmacéuticamente aceptables usados en emulsiones son líquidos no acuosos, agentes emulsionantes y conservantes. Las suspensiones utilizan agentes de suspensión y conservantes farmacéuticamente aceptables. Las sustancias farmacéuticamente aceptables utilizadas en gránulos no efervescentes, para reconstituirse en una forma de dosificación oral líquida, incluyen diluyentes, edulcorantes y agentes humectantes. Las sustancias farmacéuticamente aceptables utilizadas en gránulos efervescentes, para reconstituirse en una forma de dosificación oral líquida, incluyen ácidos orgánicos y una fuente de dióxido de carbono. Los agentes colorantes y aromatizantes se utilizan en todas las formas de dosificación anteriores.

Los disolventes incluyen glicerina, sorbitol, alcohol etílico y jarabe. Los ejemplos de conservantes incluyen glicerina, metil y propilparabeno, ácido benzoico, benzoato de sodio y alcohol. Los ejemplos de líquidos no acuosos utilizados en emulsiones incluyen aceite mineral y aceite de semilla de algodón. Los ejemplos de agentes emulsionantes incluyen gelatina, goma arábiga, tragacanto, bentonita y tensioactivos tales como el monooleato de polioxietileno sorbitán. Los agentes de suspensión incluyen carboximetilcelulosa de sodio, pectina, tragacanto, Veegum y acacia. Los diluyentes incluyen lactosa y sacarosa. Los agentes edulcorantes incluyen sacarosa, jarabes, glicerina y agentes edulcorantes artificiales como la sacarina. Los agentes humectantes incluyen monoestearato de propilenglicol, monooleato de sorbitán, monolaurato de dietilenglicol y polioxietileno lauril éter. Los aditivos orgánicos incluyen ácido cítrico y tartárico. Las fuentes de dióxido de carbono incluyen bicarbonato de sodio y carbonato de sodio. Los agentes colorantes incluyen cualquiera de los tintes FD y C solubles en agua certificados aprobados y sus mezclas. Los agentes saborizantes incluyen sabores naturales extraídos de plantas tales como frutas y mezclas sintéticas de compuestos que producen una sensación agradable de sabor.

Para una forma de dosificación sólida, la solución o suspensión, por ejemplo, constituida en carbonato de propileno, aceites vegetales o triglicéridos, se encapsula en una cápsula de gelatina. Dichas soluciones, y la preparación y encapsulación de las mismas, se describen en las patentes de EE.UU. Números 4.328.245; 4.409.239; y 4.410.545. Para una forma de dosificación líquida, la solución, por ejemplo, en un polietilenglicol, puede diluirse con una cantidad suficiente de un vehículo líquido farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, agua, para medirse fácilmente para su administración.

Alternativamente, las formulaciones orales líquidas o semisólidas se pueden preparar disolviendo o dispersando el compuesto activo o la sal en aceites vegetales, glicoles, triglicéridos, ésteres de propilenglicol (por ejemplo, carbonato de propileno) y otros vehículos similares, y encapsulando estas soluciones o suspensiones en cápsulas de gelatina duras o blandas. Otras formulaciones útiles incluyen, entre otras, aquellas que contienen un compuesto proporcionado en el presente documento, un mono o polialquilenglicol dialquilado, que incluye, entre otros, 1,2-dimetoximetano, diglimes, triglimes, tetraglimes, polietilenglicol 350-dimetil éter, polietilenglicol-550-dimetil éter, polietilenglicol-750-dimetil éter donde 350, 550 y 750 se refieren al peso molecular promedio aproximado del polietilenglicol, y uno o más antioxidantes, como el hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol butilado (BHA), galato de propilo, vitamina E, hidroquinona, hidroxycumarinas, etanolamina, lecitina, cefalina, ácido ascórbico, ácido málico, sorbitol, ácido fosfórico, ácido tiodipropiónico y sus ésteres y ditiocarbamatos.

Otras formulaciones incluyen, entre otras, soluciones alcohólicas acuosas que incluyen un acetal farmacéuticamente aceptable. Los alcoholes utilizados en estas formulaciones son cualquier disolvente miscible con agua farmacéuticamente aceptable que tenga uno o más grupos hidroxilo, incluidos, entre otros, propilenglicol y etanol. Los acetales incluyen, entre otros, di(alquilo inferior)acetales de aldehídos de alquilo inferior tales como acetaldehído dietilacetil.

En todas las realizaciones, las formulaciones de comprimidos y cápsulas pueden recubrirse como saben los expertos en la técnica para modificar o mantener la disolución del ingrediente activo. Así, por ejemplo, pueden recubrirse con un recubrimiento convencional digerible por vía entérica, tal como el fenilsalicilato, ceras y celulosa acetato ftalato.

La administración parenteral, generalmente caracterizada por la inyección, ya sea por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa también se proporciona en el presente documento. Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquidos antes de la inyección, o como emulsiones. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol o etanol. Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas que se administrarán también pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH, estabilizadores, potenciadores de la solubilidad y otros agentes similares, como por ejemplo, acetato de sodio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina y ciclodextrinas. La implantación de un sistema de liberación lenta o sostenida, de manera que se mantiene un nivel constante de dosificación también se contempla en el presente documento. Brevemente, un compuesto proporcionado en este documento se dispersa en una matriz interna sólida, por ejemplo, polimetilmetacrilato, polibutylmetacrilato, policloruro de vinilo plastificado o no plastificado, nailon plastificado, polietilentereftalato plastificado, caucho natural, poliisopreno, poliisobutileno, polibutadieno, polietileno, copolímeros de etileno-

vinilacetato, cauchos de silicona, polidimetilsiloxanos, copolímeros de carbonato de silicona, polímeros hidrófilos como hidrogeles de ésteres de ácido acrílico y metacrílico, colágeno, polivinilalcohol reticulado y acetato de polivinilo parcialmente hidrolizado reticulado, que está rodeado por una membrana polimérica externa, por ejemplo, polietileno, polipropileno, copolímeros de etileno/propileno, copolímeros de etileno/acrilato de etilo, copolímeros de etileno/vinilacetato, cauchos de silicona, siloxanos de polidimetilo, caucho de neopreno, polietileno clorado, policloruro de vinilo, copolímeros de cloruro de vinilo con acetato de vinilo, cloruro de vinilideno, etileno y propileno, ionómero tereftalato de polietileno, gomas de epiclorohidrina de caucho de butilo, copolímero de etileno/alcohol de vinilo, terpolímero de etileno/acetato de vinilo/alcohol de vinilo y copolímero de etileno/viniloxietanol, que es insoluble en fluidos corporales. El compuesto se difunde a través de la membrana polimérica externa en una etapa de control de la velocidad de liberación. El porcentaje de compuesto activo contenido en tales composiciones parenterales es altamente dependiente de la naturaleza específica del mismo, así como de la actividad del compuesto y las necesidades del sujeto.

La administración parenteral de las composiciones incluye las administraciones intravenosa, subcutánea e intramuscular. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones estériles listas para inyección, productos solubles en seco estériles, como polvos liofilizados, listos para ser combinados con un disolvente justo antes de su uso, incluyendo comprimidos hipodérmicos, suspensiones estériles listas para inyección, productos insolubles secos estériles listos para ser combinados con un vehículo justo antes de su uso y emulsiones estériles. Las soluciones pueden ser tanto acuosas como no acuosas.

Si se administran por vía intravenosa, los vehículos adecuados incluyen una solución salina fisiológica o una solución salina tamponada con fosfato (PBS), y soluciones que contienen agentes espesantes y solubilizantes, como glucosa, polietilenglicol y polipropilenglicol y mezclas de los mismos.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables usados en las preparaciones parenterales incluyen vehículos acuosos, vehículos no acuosos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos, tampones, antioxidantes, anestésicos locales, agentes de suspensión y dispersión, agentes emulsionantes, agentes secuestrantes o quelantes y otras sustancias farmacéuticamente aceptables.

Los ejemplos de vehículos acuosos incluyen la inyección de cloruro de sodio, la inyección de la solución de Ringer, la inyección de dextrosa isotónica, la inyección de agua estéril, la dextrosa y la inyección de la solución de Ringer lactada. Los vehículos parenterales no acuosos incluyen aceites fijos de origen vegetal, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo y aceite de cacahuete. Los agentes antimicrobianos en concentraciones bacteriostáticas o fungistáticas se deben agregar a las preparaciones parenterales envasadas en recipientes de dosis múltiples que incluyen fenoles o cresoles, mercuriales, alcohol bencílico, clorobutanol, ésteres de metil y propil ácido hidroxibenzoico, timerosal, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio. Los agentes isotónicos incluyen cloruro de sodio y dextrosa. Los tampones incluyen fosfato y citrato. Los antioxidantes incluyen bisulfato de sodio. Los anestésicos locales incluyen clorhidrato de procaína. Los agentes de suspensión y dispersión incluyen carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropilmetilcelulosa y polivinilpirrolidona. Los agentes emulsionantes incluyen polisorbato 80 (TWEEN® 80). Un agente secuestrante o quelante de iones metálicos incluye EDTA. Los vehículos farmacéuticos también incluyen alcohol etílico, polietilenglicol y propilenglicol para vehículos miscibles con agua e hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido láctico para ajustar el pH.

La concentración del FTI se ajusta de modo que una inyección proporcione una cantidad eficaz para producir el efecto farmacológico deseado. La dosis exacta depende de la edad, el peso y el estado del paciente o animal como se conoce en la técnica. Las preparaciones parenterales de dosis unitarias se envasan en ampollas, viales o jeringas con aguja. Todas las preparaciones para la administración parenteral deben ser estériles, como se conoce y se practica en la técnica.

Ilustrativamente, la infusión intravenosa o intraarterial de una solución acuosa estéril que contiene un FTI es un modo eficaz de administración. Otra realización es una solución o suspensión acuosa o aceitosa estéril que contiene un material activo inyectado según sea necesario para producir el efecto farmacológico deseado.

Los inyectables están diseñados para la administración local y sistémica. Típicamente, una dosis terapéuticamente eficaz se formula para contener una concentración de al menos aproximadamente el 0,1% p/p hasta aproximadamente el 90% p/p o más, tal como más del 1% p/p del compuesto activo al tejido o tejidos tratados. El ingrediente activo puede administrarse de una vez, o puede dividirse en varias dosis más pequeñas para administrarse a intervalos de tiempo. Se entiende que la dosis precisa y la duración del tratamiento es una función del tejido que se está tratando y se puede determinar empíricamente utilizando protocolos de prueba conocidos o por extrapolación de datos de prueba in vivo o in vitro. Cabe señalar que las concentraciones y los valores de dosificación también pueden variar con la edad del individuo tratado. Debe entenderse además que para cualquier sujeto en particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse a lo largo del tiempo de acuerdo con las necesidades individuales y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las formulaciones, y que los intervalos de concentración establecidos en este documento son solo un ejemplo y no pretenden limitar el alcance o la práctica de las formulaciones reivindicadas.

5 El FTI se puede suspender en forma micronizada u otra forma adecuada o se puede derivar para producir un producto activo más soluble o para producir un profármaco. La forma de la mezcla resultante depende de varios factores, incluido el modo de administración previsto y la solubilidad del compuesto en el portador o vehículo seleccionado. La concentración efectiva es suficiente para mejorar los síntomas de la afección y puede determinarse empíricamente.

De interés en este documento también son los polvos liofilizados, que pueden reconstituirse para su administración como soluciones, emulsiones y otras mezclas. También pueden reconstituirse y formularse como sólidos o geles.

10 Los polvos liofilizados y estériles se preparan disolviendo el FTI proporcionado en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en un disolvente adecuado. El disolvente puede contener un excipiente que mejore la estabilidad u otro componente farmacológico del polvo o solución reconstituida, preparada a partir del polvo. Los excipientes que pueden usarse incluyen, entre otros, dextrosa, sorbital, fructosa, jarabe de maíz, xilitol, glicerina, glucosa, sacarosa u otro agente adecuado. El disolvente también puede contener un tampón, tal como citrato, fosfato de sodio o potasio u otro tampón similar conocido por los expertos en la técnica, en una realización, a aproximadamente pH neutro. La posterior filtración estéril de la solución seguida de la liofilización en condiciones estándar conocidas por los expertos en la materia proporciona la formulación deseada. En general, la solución resultante se distribuirá en viales para la liofilización. Cada vial contendrá una dosis única (incluidas, entre otras, 10-1000 mg o 100-500 mg) o dosis múltiples del compuesto. El polvo liofilizado se puede almacenar en condiciones apropiadas, como a unos 4°C a temperatura ambiente.

20 La reconstitución de este polvo liofilizado con agua para inyección proporciona una formulación para su uso en administración parenteral. Para la reconstitución, se agregan aproximadamente 1-50 mg, aproximadamente 5-35 mg, o aproximadamente 9-30 mg de polvo liofilizado por ml de agua estéril u otro vehículo adecuado. La cantidad precisa depende del compuesto seleccionado. Tal cantidad puede ser determinada empíricamente.

25 Las mezclas tópicas se preparan como se describe para la administración local y sistémica. La mezcla resultante puede ser una solución, suspensión, emulsión o similar y se formulan como cremas, geles, pomadas, emulsiones, soluciones, elixires, lociones, suspensiones, tinturas, pastas, espumas, aerosoles, irrigaciones, aerosoles, supositorios, vendas, parches dérmicos o cualquier otra formulación adecuada para la administración tópica.

30 El FTI o la composición farmacéutica que tiene un FTI se puede formular como aerosoles para la aplicación tópica, tal como por inhalación (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nos. 4.044.126, 4.414.209 y 4.364.923, que describen aerosoles para la administración de un esteroide útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, particularmente asma). Estas formulaciones para su administración al tracto respiratorio pueden estar en la forma de un aerosol o solución para un nebulizador, o como un polvo microfino para la insuflación, solo o en combinación con un vehículo inerte como la lactosa. En tal caso, las partículas de la formulación tendrán diámetros de menos de 50 micrones o menos de 10 micrones.

35 El FTI o la composición farmacéutica que tiene un FTI se puede formular para una aplicación local o tópica, como para la aplicación tópica en la piel y las membranas mucosas, como en el ojo, en forma de geles, cremas y lociones, y para la aplicación en los ojos o para la aplicación intracisternal o intraespinal. Se contempla la administración tópica para administración transdérmica y también para la administración a los ojos o la mucosa, o para terapias de inhalación. También se pueden administrar soluciones nasales del compuesto activo solo o en combinación con otros excipientes farmacéuticamente aceptables. Estas soluciones, particularmente aquellas destinadas a un uso oftálmico, pueden formularse como soluciones isotónicas de 0,01%-10%, pH de aproximadamente 5-7, con las sales apropiadas.

45 Otras vías de administración, tales como los parches transdérmicos y la administración rectal también se contemplan en el presente documento. Por ejemplo, las formas de dosificación farmacéutica para la administración rectal son los supositorios rectales, las cápsulas y los comprimidos para el efecto sistémico. Los supositorios rectales se usan en la presente memoria como cuerpos sólidos para su inserción en el recto que los funde o ablanda a la temperatura corporal liberando uno o más ingredientes farmacológica o terapéuticamente activos. Las sustancias farmacéuticamente aceptables utilizadas en los supositorios rectales son bases o vehículos y agentes para elevar el punto de fusión. Los ejemplos de bases incluyen la manteca de cacao (aceite de teobroma), gelatina de glicerina, carboceras (polioxietilenglicol) y mezclas apropiadas de mono, di y triglicéridos de ácidos grasos. Se pueden usar combinaciones de las diversas bases. Los agentes para elevar el punto de fusión de los supositorios incluyen espermaceti y cera. Los supositorios rectales pueden prepararse por el método de compresión o por moldeo. Un peso ejemplar de un supositorio rectal es de aproximadamente 2 a 3 gramos. Los comprimidos y las cápsulas para la administración rectal se fabrican utilizando la misma sustancia farmacéuticamente aceptable y mediante los mismos métodos que para las formulaciones de administración oral.

55 El FTI o la composición farmacéutica que tiene el FTI proporcionado en el presente documento puede administrarse por medios de liberación controlada o por dispositivos de administración que son habituales para los expertos en la técnica. Los ejemplos incluyen, entre otros, los descritos en las Patentes de EE.UU. N° 3.845.770; 3.916.899; 3.536.809; 3.598.123; 4.008.719, 5.674.533, 5.059.595, 5.591.767, 5.120.548, 5.073.543, 5.639.476, 5.354.556, 5.639.480, 5.733.566, 5.739.108, 5.891.474, 5.922.356, 5.972.891, 5.980.945, 5.993.855, 6.045.830, 6.087.324,

6.113.943, 6.197.350, 6.248.363, 6.264.970, 6.267.981, 6.376.461, 6.419.961, 6.589.548, 6.613.358, 6.699.500 y 6.740.634. Dichas formas de dosificación pueden usarse para proporcionar una liberación lenta o controlada de FTI utilizando, por ejemplo, hidropropilmetilcelulosa, otras matrices de polímeros, geles, membranas permeables, sistemas osmóticos, recubrimientos multicapa, micropartículas, liposomas, microesferas, o una combinación de los mismos para proporcionar el perfil de liberación deseado en proporciones variables. Las formulaciones adecuadas de liberación controlada conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo las descritas en este documento, pueden seleccionarse fácilmente para su uso con los ingredientes activos proporcionados en este documento.

Todos los productos farmacéuticos de liberación controlada tienen el objetivo común de mejorar la terapia con medicamentos respecto a la lograda por sus contrapartes no controladas. En una realización, el uso de una preparación de liberación controlada de diseño óptimo en el tratamiento médico se caracteriza porque se emplea un mínimo de sustancia farmacéutica para curar o controlar la afección en un período mínimo de tiempo. En ciertas realizaciones, las ventajas de las formulaciones de liberación controlada incluyen una actividad ampliada del fármaco, una frecuencia de dosificación reducida y un mayor cumplimiento por parte del paciente. Además, las formulaciones de liberación controlada pueden usarse para afectar al momento de inicio de la acción u otras características, como los niveles en sangre del medicamento y, por lo tanto, pueden afectar a la aparición de efectos secundarios (por ejemplo, efectos adversos).

La mayoría de las formulaciones de liberación controlada están diseñadas para liberar inicialmente una cantidad de fármaco (ingrediente activo) que produce rápidamente el efecto terapéutico deseado, y libera gradual y continuamente otras cantidades de fármaco para mantener este nivel de efecto terapéutico durante un período prolongado de tiempo. Para mantener este nivel constante de fármaco en el cuerpo, el fármaco debe ser liberado de la forma de dosificación a una velocidad que reemplace la cantidad de fármaco que se metaboliza y se excreta del cuerpo. La liberación controlada de un ingrediente activo puede ser estimulada por varias condiciones que incluyen, entre otras, pH, temperatura, enzimas, agua u otras condiciones o compuestos fisiológicos.

El FTI se puede administrar mediante infusión intravenosa, una bomba osmótica implantable, un parche transdérmico, liposomas u otros modos de administración. En una realización, se puede usar una bomba (véase, Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald et al., Surgery 88: 507 (1980); Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)). En otra realización, se pueden usar materiales poliméricos. En otra realización más, se puede colocar un sistema de liberación controlada en la proximidad de la diana terapéutica, es decir, requiriendo así solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, Medical Applications of Controlled Release, volumen 2, pp. 115-138 (1984)).

En algunas realizaciones, se introduce un dispositivo de liberación controlada en un sujeto cerca del sitio de activación inmune inapropiada o en un tumor. Otros sistemas de liberación controlada se discuten en la revisión de Langer (Science 249: 1527-1533 (1990)). El FTI se puede dispersar en una matriz interna sólida, p. ej., poli (metacrilato de metilo), poli (metacrilato de butilo), poli (cloruro de vinilo) plastificado o no plastificado, nailon plastificado, polietilentereftalato plastificado, caucho natural, poliisopreno, poliisobutileno, polibutadieno, polietileno, copolímeros de etileno-vinilacetato, cauchos de silicona, polidimetilsiloxanos, copolímeros de carbonato de silicona, polímeros hidrófilos tales como hidrogeles de ésteres de ácido acrílico e metacrílico, colágeno, polivinilalcohol reticulado y acetato de polivinilo parcialmente hidrolizado reticulado, que está rodeado por una membrana polimérica externa, por ejemplo, polietileno, polipropileno, copolímeros de etileno/propileno, copolímeros de etileno/acrilato de etilo, copolímeros de etileno/acetato de vinilo, cauchos de silicona, siloxanos de polidimetilo, caucho de neopreno, polietileno clorado, policloruro de vinilo, copolímeros de cloruro de vinilo con acetato de vinilo, cloruro de vinilideno, etileno y propileno, ionómero tereftalato de polietileno, gomas de epichlorohidrina de caucho butilo, copolímero de etileno/alcohol de vinilo, terpolímero de etileno/acetato de vinilo/alcohol de vinilo y copolímero de etileno/viniloxietanol, que es insoluble en fluidos corporales. El ingrediente activo luego se difunde a través de la membrana polimérica externa en una etapa de control de la velocidad de liberación. El porcentaje de ingrediente activo contenido en tales composiciones parenterales es altamente dependiente de la naturaleza específica del mismo, así como de las necesidades del sujeto.

El FTI o la composición farmacéutica de FTI se pueden envasar como artículos de fabricación que contienen material de envasado, un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo que se proporciona en el presente documento, que se utiliza para el tratamiento, la prevención o mejora de uno o más síntomas o la progresión del cáncer, incluidos los cánceres hematológicos y tumores sólidos, y un marcador que indica que el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo se usa para el tratamiento, la prevención o mejora de uno o más síntomas o progresión del cáncer, incluidos los cánceres hematológicos y los tumores sólidos.

Los artículos de fabricación descritos en este documento contienen materiales de envasado. Los materiales de envasado para su uso en el envasado de productos farmacéuticos son conocidos por los expertos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nos. 5.323.907, 5.052.558 y 5.033.252. Los ejemplos de materiales de envasado farmacéuticos incluyen, entre otros, envases tipo blister, botellas, tubos, inhaladores, bombas, bolsas, viales, recipientes, jeringas, lápices, botellas y cualquier material de envasado adecuado para una formulación seleccionada y modo de administración previsto y tratamiento. Se contempla una amplia gama de formulaciones de los compuestos y composiciones proporcionadas en el presente documento.

2.3. Dosificaciones

La cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que tiene el FTI se administra por vía oral o parenteral. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que tiene tipifarnib como ingrediente activo y se administra por vía oral en una cantidad de 1 a 1500 mg/kg por día, ya sea como una dosis única o subdividida en más de una dosis o más particularmente en una cantidad de 10 a 1200 mg/kg diarios. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que tiene tipifarnib como ingrediente activo se administra por vía oral en una cantidad de 100 mg/kg diarios, 200 mg/kg diarios, 300 mg/kg diarios, 400 mg/kg diarios, 500 mg/kg diarios, 600 mg/kg diarios, 700 mg/kg diarios, 800 mg/kg diarios, 900 mg/kg diarios, 1000 mg/kg diarios, 1100 mg/kg diarios, o 1200 mg/kg diarios. En algunas realizaciones, el FTI es el tipifarnib.

De acuerdo con la invención, el FTI es el tipifarnib. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis de 200-1500 mg al día. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis de 200-1200 mg al día. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis de 200 mg al día. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis de 300 mg al día. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis de 400 mg al día. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis de 500 mg al día. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis de 600 mg al día. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis de 700 mg al día. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis de 800 mg al día. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis de 900 mg al día. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis de 1000 mg al día. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis de 1100 mg al día. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis de 1200 mg al día. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis de 1300 mg al día. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis de 1400 mg al día.

De acuerdo con la invención, el FTI es el tipifarnib. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis de 200-1400 mg b.i.d. (es decir, dos veces al día). En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis de 300-1200 mg b.i.d. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis de 300-900 mg b.i.d. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis de 600 mg b.i.d. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis de 700 mg b.i.d. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis de 800 mg b.i.d. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis de 900 mg b.i.d. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis de 1000 mg b.i.d. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis de 1100 mg b.i.d. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis de 1200 mg b.i.d.

De acuerdo con la invención, el FTI es el tipifarnib. Como entenderá cualquier experto en la materia, la dosis varía según la forma de dosificación empleada, el estado y la sensibilidad del paciente, la vía de administración y otros factores. La dosis exacta será determinada por el médico, a la luz de los factores relacionados con el sujeto que requiere tratamiento. La dosis y la administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes del ingrediente activo o para mantener el efecto deseado. Los factores que se pueden tener en cuenta incluyen la gravedad del estado de la enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el sexo del sujeto, la dieta, el tiempo y la frecuencia de administración, las combinaciones de medicamentos, las sensibilidades de reacción y la tolerancia/respuesta frente a la terapia. Durante un ciclo de tratamiento, la dosis diaria puede variar. En algunas realizaciones, la dosificación de inicio puede reducirse dentro del ciclo de tratamiento. En algunas realizaciones, la dosis inicial puede ajustarse dentro del ciclo de tratamiento. La dosis final puede depender de la aparición de toxicidad limitante de la dosis y otros factores. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis inicial de 300 mg diarios y se eleva a una dosis máxima de 400 mg, 500 mg, 600 mg, 700 mg, 800 mg, 900 mg, 1000 mg, 1100 mg o 1200 mg diaria. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis inicial de 400 mg diarios y se eleva a una dosis máxima de 500 mg, 600 mg, 700 mg, 800 mg, 900 mg, 1000 mg, 1100 mg o 1200 mg al día. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis inicial de 500 mg diarios y se eleva a una dosis máxima de 600 mg, 700 mg, 800 mg, 900 mg, 1000 mg, 1100 mg o 1200 mg al día. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis inicial de 600 mg diarios y se eleva a una dosis máxima de 700 mg, 800 mg, 900 mg, 1000 mg, 1100 mg o 1200 mg al día. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis inicial de 700 mg al día y se eleva a una dosis máxima de 800 mg, 900 mg, 1000 mg, 1100 mg o 1200 mg al día. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis inicial de 800 mg diarios y se eleva a una dosis máxima de 900 mg, 1000 mg, 1100 mg o 1200 mg diarios. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis inicial de 900 mg al día y se eleva a una dosis máxima de 1000 mg, 1100 mg o 1200 mg al día. El aumento de la dosis se puede hacer de una vez, o paso a paso. Por ejemplo, una dosis inicial de 600 mg diarios se puede aumentar a una dosis final de 1000 mg diarios al aumentar en 100 mg por día en el transcurso de 4 días, o al aumentar en 200 mg por día en el transcurso de 2 días o aumentando en 400 mg a la vez.

En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis inicial relativamente alta y se ajusta a una dosis más baja dependiendo de la respuesta del paciente y otros factores. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis inicial de 1200 mg al día y se reduce a una dosis final de 1100 mg, 1000 mg, 900 mg, 800 mg, 700 mg, 600 mg, 500 mg, 400 mg o 300 mg diario. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis inicial de 1100 mg diarios y se reduce a una dosis final de 1000 mg, 900 mg, 800 mg, 700 mg, 600 mg, 500 mg, 400 mg o 300 mg al día. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis inicial de 1000 mg diarios y se reduce a una dosis final de 900 mg, 800 mg, 700 mg, 600 mg, 500 mg, 400 mg o 300 mg al día. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis inicial de 900 mg al día y se reduce a una dosis final de 800 mg, 700 mg, 600 mg, 500 mg, 400 mg o 300 mg al día. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis inicial de 800 mg al día y se

reduce a una dosis final de 700 mg, 600 mg, 500 mg, 400 mg o 300 mg al día. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis inicial de 600 mg al día y se reduce a una dosis final de 500 mg, 400 mg o 300 mg al día. La reducción de la dosis puede hacerse de una vez, o paso a paso. En algunas realizaciones, el FTI es el tipifarnib. Por ejemplo, una dosis inicial de 900 mg diarios se puede reducir a una dosis final de 600 mg diarios al disminuir en 100 mg por día en el transcurso de 3 días, o al disminuir en 300 mg al mismo tiempo.

Un ciclo de tratamiento puede tener diferente duración. En algunas realizaciones, el ciclo de tratamiento puede ser una semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses o 12 meses. En algunas realizaciones, el ciclo de tratamiento es de 4 semanas. El ciclo de tratamiento puede tener un programa intermitente. En algunas realizaciones, el ciclo de tratamiento de 2 semanas puede tener una dosis de 5 días seguida de un descanso de 9 días. En algunas realizaciones, el ciclo de tratamiento de 2 semanas puede tener una dosis de 6 días seguida de un descanso de 8 días. En algunas realizaciones, el ciclo de tratamiento de 2 semanas puede tener una administración de 7 días seguida de un descanso de 7 días. En algunas realizaciones, el ciclo de tratamiento de 2 semanas puede tener una dosis de 8 días seguida de un descanso de 6 días. En algunas realizaciones, el ciclo de tratamiento de 2 semanas puede tener una dosis de 9 días seguida de un descanso de 5 días.

En algunas realizaciones, el FTI se administra diariamente en 3 de cada 4 semanas en ciclos repetidos de 4 semanas. En algunas realizaciones, el FTI se administra diariamente en semanas alternas (una semana sí, otra semana de descanso) en ciclos repetidos de 4 semanas. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis de 300 mg b.i.d. oralmente en 3 de cada 4 semanas en ciclos repetidos de 4 semanas. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis de 600 mg b.i.d. oralmente en 3 de cada 4 semanas en ciclos repetidos de 4 semanas. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis de 900 mg b.i.d. oralmente en semanas alternas (una semana sí, otra semana de descanso) en ciclos repetidos de 4 semanas. En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis de 1200 mg b.i.d. oralmente en semanas alternas (los días 1-7 y 15-21 de ciclos repetidos de 28 días). En algunas realizaciones, el FTI se administra a una dosis de 1200 mg b.i.d. oralmente durante los días 1-5 y 15-19 de los ciclos repetidos de 28 días.

En algunas realizaciones, se puede utilizar el régimen de semanas alternas de tipifarnib adoptado de 900 mg b.i.d. Bajo este régimen, los pacientes reciben una dosis inicial de 900 mg, po, b.i.d. en los días 1-7 y 15-21 de los ciclos de tratamiento de 28 días. En algunas realizaciones, los pacientes reciben dos ciclos de tratamiento. En algunas realizaciones, los pacientes reciben tres ciclos de tratamiento. En algunas realizaciones, los pacientes reciben cuatro ciclos de tratamiento. En algunas realizaciones, los pacientes reciben cinco ciclos de tratamiento. En algunas realizaciones, los pacientes reciben seis ciclos de tratamiento. En algunas realizaciones, los pacientes reciben siete ciclos de tratamiento. En algunas realizaciones, los pacientes reciben ocho ciclos de tratamiento. En algunas realizaciones, los pacientes reciben nueve ciclos de tratamiento. En algunas realizaciones, los pacientes reciben diez ciclos de tratamiento. En algunas realizaciones, los pacientes reciben once ciclos de tratamiento. En algunas realizaciones, los pacientes reciben doce ciclos de tratamiento. En algunas realizaciones, los pacientes reciben más de doce ciclos de tratamiento.

En ausencia de toxicidades inmanejables, los sujetos pueden continuar recibiendo el tratamiento con tipifarnib hasta por 12 meses. La dosis también se puede aumentar a 1200 mg b.i.d. si el sujeto está tolerando bien el tratamiento. También se pueden incluir reducciones de dosis por etapas de 300 mg para controlar las toxicidades emergentes del tratamiento relacionadas con el tratamiento.

En algunas otras realizaciones, el tipifarnib se administra por vía oral a una dosis de 300 mg b.i.d. diariamente durante 21 días, seguido de 1 semana de descanso, en ciclos de tratamiento de 28 días (programa de 21 días; Cheng D T, et al., *J Mol Diagn.* (2015) 17(3):251-64). En algunas realizaciones, se adopta una dosis de 5 días que varía de 25 a 1300 mg b.i.d. seguido de un descanso de 9 días (programa de 5 días; Zujewski J., *J Clin Oncol.*, (2000) febrero; 18 (4): 927-41). En algunas realizaciones, se adopta una dosis de b.i.d. de 7 días seguida de un descanso de 7 días (programa de 7 días; Lara PN Jr., *Anticancer Drugs.*, (2005) 16 (3): 317-21; Kirschbaum MR, *Leukemia.*, (2011) October; 25 (10): 1543-7). En el programa de 7 días, los pacientes pueden recibir una dosis inicial de 300 mg b.i.d. con 300 mg de dosis escalonadas hasta una dosis máxima planificada de 1800 mg b.i.d. En el estudio programado de 7 días, los pacientes también pueden recibir tipifarnib b.i.d. en los días 1 a 7 y en los días 15 a 21 de los ciclos de 28 días a una dosis de hasta 1600 mg b.i.d.

El FTI puede inhibir el crecimiento de tumores en mamíferos cuando se administra como un programa de administración dos veces al día. La administración de un FTI en una sola dosis diaria durante uno a cinco días puede producir una marcada supresión del crecimiento del tumor que dura hasta al menos 21 días. En algunas realizaciones, el FTI se administra en un intervalo de dosificación de 50-400 mg/kg. En algunas realizaciones, el FTI se administra a 200 mg/kg. El régimen de administración para FTI específicos también es conocido en la técnica (por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.838.467). Por ejemplo, administraciones adecuadas para los compuestos Arglabin (documento WO98/28303), alcohol perrílico (documento WO 99/45712), SCH-66336 (Patente de Estados Unidos N° 5.874.442), L778123 (documento WO 00/01691), 2(S)-[2(S)-[2(R)-amino-3-mercapto]propilamino-3(S)-metil]-pentiloxi-3-fenilpropionil-metionina sulfona (documento WO94/10138), BMS 214662 (documento WO 97/30992), AZD3409; los compuestos de Pfizer A y B (documentos WO 00/12499 y WO 00/12498)

se dan en las memorias descriptivas de las patentes mencionadas anteriormente conocidas o que pueden ser determinadas fácilmente por cualquier experto en la materia.

5 En relación con el alcohol perrílico, el medicamento puede administrarse de 1 a 4 g por día por paciente humano de 68,03 kg (150 libras). Preferiblemente, 1-2 g por día por paciente humano de 68,03 kg (150 libras). SCH-66336 puede administrarse típicamente en una dosis unitaria de aproximadamente 0,1 mg a 100 mg, más preferiblemente de aproximadamente 1 mg a 300 mg de acuerdo con la aplicación particular. Los compuestos L778123 y 1-(3-clorofenil)-4-[1-(4-cianobencil)-5-imidazolilmetil]-2-piperazinona pueden administrarse a un paciente humano en una cantidad entre aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal y aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal al día, preferiblemente entre 0,5 mg/kg de peso corporal y aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal al día.

10 Los compuestos A y B de Pfizer pueden administrarse en dosis que van desde aproximadamente 1,0 mg hasta aproximadamente 500 mg al día, preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg al día en dosis únicas o divididas (es decir, múltiples). Los compuestos terapéuticos normalmente se administrarán en dosis diarias que variarán entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 10 mg por kg de peso corporal al día, en dosis únicas o divididas. BMS 214662 se puede administrar en un intervalo de dosis de aproximadamente 0,05 a 200 mg/kg/día, preferiblemente menos de 100 mg/kg/día en una dosis única o en 2 a 4 dosis divididas.

2.4. Terapias combinadas

15 El tratamiento con FTI se puede administrar en combinación con radioterapia o terapia de radiación. La radioterapia incluye el uso de rayos γ , rayos X y/o la administración dirigida de radioisótopos a las células tumorales. También se contemplan otras formas de factores que dañan el ADN, como las microondas, la irradiación con haz de protones (Patentes de EE. UU. Números 5.760.395 y 4.870.287), e irradiación UV. Es muy probable que todos estos factores afecten a una amplia gama de daños en el ADN, en los precursores del ADN, en la replicación y reparación del ADN y en el ensamblaje y mantenimiento de los cromosomas.

20 Se puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica con un FTI que sensibilice eficazmente al tumor en el huésped frente al efecto de la irradiación. (Patente de Estados Unidos N° 6.545.020). La irradiación puede ser una radiación ionizante y, en particular, la radiación gamma. En algunas realizaciones, la radiación gamma es emitida por aceleradores lineales o por radionucleidos. La irradiación del tumor por radionucleidos puede ser externa o interna.

30 La irradiación también puede ser una radiación por rayos X. Los intervalos de dosis para los rayos X varían desde dosis diarias de 50 a 200 roentgens durante períodos prolongados de tiempo (3 a 4 semanas), hasta dosis únicas de 2000 a 6000 roentgens. Los intervalos de dosificación para los radioisótopos varían ampliamente y dependen de la vida media del isótopo, la fuerza y el tipo de radiación emitida y la absorción por las células neoplásicas.

35 En algunas realizaciones, la administración de la composición farmacéutica comienza y dura hasta un mes, en particular hasta 10 días o una semana, antes de la irradiación del tumor. Además, la irradiación del tumor se fracciona y la administración de la composición farmacéutica se mantiene en el intervalo entre la primera y la última sesión de irradiación.

La cantidad de FTI, la dosis de irradiación y la intermitencia de las dosis de irradiación dependerán de una serie de parámetros como el tipo de tumor, su ubicación, la reacción de los pacientes a la quimioterapia o radioterapia y, en última instancia, serán determinadas por el médico y los radiólogos en cada caso individual.

40 En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento incluyen además administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente activo o una terapia de atención de apoyo. El segundo agente activo puede ser un agente quimioterapéutico. Un agente o fármaco quimioterapéutico se puede clasificar por su modo de actividad dentro de una célula, por ejemplo, si afecta al ciclo celular y en qué etapa lo hace. Alternativamente, el agente puede caracterizarse en función de su capacidad para reticular directamente el ADN, intercalarse en el ADN o para inducir aberraciones cromosómicas y mitóticas al afectar a la síntesis de ácidos nucleicos.

45 Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclosfosfamida; sulfonatos de alquilo, tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilaminaminas, que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilfosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacin y bulatacinona); una camptotecina (incluido el topotecán análogo sintético); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluidos sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluidos los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobin; pancratistatina; una sarcodictina; espongiatina; mostazas nitrogenadas, tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida y mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos, como los antibióticos enedina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma 1I y caliqueamicina omega 1I); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bifosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como el cromóforo

neocarzinostatina y los cromóforos anibióticos de enedina relacionados con la cromoproteína, aclacinomisinas, actinomicina, autranicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo morfolin-doxorubicina, cianomorfolin-doxorubicina, 2-pirrolin-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, 5
 10
 15
 20
 25

Los segundos agentes activos pueden ser moléculas grandes (por ejemplo, proteínas) o moléculas pequeñas (por ejemplo, moléculas sintéticas inorgánicas, organometálicas u orgánicas). En algunas realizaciones, el segundo agente activo es un agente hipometilante de ADN, un anticuerpo terapéutico que se une específicamente a un antígeno canceroso, un factor de crecimiento hematopoyético, citocina, agente anticanceroso, antibiótico, inhibidor de cox-2, agente inmunomodulador, globulina anti-timocitos, agente inmunosupresor, corticosteroides o un mutante farmacológicamente activo o un derivado de estos.

En algunas realizaciones, el segundo agente activo es un agente hipometilante de ADN, tal como un análogo de citidina (por ejemplo, azacitidina) o una 5-azadesoxicitidina (por ejemplo, decitabina). En algunas realizaciones, el segundo agente activo es un agente citorreductor, que incluye, entre otros, inducción, topotecán, Hydrea, PO etopósido, lenalidomida, LDAC y tioguanina. En algunas realizaciones, el segundo agente activo es mitoxantrona, etopósido, citarabina o valspodar. En algunas realizaciones, el segundo agente activo es la Mitoxantrona más Valspodar, Etopósido más Valspodar, o Citarabina más Valspodar. En algunas realizaciones, el segundo agente activo es idarubicina, fludarabina, topotecán o ara-C. En algunas otras realizaciones, el segundo agente activo es idarubicina más ara-C, fludarabina más ara-C, mitoxantrona más ara-C o topotecán más ara-C. En algunas realizaciones, el segundo agente activo es una quinina. Se pueden usar otras combinaciones de los agentes especificados anteriormente, y las dosis pueden ser determinadas por el médico.

Para cualquier tipo de cáncer específico descrito en este documento, se pueden usar los tratamientos que se describen en este documento o que están, de otra manera, disponibles en la técnica en combinación con el tratamiento con FTI. Por ejemplo, los medicamentos que se pueden usar en combinación con el FTI incluyen belinostat (Beleodaq®) y pralatrexato (Folotyn®), comercializados por Spectrum Pharmaceuticals, romidepsin (Istodax®), comercializado por Celgene, y brentuximab vedotin (Adcetris®) (para ALCL), comercializado por Seattle Genetics; los medicamentos que se pueden usar en combinación con el FTI incluyen azacitidina (Vidaza®) y lenalidomida (Revlimid®), comercializado por Celgene, y decitabina (Dacogen®) comercializado por Otsuka y Johnson & Johnson; los medicamentos que se pueden usar en combinación con el FTI para el cáncer de tiroides incluyen vandetanib de AstraZeneca (Caprelsa®), sorafenib de Bayer (Nexavar®), cabozantinib de Exelixis (Cometriq®) y lenvatinib de Eisai (Lenvima®).

También pueden usarse en combinación con el tratamiento con FTI terapias no citotóxicas como el pralatrexato (Folotyn®), romidepsin (Istodax®) y belinostat (Beleodaq®).

En algunas realizaciones, el segundo agente activo es un agente inmunoterapéutico. En algunas realizaciones, el segundo agente activo es un anticuerpo anti-PD1 o un anticuerpo anti-PDL1.

Se contempla que el segundo agente activo o la segunda terapia usada en combinación con el FTI se puede administrar antes, al mismo tiempo o después del tratamiento con FTI. El segundo agente activo o la segunda terapia usada en combinación con el FTI puede administrarse antes del tratamiento con FTI. El segundo agente activo o la segunda terapia usada en combinación con el FTI puede administrarse al mismo tiempo que el

tratamiento con FTI. El segundo agente activo o la segunda terapia usada en combinación con el FTI puede administrarse después del tratamiento con FTI.

El tratamiento con FTI también se puede administrar en combinación con un trasplante de médula ósea. El FTI se puede administrar antes del trasplante de médula ósea. El FTI también se puede administrar después del trasplante de médula ósea.

3. Genes inmunológicos como biomarcadores para el tratamiento con FTI

En el presente documento se describen métodos de selección de pacientes con cáncer para el tratamiento con un inhibidor de la farnesiltransferasa (FTI). Los métodos descritos en este documento se basan, en parte, en el descubrimiento de que los genotipos y los niveles de expresión de ciertos genes que están asociados con las actividades de las células asesinas naturales (células NK) están correlacionados con el beneficio clínico de un tratamiento con FTI. Específicamente, el genotipado de los genes KIR y HLA y los niveles de expresión de los biomarcadores, incluidos KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 y GZMM, se pueden usar para predecir la capacidad de respuesta de un paciente con cáncer frente a un tratamiento con FTI. Como se describe en este documento, además de los niveles de expresión de los biomarcadores individuales, la relación relativa de los niveles de expresión entre ciertos biomarcadores, por ejemplo, la relación del nivel de expresión de KIR2DS2 frente a la de KIR2DL2, o la relación del nivel de expresión de KIR2DS5 respecto al de KIR2DL5, también se puede usar para predecir la capacidad de respuesta de un paciente con cáncer frente a un tratamiento con FTI. Por consiguiente, en este documento se describen métodos para predecir la capacidad de respuesta de un paciente con cáncer frente a un tratamiento con FTI, métodos para la selección de la población de pacientes con cáncer para un tratamiento con FTI y métodos para tratar el cáncer en un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI, basada en el genotipo o los niveles de expresión de estos biomarcadores en una muestra del paciente. En el presente documento también se describen composiciones y kits para predecir la capacidad de respuesta de un paciente con cáncer frente a un tratamiento con FTI.

La farnesiltransferasa (FTasa) desempeña funciones cruciales en las modificaciones postraduccionales de las proteínas Ras. Las FTI son una clase de medicamentos contra el cáncer biológicamente activos que inhiben la farnesilación de una amplia gama de proteínas diana, incluida la Ras. Las proteínas Ras desempeñan un papel fundamental en la transducción de señales del crecimiento celular: estimulantes, y la mutación del gen ras conduce a la activación constante de la proteína, lo que finalmente produce una proliferación celular descontrolada. La alta prevalencia de genes ras mutados, que se encuentran en el 30% de todos los cánceres humanos, hace de esta vía un objetivo atractivo para el desarrollo de fármacos contra el cáncer. Una forma de interferir con la función de Ras es la inhibición de la FTasa, la enzima que enlaza un grupo isoprenilo de 15 carbonos a las proteínas Ras, mediante los FTI. Los FTI bloquean la activación de Ras a través de la inhibición de FTasa, lo que finalmente resulta en la detención del crecimiento celular. Por lo tanto, se ha predicho que los FTI serían agentes terapéuticos eficaces en el tratamiento del cáncer.

Sin embargo, no se ha demostrado ninguna correlación entre las mutaciones de ras y la respuesta frente a los FTI en estudios clínicos anteriores (Karp et al. *Blood* 97: 3361-3369 (2001) y la publicación de patente de EE. UU. 20070048782)). Si bien varios estudios clínicos iniciales se enfocaron en los cánceres que exhibieron altas frecuencias de mutaciones de ras, la tasa de respuesta fue decepcionantemente baja en esos ensayos. (Mesa *Lancet Oncol* 6: 279-286 (2006); Rao et al. *J Clin Oncol* 22: 3950-3957 (2004)).

Los primeros estudios de tipifarnib, un FTI, se realizaron en pacientes con un riesgo bajo y con AML no tratada previamente (CTEP-20 fase II), y pacientes con AML en recaída/refractaria (INT-17 Fase II). Un estudio en fase III de tipifarnib versus el mejor tratamiento complementario (BSC) no pudo demostrar una mejoría en la supervivencia general. Múltiples genes/proteínas se han asociado en la bibliografía con la actividad de FTI (AKAP13, mDIA, etc.) (Raponi et al. *Clin Cancer Res.* 13:2254-60 (2007); Kamasani et al. *Cancer Biology & Therapy*, 6: 1418-1423 (2007)), y los análisis de perfiles de expresión génica en muestras de médula ósea de 2 estudios de AML (CTEP-20, INT-17) identificaron la proporción de la expresión de 2 genes: RASGRP1 (transductor de la señal de las células T) y APTX (proteína reparadora del ADN) como un biomarcador potencial de la actividad de tipifarnib en la AML (Raponi et al. *Blood*. 111:2589-96(2008)). Sin embargo, un estudio prospectivo posterior que utilizó la proporción de 2 genes en los blastos de médula ósea como criterio de inclusión no demostró ningún beneficio clínico significativo del tipifarnib en la AML (*Lancet et al. Blood (ASH)* 120: Abstract 1508 (2012)).

Se describen en este documento múltiples genes inmunológicos como biomarcadores asociados con un mejor pronóstico para un tratamiento con FTI, y en el presente documento se describen nuevos métodos para la selección de pacientes para el tratamiento con FTI. A diferencia de los marcadores previamente identificados, tales como el RASGRP1, que se encontró que estaba asociado con un buen pronóstico no solo en el tratamiento con FTI, sino también en otros tipos de quimioterapia estándar, los biomarcadores relacionados con la inmunidad identificados en la presente invención se asocian específicamente con el beneficio clínico de un tratamiento con FTI, pero no son agentes de otras quimioterapias estándar.

Los biomarcadores como se identifican en este documento incluyen KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5, GZMM, así como el ligando específico para KIR2DS2, HLA-C2. Los portadores de KIR2DS2 y HLA-C2 mostraron

estar predispuestos a MDS. (Serio et al., Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2006 108: Resumen 2670; Cook et al., Blood 2004; 103: 1521-152). Los biomarcadores inmunológicos identificados en la presente invención son todos genes relacionados con las células NK. El descubrimiento de que un FTI, tal como el tipifarnib, reconoce selectivamente a los cánceres con los genotipos KIR específicos o los perfiles de expresión descritos en este documento, puede basarse, al menos en parte, en el mecanismo que ciertas células NK con los genotipos KIR específicos o perfiles de expresión pueden inducir autoinmunidad. Tales células NK también pueden regular negativamente la presentación de antígenos, matar o regular a la baja ciertos subtipos de células T. A través de la inhibición de la señalización KIR-RAS, los FTI pueden modular o inhibir la actividad de las células NK, facilitar la citotoxicidad hacia las células cancerosas mediante la modulación del propio sistema inmunológico del paciente. Además, a través de la inhibición de la señalización KIR-RAS, los FTI pueden modular o inhibir la actividad de las células NK y otras células inmunitarias contra las células hematológicas normales y sus precursores, reduciendo o eliminando la necesidad de transfusión de glóbulos rojos o plaquetas, o la administración del factor de crecimiento hematológico.

3.1. Genotipado de KIR y genotipado de HLA

Como se describe en el presente documento, el genotipo de los genes KIR y los genes HLA de un sujeto puede ser indicativo de la probabilidad de que el sujeto responda a un tratamiento con FTI. Un paciente de cáncer, que es portador de KIR2DS2, KIR2DS5 o HLA-C2, es probable que responda a algún tratamiento con FTI. En consecuencia, los pacientes con cáncer de tipo KIR, y el tratamiento selectivo de aquellos que son portadores de KIR2DS2 o KIR2DS5, pueden aumentar la tasa de respuesta general de los pacientes con cáncer respecto a un tratamiento con FTI. Además, el genotipado de HLA de pacientes con cáncer y el tratamiento selectivo de aquellos que son portadores de HLA-C2 puede aumentar aún más la tasa de respuesta general de los pacientes con cáncer respecto a un tratamiento con FTI.

En algunos ejemplos, se describe en este documento un FTI para usar en métodos para tratar el cáncer en un sujeto administrando una cantidad terapéuticamente eficaz del FTI al sujeto, en donde el sujeto es un portador de KIR2DS2 o KIR2DS5. En algunos ejemplos, se describe en este documento un FTI para usar en un método para tratar el cáncer en un sujeto mediante el genotipado de KIR del sujeto, y la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del FTI al sujeto, en donde el sujeto es un portador de KIR2DS2 o KIR2DS5. En algunos ejemplos, el sujeto es un portador de KIR2DS2. En algunos ejemplos, el sujeto es un portador de KIR2DS5. En algunos ejemplos, el sujeto es un portador de KIR2DS2 y KIR2DS5. En algunos ejemplos, el sujeto tampoco es un portador de KIR2DL2. En algunos ejemplos, el sujeto tampoco es un portador de KIR2DL5. En algunos ejemplos, el sujeto es un portador de KIR2DS2, pero no un portador de KIR2DL2. En algunos otros ejemplos, el sujeto es un portador de KIR2DS5, pero no un portador de KIR2DL5.

En algunos ejemplos, los métodos para tratar el cáncer en un sujeto tal como se describe en el presente documento incluyen además el genotipado de HLA al sujeto, y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un FTI al sujeto que es un portador de HLA-C2. En algunos ejemplos, el sujeto es un portador tanto de KIR2DS2 como de HLA-C2. En algunos ejemplos, el sujeto es un portador tanto de KIR2DS5 como de HLA-C2. En algunos ejemplos, el sujeto es un portador de KIR2DS2, KIR2DS5 y HLA-C2. En algunos ejemplos, el sujeto, que es portador de HLA-C2, es homocigoto HLA-C2/HLA-C2. En algunos ejemplos, el sujeto es heterocigoto HLA-C1/HLA-C2.

En algunos ejemplos, en este documento se describe un método para seleccionar un paciente con cáncer para un tratamiento con FTI mediante el genotipado de KIR, en el que se selecciona a un paciente con cáncer para el tratamiento con FTI si el paciente con cáncer es un portador de KIR2DS2 o KIR2DS5. En algunos ejemplos, en este documento se describe un método para predecir la probabilidad de que un paciente con cáncer responda a un tratamiento con FTI mediante el genotipado de KIR, y determinar que el paciente con cáncer probablemente responda a un tratamiento con FTI si el paciente con cáncer es un portador de KIR2DS2 o KIR2DS5. En algunos ejemplos, el método incluye además administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un FTI al paciente con cáncer. En algunos ejemplos, el sujeto es un portador de KIR2DS2. En algunos ejemplos, el sujeto es un portador de KIR2DS5. En algunos ejemplos, el sujeto es un portador de KIR2DS2 y KIR2DS5. En algunos ejemplos, el sujeto tampoco es portador de KIR2DL2. En algunos ejemplos, el sujeto tampoco es portador de KIR2DL5. En algunos ejemplos, el sujeto es un portador de KIR2DS2, pero no un portador de KIR2DL2. En algunos otros ejemplos, el sujeto es un portador de KIR2DS5, pero no un portador de KIR2DL5.

En algunos ejemplos, los métodos para seleccionar a un paciente con cáncer para un tratamiento con FTI o predecir la probabilidad de que un paciente con cáncer responda a un tratamiento con FTI como se describe en el presente documento incluyen además el genotipado de HLA al sujeto, y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un FTI al sujeto que es un portador de HLA-C2. En algunos ejemplos, el sujeto es un portador tanto de KIR2DS2 como de HLA-C2. En algunos ejemplos, el sujeto es un portador tanto de KIR2DS5 como de HLA-C2. En algunos ejemplos, el sujeto es un portador de KIR2DS2, KIR2DS5 y HLA-C2. En algunos ejemplos, el sujeto, que es portador de HLA-C2, es el homocigoto HLA-C2/HLA-C2. En algunos ejemplos, el sujeto es el heterocigoto HLA-C1/HLA-C2.

Los métodos de genotipado de KIR son habituales en la técnica. Los métodos ejemplares del genotipado de KIR se describen en los documentos WO 2012047985; Lebedeva et al., Hum Immun., 68(9): 789-96 (2007); Gonzalez et al., Hum Immun., 70 (10): 858-63 (2009); Yun et al., Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 106: Resumen 1407 (2005)

(Véase también Yun et al., *Clin Immunol.* 123(3):272-280 (2007)); Leung et al., *J Immunol.* 174:6540-6545 (2005); Dinauer et al., US 2008/0280289 (Ver también las partes seleccionadas del documento WO 2005/046459; y KIR Genotyping Product Brochure 2004); Chen et al., documento WO 2009/051672. Ver también el documento PCT/US2008/011671; Trachtenberg et al., Publicación de Solicitud de Patente No. US 2008/0213787 (Véase también el documento WO 2007/041067); Houtchens et al., *Immunogenetics.* 59(7):525-37 (2007); Gomez-Lozano et al., *Tissue Antigens* 59 (3): 184-193 (2002); y Shilling et al., *J Immunol.* 168:2307-2315 (2002); Patentes de EE.UU. Nos. 6.723.564, 6.111.251, 6.104.028, 6.558.902, 6.706.530, 6.423.966, 5.777.324, 6.569.385, 6.500.621, 6.300.076 y 6.258.538; Uhrberg et al., *Immunity* 7: 753-763 (1997); Gomez-Lozano et al., *Tissue Antigens* 59: 184-193 (2002); Cook et al., *Hum. Immunology* 64: 567-571 (2003); Crum et al., *Tissue Antigens* 56: 313-326 (2000); Middleton et al., *Transplant immunology* 10: 147-164 (2002); Ross et al., *Nature Biotech.*, 16: 1347-1351 (1998); Fei et al., *Rapid Comm. Mass. Spec.*, 14: 950-959 (2000); Fei et al., *NAR* 26 (11): 2827-2828 (1998); Amexis et al., *PNAS* 98 (21) 12097-12102 (2001); Li et al., *Electrophoresis* 20: 1258-1265 (1999); Buetow et al., *PNAS* 98 (2) 581-584 (2001); Storm et al., *Methods in Mol. Biol.*, 212: 241-262 (2003); Parham, *Immunology Lett.* 92: 11-13 (2004); y el ensayo MassARRAY™ Homogeneous Mass EXTEND™ (hME), Sequenom®, Application Notes, Boletín N°. 1021.

Además, algunos de los kits de genotipado KIR disponibles incluyen Inno-Train, Folleto del producto "KIR-Ready Gene", septiembre de 2005; Miltenyi Biotec, Folleto del producto "KIR Typing Kit" 2009; Invitrogen, "KIR Genotyping SSP Kit", folleto del producto, noviembre de 2006; y Tepnel Lifecodes, Folleto del producto "KIR Genotyping" de junio de 2005.

Los métodos proporcionados en el presente documento pueden realizarse mediante cualquier método descrito en el presente documento o conocido de otro modo en la técnica. En algunos ejemplos, se describe en este documento un FTI para usar en un método para tratar el cáncer en un sujeto con el FTI mediante el genotipado KIR, o la selección de un paciente con cáncer para un tratamiento con FTI mediante el genotipado KIR, en donde el genotipado KIR se realiza mediante secuenciación, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Micromatriz de ADN, ensayo de espectrometría de masas (MS), polimorfismo de nucleótido único (SNP), ensayo de inmunotransferencia o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). En algunos ejemplos, el genotipado KIR se realiza mediante micromatrices de ADN. En algunos ejemplos, el genotipado KIR se realiza mediante ELISA. En algunos ejemplos, el genotipado KIR se realiza mediante secuenciación. En algunos ejemplos, el genotipado KIR se realiza mediante la secuenciación de la próxima generación (NGS).

En algunos ejemplos, el genotipado KIR se puede realizar por PCR. En algunos ejemplos, el genotipado KIR se puede realizar por PCR usando un cebador específico de secuencia (SSP). En algunos ejemplos, los SSP incluyen aquellos que son específicos para amplificar KIR2DL2, KIR2DL5, KIR2DS2, KIR2DS5, o cualquier combinación de los mismos. En algunos ejemplos, el genotipado KIR se puede realizar por PCR usando una sonda oligonucleotídica específica de secuencia (SSOP). En algunos ejemplos, el genotipado KIR se puede realizar por PCR usando tipificación basada en secuencia (SBT). En algunos ejemplos, el genotipado KIR se puede realizar mediante micromatrices de ADN. En algunos ejemplos, el genotipado KIR puede realizarse por MS. En algunos ejemplos, el genotipado KIR se puede realizar mediante espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI-TOF). Como entenderá cualquier experto en la materia, el genotipado KIR puede realizarse mediante cualquier método descrito en el presente documento o conocido de otro modo en la técnica.

Los métodos para el genotipado de HLA son habituales en la técnica. Inicialmente, el método de tipificación de ADN más ampliamente empleado para la identificación de estos alelos ha sido el análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). Además del polimorfismo de longitud del fragmento de restricción (PCR-RFLP), otro enfoque ha sido la hibridación de productos amplificados por PCR con sondas de oligonucleótidos específicas de secuencia (PCR-SSO) para distinguir entre alelos HLA (véase, Tiercy et al., (1990) *Blood Review* 4: 9-15). Este método requiere que se produzca un producto de PCR del locus HLA de interés y luego se puntee en membranas o tiras de nitrocelulosa. Luego, cada membrana se hibrida con una sonda específica de secuencia, se lava y luego se analiza mediante exposición a una película de rayos X o mediante un ensayo colorimétrico, según el método de detección. De manera similar a la metodología de PCR-SSP, las sondas se realizan en el área polimórfica alélica responsable de los diferentes alelos HLA. Cada muestra debe ser hibridada y sondada al menos 100-200 veces diferentes para una tipificación completa de Clase I y II. Los métodos de hibridación y detección para el genotipado de PCR-SSO incluyen el uso de sondas marcadas no radiactivas, formatos de microplacas, etc. (véase, por ejemplo, Saiki et al. (1989) *Proc. Natl Acad. Sci., U.S.A.* 86: 6230-6234; Erlich et al. (1991) *Eur. J. Immunogenet.* 18(1-2): 33-55; Kawasaki et al. (1993) *Methods Enzymol.* 218: 369-381).

Se ha descrito un método de genotipado molecular que utiliza la amplificación de cebadores específicos de secuencia (PCR-SSP) (véase, Olerup y Zetterquist (1992) *Tissue Antigens* 39: 225-235). Este método de PCR-SSP es simple, útil y rápido, ya que el paso de detección es mucho más simple. En PCR-SSP, los cebadores específicos de secuencia alélica amplifican solo el alelo de la plantilla complementaria, lo que permite detectar la variabilidad genética con un alto grado de resolución. Este método permite la determinación del tipo de HLA simplemente por la presencia o ausencia de productos de amplificación (llamados colectivamente "amplificón") después de la PCR. En PCR-SSP, la detección de los productos de amplificación se realiza generalmente mediante electroforesis en gel de agarosa, seguida de tinción con bromuro de etidio (EtBr) del gel.

Otro método de genotipado de HLA es el SSCP: polimorfismo conformacional de cadena simple. Brevemente, los productos de la PCR monocatenarios de los diferentes loci HLA se someten a electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturante (PAGE). Las hebras individuales migrarán a una ubicación única en función de su composición de pares base. En comparación con los estándares conocidos, se puede deducir un genotipado. Se puede utilizar para determinar la verdadera homocigosidad.

También se puede utilizar en los métodos proporcionados en el presente documento otros métodos del genotipado de HLA, que incluyen, entre otros, la secuenciación, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la micromatriz de ADN, la espectrometría de masas (MS), el ensayo de polimorfismo de nucleótido único (SNP), el ensayo de inmunotransferencia o el ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA). En algunas realizaciones, la secuenciación puede ser NGS. Otros métodos se han descrito en la Patente de EE.UU. N° 6.670.124, Patente de EE.UU. No. 5.468.611, Patente de EE.UU. N° 8.435.740, Patente de EE.UU. N° 8.771.951 y US 20130267613. Otros métodos diferentes para el genotipado de HLA conocidos en la técnica también se pueden usar en los métodos descritos en este documento.

Por ejemplo, el ensayo de polimorfismo de nucleótido único (SNP) se puede utilizar para el genotipado de HLA. El ensayo SNP puede genotipar diferentes HLA según el polimorfismo en la posición 77 en HLA-C y en la posición 83 en HLA-B y -A. El ensayo SNP se puede realizar en el HT7900 de Applied Biosystems, siguiendo el protocolo de ensayo de discriminación alélica proporcionado por el fabricante. Los cebadores para el ensayo se diseñaron de tal manera que amplificaron todos los alelos de un tipo de HLA particular (como HLA-C), así como el amplicón que contenía la región polimórfica de interés. Dos sondas fueron diseñadas con una sola falta de coincidencia entre ellas. Cada sonda se unió a un solo grupo de alelos y se marcó con colorante fluorescente 6FAM o VIC en su extremo 5'. Las sondas también contenían aglutinante de surco menor Taqman® (MGB) con inactivador no fluorescente (NFQ) (Applied Biosystems). Para HLA-C, el cebador directo puede ser 5'-TTGGGACCGGGAGACACAG-3' y el cebador inverso puede ser 5'-CGATGTAATCCTTGCCGTC-3'. Las sondas utilizadas para HLA-C1 y HLA-C2 pueden ser 6FAM-CCGAGTGAG CCTGC-MGBNFQ y VIC-CCGAGTGAA CCTGC-MGBNFQ, respectivamente. Cada mezcla de reacción del ensayo puede contener una concentración de sonda de 250 nM y 20 ng de ADN genómico en la mezcla maestra del genotipado Taqman 1x de Applied Biosystems (EE. UU.).

En algunos ejemplos, el genotipado KIR o el genotipado HLA se realizan como un diagnóstico complementario al tratamiento con FTI. El diagnóstico complementario se puede realizar en la clínica donde se trata al sujeto. El diagnóstico complementario también se puede realizar en un sitio distinto al de la clínica donde se trata al sujeto.

En algunos ejemplos, los métodos del genotipado de KIR o genotipado HLA incluyen obtener una muestra de un sujeto. El sujeto puede ser un paciente con cáncer. La muestra puede ser una muestra de sangre completa, una muestra de médula ósea, una muestra de sangre parcialmente purificada, PBMC o biopsia de tejido. En algunos ejemplos, la muestra es una muestra de médula ósea de un paciente con cáncer. En algunos ejemplos, la muestra son PBMC de un paciente con cáncer. En algunos ejemplos, la muestra son células NK enriquecidas. Las células NK pueden enriquecerse a partir de la médula ósea, sangre completa o sangre parcialmente purificada de un paciente con cáncer. En algunos ejemplos, las células NK se expanden adicionalmente in vitro antes del genotipado de KIR.

3.2. Expresión de KIR y expresión de GZMM

Tal como se describe en el presente documento, el nivel de expresión de un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 y GZMM en una muestra de un sujeto puede ser indicativo de la probabilidad de que el sujeto responda a un tratamiento con FTI. Un paciente con cáncer cuyo nivel de expresión de KIR2DS2 es más alto que un nivel de expresión de referencia de KIR2DS2 es probable que responda a un tratamiento con FTI. Un paciente con cáncer cuyo nivel de expresión de KIR2DS5 es más alto que un nivel de expresión de referencia de KIR2DS5 es probable que responda a un tratamiento con FTI. Un paciente con cáncer cuyo nivel de expresión de GZMM es más alto que un nivel de expresión de referencia de GZMM es probable que responda a un tratamiento con FTI. Un paciente con cáncer cuyo nivel de expresión de KIR2DL2 es inferior al nivel de expresión de referencia de KIR2DL2 es probable que responda a un tratamiento con FTI. Un paciente con cáncer cuyo nivel de expresión de KIR2DL5 es más bajo que un nivel de expresión de referencia de KIR2DL5 es probable que responda a un tratamiento con FTI. En consecuencia, la detección del nivel de expresión de uno o más de estos biomarcadores en pacientes con cáncer y el tratamiento selectivo de los pacientes con cáncer que cumplen con una o más de las condiciones descritas anteriormente, puede aumentar la tasa de respuesta general de los pacientes con cáncer respecto a un tratamiento con FTI.

En algunos ejemplos, el nivel de expresión de KIR2DL5 es el nivel de expresión total de KIR2DL5A y KIR2DL5B. En algunos ejemplos, el nivel de expresión de KIR2DL5 es el nivel de expresión de KIR2DL5A. En algunos ejemplos, el nivel de expresión de KIR2DL5 es el nivel de expresión de KIR2DL5B.

Además, en el presente documento se describen métodos para utilizar la proporción de niveles de expresión de ciertos biomarcadores para predecir la probabilidad de que un sujeto responda a un tratamiento con FTI. Por ejemplo, una alta relación entre el nivel de expresión de KIR2DS2 y el nivel de expresión de KIR2DL2 (la "relación

- 2DS2/2DL2") puede indicar que el sujeto probablemente está respondiendo a un tratamiento de FTI. De manera similar, una alta proporción del nivel de expresión de KIR2DS5 respecto al nivel de expresión de KIR2DL5 (la "relación 2DS5/2DL5") puede indicar que el sujeto es probable que responda a un tratamiento con FTI. En consecuencia, la detección del nivel de expresión de estos biomarcadores en pacientes con cáncer y el tratamiento selectivo de los pacientes con cáncer cuya relación 2DS2/2DL2 es más alta que una relación de referencia, o cuya relación 2DS5/2DL5 es más alta que una relación de referencia, o ambas, puede aumentar la tasa de respuesta global de pacientes con cáncer respecto al tratamiento con FTI.
- 5 En algunos ejemplos, se describe en este documento un FTI para usar en un método para tratar el cáncer en un sujeto administrando una cantidad terapéuticamente eficaz del FTI al sujeto, en el que:
- 10 (i) el nivel de expresión de KIR2DS2 en una muestra del sujeto es más alto que el nivel de expresión de referencia de KIR2DS2;
- (ii) el nivel de expresión de KIR2DL2 en una muestra del sujeto es inferior al nivel de expresión de referencia de KIR2DL2;
- 15 (iii) el nivel de expresión de KIR2DS5 en una muestra del sujeto es más alto que el nivel de expresión de referencia de KIR2DS5;
- (iv) el nivel de expresión de KIR2DL5 en una muestra del sujeto es inferior al nivel de expresión de referencia de KIR2DL5; o
- (v) el nivel de expresión de GZMM en una muestra del sujeto es más alto que un nivel de expresión de referencia de GZMM; o cualquier combinación de los mismos.
- 20 En algunos ejemplos, se describe en este documento un FTI para usar en un método para tratar el cáncer en un sujeto mediante:
- (a) la determinación del nivel de expresión de un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 y GZMM en una muestra del sujeto, en donde:
- 25 (i) el nivel de expresión de KIR2DS2 en la muestra es más alto que un nivel de expresión de referencia de KIR2DS2;
- (ii) el nivel de expresión de KIR2DL2 en la muestra es inferior al nivel de expresión de referencia de KIR2DL2;
- (iii) el nivel de expresión de KIR2DS5 en la muestra es más alto que un nivel de expresión de referencia de KIR2DS5;
- 30 (iv) el nivel de expresión de KIR2DL5 en la muestra es inferior al nivel de expresión de referencia de KIR2DL5; o
- (v) el nivel de expresión de GZMM en la muestra es más alto que un nivel de expresión de referencia de GZMM; y
- (b) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del FTI al sujeto.
- 35 En algunos ejemplos, se describe en este documento un FTI para usar en un método para seleccionar un paciente con cáncer para el tratamiento con FTI mediante la determinación del nivel de expresión de un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 y GZMM en una muestra de un paciente con cáncer, en el que el paciente con cáncer se selecciona para el tratamiento con FTI si:
- 40 (i) el nivel de expresión de KIR2DS2 en una muestra del sujeto es más alto que el nivel de expresión de referencia de KIR2DS2;
- (ii) el nivel de expresión de KIR2DL2 en una muestra del sujeto es inferior al nivel de expresión de referencia de KIR2DL2;
- (iii) el nivel de expresión de KIR2DS5 en una muestra del sujeto es más alto que el nivel de expresión de referencia de KIR2DS5;
- 45 (iv) el nivel de expresión de KIR2DL5 en una muestra del sujeto es inferior al nivel de expresión de referencia de KIR2DL5; o
- (v) el nivel de expresión de GZMM en una muestra del sujeto es más alto que un nivel de expresión de referencia de GZMM; o cualquier combinación de los mismos.

En algunos ejemplos, los métodos descritos en este documento incluyen tratar a un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un FTI o seleccionar a un paciente con cáncer para un tratamiento con FTI, en el que se cumple una de las cinco condiciones:

- 5 (i) el nivel de expresión de KIR2DS2 en la muestra del paciente con cáncer es más alto que el nivel de expresión de referencia de KIR2DS2 (condición 1);
- (ii) el nivel de expresión de KIR2DS5 en la muestra del sujeto o paciente con cáncer es superior al nivel de expresión de referencia de KIR2DS5 (condición 2);
- (iii) el nivel de expresión de KIR2DL2 en la muestra del paciente con cáncer es más bajo que un nivel de expresión de referencia de KIR2DL2 (condición 3);
- 10 (iv) el nivel de expresión de KIR2DL5 en la muestra del sujeto o paciente con cáncer es más bajo que un nivel de expresión de referencia de KIR2DL5 (condición 4); y
- (v) el nivel de expresión de GZMM en la muestra del sujeto o paciente con cáncer es más alto que un nivel de expresión de referencia de GZMM (condición 5).

15 Cualquier persona con experiencia ordinaria en la técnica entendería que el cumplimiento de cualquiera de las cinco condiciones descritas anteriormente puede indicar que es probable que el sujeto responda al tratamiento con FTI. En consecuencia, cada condición puede servir independientemente como criterio de selección del paciente para un tratamiento con FTI con el fin de aumentar la tasa de respuesta general. Cualquier persona con experiencia ordinaria en la técnica también entendería que las combinaciones de dos o más afecciones también pueden servir como criterios de selección de pacientes para el tratamiento con FTI, que son más selectivas que una única afección y potencialmente pueden lograr una tasa de respuesta general más alta. Por consiguiente, en este documento también se describe un método para usar cualquier combinación o permutación de las condiciones anteriores para la selección de pacientes para un tratamiento con FTI.

20

En algunos ejemplos, el método descrito en el presente documento incluye tratar a un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un FTI o seleccionar a un paciente con cáncer para un tratamiento con FTI, en donde el sujeto o el paciente con cáncer cumple con dos de las cinco condiciones descritas anteriormente, tales como las condiciones 1 y 2, 1 y 3, 1 y 4, 1 y 5, 2 y 3, 2 y 4, 2 y 5, 3 y 4, 3 y 5, o 4 y 5. En algunos ejemplos, el sujeto o paciente con cáncer cumple las condiciones 1 y 2. En algunos ejemplos, el sujeto o paciente con cáncer cumple las condiciones 1 y 3. En algunos ejemplos, el sujeto o paciente con cáncer cumple las condiciones 1 y 4. En algunos ejemplos, el sujeto o paciente con cáncer cumple las condiciones 1 y 5. En algunos ejemplos, el sujeto o paciente con cáncer cumple las condiciones 2 y 3. En algunos ejemplos, el sujeto o paciente con cáncer cumple las condiciones 2 y 4. En algunos ejemplos, el sujeto o paciente con cáncer cumple las condiciones 2 y 5. En algunos ejemplos, el sujeto o paciente con cáncer cumple las condiciones 3 y 4. En algunas realizaciones, el sujeto o paciente con cáncer cumple las condiciones 3 y 5. En algunos ejemplos, el sujeto o paciente con cáncer cumple las condiciones 4 y 5. Por ejemplo, en algunos ejemplos, el método incluye tratar a un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un FTI o seleccionar a un paciente con cáncer para un tratamiento con FTI, en donde el nivel de expresión de KIR2DS2 en una muestra del sujeto es más alto que un nivel de expresión de referencia de KIR2DS2, y en donde el nivel de expresión de GZMM en una muestra del sujeto es más alto que un nivel de expresión de referencia de GZMM. Para otro ejemplo, en algunos ejemplos, el método incluye tratar a un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI o seleccionar a un paciente con cáncer para un tratamiento con FTI, en donde el nivel de expresión de KIR2DS5 en una muestra del sujeto es más alto que el nivel de expresión de referencia de KIR2DS5 y el nivel de expresión de KIR2DL2 en una muestra del sujeto es inferior al nivel de expresión de referencia de KIR2DL2.

25

30

35

40

En algunos ejemplos, el método descrito en el presente documento incluye tratar a un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un FTI o seleccionar a un paciente con cáncer para un tratamiento con FTI, en el que el sujeto o el paciente con cáncer cumple con tres de las cinco condiciones descritas anteriormente, tales como las condiciones 1, 2 y 3; 1, 2 y 4; 1, 2 y 5; 1, 3 y 4; 1, 3 y 5; 1, 4 y 5; 2, 3 y 4; 2, 3 y 5; 2, 4 y 5; o 3, 4 y 5. En algunos ejemplos, el sujeto o paciente con cáncer cumple las condiciones 1, 2 y 3. En algunos ejemplos, el sujeto o paciente con cáncer cumple las condiciones 1, 2 y 4. En algunos ejemplos, el sujeto o paciente con cáncer cumple las condiciones 1, 2 y 5. En algunos ejemplos, el sujeto o paciente con cáncer cumple las condiciones 1, 3 y 4. En algunos ejemplos, el sujeto o paciente con cáncer cumple las condiciones 1, 3 y 5. En algunos ejemplos, el sujeto o paciente con cáncer cumple las condiciones 1, 4 y 5. En algunos ejemplos, el sujeto o paciente con cáncer cumple las condiciones 2, 3 y 4. En algunos ejemplos, el sujeto o paciente con cáncer cumple las condiciones 2, 3 y 5. En algunos ejemplos, el sujeto o paciente con cáncer cumple las condiciones 2, 4 y 5. En algunos ejemplos, el sujeto o paciente con cáncer cumple las condiciones 3, 4 y 5. Por ejemplo, en algunos otros ejemplos, el método incluye tratar a un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI o seleccionar a un paciente con cáncer para un tratamiento con FTI, en donde el nivel de expresión de KIR2DS2 en una muestra del sujeto es más alto que un nivel de expresión de referencia de KIR2DS2, el nivel de expresión de KIR2DL2 en una muestra del sujeto es más bajo que el nivel de expresión de referencia de KIR2DL2, y el nivel de expresión de GZMM en una muestra del sujeto es más alto que el nivel de expresión de referencia de GZMM.

45

50

55

5 En algunos ejemplos, el método descrito en este documento incluye tratar a un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un FTI o seleccionar a un paciente con cáncer para un tratamiento con FTI, en donde el sujeto o el paciente con cáncer cumple con cuatro de las cinco condiciones descritas anteriormente, tales como las condiciones 1, 2, 3 y 4; 1, 2, 3 y 5; 1, 2, 4 y 5; 1, 3, 4 y 5; o 2, 3, 4 y 5. En algunos ejemplos, el sujeto o paciente con cáncer cumple las condiciones 1, 2, 3 y 4. En algunos ejemplos, el sujeto o paciente con cáncer cumple las condiciones 1, 2, 3 y 5. En algunos ejemplos, el sujeto o paciente con cáncer cumple las condiciones 1, 2, 4 y 5. En algunos ejemplos, el sujeto o paciente con cáncer cumple las condiciones 1, 3, 4 y 5. En algunos ejemplos, el sujeto o paciente con cáncer cumple las condiciones 2, 3, 4 y 5.

10 En algunos ejemplos, el método descrito en el presente documento incluye tratar a un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un FTI o seleccionar a un paciente con cáncer para un tratamiento con FTI, en donde el sujeto o el paciente con cáncer cumple con las cinco condiciones descritas anteriormente, a saber, en donde:

(i) el nivel de expresión de KIR2DS2 en una muestra del sujeto es más alto que un nivel de expresión de referencia de KIR2DS2;

15 (ii) el nivel de expresión de KIR2DL2 en una muestra del sujeto es inferior al nivel de expresión de referencia de KIR2DL2;

(iii) el nivel de expresión de KIR2DS5 en una muestra del sujeto es más alto que el nivel de expresión de referencia de KIR2DS5;

(iv) el nivel de expresión de KIR2DL5 en una muestra del sujeto es inferior al nivel de expresión de referencia de KIR2DL5; y

20 (v) el nivel de expresión de GZMM en una muestra del sujeto es más alto que un nivel de expresión de referencia de GZMM.

Además del nivel de expresión de los biomarcadores individuales, la proporción de los niveles de expresión entre dos biomarcadores también puede servir como criterio para la selección de pacientes para un tratamiento con FTI que aumente la tasa de respuesta. En algunos ejemplos, se describe en este documento un FTI para usar en un método para tratar el cáncer en un sujeto administrando una cantidad terapéuticamente eficaz del FTI al sujeto, en donde:

(i) la relación entre el nivel de expresión de KIR2DS2 y el nivel de expresión de KIR2DL2 (la relación 2DS2/2DL2) en una muestra del sujeto es mayor que la relación de referencia 2DS2/2DL2; o

30 (ii) la relación entre el nivel de expresión de KIR2DS5 y el nivel de expresión de KIR2DL5 (la relación 2DS5/2DL5) en una muestra de la muestra es mayor que la relación de referencia 2DS5/2DL5.

En algunos ejemplos, se describe en este documento un FTI para usar en un método para tratar el cáncer en un sujeto mediante la determinación de los niveles de expresión de KIR2DS2 y KIR2DL2, o los niveles de expresión de KIR2DS5 y KIR2DL5 en una muestra del sujeto, en donde:

(i) la relación 2DS2/2DL2 en la muestra es más alta que la relación de referencia 2DS2/2DL2; o

35 (ii) la relación 2DS5/2DL5 en la muestra es más alta que la relación de referencia 2DS5/2DL5;

y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del FTI al sujeto.

En algunos ejemplos, se describe en este documento un FTI para usar en un método para seleccionar a un paciente con cáncer para un tratamiento con FTI mediante la determinación de los niveles de expresión de KIR2DS2 y KIR2DL2, o los niveles de expresión de KIR2DS5 y KIR2DL5 en una muestra de un paciente con cáncer, en donde el paciente con cáncer se selecciona para el tratamiento con FTI siempre que:

(i) la relación 2DS2/2DL2 en la muestra sea más alta que la relación de referencia 2DS2/2DL2; o

(ii) la relación 2DS5/2DL5 en la muestra sea más alta que la relación de referencia 2DS5/2DL5;

y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del FTI al sujeto.

45 En algunos ejemplos, el método descrito en este documento incluye tratar a un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI o seleccionar a un paciente con cáncer para un tratamiento con FTI, en donde la relación 2DS2/2DL2 en una muestra del sujeto o paciente con cáncer es más alta que una relación de referencia 2DS2/2DL2. En algunos ejemplos, el método incluye tratar a un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un FTI o seleccionar a un paciente con cáncer para un tratamiento con FTI, en donde la relación 2DS5/2DL5 en una muestra del sujeto o paciente con cáncer es más alta que una relación 2DS5/2DL5 de referencia. En algunos ejemplos, el método incluye tratar a un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI o seleccionar a un paciente con cáncer para un tratamiento con FTI, en donde la relación 2DS2/2DL2 en una muestra del sujeto o

paciente con cáncer es más alta que una relación de referencia 2DS2/2DL2, y la relación de 2DS5/2DL5 en una muestra del sujeto o paciente con cáncer es más alta que la relación de referencia 2DS5/2DL5.

En algunos ejemplos, los métodos descritos en el presente documento para seleccionar a un paciente con cáncer para un tratamiento con FTI también pueden basarse en el nivel de expresión de biomarcadores individuales como en la proporción del nivel de expresión entre biomarcadores. En algunos ejemplos, el método incluye tratar a un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI o seleccionar a un paciente con cáncer para un tratamiento con FTI, en donde la relación 2DS2/2DL2 en una muestra del sujeto o paciente con cáncer es más alta que una relación de referencia 2DS2/2DL2 y el paciente con cáncer o sujeto cumple al menos una de las cinco condiciones descritas anteriormente con respecto al nivel de expresión individual de los biomarcadores. En algunos ejemplos, el método incluye tratar a un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI o seleccionar a un paciente con cáncer para un tratamiento con FTI, en donde la relación 2DS5/2DL5 en una muestra del sujeto o paciente con cáncer es más alta que una referencia relación de 2DS5/2DL5 y el paciente con cáncer o sujeto cumple al menos una de las cinco condiciones descritas anteriormente con respecto al nivel de expresión individual de los biomarcadores. En algunos ejemplos, el método incluye tratar a un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI o seleccionar a un paciente con cáncer para un tratamiento con FTI, en donde la relación 2DS2/2DL2 en una muestra del sujeto o paciente con cáncer es más alta que una relación de referencia 2DS2/2DL2 y la relación 2DS5/2DL5 en una muestra del paciente con cáncer es más alta que la relación 2DS5/2DL5 de referencia, y el paciente con cáncer o el sujeto cumple al menos una de las cinco condiciones descritas anteriormente con respecto al nivel de expresión individual de los biomarcadores.

En algunos ejemplos, el nivel de expresión de KIR2DL5 es el nivel de expresión total de KIR2DL5A y KIR2DL5B. En algunos ejemplos, el nivel de expresión de KIR2DL5 es el nivel de expresión de KIR2DL5A. En algunos ejemplos, el nivel de expresión de KIR2DL5 es el nivel de expresión de KIR2DL5B. Por lo tanto, en algunos ejemplos, la relación 2DS5/2DL5 es la relación del nivel de expresión KIR2DS5 frente al nivel total de expresión de KIR2DL5A y KIR2DL5B. En algunos ejemplos, la relación 2DS5/2DL5 es la relación del nivel de expresión KIR2DS5 frente al nivel de expresión de KIR2DL5A. En algunos ejemplos, la relación 2DS5/2DL5 es la relación del nivel de expresión KIR2DS5 frente al nivel de expresión de KIR2DL5B.

Una vez más, las cinco condiciones para seleccionar a un sujeto o a un paciente con cáncer para un tratamiento con FTI según el nivel de expresión de un biomarcador único incluyen: condición 1: el nivel de expresión de KIR2DS2 en una muestra del sujeto o paciente con cáncer es más alto que un nivel de expresión de referencia KIR2DS2. condición 2: el nivel de expresión de KIR2DS5 en una muestra del sujeto o paciente con cáncer es más alto que el nivel de expresión de referencia de KIR2DS5; condición 3: el nivel de expresión de KIR2DL2 en una muestra del sujeto o paciente con cáncer es más bajo que un nivel de expresión de referencia de KIR2DL2; condición 4: el nivel de expresión de KIR2DL5 en una muestra del sujeto o paciente con cáncer es más bajo que un nivel de expresión de referencia de KIR2DL5; condición 5: el nivel de expresión de GZMM en una muestra del sujeto o paciente con cáncer es más alto que un nivel de expresión de referencia de GZMM. Cualquier combinación o permutación de estas condiciones se puede usar en otra combinación con uno o ambos criterios según la relación de expresión (la relación 2DS2/2DL2 y la relación 2DS2/2DL2) como criterios para la selección de pacientes para un tratamiento con FTI.

Por ejemplo, en algunos ejemplos, el método descrito en este documento incluye tratar a un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI o seleccionar a un paciente con cáncer para un tratamiento con FTI, en donde la relación 2DS2/2DL2 en una muestra del sujeto o paciente con cáncer es mayor que una relación de referencia 2DS2/2DL2, y el nivel de expresión de GZMM en una muestra del sujeto es más alto que un nivel de expresión de referencia de GZMM. En algunos ejemplos, el método incluye tratar a un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI o seleccionar a un paciente con cáncer para un tratamiento con FTI, en donde la relación 2DS5/2DL5 en una muestra del sujeto o paciente con cáncer es más alta que una relación de referencia 2DS5/2DL5 y el nivel de expresión de KIR2DS2 en una muestra del sujeto es mayor que el nivel de expresión de referencia de KIR2DS2. Cualquier persona con experiencia ordinaria en la técnica entendería que el alcance de la presente invención no se limita a estas combinaciones ejemplares e incluye cualquier combinación o permutación del criterio individual de selección de pacientes para un tratamiento con FTI como se describe en este documento.

Como se describe en el presente documento, el genotipo KIR, el genotipo HLA y el perfil de expresión de algunos genes relacionados con las células NK se pueden usar para predecir la capacidad de respuesta de un paciente con cáncer respecto a un tratamiento con FTI. Por consiguiente, en el presente documento se describen métodos para seleccionar pacientes con cáncer para un tratamiento con FTI, o métodos para tratar a un paciente con FTI, incluido genotipar KIR primero del paciente o determinar el perfil de expresión de los biomarcadores identificados en este documento para evaluar si es probable que el paciente responda al tratamiento. Los métodos pueden incluir además genotipar HLA del paciente. Cualquier persona con experiencia ordinaria en la técnica entendería que estos métodos pueden usarse independientemente como criterios de selección de pacientes para un tratamiento con FTI. Además, los métodos también se pueden utilizar en relación con otros enfoques de clasificación de pacientes para aumentar aún más la tasa de respuesta de una población de pacientes a un tratamiento con FTI. Por ejemplo, en algunos ejemplos, los métodos descritos en este documento incluyen además determinar el estado de mutación del gen ras y seleccionar a un paciente para un tratamiento con FTI cuando el paciente tiene una mutación ras particular, como la mutación K-ras o la mutación N-ras, como se describe con mayor detalle a continuación. En algunos ejemplos, los

métodos descritos en el presente documento incluyen además determinar el estado de mutación del gen ras y seleccionar a un paciente para un tratamiento con FTI cuando el paciente tiene K-ras natural y N-ras natural. Los métodos proporcionados en el presente documento pueden incluir además determinar el estado de mutación del gen ras y seleccionar a un paciente para un tratamiento con FTI cuando el paciente tiene una mutación H-ras. En otras realizaciones, los métodos descritos en el presente documento pueden incluir además el uso de la relación de 2 genes entre RASGRP1 y APTX como criterio adicional de selección de pacientes para un tratamiento con FTI (Patente de Estados Unidos N° 7.932.036). Los métodos descritos en el presente documento, o conocidos de otro modo en la técnica, pueden usarse para determinar el estado de mutación del gen ras o la expresión de otros biomarcadores tales como RASGRP1 o APTX. En algunas realizaciones, el estado de mutación de H-ras puede determinarse por NGS.

En algunos ejemplos, los métodos descritos en este documento incluyen determinar el nivel de expresión de un biomarcador. En algunos ejemplos, el nivel de expresión de un biomarcador puede ser el nivel de proteína del biomarcador. En algunos ejemplos, el nivel de expresión de un biomarcador puede ser el nivel de ARN del biomarcador. Cualquier método, como se describe en el presente documento o conocido de otro modo en la técnica, para determinar el nivel de proteína o el nivel de ARN de un gen se puede usar para determinar el nivel de expresión de un biomarcador en la presente invención.

Los métodos ejemplares para detectar o cuantificar los niveles de ARNm incluyen, entre otros, métodos basados en PCR, transferencias Northern, ensayos de protección con ribonucleasas y similares. La secuencia de ARNm (por ejemplo, el ARNm de un biomarcador, como CRBN o un CAP, o un fragmento del mismo) se puede usar para preparar una sonda que sea al menos parcialmente complementaria. Luego, la sonda se puede usar para detectar la secuencia de ARNm en una muestra, utilizando cualquier ensayo adecuado, como los métodos basados en PCR, transferencias Northern, un ensayo de varilla de medición, y similares.

Los métodos comúnmente usados conocidos en la técnica para la cuantificación de la expresión de ARNm en una muestra incluyen transferencia Northern e hibridación in situ (Parker & Barnes, *Methods in Molecular Biology* 106: 247-283 (1999)); Ensayos de protección de ARNasa (Hod, *Biotechniques* 13: 852-854 (1992)); y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Weis et al., *Trends in Genetics* 8: 263-264 (1992)). Alternativamente, pueden emplearse anticuerpos que puedan reconocer dúplex específicos, incluidos dúplex de ADN, dúplex de ARN y dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína. Los métodos representativos para el análisis de la expresión génica basada en la secuenciación incluyen el análisis en serie de la expresión génica (SAGE) y el análisis de la expresión génica mediante la secuenciación masiva de firmas paralelas (MPSS).

Un método cuantitativo sensible y flexible es la PCR. Ejemplos de métodos de PCR se pueden encontrar en la bibliografía. Se pueden encontrar ejemplos de ensayos de PCR en las patentes de EE.UU. N° 6.927.024. Se pueden encontrar ejemplos de métodos de RT-PCR en las patentes de EE.UU. No. 7.122.799. Un método de PCR in situ fluorescente se describe en la patente de EE.UU. No. 7.186.507.

Sin embargo, se observa que también se pueden usar otros protocolos de amplificación de ácidos nucleicos (es decir, distintos de la PCR) en los métodos analíticos de ácido nucleico descritos en el presente documento. Por ejemplo, los métodos de amplificación adecuados incluyen la reacción en cadena de la ligasa (véase, por ejemplo, Wu & Wallace, *Genomics* 4: 560-569, 1988); ensayo de desplazamiento de cadena (véase, por ejemplo, Walker et al., *Proc. Natl Acad Sci. USA* 89: 392-396, 1992; Patente de EE.UU. N° 5.455.166); y varios sistemas de amplificación basados en la transcripción, incluidos los métodos descritos en las patentes de EE. UU. N° 5.437.990; 5.409.818; y 5.399.491; el sistema de amplificación de la transcripción (TAS) (Kwoh et al., *Proc. Natl Acad Sci. USA* 86: 1173-1177, 1989); y replicación de secuencia autosostenida (3SR) (Guatelli et al., *Proc. Natl Acad Sci. USA* 87: 1874-1878, 1990; documento WO 92/08800). Alternativamente, se pueden usar métodos que amplifiquen la sonda a niveles detectables, como la amplificación de la Q-replicasa (Kramer & Lizardi, *Nature* 339: 401-402, 1989; Lomeli et al., *Clin. Chem.* 35: 1826-1831, 1989). Abramson y Myers en *Current Opinion in Biotechnology* 4: 41-47 (1993) proporcionan una revisión de los métodos de amplificación conocidos.

El ARNm puede aislarse a partir de la muestra de tejido de partida. Los métodos generales para la extracción de ARNm son habituales en la técnica y se describen en manuales estándar de biología molecular, incluidos Ausubel et al., *Current Protocols of Molecular Biology*, John Wiley and Sons (1997). En particular, el aislamiento del ARN se puede realizar utilizando un kit de purificación, un conjunto de tampones y proteasas de fabricantes comerciales, como Qiagen, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Por ejemplo, el ARN total de las células en cultivo se puede aislar usando mini-columnas Qiagen RNeasy. Otros kits de aislamiento de ARN disponibles en el mercado incluyen el kit completo de purificación de ADN y ARN MASTERPURE® (EPICENTRE®, Madison, WI) y el kit de aislamiento de ARN en bloque de parafina (Ambion, Inc.). El ARN total de las muestras de tejido se puede aislar utilizando el ARN Stat-60 (Tel-Test). El ARN preparado a partir del tumor se puede aislar, por ejemplo, mediante centrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio.

En algunos ejemplos, el primer paso en el perfil de expresión génica por PCR es la transcripción inversa de la plantilla de ARN en el ADNc, seguida de su amplificación exponencial en una reacción de PCR. En otros ejemplos, se puede usar una reacción combinada de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), por ejemplo, como se describe en las patentes de EE.UU. Nos. 5.310.652; 5.322.770; 5.561.058; 5.641.864; y

5.693.517. Las dos transcriptasas inversas comúnmente utilizadas son la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis avilo (AMV-RT) y la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV-RT). El paso de la transcripción inversa suele imprimirse utilizando cebadores específicos, hexámeros aleatorios o cebadores oligo-dT, según las circunstancias y el objetivo del perfil de expresión. Por ejemplo, el ARN extraído se puede transcribir de forma inversa utilizando un kit de PCR de ARN GENEAMP™ (Perkin Elmer, California, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA derivado se puede usar como plantilla en la siguiente reacción de PCR.

En algunos ejemplos, la PCR de transcripción inversa en tiempo real (qRT-PCR) se puede usar tanto para la detección como para la cuantificación de dianas de ARN (Bustin, et al., 2005, Clin. Sci., 109: 365-379). Se pueden encontrar ejemplos de métodos basados en qRT-PCR, por ejemplo, en la patente de EE.UU. 7.101.663. Los instrumentos para la PCR en tiempo real, como el Applied Biosystems 7500, están disponibles comercialmente, al igual que los reactivos, como la química de detección de secuencia TaqMan.

Por ejemplo, se pueden usar los ensayos de expresión génica TaqMan, siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos kits son ensayos de expresión génica preformulados para la detección y cuantificación rápidas y confiables de transcritos de ARNm de humanos, ratones y ratas. Se puede utilizar el ensayo TaqMan® o de 5'-nucleasa, como se describe en las patentes de EE.UU. Nº 5.210.015; 5.487.972; y 5.804.375; y Holland et al., 1988, Proc. Natl Acad Sci. USA 88: 7276-7280. La PCR de TAQMAN® utiliza típicamente la actividad de 5'-nucleasa de la polimerasa Taq o Tth para hidrolizar una sonda de hibridación unida a su amplicón objetivo, pero se puede usar cualquier enzima con actividad de nucleasa 5' equivalente. Se utilizan dos cebadores oligonucleotídicos para generar un amplicón típico de una reacción de PCR. Un tercer oligonucleótido, o sonda, está diseñado para detectar la secuencia de nucleótidos ubicada entre los dos cebadores de PCR. La sonda no es extensible por la enzima Taq ADN polimerasa, y está marcada con un colorante fluorescente indicador y un colorante fluorescente inactivador. Cualquier emisión inducida por láser del colorante indicador se extingue con el colorante de extinción cuando los dos colorantes se ubican muy juntos como están en la sonda. Durante la reacción de amplificación, la enzima Taq ADN polimerasa corta la sonda de una manera dependiente de la plantilla. Los fragmentos de la sonda resultantes se disocian en la solución, y la señal del colorante indicador liberado está libre del efecto de extinción del segundo fluoróforo. Se libera una molécula del colorante indicador para cada nueva molécula sintetizada, y la detección del colorante indicador no extinguido proporciona la base para la interpretación cuantitativa de los datos.

Cualquier método adecuado para detectar el producto de degradación puede usarse en un ensayo de nucleasa 5'. A menudo, la sonda de detección está marcada con dos colorantes fluorescentes, uno de los cuales es capaz de apagar la fluorescencia del otro colorante. Los tintes se unen a la sonda, preferiblemente uno unido al extremo 5' y el otro que se une a un sitio interno, de modo que la extinción se produce cuando la sonda está en un estado no hibridado y tal que la escisión de la sonda por 5' respecto a la actividad de exonucleasa 3' de la ADN polimerasa se produce entre los dos colorantes.

La amplificación da como resultado la escisión de la sonda entre los colorantes con una eliminación concomitante de la extinción y un aumento de la fluorescencia observable a partir del colorante inicialmente inactivado. La acumulación de producto de degradación se monitoriza midiendo el aumento de la fluorescencia de la reacción. Las Patentes de EE.UU. 5.491.063 y 5.571.673 describen métodos alternativos para detectar la degradación de la sonda que se produce concomitante con la amplificación. Los datos del ensayo de 5'-nucleasa pueden expresarse inicialmente como Ct, o el ciclo umbral. Como se discutió anteriormente, los valores de fluorescencia se registran durante cada ciclo y representan la cantidad de producto amplificado hasta ese punto en la reacción de amplificación. El punto en el que la señal fluorescente se registra por primera vez como estadísticamente significativa es el ciclo umbral (Ct).

Para minimizar los errores y el efecto de la variación entre muestras, la PCR generalmente se realiza usando un estándar interno. El estándar interno ideal se expresa a un nivel constante entre diferentes tejidos y no se ve afectado por el tratamiento experimental. Los ARN que se utilizan con más frecuencia para normalizar los patrones de expresión génica son los ARNm para los genes de mantenimiento, gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) y P-actina.

Los cebadores y las sondas de PCR se diseñan en función de las secuencias de intrones presentes en el gen a amplificar. En este ejemplo, el primer paso en el diseño del cebador/sonda es la delineación de secuencias de intrones dentro de los genes. Esto se puede hacer mediante un software disponible públicamente, como el software DNA BLAT desarrollado por Kent, W., Genome Res. 12 (4): 656-64 (2002), o por el software BLAST, incluidas sus variaciones. Los pasos subsiguientes siguen métodos bien establecidos de diseño de cebadores y sondas de PCR.

Para evitar señales no específicas, puede ser importante enmascarar secuencias repetitivas dentro de los intrones cuando se diseñan los cebadores y las sondas. Esto se puede lograr fácilmente usando el programa Repeat Masker disponible en línea a través de Baylor College of Medicine, que evalúa las secuencias de ADN frente a una biblioteca de elementos repetitivos y devuelve una secuencia problema en la que los elementos repetitivos están enmascarados. Las secuencias de intrones enmascarados se pueden usar entonces para diseñar secuencias de cebadores y sondas utilizando cualquier paquete de diseño de cebadores/sondas disponible comercialmente o de otro modo, como Primer Express (Applied Biosystems); ensayo por diseño de MGB (Applied Biosystems); Primer3

(Rozen y Skaletsky (2000) Primer3 en la WWW para usuarios generales y para programadores biólogos. En: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, N.J., pp. 365-386).

5 Los factores considerados en el diseño del cebador de PCR incluyen la longitud del cebador, la temperatura de fusión (T_m) y el contenido de G/C, la especificidad, las secuencias del cebador complementarias y la secuencia del extremo 3'. En general, los cebadores de la PCR óptimos tienen generalmente una longitud de 17-30 bases, y contienen aproximadamente 20-80%, tal como, por ejemplo, aproximadamente 50-60% de bases G + C. La T_m está entre 50 y 80°C, por ejemplo. se prefieren típicamente de aproximadamente 50 a 70°C. Para obtener más pautas para el diseño de cebadores y sondas de PCR, consultar, p. ej. Dieffenbach et al., "General Concepts for PCR Primer Design" en: PCR Primer, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1995, pp. 133-155; Innis y Gelfand, "Optimization of PCRs" en: PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, CRC Press, Londres, 1994, páginas 5-11; y Plasterer, T. N. Primerselect: Primer and probe design. Methods Mol. Biol. 70: 520-527 (1997).

15 Un ejemplo de programa de PCR, por ejemplo, es 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos, 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, luego 60°C durante 1 minuto. Para determinar el número de ciclo en el que la señal de fluorescencia asociada con una acumulación particular de amplicón cruza el umbral (denominado TC), los datos se pueden analizar, por ejemplo, utilizando un software de Detección de Secuencias del Sistema de PCR en Tiempo Real 7500 v1.3 utilizando el método de cálculo de cuantificación relativa de CT comparativo. Usando este método, la salida se expresa como el número cambio en los niveles de expresión. En algunos ejemplos, el nivel umbral puede seleccionarse para que se determine automáticamente por el software. En algunos ejemplos, el nivel umbral se establece para estar por encima de la línea de base pero suficientemente bajo para estar dentro de la región de crecimiento exponencial de una curva de amplificación.

25 La RNA-Seq, también llamada secuenciación de pistola de transcriptoma completo (WTSS) se refiere al uso de tecnologías de secuenciación de alto rendimiento para secuenciar cDNA y obtener información sobre el contenido del ARN de la muestra. Las publicaciones que describen RNA-Seq incluyen: Wang et al., Nature Reviews Genetics 10 (1): 57-63 (enero de 2009); Ryan et al. BioTechniques 45 (1): 81-94 (2008); y Maher et al., Nature 458 (7234): 97-101 (enero de 2009).

30 La expresión génica diferencial también se puede identificar o confirmar utilizando la técnica de micromatrices. En este método, las secuencias de polinucleótidos de interés (incluidos los ADNc y oligonucleótidos) se colocan en placas o se agrupan en un sustrato de microchip. Las secuencias agrupadas se hibridan luego con sondas de ADN específicas de células o tejidos de interés.

35 En un ejemplo de la técnica de micromatrices, las inserciones amplificadas por PCR de clones de ADNc se aplican a un sustrato en una matriz densa. Preferiblemente, al menos 10.000 secuencias de nucleótidos se aplican al sustrato. Los genes de micromatrices, inmovilizados en el microchip en una relación de 10.000 elementos cada uno, son adecuados para la hibridación en condiciones rigurosas. Las sondas de ADNc marcadas por fluorescencia pueden generarse a través de la incorporación de nucleótidos fluorescentes por transcripción inversa del ARN extraído de los tejidos de interés. Las sondas de ADNc marcadas aplicadas al chip se hibridan con especificidad a cada punto del ADN en la matriz. Después de un lavado riguroso para eliminar las sondas no específicamente unidas, el chip se escanea mediante microscopía láser confocal o mediante otro método de detección, como una cámara CCD. La cuantificación de la hibridación de cada elemento agrupado permite la evaluación de la abundancia del ARNm correspondiente. Con fluorescencia de doble color, las sondas de ADNc marcadas por separado generadas a partir de dos fuentes de ARN se hibridan por pares a la matriz. La abundancia relativa de las transcripciones de las dos fuentes correspondientes a cada gen especificado se determina así simultáneamente. La escala miniaturizada de la hibridación permite una evaluación conveniente y rápida del patrón de expresión para un gran número de genes. Se ha demostrado que tales métodos tienen la sensibilidad requerida para detectar transcritos raros, que se expresan en unas pocas copias por célula, y para detectar de manera reproducible al menos aproximadamente el doble de diferencias en los niveles de expresión (Schena et al., Proc. Natl Acad Sci. USA 93 (2): 106-149 (1996)). El análisis de micromatrices se puede realizar con el equipo disponible comercialmente, siguiendo los protocolos del fabricante, como el uso de la tecnología Affymetrix GENCHIP™ o la tecnología de micromatrices de Incyte.

50 El análisis en serie de la expresión génica (SAGE) es un método que permite el análisis simultáneo y cuantitativo de un gran número de transcripciones de genes, sin la necesidad de proporcionar una sonda de hibridación individual para cada transcripción. Primero, se genera un marcador de secuencia corta (aproximadamente 10-14 pb) que contiene información suficiente para identificar de manera única una transcripción, siempre que el marcador se obtenga de una posición única dentro de cada transcripción. Luego, muchas transcripciones se unen para formar moléculas seriales largas, que pueden secuenciarse, describiendo la identidad de los múltiples marcadores simultáneamente. El patrón de expresión de cualquier población de transcripciones puede evaluarse cuantitativamente determinando la abundancia de marcadores individuales e identificando el gen correspondiente a cada marcador. Para más detalles, ver, por ejemplo, Velculescu et al., Science 270: 484-487 (1995); y Velculescu et al, Cell 88: 243-51 (1997).

La tecnología MassARRAY (Sequenom, San Diego, California) es un método automatizado de alto rendimiento para el análisis de la expresión génica que utiliza la espectrometría de masas (MS) para la detección. De acuerdo con este método, tras el aislamiento del ARN, la transcripción inversa y la amplificación por PCR, los ADNc se someten a la extensión del cebador. Los productos de extensión de cebadores derivados de cDNA se purifican y se dispensan en una matriz de chips que se carga previamente con los componentes necesarios para la preparación de la muestra MALDI-TOF MS. Los diversos ADNc presentes en la reacción se cuantifican analizando las áreas de los picos en el espectro de masas obtenido.

El nivel de ARNm también se puede medir mediante un ensayo basado en la hibridación. Un método típico de ensayo de ARNm puede contener los pasos de 1) obtener sondas de sujetos unidas a la superficie; 2) hibridación de una población de ARNm con las sondas unidas a la superficie en condiciones suficientes para proporcionar un enlace específico (3) lavados post-hibridación para eliminar los ácidos nucleicos no unidos en la hibridación; y (4) detección de los ARNm hibridados. Los reactivos utilizados en cada uno de estos pasos y sus condiciones de uso pueden variar según la aplicación particular.

Se puede usar cualquier plataforma de ensayo adecuada para determinar el nivel de ARNm en una muestra. Por ejemplo, un ensayo puede tener la forma de una varilla de medición, una membrana, un chip, un disco, una tira reactiva, un filtro, una microesfera, un portaobjetos, una placa de múltiples pocillos o una fibra óptica. Un sistema de ensayo puede tener un soporte sólido sobre el cual se una un ácido nucleico correspondiente al ARNm. El soporte sólido puede tener, por ejemplo, un plástico, un silicio, un metal, una resina, un vidrio, una membrana, una partícula, un precipitado, un gel, un polímero, una lámina, una esfera, un polisacárido, un capilar, una película, una placa, o un portaobjetos. Los componentes del ensayo se pueden preparar y envasar juntos como un kit para detectar el ARNm.

El ácido nucleico puede marcarse, si se desea, para formar una población de ARNm marcados. En general, una muestra puede marcarse usando métodos que son habituales en la técnica (por ejemplo, usando ADN ligasa, transferasa terminal o marcando la estructura de ARN, etc.; véase, por ejemplo, Ausubel, et al., *Short Protocols in Molecular Biology*, 3ª ed., Wiley & Sons 1995 y Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Tercera Edición, 2001 Cold Spring Harbor, NY). En algunos ejemplos, la muestra está marcada con un marcador fluorescente. Los tintes fluorescentes ejemplares incluyen, entre otros, tintes de xanteno, tintes de fluoresceína, tintes de rodamina, isotiocianato de fluoresceína (FITC), 6-carboxifluoresceína (FAM), 6 carboxi-2',4',7',4',7-hexaclorofluoresceína (HEX), 6-carboxi-4',5'-dicloro 2',7'-dimetoxifluoresceína (JOE o J), N,N,N',N'-tetrametil 6-carboxirodamina (TAMRA o T), 6-carboxi X rodamina (ROX o R), 5-carboxirodamina 6G (R6G5 o G5), 6 carboxirodamina 6G (R6G6 o G6) y rodamina 110; colorantes de cianina, p. ej. colorantes Cy3, Cy5 y Cy7; colorantes Alexa, por ej. Alexa-fluor-555; cumarina, dietilaminocumarina, umbeliferona; colorantes de benzimida, p. ej. Hoechst 33258; colorantes de fenantridina, p. ej. Texas Red; tintes de etidio; tintes de acridina; colorantes de carbazol; colorantes de fenoxazina; colorantes de porfirina; colorantes de polimetina, colorantes BODIPY, colorantes de quinolina, pireno, clorotriazinilo de fluoresceína, R110, eosina, JOE, R6G, tetrametilrodamina, lisamina, ROX, naftofluoresceína y similares.

La hibridación se puede llevar a cabo en condiciones de hibridación adecuadas, que pueden variar en rigurosidad según se desee. Las condiciones típicas son suficientes para producir complejos de sonda/objetivo en una superficie sólida entre miembros de unión complementarios, es decir, entre sondas sujetas unidas a la superficie y ARNm complementarios en una muestra. En ciertos ejemplos, pueden emplearse condiciones de hibridación rigurosas.

La hibridación se realiza típicamente en condiciones de hibridación rigurosas. Kallioniemi et al., *Science* 258: 818-821 (1992) y el documento WO 93/18186 describen técnicas de hibridación estándar (por ejemplo, en condiciones suficientes para proporcionar una unión específica de los ARNm diana en la muestra a las sondas). Se encuentran disponibles varias guías de técnicas generales, por ejemplo, Tijssen, *Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Partes I y II (Elsevier, Amsterdam, 1993). Para descripciones de técnicas adecuadas para hibridaciones in situ, ver Gall et al. *Meth Enzymol.*, 21: 470-480 (1981); y Angerer et al. en *Genetic Engineering: Principles and Methods* (Setlow y Hollaender, Eds.) Vol. 7, págs. 43-65 (Plenum Press, Nueva York, 1985). La selección de las condiciones apropiadas, incluida la temperatura, la concentración de sales, la concentración de polinucleótidos, el tiempo de hibridación, la rigurosidad de las condiciones de lavado y similares dependerá del diseño experimental, incluida la fuente de la muestra, la identidad de los agentes de captura, el grado de complementariedad esperado, etc., y puede determinarse como una cuestión de experimentación rutinaria para los expertos en la técnica. Los expertos en la materia reconocerán fácilmente que pueden utilizarse condiciones de hibridación y lavado alternativas pero comparables para proporcionar condiciones de rigurosidad similares.

Después del procedimiento de hibridación de ARNm, los polinucleótidos unidos a la superficie se lavan típicamente para eliminar los ácidos nucleicos no unidos. El lavado se puede realizar utilizando cualquier protocolo de lavado conveniente, donde las condiciones de lavado son típicamente estrictas, como se describió anteriormente. La hibridación de los ARNm diana con las sondas se detecta mediante técnicas estándar.

En algunos ejemplos, los métodos descritos en el presente documento incluyen determinar el nivel de ARNm de uno o más biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 y GZMM utilizando uno de los enfoques descritos en este documento o conocidos de otro modo en la técnica. En un ejemplo, los métodos incluyen determinar el nivel de ARNm de KIR2DS2 a partir de una muestra de un sujeto. En un ejemplo,

los métodos incluyen determinar el nivel de ARNm de KIR2DL2 a partir de una muestra de un sujeto. En un ejemplo, los métodos incluyen determinar el nivel de ARNm de KIR2DS5 a partir de una muestra de un sujeto. En un ejemplo, los métodos incluyen determinar el nivel de ARNm de KIR2DL5 a partir de una muestra de un sujeto. En un ejemplo, los métodos incluyen determinar el nivel de ARNm de GZMM a partir de una muestra de un sujeto.

- 5 En algunos ejemplos, el nivel de ARNm de KIR2DL5 es el nivel total de ARNm de KIR2DL5A y KIR2DL5B. En algunos ejemplos, el nivel de ARNm de KIR2DL5 es el nivel de ARNm de KIR2DL5A. En algunos ejemplos, el nivel de ARNm de KIR2DL5 es el nivel de ARNm de KIR2DL5B.

10 En algunos ejemplos, los métodos descritos en este documento incluyen determinar los niveles de ARNm de dos o más biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 y GZMM. En algunos ejemplos, los métodos incluyen determinar los niveles de ARNm de tres o más de estos biomarcadores. En algunos ejemplos, los métodos incluyen determinar los niveles de ARNm de cuatro o más de estos biomarcadores. En algunos ejemplos, los métodos incluyen determinar los niveles de ARNm de estos cinco biomarcadores.

15 En algunos ejemplos, los métodos descritos en este documento incluyen determinar los niveles de ARNm de KIR2DS2 y KIR2DL2 en una muestra de un sujeto o un paciente con cáncer, y calcular la relación del nivel de ARNm de KIR2DS2 respecto al nivel de ARNm de KIR2DL2 (la proporción de ARNm de 2DS2/2DL2). En algunos ejemplos, los métodos incluyen además determinar los niveles de ARNm de KIR2DS5 y KIR2DL5 en una muestra de un sujeto o un paciente con cáncer, y calcular la proporción del nivel de ARNm de KIR2DS5 respecto al nivel de ARNm de KIR2DL5 (la proporción de ARNm de 2DS5/2DL5). En algunos ejemplos, los métodos incluyen además determinar los niveles de ARNm de KIR2DS2 y KIR2DL2 en una muestra de un sujeto o un paciente con cáncer, y los niveles de ARNm de KIR2DS5 y KIR2DL5 en una muestra de un sujeto o un paciente con cáncer, y calcular tanto la proporción de ARNm de 2DS2/2DL2 como la proporción de ARNm de 2DS5/2DL5.

20 En algunos ejemplos, el nivel de ARNm de uno o más biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 y GZMM se determina mediante qPCR, RT-PCR, RNA-seq, análisis de micromatrices, SAGE, técnica de MassARRAY, o FISH. En algunos ejemplos, el nivel de ARNm de uno o más de los biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 y GZMM se determina por qPCR o RT-PCR.

25 En algunos ejemplos, los métodos descritos en este documento incluyen determinar el nivel de proteína de uno o más biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 y GZMM. El nivel de proteína del biomarcador puede detectarse mediante una variedad de enfoques de inmunohistoquímica (IHC) u otros métodos de inmunoensayo.

30 La tinción con IHC de las secciones de tejido ha demostrado ser un método confiable para evaluar o detectar la presencia de proteínas en una muestra. Las técnicas de inmunohistoquímica utilizan un anticuerpo para sondear y visualizar antígenos celulares in situ, generalmente por métodos cromogénicos o fluorescentes. Por lo tanto, los anticuerpos o antiseros, preferiblemente antiseros policlonales, y lo más preferiblemente anticuerpos monoclonales específicos para cada marcador se usan para detectar la expresión. Como se explica con mayor detalle a continuación, los anticuerpos pueden detectarse mediante el marcado directo de los propios anticuerpos, por ejemplo, con marcadores radiactivos, marcadores fluorescentes, marcadores de hapteno como biotina o una enzima como la peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina. Alternativamente, el anticuerpo primario no marcado se usa junto con un anticuerpo secundario marcado, que comprende antiseros, antiseros policlonales o un anticuerpo monoclonal específico para el anticuerpo primario. Los protocolos y kits de inmunohistoquímica son habituales en la técnica y están disponibles comercialmente. Los sistemas automatizados para la preparación de portaobjetos y el procesamiento de IHC están disponibles comercialmente. El sistema Ventana® BenchMark XT es un ejemplo de tal sistema automatizado.

35 Los procedimientos inmunológicos e inmunoensayos estándar se pueden encontrar en Basic and Clinical Immunology (Stites & Terr eds., 7^a ed. 1991). Además, los inmunoensayos se pueden realizar en cualquiera de varias configuraciones, que se revisan ampliamente en Enzyme Immunoassay (Maggio, ed., 1980); y Harlow & Lane, supra. Para una revisión de los inmunoensayos generales, consúltese también Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology, volumen 37 (Asai, ed. 1993); Basic and Clinical Immunology (Stites & Ten, eds., 7^a ed. 1991).

40 Los ensayos usados comúnmente para detectar el nivel de proteína de un biomarcador incluyen ensayos no competitivos, por ejemplo, ensayos en sándwich y ensayos competitivos. Típicamente, se puede usar un ensayo tal como un ensayo ELISA. Los ensayos ELISA son conocidos en la técnica, por ejemplo, para analizar una amplia variedad de tejidos y muestras, incluyendo sangre, plasma, suero o médula ósea.

45 Se encuentra disponible una amplia gama de técnicas de inmunoensayo que utilizan un formato de ensayo de este tipo; véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nos. 4.016.043, 4.424.279 y 4.018.653. Estos incluyen ensayos de un solo sitio y de dos sitios o "sándwich" de tipos no competitivos, así como en los ensayos de unión competitiva tradicionales. Estos ensayos también incluyen la unión directa de un anticuerpo marcado a un biomarcador objetivo. Los ensayos de sándwich son ensayos comúnmente utilizados. Existen diversas variaciones de la técnica de ensayo de sándwich. Por ejemplo, en un ensayo directo típico, un anticuerpo no marcado se inmoviliza sobre un sustrato

sólido, y la muestra a analizar se pone en contacto con la molécula unida. Después de un período adecuado de incubación, durante un período de tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo antígeno-anticuerpo, se agrega y se incuba un segundo anticuerpo específico para el antígeno, marcado con una molécula indicadora capaz de producir una señal detectable, lo que permite un tiempo suficiente para la formación de otro complejo de anticuerpo-anticuerpo marcado con antígeno. Cualquier material sin reaccionar se elimina por lavado y la presencia del antígeno se determina mediante la observación de una señal producida por la molécula indicadora. Los resultados pueden ser cualitativos, mediante la simple observación de la señal visible, o pueden cuantificarse comparando con una muestra de control que contiene cantidades conocidas de biomarcadores.

Las variaciones en el ensayo directo incluyen un ensayo simultáneo, en el que tanto la muestra como el anticuerpo marcado se agregan simultáneamente al anticuerpo unido. Estas técnicas son bien conocidas por los expertos en la materia, incluyendo cualquier variación menor que sea fácilmente evidente. En un ensayo sándwich directo típico, un primer anticuerpo que tiene especificidad para el biomarcador se une covalente o pasivamente a una superficie sólida. La superficie sólida puede ser de vidrio o un polímero, los polímeros más comúnmente usados son celulosa, poliacrilamida, nailon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno. Los soportes sólidos pueden estar en forma de tubos, perlas, discos de microplacas o cualquier otra superficie adecuada para realizar un inmunoensayo. Los procedimientos de unión son habituales en la técnica y generalmente consisten en una unión por enlace covalente o adsorción física, el complejo polímero-anticuerpo se lava en preparación para la muestra de prueba. Luego se agrega una parte alícuota de la muestra a analizar al complejo en fase sólida y se incuba durante un período de tiempo suficiente (por ejemplo, 2-40 minutos o durante la noche si es más conveniente) y en condiciones adecuadas (por ejemplo, de temperatura ambiente a 40°C, como entre 25°C y 32°C inclusive) para permitir la unión de cualquier subunidad presente en el anticuerpo. Después del período de incubación, la fase sólida de la subunidad del anticuerpo se lava y se seca e incuba con un segundo anticuerpo específico para una parte del biomarcador. El segundo anticuerpo está unido a una molécula indicadora que se usa para indicar la unión del segundo anticuerpo al marcador molecular.

En algunos ejemplos, se puede usar citometría de flujo (FACS) para detectar el nivel de proteína de un biomarcador. Las proteínas de superficie (como los KIR) pueden detectarse utilizando anticuerpos contra biomarcadores específicos. El citómetro de flujo detecta e informa la intensidad del anticuerpo marcado con fluorocromos, que indica el nivel de expresión del biomarcador. Las proteínas citoplásmicas no fluorescentes también se pueden observar al teñir las células permeables. La tinción puede ser un compuesto de fluorescencia capaz de unirse a ciertas moléculas, o un anticuerpo marcado con fluorocromo para unirse a la molécula de elección.

Un método alternativo consiste en inmovilizar los biomarcadores objetivo en la muestra y luego exponer el objetivo inmovilizado a un anticuerpo específico, que puede estar o no marcado con una molécula indicadora. Dependiendo de la cantidad del objetivo y la fuerza de la señal de la molécula indicadora, el objetivo enlazado puede ser detectable mediante un marcado directo con el anticuerpo. Alternativamente, el segundo anticuerpo marcado, específico para el primer anticuerpo se expone al complejo de objetivo-primer anticuerpo para formar un complejo terciario de objetivo-primer anticuerpo-segundo anticuerpo. El complejo es detectado por la señal emitida por una molécula indicadora marcada.

En el caso de un inmunoensayo enzimático, la enzima se conjuga con el segundo anticuerpo, generalmente mediante glutaraldehído o peryodato. Sin embargo, como se reconocerá fácilmente, existe una amplia variedad de técnicas de conjugación diferentes, que están fácilmente disponibles para el experto en la materia. Las enzimas usadas comúnmente incluyen la peroxidasa de rábano picante, la glucosa oxidasa, la beta-galactosidasa y la fosfatasa alcalina, y otras se discuten en este documento. Los sustratos a usar con las enzimas específicas se eligen generalmente para la producción, mediante hidrólisis por la enzima correspondiente, de un cambio de color detectable. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen fosfatasa alcalina y peroxidasa. También es posible emplear sustratos fluorogénicos, que producen un producto fluorescente en lugar de los sustratos cromogénicos mencionados anteriormente. En todos los casos, el anticuerpo marcado con enzima se agrega al complejo de primer anticuerpo-marcador molecular, se deja que se una, y luego el exceso de reactivo se elimina por lavado. Luego se agrega una solución que contiene el sustrato apropiado al complejo de anticuerpo-antígeno-anticuerpo. El sustrato reaccionará con la enzima ligada al segundo anticuerpo, dando una señal visual cualitativa, que puede cuantificarse después, generalmente espectrofotométricamente, para dar una indicación de la cantidad de biomarcador que estaba presente en la muestra. Alternativamente, compuestos fluorescentes, tales como la fluoresceína y la rodamina, pueden acoplarse químicamente a los anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Cuando se activa mediante la iluminación con luz de una longitud de onda particular, el anticuerpo marcado con fluorocromo adsorbe la energía de la luz, lo que induce un estado de excitabilidad en la molécula, seguido de la emisión de la luz en un color característico detectable visualmente con un microscopio óptico. Al igual que en el EIA, se permite que el anticuerpo marcado con fluorescencia se una al complejo primer anticuerpo-marcador molecular. Después de lavar el reactivo no unido, el complejo terciario restante se expone a la luz de la longitud de onda apropiada, la fluorescencia observada indica la presencia del marcador molecular de interés. Las técnicas de inmunofluorescencia y EIA están muy bien establecidas en la técnica y se discuten en este documento.

En algunos ejemplos, los métodos descritos en este documento incluyen determinar el nivel de proteína de uno o más biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 y GZMM en una muestra de un sujeto o un paciente con cáncer usando uno de los enfoques descritos en este documento o de

otro modo conocido en la técnica. En un ejemplo, el método incluye determinar el nivel de proteína KIR2DS2 a partir de una muestra de un sujeto o un paciente con cáncer. En un ejemplo, los métodos incluyen determinar el nivel de proteína KIR2DL2 a partir de una muestra de un sujeto o un paciente con cáncer. En un ejemplo, el método incluye determinar el nivel de proteína KIR2DS5 a partir de una muestra de un sujeto o un paciente con cáncer. En un ejemplo, el método incluye determinar el nivel de proteína KIR2DL5 a partir de una muestra de un sujeto o un paciente con cáncer. En un ejemplo, el método incluye determinar el nivel de proteína GZMM a partir de una muestra de un sujeto o un paciente con cáncer.

En algunos ejemplos, el nivel de proteína de KIR2DL5 es el nivel de proteína total de KIR2DL5A y KIR2DL5B. En algunos ejemplos, el nivel de proteína de KIR2DL5 es el nivel de proteína de KIR2DL5A. En algunos ejemplos, el nivel de proteína de KIR2DL5 es el nivel de proteína de KIR2DL5B.

En algunos ejemplos, los métodos descritos en este documento incluyen determinar los niveles de proteína de dos o más de estos biomarcadores. En algunos ejemplos, los métodos incluyen determinar los niveles de proteína de tres o más de estos biomarcadores. En algunos ejemplos, los métodos incluyen determinar los niveles de proteína de cuatro o más de estos biomarcadores. En algunos ejemplos, los métodos incluyen determinar los niveles de proteína de cinco de estos biomarcadores.

En algunos ejemplos, los métodos descritos en el presente documento incluyen además determinar los niveles de proteína de KIR2DS2 y KIR2DL2 en una muestra de un sujeto o un paciente con cáncer, y calcular la relación del nivel de proteína de KIR2DS2 respecto al nivel de proteína KIR2DL2 (la proporción de proteína 2DS2/2DL2). En algunos ejemplos, los métodos incluyen además determinar los niveles de proteínas de KIR2DS5 y KIR2DL5 en una muestra de un sujeto o un paciente con cáncer, y calcular la relación del nivel de proteína de KIR2DS5 respecto al nivel de proteínas KIR2DL5 (la proporción de proteínas 2DS5/2DL5). En algunos ejemplos, los métodos incluyen además determinar los niveles de proteína de KIR2DS2 y KIR2DL2 en una muestra de un sujeto o un paciente con cáncer, y los niveles de proteína de KIR2DS5 y KIR2DL5 en una muestra de un sujeto o un paciente con cáncer, y calcular tanto la relación de proteína 2DS2/2DL2 como la relación de proteína 2DS5/2DL5.

En algunos ejemplos, el nivel de proteína de uno o más biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 y GZMM se determina mediante inmunotransferencia (transferencia Western), ELISA, inmunohistoquímica, citometría de flujo, matriz de perlas citométricas o espectroscopia de masas. En algunos ejemplos, el nivel de proteína de uno o más biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 y GZMM se determina por ELISA.

3.3. Muestras

En algunas realizaciones, los métodos incluyen además obtener una muestra de un sujeto. El sujeto puede ser un mamífero, por ejemplo, un ser humano. El sujeto puede ser masculino o femenino, y puede ser un adulto, niño o bebé. El sujeto puede ser un paciente. El paciente puede ser un paciente con cáncer. Las muestras se pueden analizar en un momento dado durante la fase activa del cáncer (por ejemplo, linfoma, MDS o leucemia), o cuando el cáncer esté inactivo. En ciertas realizaciones, se puede obtener más de una muestra de un sujeto.

En algunas realizaciones, los métodos se realizan como un diagnóstico complementario del tratamiento con FTI. El diagnóstico complementario se puede realizar en la clínica donde se trata al sujeto. El diagnóstico complementario también se puede realizar en un sitio diferente al de la clínica donde se trata al sujeto.

En ciertas realizaciones, la muestra utilizada en los métodos proporcionados en el presente documento incluye fluidos corporales de un sujeto. Los ejemplos no limitantes de fluidos corporales incluyen sangre (p. ej., sangre entera periférica, sangre periférica), plasma sanguíneo, médula ósea, líquido amniótico, humor acuoso, bilis, linfa, menstruación, suero, orina, líquido cefalorraquídeo que rodea el cerebro y la columna vertebral, líquido sinovial que rodea las articulaciones óseas.

En una realización, la muestra es una muestra de médula ósea. Los procedimientos para obtener las muestras de la médula ósea son habituales en la técnica, incluidos, entre otros, biopsia de médula ósea y aspiración de la médula ósea. La médula ósea tiene una porción fluida y una porción más sólida. En las biopsias de la médula ósea, se toma una muestra de la porción sólida. En la aspiración de la médula ósea, se toma una muestra de la porción líquida. La biopsia de médula ósea y la aspiración de médula ósea se pueden realizar al mismo tiempo y se denomina examen de médula ósea.

En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de sangre. La muestra de sangre se puede obtener usando técnicas convencionales como se describe en, por ejemplo, Innis et al, editores, PCR Protocols (Academic Press, 1990). Los glóbulos blancos se pueden separar de las muestras de sangre mediante técnicas convencionales o kits disponibles en el mercado, p. ej. el kit RosetteSep (Stein Cell Technologies, Vancouver, Canadá). Subpoblaciones de glóbulos blancos, p. ej. las células mononucleares, las células NK, las células B, las células T, los monocitos, los granulocitos o los linfocitos se pueden aislar adicionalmente mediante técnicas convencionales, p. ej. clasificación celular activada magnéticamente (MACS) (Miltenyi Biotec, Auburn, California) o clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) (Becton Dickinson, San Jose, California).

En una realización, la muestra de sangre contiene de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 10,0 ml, de aproximadamente 0,2 ml a aproximadamente 7 ml, de aproximadamente 0,3 ml a aproximadamente 5 ml, de aproximadamente 0,4 ml a aproximadamente 3,5 ml, o de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 3 ml. En otra realización, la muestra de sangre contiene aproximadamente 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 ó 10,0 ml.

En algunas realizaciones, la muestra utilizada en los presentes métodos incluye una biopsia (por ejemplo, una biopsia de tumor). La biopsia puede ser de cualquier órgano o tejido, por ejemplo, piel, hígado, pulmón, corazón, colon, riñón, médula ósea, dientes, ganglios linfáticos, cabello, bazo, cerebro, senos u otros órganos. Cualquier técnica de biopsia conocida por los expertos en la técnica puede usarse para aislar una muestra de un sujeto, por ejemplo, biopsia abierta, biopsia cerrada, biopsia central, biopsia incisional, biopsia por escisión o biopsia por aspiración con aguja fina.

En una realización, la muestra usada en los métodos proporcionados en este documento se obtiene del sujeto antes de que el sujeto reciba un tratamiento para la enfermedad o trastorno. En otra realización, la muestra se obtiene del sujeto mientras el sujeto recibe el tratamiento para la enfermedad o trastorno. En otra realización, la muestra se obtiene del sujeto después de que el sujeto reciba el tratamiento para la enfermedad o trastorno. En diversas realizaciones, el tratamiento incluye administrar un FTI al sujeto.

En ciertas realizaciones, la muestra usada en los métodos proporcionados en el presente documento incluye una pluralidad de células. Dichas células pueden incluir cualquier tipo de células, por ejemplo, células madre, células sanguíneas (por ejemplo, PBMC), linfocitos, células NK, células B, células T, monocitos, granulocitos, células inmunitarias o células tumorales o cancerosas. En ciertas realizaciones, la muestra usada en los métodos proporcionados en el presente documento incluye una pluralidad de células NK enriquecidas de una muestra de sangre o una muestra de médula ósea de un sujeto, o un paciente con cáncer. Se pueden obtener poblaciones de células específicas utilizando una combinación de anticuerpos disponibles en el mercado (por ejemplo, Quest Diagnostic (San Juan Capistrano, Calif.); Dako (Dinamarca)).

En ciertas realizaciones, la muestra utilizada en los métodos proporcionados en este documento proviene de un tejido enfermo, por ejemplo, de un individuo que tiene cáncer (por ejemplo, linfoma, MDS o leucemia). En ciertas realizaciones, las células pueden obtenerse a partir del tumor o de las células cancerosas o de un tejido tumoral, tal como una biopsia de tumor o un explante de tumor. En ciertas realizaciones, el número de células utilizadas en los métodos proporcionados en el presente documento puede variar desde una sola célula hasta aproximadamente 10^9 células. En algunas realizaciones, el número de células utilizadas en los métodos proporcionados en este documento es de aproximadamente 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 ó 5×10^8 .

El número y el tipo de células recolectadas de un sujeto se pueden monitorear, por ejemplo, midiendo los cambios en la morfología y en los marcadores de la superficie celular usando técnicas de detección de células estándar tales como citometría de flujo, clasificación de células, inmunocitoquímica (por ejemplo, tinción con anticuerpos específicos de tejidos o específicos marcadores de células), clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), clasificación de células activadas magnéticamente (MACS), mediante el examen de la morfología de las células usando microscopía de luz o confocal, y/o midiendo los cambios en la expresión de genes utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, tales como PCR y perfiles de expresión génica. Estas técnicas también pueden utilizarse para identificar células que sean positivas para uno o más marcadores en particular. La clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) es un método bien conocido para separar partículas, incluidas las células, basado en las propiedades fluorescentes de las partículas (Kamarch, 1987, Methods Enzymol, 151: 150-165). La excitación con láser de los restos fluorescentes en las partículas individuales da como resultado una pequeña carga eléctrica que permite la separación electromagnética de partículas positivas y negativas de una mezcla. En una realización, los anticuerpos o ligandos específicos de marcadores de la superficie celular están marcados con distintos marcadores fluorescentes. Las células se procesan a través del clasificador de células, lo que permite la separación de las células en función de su capacidad para unirse a los anticuerpos utilizados. Las partículas clasificadas por FACS pueden depositarse directamente en pocillos individuales de placas de 96 pocillos o de 384 pocillos para facilitar la separación y la clonación.

En ciertas realizaciones, se usan subconjuntos de células en los métodos proporcionados en el presente documento. Los métodos para clasificar y aislar poblaciones específicas de células son habituales en la técnica y pueden basarse en el tamaño celular, la morfología o los marcadores intracelulares o extracelulares. Tales métodos incluyen, entre otros, citometría de flujo, clasificación de flujo, FACS, separación basada en perlas, tal como clasificación de células magnéticas, separación basada en tamaños (por ejemplo, un tamiz, una serie de obstáculos o un filtro), clasificación en un dispositivo de microfluidos, separación basada en anticuerpos, sedimentación, adsorción por afinidad, extracción por afinidad, centrifugación en gradiente de densidad, microdissección con captura láser, etc. En algunas realizaciones, la muestra incluye células NK enriquecidas clasificadas por uno o más métodos descritos en el presente documento, o conocidos de otro modo en la técnica. En un ejemplo, las células NK enriquecidas se expanden adicionalmente in vitro antes de ser sometidas al genotipado KIR, el genotipado HLA o el análisis del nivel de expresión de uno o más biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 y GZMM.

La muestra puede ser una muestra de sangre completa, una muestra de médula ósea, una muestra de sangre parcialmente purificada, PBMC o biopsia de tejido. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de médula ósea de un paciente con cáncer. En algunas realizaciones, la muestra son PBMC de un paciente con cáncer. En algunas realizaciones, la muestra está enriquecida con células NK de médula ósea, sangre total o sangre parcialmente purificada. En algunas realizaciones, las células NK se expanden adicionalmente in vitro. Los métodos para obtener una muestra de un sujeto y los métodos para preparar la muestra para determinar el nivel de ARNm o el nivel de proteína de uno o más biomarcadores son habituales en la técnica.

3.4. Niveles de referencia y relaciones de referencia

En el presente documento se describe un FTI para usar en métodos que tratan a sujetos con una cantidad terapéuticamente eficaz del FTI o que seleccionan a pacientes con cáncer para un tratamiento con FTI, basado en el genotipado KIR, el nivel de expresión (ya sea el nivel de ARNm o el nivel de proteína) de uno o más de los biomarcadores individuales seleccionados del grupo formado por KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 y GZMM, o cualquiera o ambos de la relación de los niveles de expresión entre biomarcadores (la relación 2DS2/2DL2; la relación 2DS5/2DL5). En algunos ejemplos, un paciente con cáncer se selecciona para el tratamiento con FTI si el paciente con cáncer es un portador de KIR2DS2 o KIR2DS5, o ambos. En algunos ejemplos, el paciente con cáncer se selecciona para el tratamiento con FTI siempre que:

- (i) el nivel de expresión de KIR2DS2 en la muestra del sujeto sea más alto que el nivel de expresión de referencia de KIR2DS2;
- (ii) el nivel de expresión de KIR2DL2 en la muestra del sujeto sea inferior al nivel de expresión de referencia de KIR2DL2;
- (iii) el nivel de expresión de KIR2DS5 en la muestra del sujeto sea más alto que el nivel de expresión de referencia de KIR2DS5;
- (iv) el nivel de expresión de KIR2DL5 en la muestra del sujeto sea inferior al nivel de expresión de referencia de KIR2DL5;
- (v) el nivel de expresión de GZMM en la muestra del sujeto sea más alto que el nivel de expresión de referencia de GZMM;
- (vi) la relación entre el nivel de expresión de KIR2DS2 y el nivel de expresión de KIR2DL2 en la muestra del sujeto sea mayor que la relación de referencia de un nivel de expresión de KIR2DS2 respecto a un nivel de expresión de KIR2DL2; o
- (vii) la relación entre el nivel de expresión de KIR2DS5 y el nivel de expresión de KIR2DL5 en la muestra del sujeto sea mayor que la relación de referencia de un nivel de expresión de KIR2DS5 respecto a un nivel de expresión de KIR2DL5; o cualquier combinación de (i)-(vii).

Los métodos descritos en el presente documento pueden incluir además determinar un nivel de expresión de referencia de cada biomarcador individual seleccionado del grupo que consiste en KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 y GZMM, o la relación de referencia entre el nivel de expresión de los biomarcadores, incluida la relación de referencia 2DS2/2DL2 y la relación 2DS5/2DL5 de referencia. En algunos ejemplos, el nivel de expresión de referencia de un biomarcador es el nivel de expresión del biomarcador en una muestra de un individuo sano, o el nivel de expresión promedio o medio del biomarcador en múltiples muestras de uno o varios individuos sanos. En algunos ejemplos, el nivel de expresión de referencia de un biomarcador es el nivel de expresión promedio del biomarcador en muestras de 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más individuos sanos. En algunos ejemplos, el nivel de expresión de referencia de un biomarcador es el nivel de expresión medio del biomarcador en muestras de 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más individuos sanos.

En algunos ejemplos, el nivel de expresión de referencia de KIR2DS2 es el nivel de expresión de KIR2DS2 en una muestra de un individuo sano, o el nivel de expresión promedio o medio de KIR2DS2 en muestras múltiples de uno o varios individuos sanos. En algunos ejemplos, el nivel de expresión de referencia de KIR2DL2 es el nivel de expresión de KIR2DL2 en una muestra de un individuo sano, o el nivel de expresión promedio o medio de KIR2DL2 en muestras múltiples de uno o varios individuos sanos. En algunos ejemplos, el nivel de expresión de referencia de KIR2DS5 es el nivel de expresión de KIR2DS5 en una muestra de un individuo sano, o el nivel de expresión promedio o medio de KIR2DS5 en muestras múltiples de uno o varios individuos sanos. En algunos ejemplos, el nivel de expresión de referencia de KIR2DL5 es el nivel de expresión de KIR2DL5 en una muestra de un individuo sano, o el nivel de expresión promedio o medio de KIR2DL5 en muestras múltiples de uno o varios individuos sanos. En algunos ejemplos, el nivel de expresión de referencia de GZMM es el nivel de expresión de GZMM en una muestra de un individuo sano, o el nivel de expresión promedio o medio del GZMM en múltiples muestras de uno o varios individuos sanos.

En algunos ejemplos, los métodos descritos en este documento incluyen además determinar una relación de referencia entre los niveles de expresión de dos biomarcadores, como la relación de expresión de referencia

2DS2/2DL2, o la relación de expresión de referencia 2DS5/2DL5. En algunos ejemplos, la relación de expresión de referencia de los biomarcadores es la relación de expresión de los biomarcadores en una muestra de un individuo sano, o la relación de expresión promedio o media de los biomarcadores en múltiples muestras de uno o varios individuos sanos. En algunos ejemplos, la relación de expresión de referencia de dos biomarcadores es la relación de expresión promedio de los biomarcadores en muestras de 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más individuos sanos. En algunos ejemplos, la relación de expresión de referencia de dos biomarcadores es la relación de expresión media de los biomarcadores en muestras de 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más individuos sanos.

En algunos ejemplos, la relación de referencia 2DS2/2DL2 es la relación 2DS2/2DL2 en una muestra de un individuo sano, o la proporción promedio o media de 2DS2/2DL2 en muestras múltiples de uno o varios individuos sanos. En algunos ejemplos, la relación de referencia 2DS5/2DL5 es el 2DS5/2DL5 en una muestra de un individuo sano, o el promedio o la media de 2DS5/2DL5 en múltiples muestras de uno o varios individuos sanos.

En algunos ejemplos, el nivel de expresión de referencia de un biomarcador o la relación de referencia entre los niveles de expresión de dos biomarcadores se puede determinar en función del análisis estadístico de los datos de los ensayos clínicos anteriores, incluido el resultado de un grupo de pacientes, a saber, la capacidad de respuesta de los pacientes a un tratamiento con FTI, así como los niveles de expresión del biomarcador o la relación de los niveles de expresión entre biomarcadores del grupo de pacientes. Una serie de métodos estadísticos son habituales en la técnica para determinar el nivel de referencia (o denominado "valor de corte") de uno o más biomarcadores cuando se usan para predecir la capacidad de respuesta de un paciente a un tratamiento particular, o para clasificar a los pacientes para un tratamiento particular.

Un método incluye analizar perfiles de expresión génica para los biomarcadores identificados en el presente documento que distinguen al respondedor del no respondedor para determinar el nivel de expresión de referencia para uno o más biomarcadores. Las comparaciones entre respondedores y no respondedores se pueden realizar utilizando la prueba U de Mann-Whitney, la prueba de Chi cuadrado o la prueba exacta de Fisher. El análisis de las estadísticas descriptivas y las comparaciones se pueden realizar utilizando el software SigmaStat (Systat Software, Inc., San José, California, EE. UU.).

En algunos ejemplos, se puede adoptar un análisis del árbol de clasificación y regresión (CART) para determinar el nivel de referencia. El análisis de CART se basa en un algoritmo binario de partición recursiva y permite el descubrimiento de interacciones variables predictoras complejas que pueden no ser evidentes con los métodos más tradicionales, como la regresión lineal múltiple. La partición recursiva binaria se refiere al análisis que es: 1) binario, lo que significa que hubo dos posibles variables de resultado, a saber, "respondedores" y "no respondedores", con el efecto de dividir a los pacientes en 2 grupos; 2) recursivo, lo que significa que el análisis se puede realizar varias veces; y 3) particionado, lo que significa que todo el conjunto de datos se puede dividir en secciones. Este análisis también tiene la capacidad de eliminar las variables predictoras con un rendimiento bajo. El árbol de clasificación se puede construir utilizando Salford Predictive Modeler v6.6 (Salford Systems, San Diego, California, EE. UU.).

Los artículos descritos en este documento son representaciones de los perfiles de expresión génica útiles para predecir la capacidad de respuesta de un paciente con cáncer frente a un tratamiento con FTI que se reduce a un medio que se puede leer automáticamente, como medios legibles por computadora (magnéticos, ópticos y similares). Los artículos también pueden incluir instrucciones para evaluar los perfiles de expresión génica en dichos medios. Por ejemplo, los artículos pueden comprender un CD-ROM con instrucciones informáticas para comparar los perfiles de expresión génica de los biomarcadores descritos anteriormente. Los artículos también pueden tener perfiles de expresión génica grabados digitalmente en los mismos para que puedan compararse con los datos de expresión génica de las muestras de los pacientes. Alternativamente, los perfiles se pueden grabar en diferentes formatos de representación. Los algoritmos de agrupación en clúster, como los incorporados en los programas informáticos "OMNIVIZ" y "TREE VIEW" mencionados anteriormente, pueden ayudar mejor en la visualización de dichos datos.

El análisis de la Característica del Operador del Receptor (ROC) se puede utilizar para determinar el nivel de expresión de referencia o la relación de expresión de referencia, o probar el valor predictivo general de genes individuales y/o clasificadores multigénicos. Se puede encontrar una revisión del análisis ROC en Soreide, J Clin Pathol 10.1136 (2008).

El nivel de referencia se puede determinar a partir de la curva ROC del conjunto de instrucción para garantizar una alta sensibilidad y una alta especificidad. Para determinar cuántos biomarcadores se necesitan para ser incluidos en el predictor, se puede usar la validación cruzada de dejar uno fuera (LOOCV). Se registran los puntajes de respuesta para las muestras "excluidas" basadas en diferentes números de genes. Los rendimientos de los predictores con diferentes números de genes pueden evaluarse en función de la tasa de error de clasificación errónea, la sensibilidad, la especificidad, los valores de p que miden la separación de las curvas de Kaplan-Meier de los dos grupos predichos.

El algoritmo Top Pair Scoring Pair (TSP) introducido por primera vez por Geman et al. (2004) puede ser utilizado. En esencia, el algoritmo clasifica todos los pares de genes (genes i y j) según la diferencia absoluta (D_{ij}) en la frecuencia del evento donde el gen i tiene un valor de expresión más alto que el gen j en muestras entre la clase C1

- y C2. En los casos en los que hay varios pares de puntajes superiores (todos compartiendo el mismo Dij), se selecciona el par superior por un puntaje de intervalo secundario que mide la magnitud a la que se producen las inversiones de los niveles de expresión génica de una clase a otra dentro de un par de genes. El par superior con la frecuencia más alta de Dij absoluto > 2 veces en todas las muestras se seleccionará como par candidato. El par candidato se puede evaluar en un conjunto de datos de pruebas independientes. La validación cruzada de dejar-uno-fuera (LOOCV) se puede llevar a cabo en el conjunto de datos de instrucción para evaluar cómo se realiza el algoritmo. Los rendimientos de los predictores pueden evaluarse en función de la tasa máxima de errores de clasificación errónea. Todos los análisis estadísticos se pueden hacer utilizando R (R Development Core Team, 2006).
- 5
- 10 Una revisión de los métodos y herramientas estadísticas útiles para determinar el nivel de referencia se puede encontrar en James Westgard, Ph.D., Basic Methods Validation, 3ª edición (2008). Se hacen referencias específicas al Capítulo 9 ("How is reportable range of a method determined") y al Capítulo 15 ("How is a reference interval verified").
- 15 El intervalo clínicamente informativo (CRR) es el intervalo de valores de análisis que un método puede medir, lo que permite la dilución de la muestra, la concentración u otro tratamiento previo utilizado para extender el intervalo de medición analítica directa. Como se indica en la Validación de Métodos Básicos por el Dr. Westgard, el experimento que se realiza a menudo se denomina "experimento de linealidad", aunque técnicamente no existe el requisito de que un método proporcione una respuesta lineal a menos que se utilice una calibración de dos puntos. Este intervalo también puede denominarse "intervalo lineal", "intervalo analítico" o "intervalo de trabajo" para un método.
- 20 El intervalo de notificación se evalúa mediante la inspección del gráfico de linealidad. Esa inspección puede implicar trazar manualmente la mejor línea recta a través de la porción lineal de los puntos, dibujar una línea punto a punto a través de todos los puntos y luego comparar con la mejor línea recta, o ajustar una línea de regresión a través de los puntos en el intervalo lineal. Existen cálculos estadísticos más complicados que se recomiendan en algunas pautas, como el protocolo EP-6 del Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico (CLSI) para evaluar la linealidad de los métodos analíticos. Pero comúnmente se acepta que el intervalo de notificación se puede determinar adecuadamente a partir de una evaluación "visual", es decir, dibujando manualmente la mejor línea recta que se ajuste a los puntos más bajos de la serie. El Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico (CLSI) recomienda un mínimo de al menos 4 niveles de concentración, preferiblemente 5 diferentes. Se pueden usar más de 5, especialmente si se debe maximizar el límite superior del intervalo notificable, pero 5 niveles son convenientes y casi siempre suficientes.
- 25
- 30 Un intervalo de referencia se establece típicamente analizando muestras que se obtienen de individuos que cumplen con criterios cuidadosamente definidos (grupo de muestra de referencia). Protocolos como los del Panel de Expertos de la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC) en Teoría de los Valores de Referencia y el CLSI delinean procedimientos sistemáticos integrales que utilizan grupos de muestras de referencia cuidadosamente seleccionados para establecer intervalos de referencia. Estos protocolos generalmente requieren un mínimo de 120 personas de referencia para cada grupo (o subgrupo) que se debe caracterizar.
- 35
- 40 La directriz aprobada por el CLSI C28-A2 describe diferentes formas en las que un laboratorio puede validar la transferencia de los intervalos de referencia establecidos al laboratorio individual que incluye 1. El juicio divino, en el que el laboratorio simplemente revisa la información presentada y verifica subjetivamente que los intervalos de referencia son aplicables a la población de pacientes y métodos de prueba del laboratorio adoptante; 2. Verificación con 20 muestras, en donde la validación experimental se realiza mediante la recopilación y el análisis de muestras de 20 individuos que representan la población de la muestra de referencia; 3. Estimación con 60 muestras, en la que se realiza una validación experimental mediante la recopilación y el análisis de muestras de 60 individuos que representan la población de muestras de referencia, y el intervalo de referencia real se estima y compara con el intervalo reivindicado o informado utilizando una fórmula estadística que compara las desviaciones medias y estándar de las dos poblaciones; y 4. Cálculo a partir del método comparativo, en el que se puede ajustar o corregir los intervalos de referencia reivindicados o informados sobre la base del sesgo metodológico observado y la relación matemática demostrada entre los métodos analíticos utilizados.
- 45
- 50 Cualquier persona con experiencia ordinaria en la técnica entiende que el nivel de expresión de referencia de los biomarcadores descritos en el presente documento así como las relaciones de referencia entre los dos biomarcadores pueden determinarse mediante uno o más métodos como los descritos en este documento u otros métodos conocidos en la técnica.
- Por consiguiente, en algunos ejemplos, los métodos descritos en el presente documento incluyen:
- 55 a) determinar el nivel de expresión de referencia de un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5, GZMM; y
- b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI a un paciente con cáncer siempre que:
- (i) el nivel de expresión de KIR2DS2 en la muestra del paciente con cáncer sea más alto que el nivel de expresión de referencia de KIR2DS2;

(ii) el nivel de expresión de KIR2DL2 en la muestra del paciente con cáncer sea más bajo que el nivel de expresión de referencia de KIR2DL2;

(iii) el nivel de expresión de KIR2DS5 en la muestra del paciente con cáncer sea más alto que el nivel de expresión de referencia de KIR2DS5;

5 (iv) el nivel de expresión de KIR2DL5 en la muestra del paciente con cáncer sea más bajo que el nivel de expresión de referencia de KIR2DL5; o

(v) el nivel de expresión de GZMM en la muestra del paciente con cáncer sea más alto que el nivel de expresión de referencia de GZMM; o cualquier combinación de (i)-(v).

10 En algunos ejemplos, el nivel de expresión de KIR2DL5 son los niveles de expresión totales de KIR2DL5A y KIR2DL5B. En algunos ejemplos, el nivel de expresión de KIR2DL5 es el nivel de expresión de KIR2DL5A. En algunos ejemplos, el nivel de expresión de KIR2DL5 es el nivel de expresión de KIR2DL5B.

Por consiguiente, en algunos ejemplos, los métodos descritos en el presente documento incluyen:

a) determinar el nivel de ARNm de referencia de un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5, GZMM; y

15 b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI a un paciente con cáncer siempre que:

(i) el nivel de ARNm de KIR2DS2 en la muestra del paciente con cáncer sea más alto que el nivel de ARNm de referencia de KIR2DS2;

(ii) el nivel de ARNm de KIR2DL2 en la muestra del paciente con cáncer sea más bajo que el nivel de ARNm de referencia de KIR2DL2;

20 (iii) el nivel de ARNm de KIR2DS5 en la muestra del paciente con cáncer sea más alto que el nivel de ARNm de referencia de KIR2DS5;

(iv) el nivel de ARNm de KIR2DL5 en la muestra del paciente con cáncer sea más bajo que el nivel de ARNm de referencia de KIR2DL5; o

25 (v) el nivel de ARNm de GZMM en la muestra del paciente con cáncer sea más alto que el nivel de ARNm de referencia de GZMM; o cualquier combinación de (i)-(v).

En algunos ejemplos, el nivel de ARNm de KIR2DL5 son los niveles totales de ARNm de KIR2DL5A y KIR2DL5B. En algunos ejemplos, el nivel de ARNm de KIR2DL5 es el nivel de ARNm de KIR2DL5A. En algunos ejemplos, el nivel de ARNm de KIR2DL5 es el nivel de ARNm de KIR2DL5B.

Por consiguiente, en algunos ejemplos, los métodos proporcionados en el presente documento incluyen:

30 a) determinar el nivel de proteína de referencia de un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5, GZMM; y

b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI a un paciente con cáncer siempre que:

(i) el nivel de proteína de KIR2DS2 en la muestra del paciente con cáncer sea más alto que el nivel de proteína de referencia de KIR2DS2;

35 (ii) el nivel de proteína de KIR2DL2 en la muestra del paciente con cáncer sea más bajo que el nivel de proteína de referencia de KIR2DL2;

(iii) el nivel de proteína de KIR2DS5 en la muestra del paciente con cáncer sea más alto que el nivel de proteína de referencia de KIR2DS5;

40 (iv) el nivel de proteína de KIR2DL5 en la muestra del paciente con cáncer sea más bajo que el nivel de proteína de referencia de KIR2DL5; o

(v) el nivel de proteína de GZMM en la muestra del paciente con cáncer sea más alto que el nivel de proteína de referencia de GZMM; o cualquier combinación de (i)-(v).

45 En algunos ejemplos, el nivel de proteína de KIR2DL5 son los niveles de proteína total de KIR2DL5A y KIR2DL5B. En algunos ejemplos, el nivel de proteína de KIR2DL5 es el nivel de proteína de KIR2DL5A. En algunos ejemplos, el nivel de proteína de KIR2DL5 es el nivel de proteína de KIR2DL5B.

En algunos ejemplos, los métodos descritos en este documento incluyen:

a) determinar la relación de referencia 2DS2/2DL2, o la relación de referencia 2DS5/2DL5; y

b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI a un paciente con cáncer siempre que:

(i) la relación 2DS2/2DL2 en la muestra del paciente con cáncer sea más alta que la relación de referencia 2DS2/2DL2; o

5 (ii) la proporción 2DS5/2DL5 en la muestra del paciente con cáncer sea más alta que la relación de referencia 2DS5/2DL5; o ambos (i) y (ii).

En algunos ejemplos, la relación 2DS2/2DL2 es la relación entre el nivel de ARNm de KIR2DS2 y el nivel de ARNm de KIR2DL2. En algunos ejemplos, la relación 2DS2/2DL2 es la relación entre el nivel de proteína KIR2DS2 y el nivel de proteína KIR2DL2. En algunos ejemplos, la proporción 2DS5/2DL5 es la relación entre el nivel de ARNm de KIR2DS5 y el nivel de ARNm de KIR2DL5. En algunos ejemplos, la relación 2DS5/2DL5 es la relación entre el nivel de proteína KIR2DS5 y el nivel de proteína KIR2DL5.

3.5. Cánceres

En el presente documento se describe un FTI para usar en métodos para tratar un cáncer en un sujeto con el FTI, y métodos para seleccionar pacientes con cáncer para un tratamiento con FTI. El cáncer puede ser un cáncer hematopoyético o un tumor sólido. En el presente documento se describen también métodos para tratar una afección premaligna en un sujeto con un FTI, y métodos para seleccionar pacientes con una afección premaligna para un tratamiento con FTI. En algunas realizaciones, el FTI es el tipifarnib.

En algunos ejemplos, en el presente documento se describe un FTI para usar en métodos para tratar un cáncer hematopoyético en un sujeto con el FTI o seleccionar pacientes con cáncer para un tratamiento con FTI. Los cánceres hematológicos son cánceres de la sangre o de la médula ósea. Los ejemplos de cánceres hematológicos (o hematógenos) incluyen leucemias, linfoma y síndrome mielodisplásico (MDS).

La leucemia se refiere a neoplasias malignas de los tejidos formadores de sangre. Se describen varias formas de leucemias, por ejemplo, en la patente de EE.UU. No. 7.393.862 y la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos No. 60/380.842, presentada el 17 de mayo de 2002. Aunque, según se describe, los virus causan varias formas de leucemia en animales, las causas de la leucemia en humanos son, en gran medida, desconocidas. El Manual Merck, 944-952 (17^a ed. 1999). La transformación a malignidad ocurre típicamente en una sola célula a través de dos o más pasos con la proliferación subsiguiente y la expansión clonal. En algunas leucemias, se han identificado translocaciones cromosómicas específicas con morfología celular leucémica consistente y características clínicas especiales (por ejemplo, translocaciones de 9 y 22 en la leucemia mielocítica crónica, y de 15 y 17 en la leucemia promielocítica aguda). Las leucemias agudas son predominantemente poblaciones de células indiferenciadas y las leucemias crónicas son formas de células más maduras.

Las leucemias agudas se dividen en los tipos linfoblásticos (LLA) y no linfoblásticos (ANLL). El Manual Merck, 946-949 (17^a ed. 1999). Se pueden subdividir aún más por su apariencia morfológica y citoquímica según la clasificación franco-estadounidense-británica (FAB) o según su tipo y grado de diferenciación. El uso de anticuerpos monoclonales específicos de células B y T y de antígeno mielóide es más útil para la clasificación. La ALL es predominantemente una enfermedad infantil que se establece mediante los hallazgos de laboratorio y el examen de médula ósea. La ANLL, también conocida como leucemia mielógena aguda o AML, ocurre en todas las edades y es la leucemia aguda más común entre los adultos; es la forma generalmente asociada con la irradiación como agente causal. En algunos ejemplos, en el presente documento se describe un FTI para usar en métodos para tratar a un paciente con LMA con el FTI, o métodos para seleccionar pacientes para el tratamiento con FTI.

Los procedimientos estándar para tratar a los pacientes con AML suelen incluir 2 fases de quimio (quimioterapia): inducción de la remisión (o inducción) y consolidación (terapia posterior a la remisión). La primera parte del tratamiento (inducción de la remisión) está dirigida a eliminar la mayor cantidad posible de células leucémicas. La intensidad del tratamiento puede depender de la edad y la salud de la persona. La quimioterapia intensiva a menudo se administra a personas menores de 60 años. Algunos pacientes mayores que gozan de buena salud pueden beneficiarse de un tratamiento similar o ligeramente menos intensivo. Las personas que son mucho mayores o que tienen mala salud no son adecuadas para las quimioterapias intensivas.

En pacientes más jóvenes, como los menores de 60 años, la inducción a menudo implica el tratamiento con 2 medicamentos quimioterapéuticos, citarabina (ara-C) y un medicamento de antraciclina como la daunorubicina (daunomicina) o idarubicina. Algunas veces también se administra un tercer medicamento, cladribina (Leustatina, 2-CdA). La quimioterapia generalmente se administra en el hospital y dura aproximadamente una semana. En casos raros en los que la leucemia se ha extendido al cerebro o a la médula espinal, también se puede administrar quimioterapia en el líquido cefalorraquídeo (LCR). La radioterapia también podría usarse.

La inducción se considera exitosa si se logra la remisión. Sin embargo, la LMA en algunos pacientes puede ser refractaria a la inducción. En los pacientes que responden a la inducción, se administra entonces un tratamiento para tratar de destruir las células leucémicas restantes y ayudar a prevenir las recaídas, lo que se denomina la

consolidación. Para los pacientes más jóvenes, las principales opciones para la terapia de consolidación son: varios ciclos de quimioterapia con altas dosis de citarabina (ara-C) (a veces conocida como HiDAC); trasplante alogénico de células madre (donante); y trasplante autólogo de células madre.

5 Las leucemias crónicas se describen como linfocíticas (CLL) o mielocíticas (CML). El Manual Merck, 949-952 (17^a ed. 1999). La CLL se caracteriza por la aparición de linfocitos maduros en la sangre, la médula ósea y los órganos linfoides. El sello distintivo de la CLL es la linfocitosis absoluta ($> 5.000/\mu\text{L}$) y un aumento de linfocitos en la médula ósea. La mayoría de los pacientes con CLL también presentan expansión clonal de linfocitos con características de células B. La CLL es una enfermedad que se presenta en la edad media o avanzada. En la CML, el rasgo característico es el predominio de células granulocíticas en todas las etapas de diferenciación en la sangre, médula
10 ósea, hígado, bazo y otros órganos. En el paciente sintomático en el momento del diagnóstico, el recuento total de glóbulos blancos (WBC, por sus siglas en inglés) suele ser de aproximadamente $200.000/\mu\text{L}$, pero puede llegar a ser $1.000.000/\mu\text{L}$. La CML es relativamente fácil de diagnosticar debido a la presencia del cromosoma Filadelfia. Se sabe que las células estromales de la médula ósea facilitan la progresión de la enfermedad de la CLL y la resistencia a la quimioterapia. Interrumpir las interacciones entre las células de la CLL y las células del estroma es un objetivo adicional de la quimioterapia para la CLL.
15

Además, otras formas de LLC incluyen la leucemia prolinfocítica (PLL), la leucemia de linfocitos granulares grandes (LGL), la leucemia de células pilosas (HCL). Las células cancerosas en la PLL son similares a las células normales llamadas prolinfocitos, formas inmaduras de los linfocitos B (B-PLL) o linfocitos T (T-PLL). Tanto B-PLL como T-PLL tienden a ser más agresivos que el tipo habitual de CLL. Las células cancerosas de LGL son grandes y tienen características de células T o NK. La mayoría de las leucemias LGL son de crecimiento lento, pero un número pequeño es más agresivo. La HCL es otro tipo de cáncer de linfocitos que tiende a progresar lentamente y representa aproximadamente el 2% de todas las leucemias. Las células cancerosas son un tipo de linfocito B, pero son diferentes de las que se observan en la CLL.
20

La leucemia mielomonocítica crónica (LMCM) se clasifica como una neoplasia mielodisplásica/mieloproliferativa según la clasificación de tumores hematopoyéticos del 2008 de la Organización Mundial de la Salud. Los pacientes con CMML tienen un alto número de monocitos en su sangre (al menos 1.000 por mm^3). Dos clases, mielodisplásicas y mieloproliferativas, se han distinguido según el nivel del recuento de los glóbulos blancos (umbral 13 G/L). A menudo, el recuento de monocitos es mucho mayor, lo que hace que su recuento total de glóbulos blancos también sea muy alto. Por lo general, hay células anormales en la médula ósea, pero la cantidad de blastos es inferior al 20%. Alrededor del 15% al 30% de los pacientes con CMML desarrollan leucemia mieloide aguda. El diagnóstico de CMML se basa en una combinación de anomalías morfológicas, histopatológicas y cromosómicas en la médula ósea. El modelo de pronóstico de Mayo clasificó a los pacientes con CMML en tres grupos de riesgo según: aumento en el conteo absoluto de monocitos, presencia de blastos circulantes, hemoglobina $<10 \text{ g/dL}$ y plaquetas $<100 \times 10^9/\text{L}$. La supervivencia media fue de 32 meses, 18,5 meses y 10 meses en los grupos de riesgo bajo, intermedio y alto, respectivamente. La clasificación de Groupe Francophone des (GFM) segregó a los pacientes de CMML en tres grupos de riesgo según: una edad > 65 años, $\text{WBC} > 15 \times 10^9/\text{L}$, anemia, plaquetas $< 100 \times 10^9/\text{L}$, y estado de mutación ASXL1. Después de un seguimiento medio de 2,5 años, la supervivencia varió de no alcanzada en el grupo de bajo riesgo a 14,4 meses en el grupo de alto riesgo.
25
30
35

El linfoma se refiere a los cánceres que se originan en el sistema linfático. El linfoma se caracteriza por neoplasias malignas de linfocitos: linfocitos B (linfoma de células B), linfocitos T (linfoma de células T) y células asesinas naturales (linfoma de células NK). El linfoma generalmente comienza en los ganglios linfáticos o en la acumulación de tejido linfático en órganos que incluyen, entre otros, el estómago o los intestinos. El linfoma puede afectar a la médula ósea y a la sangre en algunos casos. El linfoma se puede diseminar de un sitio a otras partes del cuerpo.
40

Los tratamientos de varias formas de linfomas se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. No. 7.468.363. Dichos linfomas incluyen, entre otros, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma cutáneo de células B, linfoma activado de células B, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma de células del manto (MCL), linfoma folicular (FL; incluyendo, entre otros, FL grado I, FL grado II), linfoma del centro folicular, linfoma transformado, linfoma linfocítico de diferenciación intermedia, linfoma linfocítico intermedio (ILL), linfoma linfocítico difuso pobremente diferenciado (PDL), linfoma centrocítico, linfoma de células escindidas pequeñas difuso (DSCCL),
45
50 linfomas de células T periféricas (PTCL), linfoma de células T cutáneas (CTCL) y linfoma de la zona del manto y linfoma folicular de bajo grado.

El linfoma no Hodgkin (LNH) es el quinto cáncer más común entre hombres y mujeres en los Estados Unidos con una estimación de 63.190 casos nuevos y 18.660 muertes en 2007. Jemal A, et al., CA Cancer J Clin 2007; 57 (1): 43-66. La probabilidad de desarrollar LNH aumenta con la edad y la incidencia de LNH en los ancianos ha aumentado de manera constante en la última década, lo que ha generado preocupación por el envejecimiento de la población de los EE. UU. Id. Clarke C A, et al., Cancer 2002; 94 (7): 2015-2023.
55

La DLBCL representa aproximadamente un tercio de los linfomas no Hodgkin. Mientras que algunos pacientes con DLBCL se curan con quimioterapia tradicional, el resto muere a causa de la enfermedad. Los fármacos contra el cáncer causan el agotamiento rápido y persistente de los linfocitos, posiblemente por la inducción directa de la apoptosis en células T y B maduras. Véase K. Stahnke. et al., Blood 2001, 98: 3066-3073. Se ha demostrado que el
60

recuento absoluto de linfocitos (ALC) es un factor pronóstico en el linfoma folicular no Hodgkin y resultados recientes han sugerido que el ALC en el momento del diagnóstico es un factor pronóstico importante en la DLBCL.

La DLBCL se puede dividir en distintos subtipos moleculares de acuerdo con sus patrones de perfiles de genes: DLBCL tipo células B del centro germinal (GCB-DLBCL), DLBCL tipo células B activadas (ABC-DLBCL) y linfoma mediastínico de células B primarias (PMBL) o tipo sin clasificar. Estos subtipos se caracterizan por diferencias distintivas en la supervivencia, la quimiorreactividad y la dependencia de la vía de señalización, en particular la vía NF- κ B. Véase D. Kim et al., *Journal of Clinical Oncology*, Actas de la Reunión Anual de la ASCO 2007, Parte I. Vol. 25, No. 18S (Suplemento del 20 de junio), 2007: 8082. Véase Bea S, et al., *Blood* 2005; 106: 3183-90; Ngo V. N. et al., *Nature* 2011; 470: 115-9. Tales diferencias han llevado a la búsqueda de estrategias de tratamiento más efectivas y específicas para cada subtipo en la DLBCL. Además de la clasificación aguda y crónica, las neoplasias también se clasifican en función de las células que dan lugar a este trastorno en precursor o periférico. Véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE.UU. N° 2008/0051379. Las neoplasias precursoras incluyen ALL y linfomas linfoblásticos y se presentan en los linfocitos antes de que se hayan diferenciado en células T o B. Las neoplasias periféricas son aquellas que se producen en los linfocitos que se han diferenciado en las células T o B. Dichas neoplasias periféricas incluyen, entre otras, CLL de células B, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmocítico, linfoma de células del manto, linfoma folicular, linfoma extranodal de células B de la zona marginal de tejido linfático asociado a mucosa, linfoma de la zona marginal nodal, linfoma esplénico de la zona marginal, leucemia de células pilosas, plasmacitoma, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) y linfoma de Burkitt. En más del 95 por ciento de los casos de CLL, la expansión clonal es de un linaje de células B. Véase *Cancer: Principles & Practice of Oncology* (3ª edición) (1989) (pp. 1843-1847). En menos del 5 por ciento de los casos de CLL, las células tumorales tienen un fenotipo de células T. A pesar de estas clasificaciones, sin embargo, el deterioro patológico de la hematopoyesis normal es el sello de todas las leucemias.

La PTCL consiste en un grupo de LNH raras y generalmente agresivas (de rápido crecimiento) que se desarrollan a partir de células T maduras. En conjunto, las PTCL representan alrededor del 4 al 10 por ciento de todos los casos de LNH, lo que corresponde a una incidencia anual de 2.800-7.200 pacientes al año en los Estados Unidos. Según algunas estimaciones, la incidencia de la PTCL está creciendo significativamente, y el aumento de la incidencia puede deberse al envejecimiento de la población. Las PTCL se subclasifican en varios subtipos, cada uno de los cuales se considera típicamente como enfermedades separadas en función de sus diferencias clínicas distintas. La mayoría de estos subtipos son raros; los tres subtipos más comunes de PTCL no especificados de otra forma, el linfoma anaplásico de células grandes, o ALCL, y el linfoma angioinmunoblástico de células T, que en conjunto representan aproximadamente el 70 por ciento de todas las PTCL en los Estados Unidos. La ALCL puede ser una ALCL cutánea o ALCL sistémica.

Para la mayoría de los subtipos de PTCL, el régimen de tratamiento de primera línea suele ser la quimioterapia de combinación, como CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona), EPOCH (etopósido, vincristina, doxorubicina, ciclofosfamida, prednisona) u otros regímenes de múltiples medicamentos. Los pacientes que recaen o son refractarios a los tratamientos de primera línea generalmente se tratan con gemcitabina en combinación con otras quimioterapias, incluida la vinorelbina (Navelbine®) y la doxorubicina (Doxil®) en un régimen llamado GND, u otros regímenes de quimioterapia como DHAP (dexametasona, citarabina, cisplatino) o ESHAP (etopósido, metilprednisolona, citarabina y cisplatino).

Debido a que la mayoría de los pacientes con PTCL recaerán, algunos oncólogos recomiendan administrar altas dosis de quimioterapia seguida de un trasplante autólogo de células madre a algunos pacientes que tuvieron una buena respuesta a su quimioterapia inicial. Las terapias recientes, no citotóxicas, que han sido aprobadas para PTCL recidivante o refractaria, como el pralatrexato (Folotyn®), romidepsin (Istodax®) y belinostat (Beleodaq®), se asocian con tasas de respuesta objetivas relativamente bajas (25-27% tasa de respuesta general u ORR) y duraciones de respuesta relativamente cortas (8,2-9,4 meses). Por consiguiente, el tratamiento de la PTCL recidivante/refractaria sigue siendo una necesidad médica importante no satisfecha.

El mieloma múltiple (MM) es un cáncer de las células plasmáticas en la médula ósea. Normalmente, las células plasmáticas producen anticuerpos y desempeñan un papel clave en la función inmunológica. Sin embargo, el crecimiento descontrolado de estas células provoca dolor y fracturas en los huesos, anemia, infecciones y otras complicaciones. El mieloma múltiple es la segunda neoplasia maligna hematológica más común, aunque las causas exactas del mieloma múltiple siguen siendo desconocidas. El mieloma múltiple causa altos niveles de proteínas en la sangre, la orina y los órganos, que incluyen, entre otros, las proteínas M y otras inmunoglobulinas (anticuerpos), albúmina y beta-2-microglobulina. La proteína M, abreviatura de proteína monoclonal, también conocida como paraproteína, es una proteína particularmente anormal producida por las células plasmáticas del mieloma y se puede encontrar en la sangre u orina de casi todos los pacientes con mieloma múltiple.

Los síntomas esqueléticos, incluido el dolor en los huesos, se encuentran entre los síntomas clínicamente más significativos del mieloma múltiple. Las células plasmáticas malignas liberan factores estimulantes de osteoclastos (que incluyen IL-1, IL-6 y TNF) que causan la lixiviación del calcio de los huesos y lesiones líticas; la hipercalcemia es otro síntoma. Los factores estimulantes de los osteoclastos, también conocidos como citoquinas, pueden prevenir la apoptosis o la muerte de las células del mieloma. El cincuenta por ciento de los pacientes tienen lesiones esqueléticas relacionadas con mielomas detectables radiológicamente en el momento del diagnóstico. Otros

síntomas clínicos comunes para el mieloma múltiple incluyen la polineuropatía, anemia, hiperviscosidad, infecciones e insuficiencia renal.

5 Se sabe que las células estromales de la médula ósea facilitan la progresión de la enfermedad del mieloma múltiple y la resistencia a la quimioterapia. Interrumpir las interacciones entre las células del mieloma múltiple y las células del estroma es un objetivo adicional de la quimioterapia del mieloma múltiple.

10 El síndrome mielodisplásico (MDS) se refiere a un grupo diverso de trastornos de las células madre hematopoyéticas. El MDS se puede caracterizar por una médula celular con una morfología y maduración alteradas (dismielopoyesis), producción de células sanguíneas ineficaces o hematopoyesis, que conduce a recuentos bajos de células sanguíneas o citopenias, y un alto riesgo de progresión a leucemia mieloide aguda, dando como resultado la producción de células sanguíneas ineficaces. Consúltense The Merck Manual 953 (17ª ed. 1999) y List et al., 1990, J Clin. Oncol. 8:1424.

15 Como grupo de neoplasias malignas de células madre hematopoyéticas con morbilidad y mortalidad significativas, el SMD es una enfermedad altamente heterogénea, y la gravedad de los síntomas y la progresión de la enfermedad pueden variar ampliamente entre los pacientes. La herramienta clínica estándar actual para evaluar la estratificación del riesgo y las opciones de tratamiento es el Sistema de puntuación de pronóstico internacional revisado, o IPSS-R. El IPSS-R diferencia a los pacientes en cinco grupos de riesgo (muy bajo, bajo, intermedio, alto, muy alto) según la evaluación de la citogenética, el porcentaje de blastos (células sanguíneas indiferenciadas) en la médula ósea, los niveles de hemoglobina y los recuentos de plaquetas y neutrófilos. La OMS también sugirió clasificar a los pacientes con MDS por una anomalía del (5q).

20 Según la ACS, la incidencia anual de la SMD es de aproximadamente 13.000 pacientes en los Estados Unidos, la mayoría de los cuales tienen 60 años de edad o más. La prevalencia estimada es de más de 60.000 pacientes en los Estados Unidos. Aproximadamente el 75% de los pacientes se encuentran en las categorías de riesgo IPSS-R de muy bajo, bajo e intermedio, o colectivamente conocidos como MDS de menor riesgo.

25 La lesión de las células madre hematopoyéticas inicial puede deberse a causas tales como, entre otras, la quimioterapia citotóxica, exposición a radiación, virus, agentes químicos y predisposición genética. Una mutación clonal predomina sobre la médula ósea, suprimiendo las células madre sanas. En las primeras etapas de la MDS, la causa principal de las citopenias es el aumento de la muerte celular programada (apoptosis). A medida que la enfermedad progresa y se convierte en leucemia, la mutación genética rara vez ocurre y una proliferación de células leucémicas supera a las de la médula sana. El curso de la enfermedad difiere: algunos casos se comportan como una enfermedad indolente y otros se comportan de manera agresiva con un curso clínico muy corto que se convierte en una forma aguda de leucemia.

30 Un grupo internacional de hematólogos, el Grupo cooperativo franco-estadounidense-británico (FAB), clasificó los trastornos de MDS en cinco subgrupos, diferenciándolos de la AML. El Manual Merck 954 (17ª ed. 1999); Bennett J. M., et al., Ann. Intern. Med. Octubre de 1985, 103 (4): 620-5; y Besa E. C., Med. Clin. North Am. Mayo de 1992, 76 (3): 599-617. En todos los subtipos se encuentra un cambio displásico subyacente del trilineaje en las células de la médula ósea de los pacientes.

35 Hay dos subgrupos de anemia refractaria caracterizada por mieloblastos del cinco por ciento o menos en la médula ósea: (1) anemia refractaria (AR) y; (2) La AR con sideroblastos anillados (RARS), definida morfológicamente por tener un 15% de células eritroides con sideroblastos anillados anormales, lo que refleja una acumulación anormal de hierro en las mitocondrias. Ambos tienen un curso clínico prolongado y una baja incidencia de progresión a leucemia aguda. Besa E. C., Med. Clin. North Am, mayo de 1992, 76 (3): 599-617.

40 Hay dos subgrupos de anemias refractarias con más de cinco por ciento de mieloblastos: (1) RA con blastos en exceso (RAEB), definido como 6-20% de mieloblastos, y (2) RAEB en transformación (RAEB-T), con 21-30% de mieloblastos. Cuanto mayor es el porcentaje de mieloblastos, más corto es el curso clínico y más cerca está la enfermedad de la leucemia mielógena aguda. La transición del paciente de etapas tempranas a etapas más avanzadas indica que estos subtipos son meramente etapas de la enfermedad en lugar de entidades distintas. Con frecuencia, se considera que los pacientes ancianos con SMD con displasia trilineal y más de 30% de mieloblastos que progresan a leucemia aguda tienen un mal pronóstico debido a que su tasa de respuesta con respecto a la quimioterapia es más baja que la de los pacientes con leucemia mieloide aguda de novo. El quinto tipo de MDS, el más difícil de clasificar, es CMML. Este subtipo puede tener cualquier porcentaje de mieloblastos, pero se presenta con una monocitosis de 1000/dL o más. Puede estar asociado a esplenomegalia. Este subtipo se superpone a un trastorno mieloproliferativo y puede tener un curso clínico intermedio. Se diferencia del clásico CML que se caracteriza por un cromosoma Ph negativo.

55 La MDS es principalmente una enfermedad de personas mayores, con un inicio medio en la séptima década de la vida. La edad media de estos pacientes es de 65 años, con edades que van desde la tercera década de la vida hasta los 80 años o más. El síndrome puede ocurrir en cualquier grupo de edad, incluida la población pediátrica. Los pacientes que sobreviven al tratamiento maligno con agentes alquilantes, con o sin radioterapia, tienen una alta

incidencia de desarrollar SMD o leucemia aguda secundaria. Alrededor del 60-70% de los pacientes no tienen una exposición obvia o causa de MDS, y se clasifican como pacientes primarios de MDS.

El tratamiento de MDS se basa en la etapa y el mecanismo de la enfermedad que predomina en la fase particular del procedimiento de la enfermedad. El trasplante de médula ósea se ha utilizado en pacientes con mal pronóstico o SMD en etapa tardía. Epstein y Slease, 1985, Surg. Ann. 17:125. Un enfoque alternativo a la terapia para el MDS es el uso de factores de crecimiento hematopoyéticos o citoquinas para estimular el desarrollo de células sanguíneas en un receptor. Dexter, 1987, J. Cell Sci. 88:1; Moore, 1991, Annu. Rev. Immunol. 9: 159; y Besa E. C., Med. Clin North Am, mayo de 1992, 76 (3): 599-617. El tratamiento de MDS usando compuestos inmunomoduladores se describe en la patente de EE.UU. No. 7.189.740.

Las opciones terapéuticas se dividen en tres categorías, que incluyen cuidados de apoyo, terapia de baja intensidad y alta intensidad. La atención de apoyo incluye el uso de glóbulos rojos y transfusiones de plaquetas y citoquinas hematopoyéticas como los agentes estimulantes de la eritropoyesis o factores estimulantes de colonias para mejorar los recuentos sanguíneos. Las terapias de baja intensidad incluyen agentes hipometilantes como azacitidina (Vidaza®) y decitabina (Dacogen®), modificadores de la respuesta biológica como lenalidomida (Revlimid®) y tratamientos inmunosupresores como la ciclosporina A o la globulina antitímocítica. Las terapias de alta intensidad incluyen agentes quimioterapéuticos como idarubicina, azacitidina, fludarabina y topotecán, y trasplantes de células madre hematopoyéticas o TCMH.

Las guías de la Red Nacional Integral de Cáncer (NCCN) recomiendan que los pacientes con menor riesgo (grupos IPSS-R Muy Bajo, Bajo, Intermedio) reciban cuidados de apoyo o terapias de baja intensidad con el objetivo terapéutico principal de mejoría hematológica o HI. Las pautas de la NCCN recomiendan que los pacientes con mayor riesgo (grupos IPSS-R Alto, Muy Alto) reciban un tratamiento más agresivo con terapias de alta intensidad. En algunos casos, los pacientes con alto riesgo no pueden tolerar la quimioterapia y pueden elegir regímenes de menor intensidad. A pesar de los tratamientos actualmente disponibles, una parte importante de los pacientes con MDS carecen de terapias efectivas y las guías NCCN recomiendan ensayos clínicos como opciones terapéuticas adicionales. El tratamiento de MDS sigue siendo una necesidad insatisfecha significativa que requiere el desarrollo de nuevas terapias.

Por consiguiente, en algunos ejemplos, en el presente documento se describe un FTI para usar en métodos para tratar el cáncer hematopoyético en un sujeto, o seleccionar a un paciente con cáncer hematopoyético para un tratamiento con FTI, en el que el paciente con cáncer hematopoyético es un portador de KIR2DS2 o un portador de KIR2DS5, o ambos; o en donde:

(i) el nivel de expresión de KIR2DS2 en una muestra del paciente con cáncer hematopoyético es más alto que un nivel de expresión de referencia de KIR2DS2;

(ii) el nivel de expresión de KIR2DL2 en una muestra del paciente con cáncer hematopoyético es más bajo que un nivel de expresión de referencia de KIR2DL2;

(iii) el nivel de expresión de KIR2DS5 en una muestra del paciente con cáncer hematopoyético es más alto que un nivel de expresión de referencia de KIR2DS5;

(iv) el nivel de expresión de KIR2DL5 en una muestra del paciente con cáncer hematopoyético es inferior al nivel de expresión de referencia de KIR2DL5;

(v) el nivel de expresión de GZMM en una muestra del paciente con cáncer hematopoyético es más alto que un nivel de expresión de referencia de GZMM;

(vi) la relación entre el nivel de expresión de KIR2DS2 y el nivel de expresión de KIR2DL2 en una muestra del paciente con cáncer hematopoyético es mayor que una relación de referencia de un nivel de expresión de KIR2DS2 respecto a un nivel de expresión de KIR2DL2; o

(vii) la relación entre el nivel de expresión de KIR2DS5 y el nivel de expresión de KIR2DL5 en una muestra del paciente con cáncer hematopoyético es mayor que la proporción de referencia de un nivel de expresión de KIR2DS5 respecto a un nivel de expresión de KIR2DL5; o cualquier combinación de (i)-(vii).

En algunos ejemplos, se describe un FTI para usar en métodos para tratar un cáncer hematopoyético en un sujeto, o seleccionar a un paciente con cáncer hematopoyético para un tratamiento con FTI. Los cánceres hematológicos incluyen leucemias, incluidas las leucemias agudas (como la leucemia linfocítica aguda, la leucemia mielocítica aguda, la leucemia mielógena aguda y los mieloblastos, leucemia promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia), leucemias crónicas (como la leucemia mielocítica crónica (granulótica), leucemia mielógena crónica, leucemia mielocítica crónica, leucemia mielocítica crónica, leucemia mielocítica crónica, leucemia linfocítica crónica), leucemia mielomonocítica crónica, leucemia mielomonocítica juvenil, policitemia vera, leucemia de células NK, linfoma, linfoma de células NK, enfermedad de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano (formas indolentes y de alto grado), mieloma múltiple, linfomas periféricos de células T, linfoma cutáneo de células T, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de cadena

pesada, síndrome mielodisplásico, metaplasia mieloide anogénica, linfomahistocitosis eritropofagítica familiar, leucemia de células pilosas y mielodisplasia.

5 En algunos ejemplos, el cáncer hematopoyético a tratar por los métodos descritos en el presente documento puede ser AML, MDS, CMML, linfoma de células NK, leucemia de células NK, CTCL, PTCL, CML. En algunos ejemplos, el cáncer hematopoyético es la AML. En algunos ejemplos, el cáncer hematopoyético es MDS. En algunos ejemplos, el MDS es un MDS de menor riesgo. En algunos ejemplos, el cáncer hematopoyético es CMML. El CMML puede ser un CMML de bajo riesgo, un CMML de riesgo intermedio o un CMML de alto riesgo. El CMML puede ser un CMML mielodisplásico o un CMML mieloproliferativo. En algunos ejemplos, el CMML es un CMML de NRAS/KRAS natural. En algunos ejemplos, el cáncer hematopoyético es el linfoma NK. En algunos ejemplos, el cáncer hematopoyético es la leucemia NK. En algunos ejemplos, el cáncer hematopoyético es CTCL. En algunos ejemplos, el cáncer hematopoyético es PTCL. En algunos ejemplos, el PTCL es PTCL refractario o recidivante.

En algunos ejemplos, en el presente documento se describe un FTI para usar en métodos para tratar MDS en un sujeto, o seleccionar a un paciente con MDS para un tratamiento con FTI, en donde el paciente con MDS es un portador de KIR2DS2, KIR2DS5 o HLA-C2, o cualquier combinación de los mismos; o en donde:

15 (i) el nivel de expresión de KIR2DS2 en una muestra del paciente MDS es más alto que un nivel de expresión de referencia de KIR2DS2;

(ii) el nivel de expresión de KIR2DL2 en una muestra del paciente con MDS es inferior al nivel de expresión de referencia de KIR2DL2;

20 (iii) el nivel de expresión de KIR2DS5 en una muestra del paciente con MDS es más alto que el nivel de expresión de referencia de KIR2DS5;

(iv) el nivel de expresión de KIR2DL5 en una muestra del paciente con MDS es inferior al nivel de expresión de referencia de KIR2DL5;

(v) el nivel de expresión de GZMM en una muestra del paciente con MDS es más alto que un nivel de expresión de referencia de GZMM;

25 (vi) la relación entre el nivel de expresión de KIR2DS2 y el nivel de expresión de KIR2DL2 en una muestra del paciente con MDS es mayor que la relación de referencia de un nivel de expresión de KIR2DS2 respecto a un nivel de expresión de KIR2DL2; o

30 (vii) la relación entre el nivel de expresión de KIR2DS5 y el nivel de expresión de KIR2DL5 en una muestra del paciente MDS es más alta que la relación de referencia de un nivel de expresión de KIR2DS5 respecto a un nivel de expresión de KIR2DL5; o cualquier combinación de los mismos.

En algunos ejemplos, en el presente documento se describe un FTI para usar en métodos para tratar un MDS de menor riesgo en un sujeto, o seleccionar a un paciente con MDS de menor riesgo para un tratamiento con FTI, en donde el paciente con MDS de menor riesgo es un portador de KIR2DS2, KIR2DS5 o HLA-C2, o cualquier combinación de los mismos; o en donde:

35 (i) el nivel de expresión de KIR2DS2 en una muestra del paciente MDS es más alto que un nivel de expresión de referencia de KIR2DS2;

(ii) el nivel de expresión de KIR2DL2 en una muestra del paciente con MDS es inferior al nivel de expresión de referencia de KIR2DL2;

40 (iii) el nivel de expresión de KIR2DS5 en una muestra del paciente con MDS es más alto que el nivel de expresión de referencia de KIR2DS5;

(iv) el nivel de expresión de KIR2DL5 en una muestra del paciente con MDS es inferior al nivel de expresión de referencia de KIR2DL5;

(v) el nivel de expresión de GZMM en una muestra del paciente con MDS es más alto que un nivel de expresión de referencia de GZMM;

45 (vi) la relación entre el nivel de expresión de KIR2DS2 y el nivel de expresión de KIR2DL2 en una muestra del paciente con MDS de menor riesgo es más alta que una relación de referencia de un nivel de expresión de KIR2DS2 respecto a un nivel de expresión de KIR2DL2; o

50 (vii) la relación entre el nivel de expresión de KIR2DS5 y el nivel de expresión de KIR2DL5 en una muestra del paciente con MDS de riesgo más bajo es mayor que la relación de referencia de un nivel de expresión de KIR2DS5 respecto a un nivel de expresión de KIR2DL5; o cualquier combinación de los mismos.

En algunos ejemplos, en el presente documento se describe un FTI para usar en métodos para tratar la AML en un sujeto, o seleccionar a un paciente con AML para un tratamiento con FTI, en el que el paciente con AML es un portador de KIR2DS2, KIR2DS5 o HLA-C2, o cualquier combinación de los mismos; o en donde:

- 5 (i) el nivel de expresión de KIR2DS2 en una muestra del paciente con AML es más alto que el nivel de expresión de referencia de KIR2DS2;
- (ii) el nivel de expresión de KIR2DL2 en una muestra del paciente con LMA es inferior al nivel de expresión de referencia de KIR2DL2;
- (iii) el nivel de expresión de KIR2DS5 en una muestra del paciente con AML es más alto que un nivel de expresión de referencia de KIR2DS5;
- 10 (iv) el nivel de expresión de KIR2DL5 en una muestra del paciente con AML es inferior al nivel de expresión de referencia de KIR2DL5;
- (v) el nivel de expresión de GZMM en una muestra del paciente con AML es más alto que un nivel de expresión de referencia de GZMM;
- 15 (vi) la relación entre el nivel de expresión de KIR2DS2 y el nivel de expresión de KIR2DL2 en una muestra del paciente con AML es mayor que la relación de referencia de un nivel de expresión de KIR2DS2 respecto a un nivel de expresión de KIR2DL2; o
- (vii) la relación entre el nivel de expresión de KIR2DS5 y el nivel de expresión de KIR2DL5 en una muestra del paciente con AML es mayor que la proporción de referencia de un nivel de expresión de KIR2DS5 respecto a un nivel de expresión de KIR2DL5; o cualquier combinación de los mismos.

20 En algunos ejemplos, el paciente con AML se encuentra en una fase de inducción posterior a la remisión. En algunos ejemplos, el paciente de AML es postrasplante. En algunos ejemplos, el paciente con AML tiene más de 60 años o no es apto para la inducción de remisión. En algunos ejemplos, el paciente con AML tiene más de 65 años, 70 ó 75 años. En algunos ejemplos, el paciente con AML es refractario a la quimioterapia estándar. En algunos ejemplos, el paciente con AML es un paciente en recaída.

25 En algunos ejemplos, en el presente documento se describe un FTI para usar en métodos para tratar un tumor sólido. Los tumores sólidos son masas anormales de tejido que generalmente no contienen quistes o áreas líquidas. Los tumores sólidos pueden ser benignos o malignos. Los diferentes tipos de tumores sólidos reciben su nombre por el tipo de células que los forman (como sarcomas, carcinomas y linfomas). El tumor sólido a tratar con los métodos de la invención puede ser sarcomas y carcinomas, que incluyen fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, rhabdomiosarcoma, osteosarcoma, y otros sarcomas, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomiosarcoma, carcinoma de colon, neoplasia maligna linfoide, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma basocelular, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de tiroides medular, carcinoma papilar de tiroides, carcinoma de la glándula sebácea de feocromocitos, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de conductos biliares, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, seminoma, carcinoma de vejiga, melanoma y tumores del SNC (como un glioma (tal como el glioma del tronco encefálico y gliomas mixtos), glioblastoma (también conocido como glioblastoma multiforme), astrocitoma, linfoma del SNC, germinoma, meduloblastoma, Schwannoma craneofariogioma, ependimoma, pineaioma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, neuroblastoma, retinoblastoma y metástasis cerebrales).

45 En algunos ejemplos, en el presente documento se describe un FTI para usar en métodos para tratar un tumor sólido, en donde el tumor sólido es un melanoma maligno, carcinoma suprarrenal, carcinoma de mama, cáncer de células renales, carcinoma de páncreas, carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM) o carcinoma de primaria desconocida. Los medicamentos comúnmente administrados a pacientes con diversos tipos o estadios de tumores sólidos incluyen, entre otros, celebrex, etopósido, ciclofosfamida, docetaxel, apicitabina, IFN, tamoxifeno, IL-2, GM-CSF, o una combinación de estos.

50 En algunos ejemplos, el tumor sólido a tratar por los métodos descritos en este documento puede ser cáncer de tiroides, cáncer de cabeza y cuello, cánceres uroteliales, cánceres de saliva, cánceres del tracto digestivo superior, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de cerebro, cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de piel, cáncer de hígado y cáncer de páncreas. En algunos ejemplos, el cáncer de vejiga a tratar por los métodos descritos en el presente documento puede ser un carcinoma de células de transición.

55 En algunos ejemplos, el tumor sólido a tratar por los métodos descritos en el presente documento puede seleccionarse entre los grupos que consisten en carcinoma, melanoma, sarcoma o enfermedad granulomatosa crónica.

En algunos ejemplos, las condiciones premalignas a tratar por los métodos descritos en este documento pueden ser queilitis actínica, esófago de Barrett, gastritis atrófica, carcinoma ductal in situ, disqueratosis congénita, disfagia sideropénica, liquen plano, fibrosis submucosa oral, fibrosis solar, displasia cervical, pólipos, leucoplasia, eritroplasia, lesión escamosa intraepitelial, un trastorno premaligno o un trastorno inmunoproliferativo premaligno.

5 3.6. FTIs y dosificaciones ejemplares

En algunos ejemplos, los métodos para tratar el cáncer en un sujeto incluyen el genotipado de KIR al sujeto, y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de tipifarnib al sujeto, en donde el sujeto es un portador de KIR2DS2 o KIR2DS5, o un portador de KIR2DS2 y KIR2DS5. En algunos ejemplos, el sujeto también es un portador de HLA-C2. En algunos ejemplos, los métodos incluyen administrar al sujeto otro FTI descrito en el presente documento o conocido de otro modo en la técnica. En algunos ejemplos, el FTI se selecciona del grupo que consiste en tipifarnib, arglabin, alcohol perrílico, lonafarnib (SCH-66336), L778123, L739749, FTI-277, L744832, CP-609.754, R208176, AZD3409 y BMS-214662.

En algunos ejemplos, el método para tratar el cáncer en un sujeto incluye determinar el nivel de expresión de un biomarcador en una muestra del sujeto, en donde el biomarcador se selecciona del grupo que consiste en KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 y GZMM, y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de tipifarnib al sujeto en el que:

- (i) el nivel de expresión de KIR2DS2 en la muestra es más alto que un nivel de expresión de referencia de KIR2DS2;
- (ii) el nivel de expresión de KIR2DL2 en la muestra es inferior al nivel de expresión de referencia de KIR2DL2;
- (iii) el nivel de expresión de KIR2DS5 en la muestra es más alto que un nivel de expresión de referencia de KIR2DS5;
- (iv) el nivel de expresión de KIR2DL5 en la muestra es inferior al nivel de expresión de referencia de KIR2DL5; o
- (v) el nivel de expresión de GZMM en la muestra es más alto que un nivel de expresión de referencia de GZMM; o cualquier combinación de (i)-(v). En algunos ejemplos, los métodos incluyen administrar al sujeto otro FTI descrito en el presente documento o conocido de otro modo en la técnica. En algunos ejemplos, el FTI se selecciona del grupo que consiste en tipifarnib, arglabin, alcohol perrílico, lonafarnib (SCH-66336), L778123, L739749, FTI-277, L744832, CP-609.754, R208176, AZD3409 y BMS-214662.

Además, el método para tratar el cáncer en un sujeto incluye determinar los niveles de expresión de KIR2DS2 y KIR2DL2, o KIR2DS5 y KIR2DL5 en una muestra del sujeto, y administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de tipifarnib al sujeto, en donde:

- (i) la relación $2DS2/2DL2$ en la muestra es más alta que la relación de referencia $2DS2/2DL2$; o
- (ii) la relación $2DS5/2DL5$ en la muestra es más alta que la relación de referencia $2DS5/2DL5$; o ambos (i) y (ii). En algunos ejemplos, los métodos incluyen administrar al sujeto otro FTI descrito en el presente documento o conocido de otro modo en la técnica. En algunos ejemplos, el FTI se selecciona del grupo que consiste en tipifarnib, arglabin, alcohol perrílico, lonafarnib (SCH-66336), L778123, L739749, FTI-277, L744832, CP-609.754, R208176, AZD3409 y BMS-214662.

En algunos ejemplos, el método para tratar un cáncer hematológico en un sujeto incluye el genotipado de KIR al sujeto, y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de tipifarnib al sujeto, en donde el sujeto es un portador de KIR2DS2 o KIR2DS5, o un portador de KIR2DS2 y KIR2DS5. En algunos ejemplos, el sujeto también es un portador de HLA-C2. En algunos ejemplos, los métodos incluyen administrar al sujeto otro FTI descrito en el presente documento o conocido de otro modo en la técnica. En algunos ejemplos, el FTI se selecciona del grupo que consiste en tipifarnib, arglabin, alcohol perrílico, lonafarnib (SCH-66336), L778123, L739749, FTI-277, L744832, CP-609.754, R208176, AZD3409 y BMS-214662.

En algunos ejemplos, el método para tratar el cáncer hematológico en un sujeto incluye determinar el nivel de expresión de un biomarcador en una muestra del sujeto, en el que el biomarcador se selecciona del grupo que consiste en KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 y GZMM, y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de tipifarnib al sujeto en el que:

- (i) el nivel de expresión de KIR2DS2 en la muestra es más alto que un nivel de expresión de referencia de KIR2DS2;
- (ii) el nivel de expresión de KIR2DL2 en la muestra es inferior al nivel de expresión de referencia de KIR2DL2;
- (iii) el nivel de expresión de KIR2DS5 en la muestra es más alto que un nivel de expresión de referencia de KIR2DS5;
- (iv) el nivel de expresión de KIR2DL5 en la muestra es inferior al nivel de expresión de referencia de KIR2DL5; o

(v) el nivel de expresión de GZMM en la muestra es más alto que un nivel de expresión de referencia de GZMM; o cualquier combinación de (i)-(v). En algunos ejemplos, los métodos incluyen administrar al sujeto otro FTI descrito en el presente documento o conocido de otro modo en la técnica. En algunos ejemplos, el FTI se selecciona del grupo que consiste en tipifarnib, arglabin, alcohol perrílico, lonafarnib (SCH-66336), L778123, L739749, FTI-277, L744832, CP-609.754, R208176, AZD3409 y BMS-214662.

5

En algunos ejemplos, el método para tratar un cáncer hematológico en un sujeto incluye determinar los niveles de expresión de KIR2DS2 y KIR2DL2, o KIR2DS5 y KIR2DL5 en una muestra del sujeto, y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de tipifarnib al sujeto, en donde:

(i) la relación 2DS2/2DL2 en la muestra es más alta que la relación de referencia 2DS2/2DL2; o

10 (ii) la relación 2DS5/2DL5 en la muestra es más alta que la relación de referencia 2DS5/2DL5; o ambos (i) y (ii). En algunas realizaciones, los métodos incluyen administrar al sujeto otro FTI descrito en el presente documento o conocido de otro modo en la técnica. En algunas realizaciones, el FTI se selecciona del grupo que consiste en tipifarnib, arglabin, alcohol perrílico, lonafarnib (SCH-66336), L778123, L739749, FTI-277, L744832, CP-609.754, R208176, AZD3409 y BMS-214662.

15 En algunos ejemplos, el método para tratar un MDS de menor riesgo en un sujeto incluye el genotipado de KIR al sujeto, y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de tipifarnib al sujeto, en donde el sujeto es un portador de KIR2DS2 o KIR2DS5, o un portador de ambos KIR2DS2 y KIR2DS5. En algunos ejemplos, el sujeto también es portador de HLA-C2. En algunos ejemplos, los métodos incluyen administrar al sujeto otro FTI descrito en el presente documento o conocido de otro modo en la técnica. En algunos ejemplos, el FTI se selecciona del grupo que consiste en tipifarnib, arglabin, alcohol perrílico, lonafarnib (SCH-66336), L778123, L739749, FTI-277, L744832, CP-609.754, R208176, AZD3409 y BMS-214662.

20

En algunos ejemplos, el método para tratar un MDS de menor riesgo en un sujeto incluye determinar el nivel de expresión de un biomarcador en una muestra del sujeto, en donde el biomarcador se selecciona del grupo que consiste en KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 y GZMM, y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de tipifarnib al sujeto en el que:

25

(i) el nivel de expresión de KIR2DS2 en la muestra es más alto que un nivel de expresión de referencia de KIR2DS2;

(ii) el nivel de expresión de KIR2DL2 en la muestra es inferior al nivel de expresión de referencia de KIR2DL2;

(iii) el nivel de expresión de KIR2DS5 en la muestra es más alto que un nivel de expresión de referencia de KIR2DS5;

30 (iv) el nivel de expresión de KIR2DL5 en la muestra es inferior al nivel de expresión de referencia de KIR2DL5; o

(v) el nivel de expresión de GZMM en la muestra es más alto que un nivel de expresión de referencia de GZMM; o cualquier combinación de (i)-(v). En algunos ejemplos, los métodos incluyen administrar al sujeto otro FTI descrito en el presente documento o conocido de otro modo en la técnica. En algunos ejemplos, el FTI se selecciona del grupo que consiste en tipifarnib, arglabin, alcohol perrílico, lonafarnib (SCH-66336), L778123, L739749, FTI-277, L744832, CP-609.754, R208176, AZD3409 y BMS-214662.

35

Además, el método para tratar un MDS de menor riesgo en un sujeto incluye determinar los niveles de expresión de KIR2DS2 y KIR2DL2, o KIR2DS5 y KIR2DL5 en una muestra del sujeto, y administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de tipifarnib al sujeto, en donde:

(i) la relación 2DS2/2DL2 en la muestra es más alta que la relación de referencia 2DS2/2DL2; o

40 (ii) la relación 2DS5/2DL5 en la muestra es más alta que la relación de referencia 2DS5/2DL5; o ambos (i) y (ii). En algunos ejemplos, los métodos incluyen administrar al sujeto otro FTI descrito en el presente documento o conocido de otro modo en la técnica. En algunos ejemplos, el FTI se selecciona del grupo que consiste en tipifarnib, arglabin, alcohol perrílico, lonafarnib (SCH-66336), L778123, L739749, FTI-277, L744832, CP-609.754, R208176, AZD3409 y BMS-214662.

45 En algunos ejemplos, el FTI se administra por vía oral, parenteral, rectal o tópica. En algunos ejemplos, el FTI se administra por vía oral.

En algunas realizaciones, tipifarnib se administra por vía oral, parenteral, rectal o tópica. En algunas realizaciones, tipifarnib se administra por vía oral.

50 En algunos ejemplos, el FTI se administra a una dosis de 1-1000 mg/kg de peso corporal. En algunos ejemplos, el FTI se administra dos veces al día. En algunos ejemplos, el FTI se administra a una dosis de 200-1200 mg dos veces al día. En algunos ejemplos, el FTI se administra a una dosis de 600 mg dos veces al día. En algunos ejemplos, el FTI se administra a una dosis de 900 mg dos veces al día.

En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra en una dosis de 1-1000 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra dos veces al día. En algunos ejemplos, tipifarnib se administra en una dosis de 200-1200 mg dos veces al día. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra a una dosis de 600 mg dos veces al día. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra a una dosis de 900 mg dos veces al día.

5 En algunos ejemplos, el FTI se administra en ciclos de tratamiento. En algunos ejemplos, el FTI se administra en semanas alternas. En algunos ejemplos, el FTI se administra en los días 1-7 y 15-21 de un ciclo de tratamiento de 28 días. En algunos ejemplos, el FTI se administra por vía oral a una dosis de 900 mg dos veces al día en los días 1-7 y 15-21 de un ciclo de tratamiento de 28 días.

10 En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra en ciclos de tratamiento. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra en semanas alternas. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra en los días 1-7 y 15-21 de un ciclo de tratamiento de 28 días. En algunos ejemplos, el tipifarnib se administra por vía oral a una dosis de 900 mg dos veces al día en los días 1-7 y 15-21 de un ciclo de tratamiento de 28 días.

15 En algunos ejemplos, el FTI se administra durante al menos 3 ciclos. En algunos ejemplos, el FTI se administra durante al menos 6 ciclos. En algunos ejemplos, el FTI se administra hasta 12 ciclos. En algunos ejemplos, el FTI se administra por vía oral a una dosis de 900 mg dos veces al día en los días 1-7 y 15-21 de un ciclo de tratamiento de 28 días durante al menos tres ciclos.

20 En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra durante al menos 3 ciclos. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra durante al menos 6 ciclos. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra hasta 12 ciclos. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra por vía oral a una dosis de 900 mg dos veces al día en los días 1-7 y 15-21 de un ciclo de tratamiento de 28 días durante al menos tres ciclos.

25 En algunos ejemplos, el método para tratar un MDS de menor riesgo en un sujeto incluye el genotipado de KIR al sujeto, y administrar tipifarnib al sujeto, en donde el sujeto es un portador de KIR2DS2 o KIR2DS5, o un portador de KIR2DS2 y KIR2DS5, y en donde el tipifarnib se administra por vía oral a una dosis de 900 mg dos veces al día en los días 1-7 y 15-21 de un ciclo de tratamiento de 28 días. En algunos ejemplos, el sujeto también es portador de HLA-C2.

En algunos ejemplos, el método para tratar un MDS de menor riesgo en un sujeto incluye determinar el nivel de expresión de un biomarcador en una muestra del sujeto, en donde el biomarcador se selecciona del grupo que consiste en KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 y GZMM, y administrar tipifarnib al sujeto en el que:

- (i) el nivel de expresión de KIR2DS2 en la muestra es más alto que un nivel de expresión de referencia de KIR2DS2;
- 30 (ii) el nivel de expresión de KIR2DL2 en la muestra es inferior al nivel de expresión de referencia de KIR2DL2;
- (iii) el nivel de expresión de KIR2DS5 en la muestra es más alto que un nivel de expresión de referencia de KIR2DS5;
- (iv) el nivel de expresión de KIR2DL5 en la muestra es inferior al nivel de expresión de referencia de KIR2DL5; o
- 35 (v) el nivel de expresión de GZMM en la muestra es más alto que un nivel de expresión de referencia de GZMM; o cualquier combinación de (i)-(v); y en el que el tipifarnib se administra por vía oral a una dosis de 900 mg dos veces al día en los días 1-7 y 15-21 de un ciclo de tratamiento de 28 días.

Además, el método para tratar un MDS de menor riesgo en un sujeto incluye determinar los niveles de expresión de KIR2DS2 y KIR2DL2, o KIR2DS5 y KIR2DL5 en una muestra del sujeto, y administrar tipifarnib al sujeto, en donde:

- (i) la relación 2DS2/2DL2 en la muestra es más alta que la relación de referencia 2DS2/2DL2; o
- 40 (ii) la relación 2DS5/2DL5 en la muestra es más alta que la relación de referencia 2DS5/2DL5; o ambos (i) y (ii); y en el que el tipifarnib se administra por vía oral a una dosis de 900 mg dos veces al día en los días 1-7 y 15-21 de un ciclo de tratamiento de 28 días.

3.7. Kits

45 En algunos ejemplos, en este documento se describe un kit para el genotipado de KIR a un sujeto. En algunos ejemplos, el kit incluye una o más sondas que se unen específicamente al ADN genómico, ADNc o ARNm de uno o más genes KIR. Los genes KIR pueden incluir KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIRDL5, o cualquier combinación de los mismos. En algunos ejemplos, los kits pueden incluir además un agente para el genotipado de HLA. El agente para el genotipado de HLA puede ser una o más sondas que se unen específicamente al ADN genómico, ADNc o ARNm de uno o más genes HLA. Los genes HLA pueden incluir HLA-C1, HLA-C2 o ambos.

50 En algunos ejemplos, el kit incluye además una solución de lavado. En algunos ejemplos, el kit comprende además reactivos para medios de aislamiento o purificación de ADN genómico, medios de detección, así como controles positivos y negativos. En algunos ejemplos, el kit incluye además instrucciones para usar el kit. En algunos

ejemplos, el kit incluye además un FTI o una composición farmacológica que tiene un FTI. El kit se puede adaptar para uso en el hogar, uso clínico o uso de investigación.

5 En algunos ejemplos, en este documento se describe un kit para detectar el nivel de ARNm de uno o más biomarcadores. El uno o más biomarcadores se seleccionan del grupo que puede incluir KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIRDL5 y GZMM. En algunos ejemplos, el kit incluye una o más sondas que se unen específicamente a los ARNm de uno o más biomarcadores. En algunos ejemplos, el kit incluye además una solución de lavado. En algunos ejemplos, el kit incluye además reactivos para realizar un ensayo de hibridación, medios de aislamiento o purificación de ARNm, medios de detección, así como controles positivos y negativos. En algunos ejemplos, el kit incluye además instrucciones para usar el kit. En algunos ejemplos, el kit incluye además un FTI o una composición farmacológica que tiene un FTI. El kit se puede adaptar para uso en el hogar, uso clínico o uso de investigación.

10 En algunos ejemplos, en este documento se describe un kit para detectar el nivel de proteína de uno o más biomarcadores. El uno o más biomarcadores se seleccionan del grupo que puede incluir KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIRDL5 y GZMM. En algunos ejemplos, los kits incluyen una varilla recubierta con un anticuerpo que reconoce el biomarcador de proteínas, soluciones de lavado, reactivos para realizar el ensayo, medios de aislamiento o purificación de proteínas, medios de detección, así como controles positivos y negativos. En algunos ejemplos, el kit incluye además instrucciones para usar el kit. En algunos ejemplos, el kit incluye además un FTI o una composición farmacológica que tiene un FTI. El kit se puede adaptar para uso en el hogar, uso clínico o uso de investigación.

20 Los kits descritos en este documento pueden emplear, por ejemplo, una varilla de medición, una membrana, un chip, un disco, una tira reactiva, un filtro, una microesfera, un portaobjetos, una placa de múltiples pocillos o una fibra óptica. El soporte sólido del kit puede ser, por ejemplo, un plástico, un silicio, un metal, una resina, un vidrio, una membrana, una partícula, un precipitado, un gel, un polímero, una lámina, una esfera, un polisacárido, un capilar, una película, una placa o un portaobjetos. La muestra puede ser, por ejemplo, una muestra de sangre, una muestra de médula ósea, un cultivo celular, una línea celular, un tejido, un tejido oral, un tejido gastrointestinal, un órgano, un orgánulo, un fluido biológico, una muestra de orina o una muestra de piel. La muestra biológica puede ser, por ejemplo, una biopsia de ganglio linfático, una biopsia de médula ósea o una muestra de células tumorales de sangre periférica.

30 En algunos ejemplos, los kits descritos en este documento incluyen uno o más recipientes y componentes para realizar la RT-PCR, qPCR, secuenciación profunda, NGS o una micromatriz. En algunos ejemplos, los kits descritos en este documento emplean medios para detectar la expresión de un biomarcador mediante citometría de flujo o inmunofluorescencia. En otros ejemplos, la expresión del biomarcador se mide mediante metodologías basadas en ELISA u otros métodos similares conocidos en la técnica.

35 En algunos ejemplos, los kits descritos en el presente documento incluyen componentes para aislar proteínas. En otros ejemplos específicos, el kit farmacéutico o de ensayo incluye, en un recipiente, un FTI o una composición farmacéutica que tiene un FTI, e incluye además, en uno o más recipientes, componentes para realizar citometría de flujo o un ELISA.

40 En algunos ejemplos, en el presente documento se describen kits para medir biomarcadores que proporcionan los materiales necesarios para medir la presencia de ciertos genes, o la abundancia de uno o más de los productos génicos de los genes o un subconjunto de genes (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco o más genes) de los biomarcadores descritos en este documento. Dichos kits pueden incluir materiales y reactivos necesarios para medir ADN, ARN o proteínas. En algunos ejemplos, tales kits incluyen micromatrices, en donde la micromatriz comprende oligonucleótidos y/o fragmentos de ADN y/o ARN que se hibridan con uno o más de los transcritos de ADN o ARNm de uno o más de los genes o un subconjunto de genes de los biomarcadores proporcionados en el presente documento, o cualquier combinación de los mismos. En algunos ejemplos, tales kits pueden incluir cebadores para la PCR del ADN, el producto de ARN o la copia de ADNc del producto de ARN de los genes o subconjunto de genes. En algunos ejemplos, tales kits pueden incluir cebadores para PCR, así como sondas para PCR cuantitativa. En algunos ejemplos, tales kits pueden incluir múltiples cebadores y múltiples sondas en donde algunas de las sondas tienen diferentes fluoróforos para permitir la multiplexación de múltiples productos de un producto génico o múltiples productos génicos. En algunos ejemplos, tales kits pueden incluir además materiales y reactivos para sintetizar ADNc a partir de ARN aislado de una muestra. En algunos ejemplos, tales kits pueden incluir anticuerpos específicos para los productos proteicos de un gen o subconjunto de genes de los biomarcadores proporcionados en el presente documento. Dichos kits pueden incluir adicionalmente materiales y reactivos para aislar ARN y/o proteínas de una muestra biológica. En algunos ejemplos, dichos kits pueden incluir un programa informático integrado en medios legibles por computadora para predecir si un paciente es clínicamente sensible a un FTI. En algunos ejemplos, los kits pueden incluir un programa informático integrado en un medio legible por computadora junto con instrucciones.

60 En algunos ejemplos, los kits para medir la expresión de una o más secuencias de ácido nucleico de un gen o un subconjunto de genes de los biomarcadores descritos en el presente documento. En un ejemplo específico, tales kits miden la expresión de una o más secuencias de ácido nucleico asociadas con un gen o un subconjunto de genes de los biomarcadores descritos en el presente documento. De acuerdo con estos ejemplos, los kits pueden comprender

materiales y reactivos que son necesarios para medir la expresión de determinados productos de secuencia de ácidos nucleicos de genes o un subconjunto de genes de los biomarcadores descritos en el presente documento. Por ejemplo, se puede producir un kit de micromatrices o RT-PCR para una condición específica y contener solo los reactivos y materiales necesarios para medir los niveles de productos de transcripción de ARN específicos de los genes o un subconjunto de genes de los biomarcadores descritos en este documento para predecir si un cáncer hematológico en un paciente es clínicamente sensible a un compuesto. Alternativamente, en algunos ejemplos, los kits pueden comprender materiales y reactivos que no están limitados a los requeridos para medir la expresión de secuencias de ácido nucleico particulares de cualquier gen particular de los biomarcadores descritos en el presente documento. Por ejemplo, en ciertos ejemplos, los kits comprenden materiales y reactivos necesarios para medir los niveles de expresión de 1, 2, 3, 4 ó 5 de los biomarcadores descritos en el presente documento, además de los reactivos y materiales necesarios para medir los niveles de expresión de al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50 o más genes distintos a los de los biomarcadores descritos en el presente documento. En otros ejemplos, los kits contienen reactivos y materiales necesarios para medir los niveles de expresión de al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5 o más de los genes de los biomarcadores descritos en el presente documento, y 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 300, 350, 400, 450 o más genes que son genes que no pertenecen a los biomarcadores que se describen en este documento, o 1-10, 1-100, 1-150, 1-200, 1-300, 1-400, 1-500, 1-1000, 25-100, 25-200, 25-300, 25-400, 25-500, 25-1000, 100-150, 100-200, 100-300, 100-400, 100-500, 100-1000 o 500-1000 genes que son genes que no son de los biomarcadores descritos en este documento.

Para los kits de micromatrices de ácido nucleico, los kits generalmente incluyen sondas unidas a una superficie de soporte sólida. En uno de tales ejemplos, las sondas pueden ser oligonucleótidos o sondas de longitud más larga que incluyen sondas que varían desde 150 nucleótidos de longitud hasta 800 nucleótidos de longitud. Las sondas se pueden unir a un marcador detectable. En un ejemplo específico, las sondas son específicas para uno o más de los productos génicos de los biomarcadores descritos en el presente documento. Los kits de micromatrices pueden incluir instrucciones para realizar el ensayo y métodos para interpretar y analizar los datos resultantes del rendimiento del ensayo. En un ejemplo específico, los kits incluyen instrucciones para predecir si un cáncer hematológico en un paciente es clínicamente sensible a un FTI. Los kits también pueden incluir reactivos de hibridación y/o reactivos necesarios para detectar una señal producida cuando una sonda se hibrida a una secuencia de ácidos nucleicos diana. Generalmente, los materiales y reactivos para los kits de micromatrices se encuentran en uno o más contenedores. Cada componente del kit está generalmente en su propio recipiente adecuado.

En algunos ejemplos, el kit de micromatriz de ácido nucleico incluye materiales y reactivos necesarios para medir los niveles de expresión de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más de los genes identificados de los biomarcadores descritos en este documento, o una combinación de los mismos, además de los reactivos y materiales necesarios para medir los niveles de expresión de al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50 o más genes distintos a los de los biomarcadores descritos en este documento. En otros ejemplos, el kit de micromatriz de ácido nucleico contiene reactivos y materiales necesarios para medir los niveles de expresión de al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50 o más de los genes de los biomarcadores descritos en este documento, o cualquier combinación de los mismos, y 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 300, 350, 400, 450 o más genes que no son de los biomarcadores que se describen en este documento, o 1-10, 1-100, 1-150, 1-200, 1-300, 1-400, 1-500, 1-1000, 25-100, 25-200, 25-300, 25-400, 25-500, 25-1000, 100-150, 100-200, 100-300, 100-400, 100-500, 100-1000 o 500-1000 genes que no son de los biomarcadores descritos en este documento.

Para la PCR cuantitativa, los kits pueden incluir cebadores preseleccionados específicos para secuencias de ácido nucleico particulares. Los kits de PCR cuantitativa también pueden incluir enzimas adecuadas para amplificar ácidos nucleicos (por ejemplo, polimerasas como la Taq), y desoxinucleótidos y tampones necesarios para la mezcla de reacción para la amplificación. Los kits de PCR cuantitativa también pueden incluir sondas específicas para las secuencias de ácido nucleico asociadas o indicativas de una condición. Las sondas se pueden marcar con un fluoróforo. Las sondas también se pueden marcar con una molécula de extinción. En algunos ejemplos, los kits de la PCR cuantitativa también pueden incluir componentes adecuados para el ARN de transcripción inversa, incluidas las enzimas (por ejemplo, transcriptasas inversas como AMV, MMLV y similares) y cebadores para la transcripción inversa junto con los desoxinucleótidos y tampones necesarios para la reacción de transcripción inversa. Cada componente del kit de la PCR cuantitativa está generalmente en su propio contenedor adecuado. Por lo tanto, estos kits generalmente incluyen recipientes distintos adecuados para cada reactivo individual, enzima, cebador y sonda. Además, los kits de PCR cuantitativos pueden incluir instrucciones para realizar el ensayo y métodos para interpretar y analizar los datos resultantes de la realización del ensayo. En un ejemplo específico, los kits contienen instrucciones para predecir si un cáncer hematológico en un paciente es clínicamente sensible a un compuesto.

Para kits basados en anticuerpos, el kit puede incluir, por ejemplo: (1) un primer anticuerpo que se une a un polipéptido o proteína de interés; y, opcionalmente, (2) un segundo anticuerpo diferente que se une al polipéptido o proteína, o al primer anticuerpo y se conjuga con un marcador detectable (por ejemplo, un marcador fluorescente, un isótopo radiactivo o una enzima). El primer anticuerpo puede unirse a un soporte sólido. En un ejemplo específico, el polipéptido o proteína de interés es un biomarcador proporcionado en el presente documento. Los kits basados en anticuerpos también pueden incluir esferas para realizar una inmunoprecipitación. Cada componente de los kits basados en anticuerpos generalmente se encuentra en su propio contenedor adecuado. Por lo tanto, estos kits generalmente incluyen recipientes distintos adecuados para cada anticuerpo. Además, los kits basados en anticuerpos pueden incluir instrucciones para realizar el ensayo y métodos para interpretar y analizar los datos resultantes de la realización del ensayo. En un ejemplo específico, los kits contienen instrucciones para predecir si un cáncer hematológico en un paciente es clínicamente sensible a un FTI.

En algunos ejemplos, un kit descrito en el presente documento incluye un FTI proporcionado en el presente documento, o una composición farmacéutica que tiene un FTI. Los kits pueden incluir además agentes activos adicionales, incluidos, entre otros, los descritos en el presente documento, como un agente hipometilante de ADN, un anticuerpo terapéutico que se une específicamente a un antígeno cancerígeno, un factor de crecimiento hematopoyético, una citoquina, un agente anticancerígeno, un antibiótico, un inhibidor de la cox-2, un agente inmunomodulador, una globulina anti-timocitos, un agente inmunosupresor o un corticosteroide.

Los kits descritos en el presente documento pueden incluir además dispositivos que se utilizan para administrar el FTI u otros ingredientes activos. Los ejemplos de dichos dispositivos incluyen, entre otros, jeringas, bolsas de goteo, parches e inhaladores.

Los kits pueden incluir además células o sangre para el trasplante, así como vehículos farmacéuticamente aceptables que se pueden usar para administrar uno o más ingredientes activos. Por ejemplo, si se proporciona un ingrediente activo en una forma sólida que debe reconstituirse para administración parenteral, el kit puede comprender un contenedor sellado de un vehículo adecuado en el que el ingrediente activo se puede disolver para formar una solución estéril libre de partículas que es adecuado para la administración parenteral. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otros: agua para inyección USP; vehículos acuosos tales como, pero no limitados a, inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de dextrosa y cloruro de sodio, e inyección de Ringer lactato; vehículos miscibles con agua tales como, entre otros, alcohol etílico, polietilenglicol y polipropilenglicol; y vehículos no acuosos tales como, entre otros, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, oleato de etilo, miristato de isopropilo y benzoato de bencilo.

En algunos ejemplos de los métodos y kits descritos en el presente documento, los soportes de fase sólida se usan para purificar proteínas, marcar muestras o llevar a cabo los ensayos en fase sólida. Los ejemplos en fases sólidas adecuados para llevar a cabo los métodos descritos en el presente documento incluyen perlas, partículas, coloides, superficies individuales, tubos, placas de múltiples pocillos, placas de microtitulación, portaobjetos, membranas, geles y electrodos. Cuando la fase sólida es un material particulado (por ejemplo, perlas), en un ejemplo, se distribuye en los pocillos de placas de múltiples pocillos para permitir el procesamiento en paralelo de los soportes en fase sólida.

El kit de esta descripción puede incluir un reactivo auxiliar. En algunos ejemplos, el reactivo auxiliar puede ser un anticuerpo secundario, un reactivo de detección, un tampón de detección, un tampón de inmovilización, un tampón de dilución, un tampón de lavado o cualquier combinación de los mismos.

Los anticuerpos secundarios pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales. Los anticuerpos secundarios pueden derivarse de cualquier organismo mamífero, incluidos bovinos, ratones, ratas, hámsteres, cabras, camellos, pollos, conejos y otros. Los anticuerpos secundarios pueden incluir, por ejemplo, un anticuerpo anti-IgA humano, un anticuerpo anti-IgD humano, un anticuerpo anti-IgE humano, un anticuerpo anti-IgG humano, o un anticuerpo anti-IgM humano. Los anticuerpos secundarios pueden conjugarse con enzimas (p. ej., peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP), luciferasa y similares) o tintes (p. ej., tintes colorimétricos, tintes fluorescentes, tintes de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), tintes resueltos con el tiempo (TR)-FRET, y similares). En algunos ejemplos, el anticuerpo secundario es un anticuerpo policlonal de conejo anti-IgG humano, que está conjugado con HRP.

Cualquier reactivo de detección conocido en la técnica se puede incluir en un kit de esta descripción. En algunos ejemplos, el reactivo de detección es un reactivo de detección colorimétrico, un reactivo de detección fluorescente, o un reactivo de detección quimioluminiscente. En algunos ejemplos, el reactivo de detección colorimétrico incluye PNPP (p-nitrofenil fosfato), ABTS (2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) u OPD (o-fenilendiamina). En algunos ejemplos, el reactivo de detección fluorescente incluye QuantaBlu™ o QuantaRed™ (Thermo Scientific, Waltham, Mass.). En algunos ejemplos, el reactivo de detección luminiscente incluye luminol o luciferina. En algunos ejemplos, el reactivo de detección incluye un disparador (por ejemplo, H₂O₂) y un trazador (por ejemplo, conjugado de isoluminol).

Cualquier tampón de detección conocido en la técnica se puede incluir en un kit de esta descripción. En algunos ejemplos, el tampón de detección es un tampón citrato-fosfato (por ejemplo, alrededor de pH 4,2).

5 Cualquier solución de parada conocida en la técnica se puede incluir en un kit de esta descripción. Las soluciones de parada de esta descripción terminan o retrasan el desarrollo adicional del reactivo de detección y las señales de ensayo correspondientes. Las soluciones de parada pueden incluir, por ejemplo, tampones de pH bajo (por ejemplo, tampón de glicina, pH 2,0), agentes caotróficos (por ejemplo, cloruro de guanidinio, dodecilsulfato de sodio (SDS)) o agentes reductores (por ejemplo, ditioneitol, mecaptopetanol), o similares.

10 En algunos ejemplos, el reactivo auxiliar es un reactivo de inmovilización, que puede ser cualquier reactivo de inmovilización conocido en la técnica, incluidos los reactivos de inmovilización covalente y no covalente. Los reactivos de inmovilización covalentes pueden incluir cualquier reactivos químicos o biológicos que puedan usarse para inmovilizar covalentemente un péptido o un ácido nucleico en una superficie. Los reactivos de inmovilización covalentes pueden incluir, por ejemplo, un grupo reactivo de carboxilo a amina (por ejemplo, carbodiimidas como EDC o DCC), un grupo reactivo con amina (por ejemplo, ésteres de N-hidroxisuccinimida (NETS), imidoésteres), un reticulante de reactivo de sulfhidrilo (p. ej., maleimidias, haloacetilos, disulfuros de piridilo), un grupo reticulante reactivo con carbonilo (p. ej., hidrazidas, alcoxiaminas), un reticulador fotoreactivo (p. ej., azidas de arilo, dizirinas), o un grupo de ligación quimioselectiva (p. ej., un par de reacción de Staudinger). Los reactivos de inmovilización no covalentes incluyen cualquier reactivo químico o biológico que se pueda usar para inmovilizar un péptido o un ácido nucleico de forma no covalente en una superficie, como marcadores de afinidad (por ejemplo, biotina) o agentes de captura (por ejemplo, estreptavidina o anticuerpos anti-marcadores, como los anticuerpos anti-His6 o anti-Myc).

20 Los kits de esta descripción pueden incluir combinaciones de reactivos de inmovilización. Dichas combinaciones incluyen, por ejemplo, EDC y NHS, que se pueden usar, por ejemplo, para inmovilizar una proteína de esta descripción en una superficie, como una matriz de dextrano carboxilada (por ejemplo, en un chip CM5 de BIAcore™ o en un chip basado en dextrano). Las combinaciones de reactivos de inmovilización se pueden almacenar como combinaciones de reactivos premezclados o con uno o más reactivos de inmovilización de la combinación que se almacenan por separado de otros reactivos de inmovilización.

25 Una diversa selección de tampones de lavado es conocida en la técnica, tales como los tampones basados en tris(hidroximetil)aminometano (Tris) (por ejemplo, solución salina tamponada con Tris, TBS) o tampones de fosfato (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato, PBS). Los tampones de lavado pueden incluir detergentes, tales como detergentes iónicos o no iónicos. En algunos ejemplos, el tampón de lavado es un tampón PBS (por ejemplo, aproximadamente pH 7,4) que incluye Tween®20 (por ejemplo, aproximadamente 0,05% de Tween®20).

30 Cualquier tampón de dilución conocido en la técnica se puede incluir en un kit de esta descripción. Los tampones de dilución pueden incluir una proteína portadora (por ejemplo, albúmina de suero bovino, BSA) y un detergente (por ejemplo, Tween®20). En algunos ejemplos, el tampón de dilución es PBS (por ejemplo, aproximadamente pH 7,4) que incluye BSA (por ejemplo, aproximadamente 1% de BSA) y Tween®20 (por ejemplo, aproximadamente 0,05% de Tween®20).

35 En algunos ejemplos, el kit de esta descripción incluye un reactivo de limpieza para un sistema de ensayo automatizado. Un sistema de ensayo automatizado puede incluir sistemas de cualquier fabricante. En algunos ejemplos, los sistemas de ensayo automatizados incluyen, por ejemplo, BIO-FLASH™, BEST 2000™, DS2™, ELX50 WASHER, ELx800 WASHER y ELx800 READER. Un reactivo de limpieza puede incluir cualquier reactivo de limpieza conocido en la técnica.

40 Se observa que cualquier combinación de los ejemplos enumerados anteriormente, por ejemplo, con respecto a uno o más reactivos, tales como, sin limitación, cebadores de ácido nucleico, soporte sólido y similares, también se contemplan en relación con cualquiera de los diversos métodos y/o kits provistos en este documento.

4. K-Ras y N-Ras naturales como biomarcadores para el tratamiento con FTI

45 En el presente documento, se describen métodos de selección de pacientes con cáncer para el tratamiento con un FTI, en parte, basados en el descubrimiento de que el estado de mutación en Ras se asocia con beneficios clínicos del FTI y se puede usar para predecir la capacidad de respuesta de un paciente con cáncer respecto a un tratamiento con FTI. En consecuencia, en este documento se describen métodos para predecir la capacidad de respuesta de un paciente con cáncer frente a un tratamiento con FTI, métodos para la selección de la población de pacientes con cáncer para un tratamiento con FTI y métodos para tratar el cáncer en un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI, basados en el estado de mutación de Ras en una muestra del paciente.

4.1. Estado de mutación Ras

55 En algunos ejemplos, en este documento se proporciona un método para tratar un cáncer en un sujeto según el estado de mutación de K-Ras, N-Ras o ambos. El método descrito en este documento incluye (a) determinar la presencia o ausencia de una mutación Ras en una muestra del sujeto, en donde la mutación Ras incluye una mutación K-Ras o una mutación N-Ras y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI a dicho sujeto si se determina que dicha muestra carece de la mutación K-Ras o la mutación N-Ras.

En algunos ejemplos, el método proporcionado en este documento incluye (a) determinar la presencia o ausencia de una mutación K-Ras en una muestra del sujeto y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI a dicho sujeto si dicha muestra carece de la mutación K-Ras. En algunos ejemplos, se determina que la muestra tiene K-Ras natural.

- 5 En algunos ejemplos, el método proporcionado en el presente documento incluye (a) determinar la presencia o ausencia de una mutación N-Ras en una muestra del sujeto y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI a dicho sujeto si dicha muestra carece de la mutación N-Ras. En algunos ejemplos, se determina que la muestra tiene un N-Ras natural.

- 10 En algunos ejemplos, la mutación K-Ras es una mutación K_A-Ras. En algunos ejemplos, la mutación K-Ras es la mutación K_B-Ras. En algunos ejemplos, la mutación K-Ras es una combinación de mutación K_A-Ras y una mutación K_B-Ras. La mutación K-Ras puede incluir una mutación en un codón seleccionado del grupo que consiste en G12, G13 y Q61 de K_A-Ras, K_B-Ras o ambos. En algunos ejemplos, la mutación K_A-Ras puede incluir una mutación seleccionada del grupo que consiste en las sustituciones de aminoácidos G12C, G12D, G12A, G12V, G12S, G12F, G12R, G12N, G13C, G13D, G13R, G13S, G13N, Q61 K, Q61 H, Q61 L, Q61 P, Q61 R y A146V. En algunos ejemplos, la mutación K_B-Ras puede incluir una mutación seleccionada del grupo que consiste en las sustituciones de aminoácidos G12C, G12D, G12A, G12V, G12S, G12F, G12R, G12N, G13C, G13D, G13R, G13S, G13N, Q61 K, Q61 H, Q61 L, Q61 P, Q61 R y A146V.

- 20 En algunos ejemplos, la mutación Ras es una mutación de N-Ras. En algunos ejemplos, la mutación N-Ras puede incluir al menos una mutación en un codón seleccionado del grupo que consiste en G12, G13, G15, G60 y Q61. En algunos ejemplos, la mutación N-Ras puede incluir al menos una mutación en un codón seleccionado del grupo que consiste en G12, G13 y Q61. En algunos ejemplos, la mutación N-Ras puede incluir al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en las sustituciones de aminoácidos de G12C, G12D, G12F, G12S, G12A, G12V, G12R, G13C, G13R, G13A, G13D, G13V, G15W, G60E, Q61P, Q61L, Q61R, Q61K, Q61H y Q61E.

- 25 En algunos ejemplos, se determina que la muestra no tiene sustitución de aminoácidos en G12, G13 y Q61 de K-Ras, y que tampoco tiene ninguna sustitución de aminoácidos en G12, G13 y Q61 de N-Ras. En algunos ejemplos, se determina que la muestra no tiene ninguna mutación K-Ras o ninguna mutación N-Ras. En algunos ejemplos, se determina que la muestra tiene K-Ras natural y N-Ras natural.

- 30 El método proporcionado en el presente documento puede incluir además determinar la presencia o ausencia de una mutación H-Ras en una muestra del sujeto, y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un FTI a dicho sujeto si se determina que dicha muestra tiene una mutación H-Ras.

En algunos ejemplos, la mutación H-Ras es una mutación en un codón seleccionado del grupo que consiste en G12, G13 y Q61. En algunos ejemplos, la mutación H-Ras puede ser una mutación seleccionada del grupo que consiste en las sustituciones de aminoácidos de G12R, G12V, G13C, G13R, Q61L y Q61R.

- 35 En algunos ejemplos se describe en este documento un método para tratar un cáncer en un sujeto según el estado de mutación de K-Ras y N-Ras, que incluye (a) determinar la presencia o ausencia de una mutación de K-Ras y una mutación N-Ras en una muestra del sujeto y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI al sujeto si la muestra no tiene ninguna mutación K-Ras o ninguna mutación N-Ras. En algunos ejemplos, el método incluye administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un FTI al sujeto si la muestra tiene K-Ras natural y N-Ras natural. En algunos ejemplos, el método incluye además determinar el estado de mutación de H-Ras y, posteriormente, administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI al sujeto si la muestra del sujeto no tiene ninguna mutación de K-Ras o ninguna mutación de N-Ras, pero tiene una mutación H-Ras.

- 45 En este documento se describen métodos para predecir la capacidad de respuesta de un paciente con cáncer frente a un tratamiento con FTI, métodos para la selección de la población de pacientes con cáncer para un tratamiento con FTI, y métodos para tratar el cáncer en un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI, según el estado de mutación Ras en una muestra del paciente. En algunos ejemplos, el método incluye determinar la presencia o ausencia de una mutación Ras en una muestra del sujeto antes de comenzar el tratamiento. Los tumores o cánceres que no tienen la mutación K-Ras o la mutación N-Ras indican que es probable que los pacientes respondan al tratamiento con FTI. En algunos ejemplos, los pacientes se seleccionan para el tratamiento con FTI basándose en la falta de mutación K-Ras o mutación N-Ras. En algunos ejemplos, los pacientes se seleccionan para el tratamiento con FTI basándose en la falta de mutación K-Ras y mutación N-Ras. En algunos ejemplos, los pacientes se seleccionan adicionalmente basándose en la presencia de la mutación H-Ras. El estado de mutación Ras se puede detectar a nivel de ácido nucleico o proteína. En algunas realizaciones, el estado de la mutación Ras se determina analizando los ácidos nucleicos obtenidos de la muestra. En algunas realizaciones, el estado de la mutación Ras se determina analizando la proteína obtenida de la muestra.

- 55 Las técnicas que se pueden usar en los métodos proporcionados en este documento incluyen la hibridación in situ (Stoler, Clin. Lab. Med. 12: 215-36 (1990)), utilizando sondas marcadas con radioisótopos o fluoróforos; reacción en cadena de la polimerasa (PCR); transferencia de Southern cuantitativa, transferencia de puntos y otras técnicas para cuantificar genes individuales. En algunas realizaciones, las sondas o cebadores seleccionados para la evaluación

de la amplificación génica son altamente específicos para evitar la detección de genes homólogos estrechamente relacionados. Alternativamente, pueden emplearse anticuerpos que puedan reconocer dúplex específicos, incluidos dúplex de ADN, dúplex de ARN y dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína. Los anticuerpos, a su vez, pueden marcarse y el ensayo puede llevarse a cabo cuando el dúplex está unido a una superficie, de modo que tras la formación del dúplex en la superficie, puede detectarse la presencia de anticuerpo unido al dúplex.

En algunas realizaciones, el estado de la mutación Ras se determina analizando los ácidos nucleicos obtenidos de la muestra. Los ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ARNm o ADN genómico del sujeto de prueba. Los métodos para determinar el estado de la mutación Ras analizando ácidos nucleicos son habituales en la técnica. En algunas realizaciones, los métodos incluyen secuenciación, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), micromatriz de ADN, espectrometría de masas (MS), polimorfismo de nucleótido único (SNP), cromatografía líquida de alta resolución (DHPLC) o el ensayo de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). En algunas realizaciones, el estado de la mutación Ras se determina utilizando métodos de secuenciación estándar, que incluyen, por ejemplo, la secuenciación de Sanger, la secuenciación de próxima generación (NGS). En algunas realizaciones, el estado de la mutación Ras se determina usando MS.

En algunas realizaciones, el método incluye determinar la presencia o ausencia de una mutación Ras amplificando el ácido nucleico de Ras de una muestra mediante PCR. Por ejemplo, la tecnología de PCR y los pares de cebadores que pueden usarse son conocidos por los expertos en la técnica. (por ejemplo, Chang et al., Clinical Biochemistry, 43 (2010), 296-301; documento WO2015144184). Por ejemplo, se puede usar una PCR multiplex para amplificar los codones 12 y 13 del exón 2 y el codón 61 del exón 3 de los genes N, H o K-Ras con dos pares de cebadores universales para los exones 2 y 3. Por ejemplo, se pueden usar los siguientes cebadores:

SEQ ID NO	Exón	Secuencia de cebador
21	2	5'-CYKRBKDRMRATGACKGARTAYAARCTKGTGGT -3'
22	2	5'-ACCTCTATDGTKGGRTCRTATTC -3'
23	3	5'-CAGGATTCYTACMGRAARCARGT -3'
24	4	5' - TTKATGGCAAAYACACAVAGRAAGC -3'

Tal como se usa en el presente documento, las letras se usan de acuerdo con la notación IUPAC, por ej. "Y" denota pirimidina, "K" denota ceto, por ej. G o C, "R" denota purina, "B" C, G o T, "D" denota A, G o T, "M" denota A, C, "V" denota A, C o G.

Luego de la amplificación multiplex por PCR, los productos se pueden purificar para eliminar los cebadores y los trifosfatos de desoxinucleótidos no incorporados utilizando el sistema de limpieza PCR-M™ (Viogenebiotek Co., Sunnyvale, California, EE. UU.). El ADN purificado se puede semicuantificar en un gel de agarosa al 1% en 0,5 × TBE y visualizarlo mediante tinción con bromuro de etidio. Los productos se pueden someter luego a un análisis de extensión del cebador utilizando cebadores como se describe en Chang et al., Clinical Biochemistry 43 (2010), 296-301, por ejemplo, como los siguientes:

SEQ ID NO	RAS	Secuencia de cebador
25	K	5' -AACTTGTGGTAGTTGGAGCT
26	K	5' -ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTG
27	K	5' -TGAAAATGACTGAATATAAACTTGT GGTAGTTGGAGCTGGT
28	K	5' -GCCTGCTGAAAATGACTGAA TATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTG
29	K	5' -GCAAGTAGTAATTGATGGAGAA ACCTGTCTCTTGGATATTCTCGACACAGCAGGT
30	K	5' -GGAAGCAAGTAGTAATTGATGGAGA AACCTGTCTCTTGGATATTCTCGACACAGCAGGTC
31	K	5' -T ₄₅ ATTCTCGACACAGCAGGTCA
32	N	5' -AACTGGTGGTGGTTGGAGCA-3'
33	N	5' -T ₇ AACTGGTGGTGGTTGGAGCAG-3'
34	N	5' -T ₁₄ CAGTGCGCTTTTCCCAACAC-3'
35	N	5' -T ₂₂ GTGGTGGTGGAGCAGGTG-3'
36	N	5' -T ₂₉ CTCATGGCACTGTACTCTTCTT-3'
37	N	5' -T ₃₆ CTCATGGCACTGTACTCTTCT-3'
38	N	5' -T ₄₃ CTCTCATGGCACTGTACTCTTC-3'
39	H	5' -AGCTGGTGGTGGTGGGCGCC-3'
40	H	5' -T ₇ AGCTGGTGGTGGTGGGCGCCG-3'
41	H	5' -T ₁₄ TGGTGGTGGTGGGCGCCGGC-3'
42	H	5' -T ₂₂ GTGGTGGTGGGCGCCGGCG-3'
43	H	5' -T ₂₉ ACATCCTGGATACCGCCGGC-3'
44	H	5' -T ₃₆ ACATCCTGGATACCGCCGGCC-3'
45	H	5' -T ₄₃ CGCATGGCGCTGTACTCCTC-3'

Se pueden emplear varias concentraciones de sonda para el codón 12, 13 ó 61 (por ejemplo, 0,03-0,6 µM) en las reacciones que contienen 1,5 µl de productos de PCR purificados, así como 4 µl del Kit ABI PRISM SNaPshot Multiplex (Applied Biosystems, Foster City, California) que contiene ADN polimerasa AmpliTaq® y trifosfatos de dideoxynucleótido (ddNTP) marcados con fluorescencia (trifosfato de dideoxiadenosina marcado con RGG, trifosfato de dideoxicitidina marcado con TAMRA, trifosfato de dideoximidina marcado con ROX y trifosfato de dideoxiquanosina 10-marcado con R1). Cada mezcla de 10 µl se puede someter luego a 25 ciclos de extensión de una sola base que consisten en una etapa de desnaturalización a 96°C durante 10 s y un recocido de imprimación y

extensión a 55°C durante 35 s. Después de la extensión del ciclo, los ddNTP fluorescentes no incorporados se pueden incubar con 1 µl de fosfatasa alcalina de camarón (United States Biochemical Co., Cleveland, EE. UU.) a 37°C durante 1 h, seguido de la desactivación de la enzima a 75°C durante 15 min. Los productos de la reacción de extensión del cebador se pueden resolver luego mediante electroforesis capilar automatizada en una plataforma de electroforesis capilar, p. ej. se agregaron 14 µl de Hi-Di™ Formamida (Applied Biosystems) y 0,28 µl de GeneScan™ -120LIZ® Size Standard (Applied Biosystems) a 6 µl de los productos de extensión del cebador. Todas las muestras pueden por ejemplo, por ejemplo, analizarse en un analizador genético de ADN ABI Prism 310 (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante utilizando GeneScan™ 3.1 (Applied Biosystems).

En este documento se describen métodos para seleccionar a un paciente con cáncer que probablemente se beneficie de un tratamiento con FTI, que incluye determinar la presencia o ausencia de una mutación Ras amplificando el ácido nucleico de Ras de la muestra tumoral del paciente y secuenciando el ácido nucleico amplificado. Por consiguiente, el ácido nucleico de Ras se puede amplificar usando cebadores como se describe anteriormente y secuenciarse. Por ejemplo, el ácido nucleico K-Ras, N-Ras y H-Ras puede amplificarse por PCR como se describe anteriormente y, posteriormente, se puede subclonar utilizando, p. ej. el Kit de clonación TOPO TA para la secuenciación (Invitrogen).

En el método anterior, el ácido nucleico RAS se puede obtener a partir de la muestra del tumor del paciente mediante cualquier método conocido por el experto en la materia. Por ejemplo, se puede usar cualquier kit comercial para aislar el ADN genómico, o ARNm de una muestra de tumor, como p. ej. el mini kit de DNA Qlamp o el mini kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania). Por ejemplo, si el ARNm se aisló de la muestra de tumor del paciente, la síntesis de ADNc puede llevarse a cabo antes de los métodos descritos en este documento, de acuerdo con cualquier tecnología conocida en la técnica.

Por ejemplo, el ácido nucleico que se va a aislar de un tumor puede ser, por ejemplo, uno de ADN genómico, ARN total, ARNm o ARNm poli(A)+. Por ejemplo, si el ARNm se ha aislado de la muestra de tumor del paciente, el ARNm (ARNm total o ARNm poli(A)+) se puede usar para la síntesis de ADNc de acuerdo con tecnologías bien establecidas en la técnica anterior, como las proporcionadas en los kits de síntesis de ADNc comercial, por ejemplo el Kit Superscript® III First Strand Synthesis. El ADNc puede amplificarse aún más por medio de, p. ej. PCR y posteriormente someterse a secuenciación, por ej. una secuenciación Sanger o pirosecuenciación, para determinar la secuencia de nucleótidos de, p. ej. los codones 12 y 13 del gen RAS, p. ej. H-RAS, N-RAS o KRAS. Alternativamente, el producto de la PCR se puede, p. ej., también subclonar en un vector de clonación TA TOPO para la secuenciación. Se pueden usar otras tecnologías distintas de la secuenciación para determinar la ausencia o presencia de mutaciones de Ras en los métodos proporcionados en el presente documento, como p. ej. Extensión de cebador de un solo nucleótido (SNPE) (PLoS One. 21 de agosto de 2013; 8 (8): e72239); Micromatriz de ADN, Espectrometría de masas (MS) (por ejemplo, espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI-TOF)), Polimorfismo de nucleótido único (SNP), Cromatografía líquida desnaturalizante de alta resolución (DHPLC) o Ensayo de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP).

Por ejemplo, el ensayo de polimorfismo de nucleótido único (SNP) se puede utilizar para determinar el estado de mutación Ras en una muestra. El ensayo SNP se puede realizar en el HT7900 de Applied Biosystems, siguiendo el protocolo de ensayo de discriminación alélica proporcionado por el fabricante. El estado de la mutación Ras también puede determinarse por DHPLC o RFLP, o cualquier otro método conocido en la técnica. Bowen et al., Blood, 106: 2113-2119 (2005); Bowen et al., Blood, 101: 2770-2774 (2003); Nishikawa et al., Clin Chim Acta., 318: 107-112 (2002); Lin S Y et al., Am J Chin Pathol. 100:686-689 (1993); O'Leary J et al., J Chin Pathol. 51:576-582 (1998).

En algunas realizaciones, el estado de la mutación Ras se determina analizando la proteína obtenida de la muestra. La proteína Ras mutada puede detectarse mediante una variedad de enfoques de inmunohistoquímica (IHC) u otros métodos de inmunoensayo conocidos en la técnica. La tinción con IHC de las secciones de tejido ha demostrado ser un método confiable para evaluar o detectar la presencia de proteínas en una muestra. Las técnicas de inmunohistoquímica utilizan un anticuerpo para sondear y visualizar antígenos celulares in situ, generalmente por métodos cromogénicos o fluorescentes. Por lo tanto, se pueden usar anticuerpos o antisueros, preferiblemente antisueros policlonales, y lo más preferiblemente anticuerpos monoclonales que se dirigen específicamente a K-Ras mutante o N-Ras para detectar la expresión. Como se explica con mayor detalle a continuación, los anticuerpos pueden detectarse mediante el marcado directo de los propios anticuerpos, por ejemplo, con marcadores radiactivos, marcadores fluorescentes, marcadores de hapteno como biotina o una enzima como la peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina. Alternativamente, el anticuerpo primario no marcado se usa junto con un anticuerpo secundario marcado, que comprende antisueros, antisueros policlonales o un anticuerpo monoclonal específico para el anticuerpo primario. Los protocolos y kits de inmunohistoquímica son habituales en la técnica y están disponibles comercialmente. Los sistemas automatizados para la preparación de portaobjetos y el procesamiento de IHC están disponibles comercialmente. El sistema Ventana® BenchMark XT es un ejemplo de tal sistema automatizado.

Los procedimientos inmunológicos e inmunoensayos estándar se pueden encontrar en Basic and Clinical Immunology (Stites & Terr eds., 7ª ed. 1991). Además, los inmunoensayos se pueden realizar en cualquiera de varias configuraciones, que se revisan ampliamente en Enzyme Immunoassay (Maggio, ed., 1980); y Harlow & Lane,

supra. Para una revisión de los inmunoensayos generales, consúltese también *Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology*, volumen 37 (Asai, ed. 1993); *Basic and Clinical Immunology* (Stites & Ten, eds., 7ª ed. 1991).

5 Los ensayos para detectar mutaciones de K-Ras o mutaciones de N-Ras incluyen ensayos no competitivos, por ejemplo, ensayos en sándwich y ensayos competitivos. Típicamente, se puede usar un ensayo tal como un ensayo ELISA. Los ensayos ELISA son conocidos en la técnica, por ejemplo, para analizar una amplia variedad de tejidos y muestras, incluyendo sangre, plasma, suero o médula ósea.

10 Se encuentra disponible una amplia gama de técnicas de inmunoensayo que utilizan un formato de ensayo de este tipo, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nos. 4.016.043, 4.424.279 y 4.018.653. Estas incluyen ensayos de un solo sitio y de dos sitios o "sándwich" de tipos no competitivos, así como en los ensayos de unión competitiva tradicionales. Estos ensayos también incluyen la unión directa de un anticuerpo marcado a una proteína Ras mutante diana. Los ensayos de sándwich son ensayos comúnmente utilizados. Existen varias variaciones de la técnica de ensayo de sándwich. Por ejemplo, en un ensayo directo típico, un anticuerpo no marcado se inmoviliza sobre un sustrato sólido, y la muestra a analizar se pone en contacto con la molécula unida. Después de un período adecuado de incubación, durante un período de tiempo suficiente que se permita la formación de un complejo antígeno-anticuerpo, se agrega y se incuba un segundo anticuerpo específico para el antígeno, se marca con una molécula indicadora capaz de producir una señal detectable, dejando un tiempo suficiente para la formación de otro complejo de anticuerpo-anticuerpo marcado con antígeno. Cualquier material sin reaccionar se elimina por lavado y la presencia del antígeno se determina mediante la observación de una señal producida por la molécula indicadora. Los resultados pueden ser cualitativos, por simple observación de la señal visible, o pueden cuantificarse comparándolos con una muestra de control.

20 Las variaciones en el ensayo directo incluyen un ensayo simultáneo, en el que tanto la muestra como el anticuerpo marcado se agregan simultáneamente al anticuerpo unido. Estas técnicas son bien conocidas por los expertos en la materia, incluyendo cualquier variación menor que sea fácilmente evidente. En un ensayo sándwich directo típico, un primer anticuerpo que tiene especificidad por la proteína Ras mutante se une covalente o pasivamente a una superficie sólida. La superficie sólida puede ser de vidrio o un polímero; los polímeros más comúnmente usados son celulosa, poliácridamida, nailon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno. Los soportes sólidos pueden estar en forma de tubos, perlas, discos de microplacas o cualquier otra superficie adecuada para realizar un inmunoensayo. Los procedimientos de unión son habituales en la técnica y generalmente consisten en una unión por enlace covalente o adsorción física, el complejo polímero-anticuerpo se lava en preparación para la muestra de prueba. Luego se agrega una parte alícuota de la muestra a analizar al complejo en fase sólida y se incuba durante un período de tiempo suficiente (por ejemplo, 2-40 minutos o durante la noche si es más conveniente) y en condiciones adecuadas (por ejemplo, de temperatura ambiente a 40°C, como entre 25°C y 32°C inclusive) para permitir la unión de cualquier subunidad presente en el anticuerpo. Después del período de incubación, la fase sólida de la subunidad del anticuerpo se lava y se seca e incuba con un segundo anticuerpo específico para una porción de la proteína Ras mutante. El segundo anticuerpo está unido a una molécula indicadora que se usa para indicar la unión del segundo anticuerpo a la proteína Ras mutante.

30 En algunos ejemplos, la citometría de flujo (FACS) se puede usar para detectar el K-Ras o N-Ras mutante usando anticuerpos específicos para el mutante K-Ras o N-Ras. El citómetro de flujo detecta e informa la intensidad del anticuerpo marcado con fluorocromos, lo que indica la presencia del mutante K-Ras o N-Ras. Las proteínas citoplásmicas no fluorescentes también se pueden observar al teñir las células permeables. La tinción puede ser un compuesto de fluorescencia capaz de unirse a ciertas moléculas, o un anticuerpo marcado con fluorocromo para unirse a la molécula de elección.

35 Un método alternativo consiste en inmovilizar la proteína Ras objetivo en la muestra y luego exponer el objetivo inmovilizado a un anticuerpo específico mutante que puede estar o no marcado con una molécula indicadora. Dependiendo de la cantidad del objetivo y la fuerza de la señal de la molécula indicadora, un objetivo enlazado puede ser detectable mediante un marcado directo con el anticuerpo. Alternativamente, un segundo anticuerpo marcado, específico para el primer anticuerpo, se expone al complejo de anticuerpo del primer objetivo para formar un complejo terciario de anticuerpo de objetivo-primer anticuerpo-segundo anticuerpo. El complejo es detectado por la señal emitida por una molécula indicadora marcada.

40 En el caso de un inmunoensayo enzimático, la enzima se conjuga con el segundo anticuerpo, generalmente mediante glutaraldehído o peryodato. Sin embargo, como se reconocerá fácilmente, existe una amplia variedad de técnicas de conjugación diferentes, que están fácilmente disponibles para los expertos en la materia. Las enzimas usadas comúnmente incluyen la peroxidasa de rábano picante, la glucosa oxidasa, la beta-galactosidasa y la fosfatasa alcalina, y otras se discuten en este documento. Los sustratos a usar con las enzimas específicas se eligen generalmente para la producción, mediante hidrólisis por la enzima correspondiente, de un cambio de color detectable. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen fosfatasa alcalina y peroxidasa. También es posible emplear sustratos fluorogénicos, que producen un producto fluorescente en lugar de los sustratos cromogénicos mencionados anteriormente. En todos los casos, el anticuerpo marcado con enzima se agrega al primer complejo de marcador molecular de anticuerpo, se deja que se una, y luego el exceso de reactivo se elimina por lavado. Luego se agrega una solución que contiene el sustrato apropiado al complejo de anticuerpo-antígeno-anticuerpo. El sustrato reaccionará con la enzima unida al segundo anticuerpo, dando una señal visual cualitativa, que puede

cuantificarse aún más, generalmente espectrofotométricamente, para dar una indicación de la cantidad de proteína Ras mutante que estaba presente en la muestra. Alternativamente, los compuestos fluorescentes, como la fluoresceína y la rodamina, pueden acoplarse químicamente a los anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Cuando se activa mediante la iluminación con luz de una longitud de onda particular, el anticuerpo marcado con fluorocromo adsorbe la energía de la luz, lo que induce un estado de excitabilidad en la molécula, seguido de la emisión de la luz en un color característico detectable visualmente con un microscopio óptico. Al igual que en el EIA, se permite que el anticuerpo marcado con fluorescencia se una al primer complejo anticuerpo-marcador molecular. Después de lavar el reactivo no unido, el complejo terciario restante se expone a la luz de la longitud de onda apropiada, la fluorescencia observada indica la presencia del marcador molecular de interés. Las técnicas de inmunofluorescencia y EIA están muy bien establecidas en la técnica y se discuten en este documento.

En algunas realizaciones, la determinación del estado de la mutación Ras se realiza como un diagnóstico complementario del tratamiento con FTI. El diagnóstico complementario se puede realizar en la clínica donde se trata al sujeto. El diagnóstico complementario también se puede realizar en un sitio diferente al de la clínica donde se trata al sujeto.

Como entenderá cualquier experto en la materia, los métodos descritos en este documento son para predecir la capacidad de respuesta de un paciente con cáncer frente a un tratamiento con FTI, los métodos para la selección de la población de pacientes con cáncer para un tratamiento con FTI, y los métodos para tratar el cáncer en un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI, basada en el estado de mutación de Ras en una muestra del paciente. Cualquier método descrito en el presente documento o conocido de otro modo en la técnica para determinar el estado de mutación Ras puede aplicarse en los métodos.

4.2. Muestras

En algunos ejemplos, los métodos descritos en este documento incluyen obtener una muestra del sujeto. La muestra utilizada en los métodos proporcionados en este documento incluye fluidos corporales de un sujeto. Los ejemplos no limitantes de fluidos corporales incluyen sangre (p. ej., sangre entera periférica, sangre periférica), plasma sanguíneo, médula ósea, líquido amniótico, humor acuoso, bilis, linfa, menstruación, suero, orina, líquido cefalorraquídeo que rodea el cerebro y la columna vertebral. Líquido sinovial que rodea las articulaciones óseas.

En una realización, la muestra es una muestra de médula ósea. Los procedimientos para obtener una muestra de médula ósea son habituales en la técnica, incluidos, entre otros, biopsia de médula ósea y aspiración de médula ósea. La médula ósea tiene una porción fluida y una porción más sólida. En la biopsia de médula ósea, se toma una muestra de la porción sólida. En la aspiración de médula ósea, se toma una muestra de la porción líquida. La biopsia de médula ósea y la aspiración de médula ósea se pueden realizar al mismo tiempo y se denomina examen de médula ósea.

En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de sangre. La muestra de sangre se puede obtener usando técnicas convencionales como se describe, por ejemplo, en Innis et al, editores, PCR Protocols (Academic Press, 1990). Los glóbulos blancos se pueden separar de las muestras de sangre mediante técnicas convencionales o kits disponibles en el mercado, p. ej. el Kit RosetteSep (Stein Cell Technologies, Vancouver, Canadá). Subpoblaciones de glóbulos blancos, p. ej. las células mononucleares, las células NK, las células B, las células T, los monocitos, los granulocitos o los linfocitos se pueden aislar adicionalmente mediante técnicas convencionales, p. ej. clasificación celular activada magnéticamente (MACS) (Miltenyi Biotec, Auburn, California) o clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) (Becton Dickinson, San Jose, California).

En una realización, la muestra de sangre contiene aproximadamente de 0,1 ml a aproximadamente 10,0 ml, de aproximadamente 0,2 ml a aproximadamente 7 ml, de aproximadamente 0,3 ml a aproximadamente 5 ml, de aproximadamente 0,4 ml a aproximadamente 3,5 ml, o de aproximadamente 0,5 ml a alrededor de 3 ml. En otra realización, la muestra de sangre contiene aproximadamente 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 ó 10,0 ml.

En algunas realizaciones, la muestra utilizada en los presentes métodos incluye una biopsia (por ejemplo, una biopsia de tumor). La biopsia puede ser de cualquier órgano o tejido, por ejemplo, piel, hígado, pulmón, corazón, colon, riñón, médula ósea, dientes, ganglios linfáticos, cabello, bazo, cerebro, senos u otros órganos. Cualquier técnica de biopsia conocida por los expertos en la técnica puede usarse para aislar una muestra de un sujeto, por ejemplo, biopsia abierta, biopsia cerrada, biopsia central, biopsia incisional, biopsia por escisión o biopsia por aspiración con aguja fina.

En ciertas realizaciones, la muestra usada en los métodos proporcionados en el presente documento incluye una pluralidad de células. Dichas células pueden incluir cualquier tipo de células, por ejemplo, células madre, células sanguíneas (por ejemplo, PBMC), linfocitos, células NK, células B, células T, monocitos, granulocitos, células inmunitarias o células tumorales o cancerosas. Se pueden obtener poblaciones de células específicas utilizando una combinación de anticuerpos disponibles en el mercado (por ejemplo, Quest Diagnostic (San Juan Capistrano, Calif.); Dako (Dinamarca)).

En ciertas realizaciones, la muestra utilizada en los métodos proporcionados en este documento proviene de un tejido enfermo, por ejemplo, de un individuo que tiene cáncer (por ejemplo, linfoma, MDS o leucemia). En algunas realizaciones, las células pueden obtenerse a partir del tumor o células cancerosas o un tejido tumoral, tal como una biopsia de tumor o un explante de tumor. En ciertas realizaciones, el número de células utilizadas en los métodos proporcionados en el presente documento puede variar desde una sola célula hasta aproximadamente 10^9 células. En algunas realizaciones, el número de células utilizadas en los métodos proporcionados en este documento es de aproximadamente 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 o 5×10^8 .

El número y el tipo de células recolectadas de un sujeto se pueden monitorear, por ejemplo, midiendo los cambios en la morfología y los marcadores de la superficie celular usando técnicas de detección de células estándar tales como citometría de flujo, clasificación de células, inmunocitoquímica (por ejemplo, tinción con anticuerpos de tejidos específicos o específicos del marcador celular), clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), clasificación de células activadas magnéticamente (MACS), mediante el examen de la morfología de las células usando microscopía de luz o confocal, y/o midiendo los cambios en la expresión de genes utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, tales como PCR y perfiles de expresión génica. Estas técnicas también pueden utilizarse para identificar células que sean positivas para uno o más marcadores en particular. La clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) es un método bien conocido para separar partículas, incluidas las células, basado en las propiedades fluorescentes de las partículas (Kamarch, 1987, Methods Enzymol, 151: 150-165). La excitación con láser de los restos fluorescentes en las partículas individuales da como resultado una pequeña carga eléctrica que permite la separación electromagnética de partículas positivas y negativas de una mezcla. En una realización, los anticuerpos o ligandos específicos de marcadores de la superficie celular están marcados con distintos marcadores fluorescentes. Las células se procesan a través del clasificador de células, lo que permite la separación de las células en función de su capacidad para unirse a los anticuerpos utilizados. Las partículas clasificadas por FACS pueden depositarse directamente en pocillos individuales de placas de 96 pocillos o de 384 pocillos para facilitar la separación y la clonación.

En ciertas realizaciones, se usan subconjuntos de células en los métodos proporcionados en el presente documento. Los métodos para clasificar y aislar poblaciones específicas de células son habituales en la técnica y pueden basarse en el tamaño celular, la morfología o los marcadores intracelulares o extracelulares. Tales métodos incluyen, entre otras, citometría de flujo, clasificación de flujo, FACS, separación basada en perlas, tal como clasificación de células magnéticas, separación basada en tamaño (por ejemplo, un tamiz, una serie de obstáculos o un filtro), clasificación en un dispositivo de microfluidos, separación basada en anticuerpos, sedimentación, adsorción por afinidad, extracción por afinidad, centrifugación en gradiente de densidad, microdissección con captura láser, etc.

La muestra puede ser una muestra de sangre completa, una muestra de médula ósea, una muestra de sangre parcialmente purificada o PBMC. La muestra puede ser una biopsia de tejido o una biopsia de tumor. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de médula ósea de un paciente con cáncer. En algunas realizaciones, la muestra son PBMC de un paciente con cáncer.

4.3 Cánceres

En este documento se describe un FTI para usar en métodos para tratar un cáncer en un sujeto con el FTI, y métodos para seleccionar pacientes con cáncer para un tratamiento con FTI basado en la falta de la mutación K-Ras y mutación N-Ras. El cáncer puede ser un cáncer hematopoyético o un tumor sólido. En el presente documento también se describen métodos para tratar una condición premaligna en un sujeto con un FTI, y métodos para seleccionar pacientes con una condición premaligna para un tratamiento con FTI basado en la falta de mutación K-Ras y mutación N-Ras.

En algunos ejemplos, en el presente documento se describe un FTI para usar en métodos para tratar un tumor sólido con el FTI basado en la falta de mutación K-Ras y mutación N-Ras. Los tumores sólidos son masas anormales de tejido que generalmente no contienen quistes o áreas líquidas. Los tumores sólidos pueden ser benignos o malignos. Los diferentes tipos de tumores sólidos reciben su nombre por el tipo de células que los forman (como sarcomas, carcinomas y linfomas). El tumor sólido a tratar puede ser un sarcoma y un carcinoma, que incluyen fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, osteosarcoma, y otros sarcomas, sinoviomias, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomas, rhabdomiomas, carcinoma de colon, neoplasia maligna linfoide, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma basocelular, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de tiroides medular, carcinoma papilar de tiroides, carcinoma de la glándula sebácea de feocromocitos, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de conductos biliares, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, seminoma, carcinoma de vejiga, melanoma y tumores del SNC (como un glioma (tal como el glioma del tronco encefálico y gliomas mixtos), glioblastoma (también conocido como glioblastoma multiforme), astrocitoma, linfoma del SNC, germinoma, meduloblastoma, Schwannoma craneofariangioma, ependimoma, pineaioma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, neuroblastoma, retinoblastoma y metástasis cerebrales). En algunas realizaciones, el FTI es el tipifarnib.

En algunos ejemplos, en el presente documento se describe un FTI para usar en métodos para tratar un tumor sólido con el FTI basado en la falta de mutación K-Ras y mutación N-Ras, en donde el tumor sólido es melanoma maligno, carcinoma suprarrenal, carcinoma de mama, cáncer de células renales, carcinoma del páncreas, carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM) o carcinoma de origen primario desconocido. En algunos ejemplos, el FTI es el tipifarnib. Los medicamentos comúnmente administrados a pacientes con diversos tipos o estadios de tumores sólidos incluyen, entre otros, celebrex, etopósido, ciclofosfamida, docetaxel, apicitabina, IFN, tamoxifeno, IL-2, GM-CSF, o una combinación de estos.

En algunos ejemplos, el tumor sólido a tratar por los métodos descritos en este documento puede ser cáncer de tiroides, cánceres uroteliales, cánceres de saliva, cánceres del tracto digestivo superior, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de cerebro, cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de piel, cáncer de hígado y cáncer de páncreas. En algunos ejemplos, el cáncer de vejiga a tratar por los métodos proporcionados en el presente documento puede ser un carcinoma de células de transición. De acuerdo con la invención, el cáncer es un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC). En algunos ejemplos, el FTI es el tipifarnib.

En algunos ejemplos, el tumor sólido a tratar por los métodos descritos en el presente documento puede seleccionarse entre los grupos que consisten en carcinoma, melanoma, sarcoma o enfermedad granulomatosa crónica.

En algunos ejemplos, las condiciones premalignas a tratar por los métodos descritos en este documento pueden ser queilitis actínica, esófago de Barrett, gastritis atrófica, carcinoma ductal in situ, disqueratosis congénita, disfagia sideropénica, liquen plano, fibrosis submucosa oral, fibrosis solar, displasia cervical, pólipos, leucoplasia, eritroplasia, lesión escamosa intraepitelial, un trastorno premaligno o un trastorno inmunoproliferativo premaligno.

En algunos ejemplos, en el presente documento se describe un FTI para usar en métodos para tratar un cáncer hematopoyético en un sujeto con el FTI o seleccionar pacientes con cáncer para un tratamiento con FTI basado en la falta de mutación K-Ras y mutación N-Ras. Los cánceres hematológicos son cánceres de la sangre o de la médula ósea. Los ejemplos de cánceres hematológicos (o hematógenos) incluyen neoplasias mieloproliferativas (MPN), síndrome mielodisplásico (SMD), leucemia y linfoma. En algunas realizaciones, el cáncer es la leucemia mieloide aguda (LMA), el linfoma de células asesinas naturales (linfoma NK), la leucemia de células asesinas naturales (leucemia NK), el linfoma cutáneo de células T (LCCT), la leucemia mielomonocítica juvenil (LMML), el Linfoma de células T periféricas (PTCL), leucemia mieloide crónica (CML) o leucemia mielomonocítica crónica (CMML). En algunos ejemplos, el cáncer es CMML. En algunos ejemplos, el cáncer es JMML.

En algunos ejemplos, en el presente documento se describe un FTI para usar en métodos para tratar CMML en un sujeto con el FTI o seleccionar pacientes con CMML para un tratamiento con FTI basado en la falta de mutación K-Ras y mutación N-Ras. La CMML está clasificada como una neoplasia mielodisplásica/mieloproliferativa según la clasificación de tumores hematopoyéticos de la Organización Mundial de la Salud, 2008. La CMML puede ser un CMML mielodisplásico o un CMML mieloproliferativo. Los pacientes con CMML tienen un alto número de monocitos en su sangre (al menos 1.000 por mm³). Dos clases, mielodisplásicas y mieloproliferativas, se han distinguido según el nivel del recuento de glóbulos blancos (umbral 13 g/L). A menudo, el recuento de monocitos es mucho mayor, lo que hace que su recuento total de glóbulos blancos también sea muy alto. Por lo general, hay células anormales en la médula ósea, pero la cantidad de blastos es inferior al 20%. Alrededor del 15% al 30% de los pacientes con CMML desarrollan leucemia mieloide aguda. El diagnóstico de CMML se basa en una combinación de anomalías morfológicas, histopatológicas y cromosómicas en la médula ósea. El modelo de pronóstico de Mayo clasificó a los pacientes con CMML en tres grupos de riesgo según: el aumento en el conteo absoluto de monocitos, la presencia de blastos circulantes, hemoglobina <10 g/dL y plaquetas <100 × 10⁹/L. La supervivencia media fue de 32 meses, 18,5 meses y 10 meses en los grupos de riesgo bajo, intermedio y alto, respectivamente. La clasificación de Groupe Francophone des (GFM) segregó a los pacientes de CMML en tres grupos de riesgo según: edad > 65 años, WBC > 15 × 10⁹/L, anemia, plaquetas <100 × 10⁹/L, y estado de mutación ASXL1. Después de una media de seguimiento de 2,5 años, la supervivencia varió de no alcanzada en el grupo de bajo riesgo a 14,4 meses en el grupo de alto riesgo.

En algunos ejemplos, en el presente documento se describe un FTI para usar en métodos para tratar la CMML en un sujeto determinando la presencia o ausencia de una mutación K-Ras y una mutación N-Ras en una muestra del sujeto, y posteriormente administrando una cantidad terapéuticamente efectiva del FTI al sujeto si se determina que la muestra carece de una mutación K-Ras y que carece de mutación N-Ras. En algunos ejemplos, el FTI es el tipifarnib. En algunos ejemplos, se determina que la muestra tiene K-Ras natural y N-Ras natural.

En algunos ejemplos, en el presente documento se describe un FTI para usar en métodos para tratar la CMML en un sujeto determinando la presencia o ausencia de una mutación K-Ras en una muestra del sujeto y posteriormente administrando una cantidad terapéuticamente efectiva del FTI al sujeto si la muestra carece de la mutación K-Ras. En algunos ejemplos, el FTI es el tipifarnib. En algunos ejemplos, se determina que la muestra tiene K-Ras natural.

En algunos ejemplos, en el presente documento se describe un FTI para usar en métodos para tratar la CMML en un sujeto determinando la presencia o ausencia de una mutación N-Ras en una muestra del sujeto, y posteriormente

administrando una cantidad terapéuticamente efectiva del FTI al sujeto si la muestra carece de la mutación N-Ras. En algunos ejemplos, el FTI es el tipifarnib. En algunos ejemplos, se determina que la muestra tiene N-Ras natural.

5 En algunos ejemplos, en el presente documento se describe un FTI para usar en métodos para tratar la CMML en un sujeto determinando la presencia o ausencia de una mutación K-Ras y una mutación N-Ras en una muestra del sujeto, y posteriormente administrando tipifarnib al sujeto si la muestra tiene K-Ras natural y N-Ras natural.

10 En algunos ejemplos, en el presente documento se describe un FTI para usar en métodos para tratar MDS en un sujeto con el FTI o para seleccionar pacientes de MDS para un tratamiento con FTI. MDS se refiere a un grupo diverso de trastornos de células madre hematopoyéticas. El MDS se puede caracterizar por una médula celular con morfología y maduración deterioradas (dismielopoyesis), producción de células sanguíneas ineficaces o hematopoyesis, lo que lleva a recuentos sanguíneos bajos o citopenias (incluyendo anemia, leucopenia y trombocitopenia) y alto riesgo de progresión a leucemia mieloide aguda, resultante de la producción ineficaz de células sanguíneas. Consúltese The Merck Manual 953 (17ª ed. 1999) y List et al., 1990, J Clin. Oncol. 8:1424.

15 La MDS se puede dividir en varios subtipos dependiendo de, al menos, 1) si hay un mayor número de células blásticas presentes en la médula ósea o en la sangre, y qué porcentaje de la médula o la sangre está compuesto por estas blastos; 2) si la médula muestra un crecimiento anormal (displasia) en un solo tipo de célula sanguínea (displasia de desilineación) o en más de un tipo de célula sanguínea (displasia multilineaje); y 3) si existen anomalías cromosómicas en las células de la médula ósea y, de ser así, qué tipo o tipos de anomalías. MDS también puede categorizarse en función de los marcadores de superficie de las células cancerosas. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, los subtipos de MDS incluyen citopenia refractaria con displasia unilineal (RCUD), también conocida como anemia refractaria, neutropenia refractaria o trombocitopenia refractaria; anemia refractaria con sideroblastos en anillo (RARS); citopenia refractaria con displasia multilineaje (RCMD), que incluye RCMD-RS si hay ambos displasia multilineaje y sideroblastos de anillo; anemia refractaria con exceso de blastos-1 (RAEB-1) y anemia refractaria con exceso de blastos-2 (RAEB-2) (estos subtipos significan que los pacientes tienen al menos el 5 por ciento (RAEB-1) o al menos el 10 por ciento (RAEB-2) pero menos del 20 por ciento de blastos en su médula); MDS asociado con anomalía aislada del cromosoma 5 [del(5q)]; y MDS inclasificable (MDS-U).

20 Como grupo de neoplasias malignas de células madre hematopoyéticas con morbilidad y mortalidad significativas, el MDS es una enfermedad altamente heterogénea, y la gravedad de los síntomas y la progresión de la enfermedad pueden variar ampliamente entre los pacientes. La herramienta clínica estándar actual para evaluar la estratificación del riesgo y las opciones de tratamiento es el Sistema de puntuación de pronóstico internacional revisado, o IPSS-R. El IPSS-R diferencia a los pacientes en cinco grupos de riesgo (muy bajo, bajo, intermedio, alto, muy alto) según la evaluación de la citogenética, el porcentaje de blastos (células sanguíneas indiferenciadas) en la médula ósea, los niveles de hemoglobina y los recuentos de plaquetas y neutrófilos. La OMS también sugirió estratificar a los pacientes con MDS por una anomalía del (5q).

25 Según la ACS, la incidencia anual de SMD es de aproximadamente 13.000 pacientes en los Estados Unidos, la mayoría de los cuales tienen 60 años de edad o más. La prevalencia estimada es de más de 60.000 pacientes en los Estados Unidos. Aproximadamente el 75% de los pacientes se encuentran en las categorías de riesgo IPSS-R de muy bajo, bajo e intermedio, o colectivamente conocidos como MDS de menor riesgo.

30 La lesión de células madre hematopoyéticas inicial puede deberse a causas tales como, entre otras, quimioterapia citotóxica, radiación, virus, exposición química y predisposición genética. Una mutación clonal predomina sobre la médula ósea, suprimiendo las células madre sanas. En las primeras etapas de la MDS, la causa principal de las citopenias es el aumento de la muerte celular programada (apoptosis). A medida que la enfermedad progresa y se convierte en leucemia, la mutación genética rara vez ocurre y una proliferación de células leucémicas supera a las de la médula sana. El curso de la enfermedad difiere: algunos casos se comportan como una enfermedad indolente y otros se comportan de manera agresiva con un curso clínico muy corto que se convierte en una forma aguda de leucemia.

35 Un grupo internacional de hematólogos, el Grupo cooperativo franco-estadounidense-británico (FAB) clasificó los trastornos de MDS en cinco subgrupos, diferenciándolos de la AML. El Manual Merck 954 (17ª ed. 1999); Bennett J. M., et al., Ann. Intern. Med. Octubre de 1985, 103 (4): 620-5; y Besa E. C., Med. Clin. North Am., mayo de 1992, 76 (3): 599-617. En todos los subtipos se encuentra un cambio displásico subyacente del trilineaje en las células de la médula ósea de los pacientes.

40 Hay dos subgrupos de anemia refractaria caracterizada por mieloblastos del cinco por ciento o menos en la médula ósea: (1) anemia refractaria (AR) y; (2) La AR con sideroblastos anillados (RARS), definida morfológicamente por tener un 15% de células eritroides con sideroblastos anillados anormales, lo que refleja una acumulación anormal de hierro en las mitocondrias. Ambos tienen un curso clínico prolongado y una baja incidencia de progresión a la leucemia aguda. Besa E. C., Med. Clin. North Am., mayo de 1992, 76 (3): 599-617.

45 Hay dos subgrupos de anemias refractarias con más de cinco por ciento de mieloblastos: (1) RA con blastos en exceso (RAEB), definido como 6-20% de mieloblastos, y (2) RAEB en transformación (RAEB-T), con 21-30% de mieloblastos. Cuanto mayor es el porcentaje de mieloblastos, más corto es el curso clínico y más cerca está la

enfermedad de la leucemia mielógena aguda. La transición del paciente de etapas tempranas a etapas más avanzadas indica que estos subtipos son meramente etapas de la enfermedad en lugar de entidades distintas. Con frecuencia, se considera que los pacientes ancianos con MDS con displasia de trilineal y más de 30% de mieloblastos que progresan a leucemia aguda tienen un mal pronóstico debido a que su tasa de respuesta a la quimioterapia es más baja que la de los pacientes con leucemia mielóide aguda de novo. El quinto tipo de MDS, el más difícil de clasificar, es CMML. Este subtipo puede tener cualquier porcentaje de mieloblastos, pero se presenta con una monocitosis de 1000/dL o más. Puede estar asociado a esplenomegalia. Este subtipo se superpone con un trastorno mieloproliferativo y puede tener un curso clínico intermedio. Se diferencia del clásico CML que se caracteriza por un cromosoma Ph negativo.

La MDS es principalmente una enfermedad de personas mayores con una media de inicio en la séptima década de la vida. La edad media de estos pacientes es de 65 años, con edades que van desde la tercera década de la vida hasta los 80 años o más. El síndrome puede ocurrir en cualquier grupo de edad, incluida la población pediátrica. Los pacientes que sobreviven al tratamiento maligno con agentes alquilantes, con o sin radioterapia, tienen una alta incidencia de desarrollar SMD o leucemia aguda secundaria. Alrededor del 60-70% de los pacientes no tienen una exposición obvia o causa de MDS, y se clasifican como pacientes primarios de MDS.

En algunos ejemplos, en el presente documento se describe un FTI para usar en métodos para tratar la MPN en un sujeto con el FTI o para seleccionar pacientes de la MPN para un tratamiento con FTI. La MPN es un grupo de enfermedades que afectan a la formación de células sanguíneas. En todas las formas de MPN, las células madre en la médula ósea desarrollan defectos genéticos (llamados defectos adquiridos) que hacen que crezcan y sobrevivan de manera anormal. Esto da como resultado un número inusualmente alto de células sanguíneas en la médula ósea (médula hiper celular) y en el torrente sanguíneo. A veces, en la MPN, las células madre anormales causan cicatrización en la médula ósea, llamada mielofibrosis. La mielofibrosis puede conducir a niveles bajos de células sanguíneas, especialmente niveles bajos de glóbulos rojos (anemia). En la MPN, las células madre anormales también pueden crecer en el bazo, causando que el bazo se agrande (esplenomegalia), y en otros sitios fuera de la médula, causando el agrandamiento de otros órganos.

Existen varios tipos de MPN crónica, en función de las células afectadas. Tres tipos clásicos de NMP incluyen la policitemia vera (PV), en la que hay demasiados glóbulos rojos; trombocitemia esencial (TE), en la que hay demasiadas plaquetas; mielofibrosis primaria (PMF), en la que se acumulan fibras y blastos (células madre anormales) en la médula ósea. Otros tipos de MPN incluyen: leucemia mielóide crónica, en la que hay demasiados glóbulos blancos; leucemia neutrofílica crónica, en la que hay demasiados neutrófilos; leucemia eosinofílica crónica, no especificada de otro modo, en la que hay demasiados eosinófilos (hipereosinofilia); mastocitosis, también llamada enfermedad de los mastocitos, en la que hay demasiados mastocitos, que son un tipo de célula del sistema inmunitario que se encuentra en los tejidos, como la piel y los órganos digestivos, en lugar de en el torrente sanguíneo; neoplasias mieloides y linfoides con eosinofilia y anomalías de los genes PDGFRA, PDGFRB y FGFR1; y otras neoplasias mieloproliferativas inclasificables.

En algunos ejemplos, en el presente documento se describe un FTI para usar en métodos para tratar la leucemia en un sujeto con el FTI o seleccionar pacientes de leucemia para un tratamiento del FTI. La leucemia se refiere a neoplasias malignas de los tejidos formadores de sangre. Se describen varias formas de leucemias, por ejemplo, en la patente de EE.UU. No. 7.393.862 y la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos No. 60/380.842, presentada el 17 de mayo de 2002. Aunque, según se informa, los virus causan varias formas de leucemia en animales, las causas de la leucemia en humanos son, en gran medida, desconocidas. El Manual Merck, 944-952 (17ª ed. 1999). La transformación a malignidad ocurre típicamente en una sola célula a través de dos o más pasos con la proliferación subsiguiente y la expansión clonal. En algunas leucemias, se han identificado translocaciones cromosómicas específicas con morfología celular leucémica consistente y características clínicas especiales (por ejemplo, translocaciones de 9 y 22 en leucemia mielocítica crónica, y de 15 y 17 en leucemia promielocítica aguda). Las leucemias agudas son predominantemente poblaciones de células indiferenciadas y las leucemias crónicas son más formas de células maduras.

Las leucemias agudas se dividen en tipos linfoblásticos (LLA) y no linfoblásticos (ANLL). El Manual Merck, 946-949 (17ª ed. 1999). Se pueden subdividir aún más por su apariencia morfológica y citoquímica según la clasificación franco-estadounidense-británica (FAB) o según su tipo y grado de diferenciación. El uso de anticuerpos monoclonales específicos de células B y T y de antígeno mielóide es más útil para la clasificación. La ALL es predominantemente una enfermedad infantil que se establece mediante los hallazgos de laboratorio y el examen de médula ósea. La ANLL, también conocida como leucemia mielógena aguda o AML, ocurre en todas las edades y es la leucemia aguda más común entre los adultos; es la forma generalmente asociada con la irradiación como agente causal. En algunos ejemplos, en el presente documento se describe un FTI para usar en métodos para tratar a un paciente con LMA con el FTI, o métodos para seleccionar pacientes para el tratamiento del FTI.

Los procedimientos estándar para tratar a los pacientes con AML suelen incluir 2 fases de quimioterapia (quimioterapia): inducción de la remisión (o inducción) y consolidación (terapia posterior a la remisión). La primera parte del tratamiento (inducción de remisión) está dirigida a eliminar la mayor cantidad posible de células leucémicas. La intensidad del tratamiento puede depender de la edad y la salud de una persona. La quimioterapia intensiva a menudo se administra a personas menores de 60 años. Algunos pacientes mayores que gozan de buena

salud pueden beneficiarse de un tratamiento similar o ligeramente menos intensivo. Las personas que son mucho mayores o que tienen mala salud no son adecuadas para quimioterapias intensivas.

En pacientes más jóvenes, como los menores de 60 años, la inducción a menudo implica el tratamiento con 2 medicamentos de quimioterapia, citarabina (ara-C) y un medicamento de antraciclina como la daunorubicina (daunomicina) o idarubicina. Algunas veces también se administra un tercer medicamento, cladribina (Leustatin, 2-CdA). La quimioterapia generalmente se administra en el hospital y dura aproximadamente una semana. En casos raros en los que la leucemia se ha diseminado al cerebro o la médula espinal, también se puede administrar quimioterapia en el líquido cefalorraquídeo (LCR). La radioterapia también podría usarse.

La inducción se considera exitosa si se logra la remisión. Sin embargo, la AML en algunos pacientes puede ser refractaria a la inducción. En los pacientes que responden a la inducción, se administra un tratamiento adicional para tratar de destruir las células de leucemia restantes y ayudar a prevenir una recaída, lo que se denomina consolidación. Para los pacientes más jóvenes, las principales opciones para la terapia de consolidación son: varios ciclos de quimioterapia con altas dosis de citarabina (ara-C) (a veces conocida como HiDAC); trasplante alogénico de células madre (donante); y trasplante autólogo de células madre.

Las leucemias crónicas se describen como linfocíticas (CLL) o mielocíticas (CML). El Manual Merck, 949-952 (17ª ed. 1999). La CLL se caracteriza por la aparición de linfocitos maduros en la sangre, la médula ósea y los órganos linfoides. El sello distintivo de la CLL es la linfocitosis absoluta ($> 5.000/\mu\text{L}$) y un aumento de linfocitos en la médula ósea. La mayoría de los pacientes con CLL también tienen expansión clonal de linfocitos con características de células B. La CLL es una enfermedad de la edad media o avanzada. En la CML, el rasgo característico es el predominio de células granulocíticas en todas las etapas de diferenciación en la sangre, médula ósea, hígado, bazo y otros órganos. En el paciente sintomático en el momento del diagnóstico, el recuento total de glóbulos blancos (WBC, por sus siglas en inglés) suele ser de aproximadamente $200.000/\mu\text{L}$, pero puede llegar a $1.000.000/\mu\text{L}$. La CML es relativamente fácil de diagnosticar debido a la presencia del cromosoma Filadelfia. Se sabe que las células estromales de la médula ósea facilitan la progresión de la enfermedad de la CLL y la resistencia a la quimioterapia. Interrumpir las interacciones entre las células de la CLL y las células del estroma es un objetivo adicional de la quimioterapia para la CLL.

Además, otras formas de LLC incluyen la leucemia prolinfocítica (PLL), la leucemia de linfocitos granulares grandes (LGL), la leucemia de células pilosas (HCL). Las células cancerosas en la PLL son similares a las células normales llamadas prolinfocitos, formas inmaduras de linfocitos B (B-PLL) o linfocitos T (T-PLL). Tanto B-PLL como T-PLL tienden a ser más agresivos que el tipo habitual de CLL. Las células cancerosas de LGL son grandes y tienen características de células T o NK. La mayoría de las leucemias LGL son de crecimiento lento, pero un número pequeño es más agresivo. La HCL es otro tipo de cáncer de linfocitos que tiende a progresar lentamente y representa aproximadamente el 2% de todas las leucemias. Las células cancerosas son un tipo de linfocito B, pero son diferentes de las que se observan en la CLL.

La leucemia mielomonocítica juvenil (JMML, por sus siglas en inglés) es una leucemia crónica grave que afecta a niños en su mayoría de 4 años y menores. La edad promedio de los pacientes al momento del diagnóstico es de 2 años. La Organización Mundial de la Salud ha categorizado la JMML como un trastorno mielodisplásico y mieloproliferativo mixto. La JMML abarca diagnósticos anteriormente denominados leucemia mielóide crónica juvenil (JCML), leucemia mielomonocítica crónica de la infancia y síndrome de monosomía 7 infantil.

El linfoma se refiere a los cánceres que se originan en el sistema linfático. El linfoma se caracteriza por neoplasias malignas de linfocitos: linfocitos B (linfoma de células B), linfocitos T (linfoma de células T) y células asesinas naturales (linfoma de células NK). El linfoma generalmente comienza en los ganglios linfáticos o en la acumulación de tejido linfático en órganos que incluyen, entre otros, el estómago o los intestinos. El linfoma puede afectar a la médula ósea y la sangre en algunos casos. El linfoma se puede diseminar de un sitio a otras partes del cuerpo.

Los tratamientos de las diversas formas de linfomas se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. No. 7.468.363. Dichos linfomas incluyen, entre otros, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma cutáneo de células B, linfoma activado de células B, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma de células del manto (MCL), linfoma folicular (FL; incluyendo, entre otros, FL grado I, FL grado II), linfoma del centro folicular, linfoma transformado, linfoma linfocítico de diferenciación intermedia, linfoma linfocítico intermedio (ILL), linfoma linfocítico difuso pobremente diferenciado (PDL), linfoma centrocítico, linfoma de células escindidas difuso pequeño (DSCCL), linfomas de células T periféricas (PTCL), linfoma de células T cutáneas (CTCL) y linfoma de la zona del manto y linfoma folicular de bajo grado.

El linfoma no Hodgkin (LNH) es el quinto cáncer más común entre hombres y mujeres en los Estados Unidos con una estimación de 63.190 casos nuevos y 18.660 muertes en 2007. Jemal A, et al., CA Cancer J Clin 2007; 57 (1): 43-66. La probabilidad de desarrollar LNH aumenta con la edad y la incidencia de LNH en los ancianos ha aumentado de manera constante en la última década, lo que ha generado preocupación por el envejecimiento de la población de los EE. UU. Id. Clarke C A, et al., Cancer 2002; 94 (7): 2015-2023.

La DLBCL representa aproximadamente un tercio de los linfomas no Hodgkin. Mientras que algunos pacientes con DLBCL se curan con quimioterapia tradicional, el resto muere a causa de la enfermedad. Los fármacos contra el cáncer causan el agotamiento rápido y persistente de los linfocitos, posiblemente por la inducción directa de la apoptosis en células T y B maduras. Véase K. Stahnke. et al., Blood 2001, 98: 3066-3073. Se ha demostrado que el recuento absoluto de linfocitos (ALC) es un factor pronóstico en el linfoma folicular no Hodgkin y los resultados recientes han sugerido que el ALC en el momento del diagnóstico es un factor pronóstico importante en la DLBCL.

La DLBCL se puede dividir en distintos subtipos moleculares de acuerdo con sus patrones de perfiles de genes: DLBCL tipo células B del centro germinal (GCB-DLBCL), DLBCL tipo células B activadas (ABC-DLBCL) y linfoma mediastínico de células B primarias (PMBL) o tipo sin clasificar. Estos subtipos se caracterizan por diferencias distintivas en la supervivencia, la quimiorreactividad y la dependencia de la vía de señalización, en particular la vía NF- κ B. Véase D. Kim et al., Journal of Clinical Oncology, Actas de la Reunión Anual de la ASCO 2007, Parte I. Vol. 25, No. 18S (Suplemento del 20 de junio), 2007: 8082. Véase Bea S, et al., Blood 2005; 106: 3183-90; Ngo V. N. et al., Nature 2011; 470: 115-9. Tales diferencias han llevado a la búsqueda de estrategias de tratamiento más efectivas y específicas para cada subtipo en la DLBCL. Además de la clasificación aguda y crónica, las neoplasias también se clasifican en función de las células que dan lugar a este trastorno en precursor o periférico. Véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE.UU. N° 2008/0051379. Las neoplasias precursoras incluyen ALL y linfomas linfoblásticos y se presentan en los linfocitos antes de que se hayan diferenciado en células T o B. Las neoplasias periféricas son aquellas que se producen en los linfocitos que se han diferenciado en células T o B. Dichas neoplasias periféricas incluyen, entre otras, CLL de células B, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmocítico, linfoma de células del manto, linfoma folicular, linfoma extranodal de células B de la zona marginal de tejido linfático asociado a mucosa, linfoma de la zona marginal nodal, linfoma esplénico de la zona marginal, leucemia de células pilosas, plasmacitoma, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) y linfoma de Burkitt. En más del 95 por ciento de los casos de CLL, la expansión clonal es de un linaje de células B. Véase Cancer: Principles & Practice of Oncology (3ª edición) (1989) (pp. 1843-1847). En menos del 5 por ciento de los casos de CLL, las células tumorales tienen un fenotipo de células T. A pesar de estas clasificaciones, sin embargo, el deterioro patológico de la hematopoyesis normal es el distintivo de todas las leucemias.

La PTCL consiste en un grupo de NHL raras y generalmente agresivas (de rápido crecimiento) que se desarrollan a partir de células T maduras. En conjunto, las PTCL representan alrededor del 4 al 10 por ciento de todos los casos de NHL, lo que corresponde a una incidencia anual de 2.800-7.200 pacientes por año en los Estados Unidos. Según algunas estimaciones, la incidencia de PTCL está creciendo significativamente, y el aumento de la incidencia puede deberse a un envejecimiento de la población. Las PTCL se subclasifican en varios subtipos, cada uno de los cuales se considera típicamente como enfermedades separadas en función de sus diferencias clínicas distintas. La mayoría de estos subtipos son raros; los tres subtipos más comunes de PTCL no especificados de otra manera, el linfoma anaplásico de células grandes, o ALCL, y el linfoma angioinmunoblástico de células T, que en conjunto representan aproximadamente el 70 por ciento de todas las PTCL en los Estados Unidos. El ALCL puede ser ALCL cutáneo o ALCL sistémico.

Para la mayoría de los subtipos de PTCL, el régimen de tratamiento preferido en primer lugar suele ser la quimioterapia de combinación, como CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona), EPOCH (etopósido, vincristina, doxorubicina, ciclofosfamida, prednisona) u otros regímenes con múltiples medicamentos. Los pacientes que recaen o son refractarios a los tratamientos preferidos en primer lugar generalmente se tratan con gemcitabina en combinación con otras quimioterapias, incluida la vinorelbina (Navelbine®) y la doxorubicina (Doxil®) en un régimen llamado GND, u otros regímenes quimioterapéuticos tales como el DHAP (dexametasona, citarabina, cisplatino) o ESHAP (etopósido, metilprednisolona, citarabina y cisplatino).

Debido a que la mayoría de los pacientes con PTCL recaerán, algunos oncólogos recomiendan administrar altas dosis de quimioterapia seguido de un trasplante autólogo de células madre a algunos pacientes que tuvieron una buena respuesta a su quimioterapia inicial. Las terapias recientes, no citotóxicas, que han sido aprobadas para PTCL recidivante o refractaria, tal como el pralatrexato (Folotyn®), romidepsin (Istodax®) y belinostat (Beleodaq®), se asocian con tasas de respuesta objetivas relativamente bajas (25-27% tasa de respuesta global u ORR) y duraciones de respuesta relativamente cortas (8,2-9,4 meses). Por consiguiente, el tratamiento de la PTCL recidivante/refractaria sigue siendo una necesidad médica importante no satisfecha.

El mieloma múltiple (MM) es un cáncer de las células plasmáticas en la médula ósea. Normalmente, las células plasmáticas producen anticuerpos y desempeñan un papel clave en la función inmunológica. Sin embargo, el crecimiento descontrolado de estas células provoca dolor y fracturas en los huesos, anemia, infecciones y otras complicaciones. El mieloma múltiple es la segunda neoplasia maligna hematológica más común, aunque las causas exactas del mieloma múltiple siguen siendo desconocidas. El mieloma múltiple causa altos niveles de proteínas en la sangre, la orina y los órganos, que incluyen, entre otros, las proteínas M y otras inmunoglobulinas (anticuerpos), albúmina y beta-2-microglobulina. La proteína M, abreviatura de proteína monoclonal, también conocida como paraproteína, es una proteína particularmente anormal producida por las células plasmáticas del mieloma y se puede encontrar en la sangre u orina de casi todos los pacientes con mieloma múltiple.

Los síntomas esqueléticos, incluido el dolor en los huesos, se encuentran entre los síntomas clínicamente más significativos del mieloma múltiple. Las células plasmáticas malignas liberan factores estimulantes de osteoclastos

(que incluyen IL-1, IL-6 y TNF) que causan la lixiviación del calcio de los huesos y lesiones líticas; la hipercalcemia es otro síntoma. Los factores estimulantes de los osteoclastos, también conocidos como citoquinas, pueden prevenir la apoptosis o la muerte de las células del mieloma. El cincuenta por ciento de los pacientes tienen lesiones esqueléticas relacionadas con mieloma detectables radiológicamente en el momento del diagnóstico. Otros síntomas clínicos comunes para el mieloma múltiple incluyen polineuropatía, anemia, hiperviscosidad, infecciones e insuficiencia renal.

Se sabe que las células estromales de la médula ósea facilitan la progresión de la enfermedad del mieloma múltiple y la resistencia a la quimioterapia. Interrumpir las interacciones entre las células del mieloma múltiple y las células del estroma es un objetivo adicional de la quimioterapia del mieloma múltiple.

En algunos ejemplos, en el presente documento se describen métodos para predecir la capacidad de respuesta de un paciente con MDS frente a un tratamiento con FTI, métodos para la selección de la población de pacientes con MDS para un tratamiento con FTI, y métodos para tratar MDS en un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI, basada en el estado de mutación Ras en una muestra del paciente. En algunos ejemplos, en el presente documento se describen métodos para predecir la capacidad de respuesta de un paciente con MPN a un tratamiento con FTI, métodos para la selección de la población de pacientes con MDS para un tratamiento con FTI y métodos para tratar la MPN en un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI, basada en el estado de mutación Ras en una muestra del paciente. En algunos ejemplos, en el presente documento se describen métodos para predecir la capacidad de respuesta de un paciente con AML frente a un tratamiento con FTI, métodos para la selección de la población de pacientes con AML para un tratamiento con FTI y métodos para tratar la AML en un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI, basada en el estado de mutación Ras en una muestra del paciente. En algunos ejemplos, en el presente documento se describen métodos para predecir la capacidad de respuesta de un paciente con JMML frente a un tratamiento con FTI, métodos para la selección de la población de pacientes con JMML para un tratamiento con FTI y métodos para tratar la JMML en un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI, basada en el estado de mutación Ras en una muestra del paciente.

En algunos ejemplos, en el presente documento se describen métodos para predecir la capacidad de respuesta de un paciente con CMML frente a un tratamiento con FTI, métodos para la selección de la población de pacientes con CMML para un tratamiento con FTI, y métodos para tratar la CMML en un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI, basada en el estado de mutación Ras en una muestra del paciente. En algunos ejemplos, en este documento se describe un método para tratar CMML en un sujeto según el estado de mutación de K-Ras, N-Ras o ambos. El método descrito en este documento incluye (a) determinar la presencia o ausencia de una mutación Ras en una muestra del sujeto, en donde la mutación Ras incluye una mutación K-Ras o una mutación N-Ras y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI a dicho sujeto si se determina que dicha muestra carece de la mutación K-Ras o la mutación N-Ras. En algunos ejemplos, se determina que la muestra no tiene ninguna mutación K-Ras o ninguna mutación N-Ras. En algunos ejemplos, se determina que la muestra tiene K-Ras natural. En algunos ejemplos, se determina que la muestra tiene N-Ras natural. En algunos ejemplos, se determina que la muestra tiene K-Ras natural y N-Ras natural. En algunos ejemplos, el FTI es el tipifarnib.

En algunos ejemplos, en el presente documento se describen métodos para predecir la capacidad de respuesta de un paciente con CMML al tipifarnib, métodos para la selección de la población de pacientes con CMML para el tratamiento con tipifarnib, y métodos para tratar la CMML en un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un tipifarnib, según el estado de mutación de K-Ras y N-Ras en la muestra del paciente. En algunos ejemplos, en este documento se describe un método para tratar CMML en un sujeto según el estado de mutación de K-Ras, N-Ras o ambos. El método descrito en este documento incluye (a) determinar la presencia o ausencia de una mutación Ras en una muestra de un sujeto que tiene CMML, en donde la mutación Ras incluye una mutación K-Ras o una mutación N-Ras y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de tipifarnib al sujeto si se determina que la muestra carece de la mutación K-Ras o la mutación N-Ras. En algunos ejemplos, se determina que la muestra no tiene ninguna mutación K-Ras o ninguna mutación N-Ras. En algunos ejemplos, se determina que la muestra tiene K-Ras natural. En algunos ejemplos, se determina que la muestra tiene N-Ras natural. En algunos ejemplos, se determina que la muestra tiene K-Ras natural y N-Ras natural.

4.4. FTI y dosificaciones ejemplares

En algunos ejemplos, en este documento se describe tipifarnib para usar en un método para tratar un cáncer en un sujeto según el estado de mutación de K-Ras, N-Ras o ambos. El método descrito en este documento incluye (a) determinar la presencia o ausencia de una mutación Ras en una muestra del sujeto, en donde la mutación Ras incluye una mutación K-Ras o una mutación N-Ras y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de tipifarnib a dicho sujeto si se determina que dicha muestra carece de la mutación K-Ras o la mutación N-Ras. En algunos ejemplos, se determina que la muestra tiene K-Ras natural. En algunos ejemplos, se determina que la muestra tiene N-Ras natural. En algunos ejemplos, se determina que la muestra tiene K-Ras natural y N-Ras natural. En algunos ejemplos, los métodos incluyen administrar al sujeto otro FTI descrito en el presente documento o conocido de otro modo en la técnica. En algunos ejemplos, el FTI se selecciona del grupo que consiste en tipifarnib, arglabin, alcohol perrílico, lonafarnib (SCH-66336), L778123, L739749, FTI-277, L744832, CP-609.754, R208176, AZD3409 y BMS-214662.

En algunos ejemplos, en este documento se describe tipifarnib para usar en un método para tratar un cáncer hematológico en un sujeto basándose en el estado de mutación de K-Ras, N-Ras o ambos. El método descrito en este documento incluye (a) determinar la presencia o ausencia de una mutación Ras en una muestra del sujeto, en donde la mutación Ras incluye una mutación K-Ras o una mutación N-Ras y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de tipifarnib a dicho sujeto si se determina que dicha muestra carece de la mutación K-Ras o la mutación N-Ras. En algunos ejemplos, se determina que la muestra tiene K-Ras natural. En algunos ejemplos, se determina que la muestra tiene N-Ras natural. En algunos ejemplos, los métodos incluyen administrar al sujeto otro FTI descrito en el presente documento o conocido de otro modo en la técnica. En algunos ejemplos, el FTI se selecciona del grupo que consiste en tipifarnib, arglabin, alcohol perrílico, lonafarnib (SCH-66336), L778123, L739749, FTI-277, L744832, CP-609.754, R208176, AZD3409 y BMS-214662.

En algunos ejemplos, en este documento se describe tipifarnib para usar en un método para tratar CMML en un sujeto según el estado de mutación de K-Ras, N-Ras o ambos. El método descrito en este documento incluye (a) determinar la presencia o ausencia de una mutación Ras en una muestra del sujeto, en donde la mutación Ras incluye una mutación K-Ras o una mutación N-Ras y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de tipifarnib a dicho sujeto si se determina que dicha muestra carece de la mutación K-Ras o la mutación N-Ras. En algunos ejemplos, se determina que la muestra tiene K-Ras natural. En algunos ejemplos, se determina que la muestra tiene N-Ras natural. En algunos ejemplos, se determina que la muestra tiene K-Ras natural y N-Ras natural. En algunos ejemplos, los métodos incluyen administrar al sujeto otro FTI descrito en el presente documento o conocido de otro modo en la técnica. En algunos ejemplos, el FTI se selecciona del grupo que consiste en tipifarnib, arglabin, alcohol perrílico, lonafarnib (SCH-66336), L778123, L739749, FTI-277, L744832, CP-609.754, R208176, AZD3409 y BMS-214662.

En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra por vía oral, parenteral, rectal o tópica. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra por vía oral.

En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra en una dosis de 1-1000 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra dos veces al día. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra en una dosis de 200-1200 mg dos veces al día. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra a una dosis de 600 mg dos veces al día. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra a una dosis de 900 mg dos veces al día.

En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra en ciclos de tratamiento. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra en semanas alternas. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra en los días 1-7 y 15-21 de un ciclo de tratamiento de 28 días. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra por vía oral a una dosis de 900 mg dos veces al día en los días 1-7 y 15-21 de un ciclo de tratamiento de 28 días.

En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra durante al menos 3 ciclos. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra durante al menos 6 ciclos. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra hasta en 12 ciclos. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra por vía oral a una dosis de 900 mg dos veces al día en los días 1-7 y 15-21 de un ciclo de tratamiento de 28 días durante al menos tres ciclos.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan métodos para tratar CMML en un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un tipifarnib, según el estado de mutación de K-Ras en una muestra del paciente. En algunas realizaciones, en este documento se proporciona un método para tratar CMML en un sujeto que incluye (a) determinar una muestra del sujeto para tener K-Ras natural y, posteriormente, (b) administrar el tipifarnib al sujeto en una dosis de 900 mg dos veces al día en los días 1-7 y 15-21 de un ciclo de tratamiento de 28 días.

En algunos ejemplos, en el presente documento se describe tipifarnib para usar en métodos para tratar CMML en un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un tipifarnib, según el estado de mutación de N-Ras en una muestra del paciente. En algunos ejemplos, en este documento se proporciona un método para tratar CMML en un sujeto que incluye (a) determinar una muestra del sujeto para tener N-Ras natural y, posteriormente, (b) administrar el tipifarnib al sujeto en una dosis de 900 mg dos veces al día en los días 1-7 y 15-21 de un ciclo de tratamiento de 28 días.

En algunos ejemplos, en el presente documento se describe tipifarnib para usar en métodos para tratar CMML en un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un tipifarnib, según el estado de mutación de K-Ras y N-Ras en una muestra del paciente. En algunos ejemplos, en este documento se describe un método para tratar CMML en un sujeto que incluye (a) determinar una muestra del sujeto para tener K-Ras natural y N-Ras natural y, posteriormente, (b) administrar el tipifarnib al sujeto en una dosis de 900 mg dos veces al día en los días 1-7 y 15-21 de un ciclo de tratamiento de 28 días.

5. H-Ras mutante como biomarcadores para el tratamiento con FTI

5.1. Estado de la mutación H-Ras

La proteína H-ras participa en la regulación de la división celular en respuesta a la estimulación del factor de crecimiento. Los factores de crecimiento actúan al unir los receptores de la superficie celular que abarcan la membrana plasmática de la célula. Una vez activados, los receptores estimulan los eventos de transducción de señales en el citoplasma, un procedimiento mediante el cual las proteínas y los segundos mensajeros transmiten señales desde el exterior de la célula al núcleo de la célula e instruyen a la célula a crecer o dividirse. H-ras se localiza en la membrana plasmática y es un elemento activo inicial en muchas vías de transducción de señales. H-ras actúa como un interruptor de encendido/apagado molecular; una vez que se enciende, recluta y activa las proteínas necesarias para la propagación de la señal del receptor. En ciertos tumores, las mutaciones en H-ras o sus efectores en sentido ascendente hacen que esté permanentemente activado, lo que resulta en una activación persistente de señales de crecimiento y proliferación posteriores que impulsan el crecimiento de las células tumorales. Los FTI trabajan para prevenir el crecimiento y la proliferación aberrantes de las células que dependen de estas vías de señalización mediante la inhibición de la farnesilación de proteínas y la subsiguiente localización de la membrana de H-ras, por lo tanto, desactivando H-ras.

Los FTI, como el tipifarnib, previenen la farnesilación de la proteína, un tipo de modificación de la proteína conocida como prenilación, que junto con otras modificaciones de la proteína, permite la localización en la membrana de H-ras donde puede recibir y transmitir señales extracelulares implicadas en la iniciación y el desarrollo del cáncer. Los FTI, tales como el tipifarnib, pueden bloquear la farnesilación de H-ras y su posterior localización en la membrana, e inhibir la transformación celular oncogénica dirigida por H-ras in vitro e in vivo. Mientras que K-ras y N-ras utilizan de manera similar la farnesilación de proteínas, también pueden utilizar una vía de prenilación relacionada que también conduce a la localización de la membrana. Mientras tanto, la localización de la membrana H-ras depende únicamente de la farnesilación de las proteínas.

En algunas realizaciones, el cáncer a tratar por los métodos proporcionados en el presente documento puede tener mutaciones H-ras. En algunas realizaciones, el cáncer a tratar por los métodos proporcionados en el presente documento puede ser un cáncer de cabeza y cuello con mutación H-ras. Los métodos proporcionados en el presente documento o de otro modo conocidos en la técnica pueden usarse para determinar el estado de mutación de un gen ras. En algunas realizaciones, el estado de mutación de un gen ras se puede determinar en un ensayo basado en NGS. En algunas realizaciones, el estado de mutación de un gen ras puede determinarse mediante un ensayo cualitativo basado en PCR. Un ensayo cualitativo basado en PCR puede ser técnicamente similar a los ensayos basados en PCR ya desarrollados y aprobados por la FDA para K-ras. En algunas realizaciones, el estado de mutación de un gen ras se puede determinar en forma de un diagnóstico complementario al tratamiento con FTI, como el tratamiento con tipifarnib. El diagnóstico complementario se puede realizar en la clínica donde el paciente recibe el tratamiento con tipifarnib, o en un sitio diferente.

En el presente documento se describen métodos de selección de pacientes con cáncer para el tratamiento con un FTI según la presencia de una mutación H-Ras. Estos métodos se basan, en parte, en el descubrimiento de que la mutación H-Ras está asociada con los beneficios clínicos del tratamiento con FTI y, por lo tanto, se puede usar para predecir la capacidad de respuesta de un paciente con cáncer frente a un tratamiento con FTI. Por consiguiente, en este documento se describen métodos para predecir la capacidad de respuesta de un paciente con cáncer frente a un tratamiento con FTI, métodos para la selección de la población de pacientes con cáncer para un tratamiento con FTI, y métodos para tratar el cáncer en un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI, basado en la presencia de la mutación H-Ras en una muestra del paciente. El cáncer puede ser un cáncer hematopoyético o un tumor sólido. En algunos ejemplos, el cáncer es un tumor sólido.

Se describe en este documento un FTI para usar en un método para tratar un cáncer en un sujeto basándose en la presencia de una mutación H-Ras. El método proporcionado en este documento incluye (a) determinar la presencia o ausencia de una mutación H-Ras en una muestra del sujeto y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del FTI al sujeto si se determina que la muestra tiene una mutación H-Ras. La muestra puede ser una muestra tumoral. En algunas realizaciones, los métodos incluyen (a) determinar que un paciente con cáncer tiene una mutación H-Ras y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI al sujeto.

En algunas realizaciones, la mutación H-Ras es una mutación en un codón seleccionado del grupo que consiste en G12, G13 y Q61. En algunas realizaciones, la mutación H-Ras puede ser una mutación seleccionada del grupo que consiste en las sustituciones de aminoácidos de G12R, G12V, G13C, G13R, Q61L y Q61R. En algunas realizaciones, la mutación puede ser una mutación en otro codón que resulta en la activación de la proteína H-Ras.

Los métodos proporcionados en este documento incluyen además (a) determinar la presencia o ausencia de una mutación K-Ras y una mutación N-Ras en una muestra del sujeto y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un FTI al sujeto si la muestra no tiene la mutación K-Ras o la mutación N-Ras. En algunos ejemplos, el método incluye administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un FTI al sujeto si la muestra tiene K-Ras natural y N-Ras natural.

En algunos ejemplos, la mutación K-Ras es una mutación K_A -Ras. En algunos ejemplos, la mutación K-Ras es la mutación K_B -Ras. En algunos ejemplos, la mutación K-Ras es una combinación de la mutación K_A -Ras y una mutación K_B -Ras. La mutación K-Ras puede incluir una mutación en un codón seleccionado del grupo que consiste

en G12, G13 y Q61 de K_A-Ras, K_B-Ras o ambos. En algunos ejemplos, la mutación K_A-Ras puede incluir una mutación seleccionada del grupo que consiste en las sustituciones de aminoácidos G12C, G12D, G12A, G12V, G12S, G12F, G12R, G12N, G13C, G13D, G13R, G13S, G13N, Q61 K, Q61 H, Q61 L, Q61 P, Q61 R y A146V. En algunos ejemplos, la mutación K_B-Ras puede incluir una mutación seleccionada del grupo que consiste en las sustituciones de aminoácidos G12C, G12D, G12A, G12V, G12S, G12F, G12R, G12N, G13C, G13D, G13R, G13S, G13N, Q61 K, Q61 H, Q61 L, Q61 P, Q61 R y A146V.

En algunos ejemplos, la mutación N-Ras puede incluir al menos una mutación en un codón seleccionado del grupo que consiste en G12, G13, G15, G60 y Q61. En algunos ejemplos, la mutación N-Ras puede incluir al menos una mutación en un codón seleccionado del grupo que consiste en G12, G13 y Q61. En algunos ejemplos, la mutación N-Ras puede incluir al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en las sustituciones de aminoácidos de G12C, G12D, G12F, G12S, G12A, G12V, G12R, G13C, G13R, G13A, G13D, G13V, G15W, G60E, Q61P, Q61L, Q61R, Q61K, Q61H y Q61E.

En algunos ejemplos, se determina que la muestra no tiene sustitución de aminoácidos en G12, G13 y Q61 de K-Ras, y tampoco tiene sustitución de aminoácidos en G12, G13 y Q61 de N-Ras. En algunos ejemplos, se determina que la muestra no tiene ninguna mutación K-Ras o ninguna mutación N-Ras. En algunos ejemplos, se determina que la muestra tiene K-Ras natural y N-Ras natural.

En algunos ejemplos, el método proporcionado en este documento incluye (a) determinar la presencia o ausencia de una mutación H-Ras, una mutación K-Ras y una mutación N-Ras en una muestra del sujeto y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI al sujeto si se determina que la muestra tiene una mutación H-Ras, pero no una mutación K-Ras o una mutación N-Ras. La muestra puede ser una muestra tumoral. En algunos ejemplos, los métodos incluyen (a) determinar que un paciente con cáncer tenga una mutación H-Ras y K-Ras natural y N-Ras natural y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un FTI al sujeto. En algunos ejemplos, el FTI es el tipifarnib.

En el presente documento se describe un FTI para usar en métodos para tratar un cáncer en un sujeto con un FTI, y métodos para seleccionar pacientes con cáncer para el tratamiento con FTI basado en la presencia de una mutación H-Ras. El cáncer puede ser un cáncer hematopoyético o un tumor sólido. También, en el presente documento se describe un FTI para usar en métodos para tratar una condición premaligna en un sujeto con el FTI, y métodos para seleccionar pacientes con una condición premaligna para un tratamiento con FTI según el estado de mutación H-Ras.

En algunos ejemplos, en el presente documento se describe un FTI para usar en métodos para tratar un cáncer en un sujeto con el FTI o seleccionar pacientes con cáncer para un tratamiento con FTI basado en la presencia de una mutación H-Ras. El cáncer puede ser un cáncer hematopoyético o un tumor sólido. El cáncer puede estar relacionado con el virus del papiloma humano (VPH+ o VPH positivo) o no estar relacionado con el VPH (VPH- o VPH negativo).

En este documento se describen métodos para predecir la capacidad de respuesta de un paciente con cáncer frente a un tratamiento con FTI, métodos para la selección de la población de pacientes con cáncer para un tratamiento con FTI, y métodos para tratar el cáncer en un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI, en función de la presencia de una mutación H-Ras en una muestra del paciente. El estado de mutación de H-Ras puede detectarse a nivel de ácido nucleico o proteína. En algunos ejemplos, el estado de la mutación H-Ras se determina analizando los ácidos nucleicos obtenidos de la muestra. En algunos ejemplos, el estado de la mutación H-Ras se determina analizando la proteína obtenida de la muestra.

En algunas realizaciones, el estado de la mutación H-Ras se determina analizando los ácidos nucleicos obtenidos de la muestra. Los ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ARNm o ADN genómico del sujeto de prueba. Los métodos para determinar el estado de la mutación Ras analizando ácidos nucleicos son habituales en la técnica. En algunas realizaciones, los métodos incluyen secuenciación, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), micromatriz de ADN, espectrometría de masas (MS), polimorfismo de nucleótido único (SNP), cromatografía líquida de alta resolución (DHPLC) o ensayo de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). En algunas realizaciones, el estado de la mutación Ras se determina utilizando métodos de secuenciación estándar, que incluyen, por ejemplo, la secuenciación de Sanger, la secuenciación de próxima generación (NGS). En algunas realizaciones, el estado de la mutación Ras se determina usando MS.

En algunas realizaciones, el estado de la mutación H-Ras se determina analizando la proteína obtenida de la muestra. La proteína Ras H mutada se puede detectar mediante una variedad de enfoques de inmunohistoquímica (IHC), ensayo de inmunotransferencia, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) u otros métodos de inmunoensayo conocidos en la técnica.

Como entenderá cualquier experto en la materia, cualquier método descrito en el presente documento o conocido de otro modo en la técnica para analizar la mutación Ras puede usarse para determinar la presencia o ausencia de una mutación de H-Ras.

5.2. Muestras

En algunos ejemplos, los métodos proporcionados en este documento incluyen obtener una muestra del sujeto. En algunos ejemplos, la muestra es una muestra de tumor. En algunos ejemplos, la muestra utilizada en los presentes métodos incluye una biopsia (por ejemplo, una biopsia de tumor). La biopsia puede ser de cualquier órgano o tejido, por ejemplo, piel, hígado, pulmón, corazón, colon, riñón, médula ósea, dientes, ganglios linfáticos, cabello, bazo, cerebro, senos u otros órganos. Cualquier técnica de biopsia conocida por los expertos en la técnica puede usarse para aislar una muestra de un sujeto, por ejemplo, biopsia abierta, biopsia cerrada, biopsia central, biopsia incisional, biopsia por escisión o biopsia por aspiración con aguja fina.

La muestra utilizada en los métodos proporcionados en este documento incluye fluidos corporales de un sujeto. Los ejemplos no limitantes de fluidos corporales incluyen sangre (p. ej., sangre entera periférica, sangre periférica), plasma sanguíneo, médula ósea, líquido amniótico, humor acuoso, bilis, linfa, menstruación, suero, orina, líquido cefalorraquídeo que rodea el cerebro y la columna vertebral, líquido sinovial que rodea las articulaciones óseas.

En una realización, la muestra es una muestra de médula ósea. Los procedimientos para obtener una muestra de médula ósea son habituales en la técnica, incluidos, entre otros, la biopsia de médula ósea y la aspiración de la médula ósea. La médula ósea tiene una porción fluida y una porción más sólida. En la biopsia de médula ósea, se toma una muestra de la porción sólida. En la aspiración de médula ósea, se toma una muestra de la porción líquida. La biopsia de médula ósea y la aspiración de médula ósea se pueden realizar al mismo tiempo y se denomina examen de médula ósea.

En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de sangre. La muestra de sangre se puede obtener usando técnicas convencionales como se describe, por ejemplo, en Innis et al, editores, PCR Protocols (Academic Press, 1990). Los glóbulos blancos se pueden separar de las muestras de sangre mediante técnicas convencionales o kits disponibles en el mercado, p. ej. el Kit RosetteSep (Stein Cell Technologies, Vancouver, Canadá). Subpoblaciones de glóbulos blancos, p. ej. las células mononucleares, las células NK, las células B, las células T, los monocitos, los granulocitos o los linfocitos se pueden aislar adicionalmente mediante técnicas convencionales, p. ej. por clasificación celular activada magnéticamente (MACS) (Miltenyi Biotec, Auburn, California) o clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) (Becton Dickinson, San Jose, California).

En ciertas realizaciones, la muestra usada en los métodos proporcionados en el presente documento incluye una pluralidad de células. Dichas células pueden incluir cualquier tipo de células, por ejemplo, células madre, células sanguíneas (por ejemplo, PBMC), linfocitos, células NK, células B, células T, monocitos, granulocitos, células inmunitarias o células tumorales o cancerosas. Se pueden obtener poblaciones de células específicas utilizando una combinación de anticuerpos disponibles en el mercado (por ejemplo, Quest Diagnostic (San Juan Capistrano, Calif.); Dako (Dinamarca)).

En ciertas realizaciones, la muestra utilizada en los métodos proporcionados en este documento proviene de un tejido enfermo, por ejemplo, de un individuo que tiene cáncer (un cáncer de cabeza y cuello). En algunas realizaciones, las células pueden obtenerse a partir del tumor o células cancerosas o un tejido tumoral, tal como una biopsia de tumor o un explante de tumor. En ciertas realizaciones, el número de células utilizadas en los métodos proporcionados en el presente documento puede variar desde una sola célula hasta aproximadamente 10^9 células. En algunas realizaciones, el número de células utilizadas en los métodos proporcionados en este documento es de aproximadamente 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 o 5×10^8 .

El número y el tipo de células recolectadas de un sujeto se pueden monitorear, por ejemplo, midiendo los cambios en la morfología y los marcadores de la superficie celular usando técnicas de detección de células estándar tales como citometría de flujo, clasificación de células, inmunocitoquímica (por ejemplo, tinción con tejidos específicos o anticuerpos específicos del marcador de células), clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), clasificación de células activadas magnéticamente (MACS), mediante el examen de la morfología de las células usando microscopía de luz o confocal, y/o midiendo los cambios en la expresión de genes utilizando técnicas habituales en la técnica, tales como PCR y perfiles de expresión génica. Estas técnicas también pueden utilizarse para identificar células que son positivas para uno o más marcadores en particular. La clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) es un método habitual para separar partículas, incluidas las células, basado en las propiedades fluorescentes de las partículas (Kamarch, 1987, Methods Enzymol, 151: 150-165). La excitación con láser de los restos fluorescentes en las partículas individuales da como resultado una pequeña carga eléctrica que permite la separación electromagnética de partículas positivas y negativas de una mezcla. En una realización, los anticuerpos o ligandos específicos de marcadores de la superficie celular están marcados con distintos marcadores fluorescentes. Las células se procesan a través del clasificador de células, lo que permite la separación de las células en función de su capacidad para unirse a los anticuerpos utilizados. Las partículas clasificadas por FACS pueden depositarse directamente en pocillos individuales de placas de 96 pocillos o de 384 pocillos para facilitar la separación y la clonación.

En ciertas realizaciones, se usan subconjuntos de células en los métodos proporcionados en el presente documento. Los métodos para clasificar y aislar poblaciones específicas de células son habituales en la técnica y pueden basarse en el tamaño celular, la morfología o los marcadores intracelulares o extracelulares. Tales métodos incluyen, entre otros, la citometría de flujo, clasificación de flujo, FACS, separación basada en perlas, tal como clasificación de células magnéticas, separación basada en tamaño (por ejemplo, un tamiz, una serie de obstáculos o

un filtro), clasificación en un dispositivo de microfluidos, separación basada en anticuerpos, sedimentación, adsorción por afinidad, extracción por afinidad, centrifugación en gradiente de densidad, microdissección con captura láser, etc.

5.3. Cánceres

5 En algunos ejemplos, en el presente documento se describe un FTI para usar en métodos para tratar un cáncer hematopoyético en un sujeto con el FTI o para seleccionar pacientes con cáncer para un tratamiento con FTI basado en la presencia de una mutación H-Ras. En algunos ejemplos, el cáncer hematopoyético es HPV negativo. En algunos ejemplos, los métodos incluyen (a) determinar si un paciente con cáncer hematopoyético negativo al VPH tiene una mutación H-Ras y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de tipifarnib al paciente.

10 Los cánceres hematológicos son cánceres de la sangre o de la médula ósea. Los ejemplos de cánceres hematológicos (o hematógenos) incluyen neoplasias mieloproliferativas (MPN), síndrome mielodisplásico (MDS), leucemia y linfoma. En algunos ejemplos, el cáncer es la leucemia mieloide aguda (AML), el linfoma de células asesinas naturales (linfoma NK), la leucemia de células asesinas naturales (leucemia NK), el linfoma cutáneo de células T (LCCT), la leucemia mielomonocítica juvenil (LMML), el linfoma de células T periféricas (PTCL), leucemia mieloide crónica (CML) o leucemia mielomonocítica crónica (CMML). En algunos ejemplos, el cáncer es JMML.

15 En algunos ejemplos, en el presente documento se describe un FTI para usar en métodos para tratar un tumor sólido con el FTI basándose en la presencia de una mutación H-Ras. En algunas realizaciones, el tumor sólido es HPV negativo. En algunas realizaciones, el FTI es el tipifarnib. En algunas realizaciones, los métodos incluyen (a) determinar que un paciente con tumor sólido negativo frente a HPV tenga una mutación H-Ras y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de tipifarnib al paciente.

20 Los tumores sólidos son masas anormales de tejido que generalmente no contienen quistes o áreas líquidas. Los tumores sólidos pueden ser benignos o malignos. Los diferentes tipos de tumores sólidos reciben su nombre por el tipo de células que los forman (como sarcomas, carcinomas y linfomas). El tumor sólido a tratar con los métodos de la invención puede ser sarcomas y carcinomas, que incluyen carcinoma de cabeza y cuello, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, osteosarcoma y otros sarcomas, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomyosarcoma, carcinoma de colon, carcinoma linfóide, cáncer pancreático, cáncer de mama, cánceres de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de tiroides, carcinoma medular de tiroides, carcinoma papilar de tiroides, carcinoma de la glándula sebácea de feocromocitos, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinomas de conductos biliares, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, seminoma, carcinoma de vejiga, melanoma y tumores del SNC (como un glioma (tal como el glioma del tronco encefálico y gliomas mixtos), glioblastoma (también conocido como glioblastoma multiforme), astrocitoma, linfoma del SNC, germinoma, meduloblastoma, Schwannoma craneofariangioma, ependimoma, pineaioma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, neuroblastoma, retinoblastoma y metástasis cerebrales).

25 En el presente documento se describen métodos para tratar un tumor sólido con un FTI basado en la presencia de una mutación H-Ras, en donde el tumor sólido es cáncer de tiroides, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de glándulas salivales, melanoma maligno, carcinoma suprarrenal, carcinoma de mama, cáncer de células renales, carcinoma de páncreas, carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM) o carcinoma de origen primario desconocido. De acuerdo con la invención, el FTI es el tipifarnib. Los medicamentos comúnmente administrados a pacientes con diversos tipos o estadios de tumores sólidos incluyen, entre otros, celebrex, etopósido, ciclofosfamida, docetaxel, apicitabina, IFN, tamoxifeno, IL-2, GM-CSF, o una combinación de estos.

30 En algunos ejemplos, el tumor sólido a tratar por los métodos descritos en este documento puede ser cáncer de tiroides, cánceres uroteliales, cánceres de saliva, cánceres del tracto digestivo superior, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de cerebro, cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de piel, cáncer de hígado y cáncer de páncreas. En algunos ejemplos, el cáncer de vejiga a tratar por los métodos proporcionados en el presente documento puede ser un carcinoma de células de transición. En algunos ejemplos, el FTI es el tipifarnib.

35 En algunos ejemplos, el tumor sólido a tratar por los métodos descritos en el presente documento puede seleccionarse entre los grupos que consisten en carcinoma, melanoma, sarcoma o enfermedad granulomatosa crónica.

40 En algunos ejemplos, las condiciones premalignas a tratar por los métodos en este documento pueden ser queratitis actínica, esófago de Barrett, gastritis atrófica, carcinoma ductal in situ, disqueratosis congénita, disfagia sideropénica, liquen plano, fibrosis submucosa oral, fibrosis solar, displasia cervical, pólipos, leucoplasia, eritroplasia, lesión escamosa intraepitelial, un trastorno premaligno o un trastorno inmunoproliferativo premaligno.

En el presente documento se describen métodos para tratar un tumor sólido en un sujeto con un FTI y métodos para seleccionar pacientes con un tumor sólido para el tratamiento del FTI basándose en la presencia de una mutación H-Ras en el sujeto, en donde el tumor sólido es el cáncer de tiroides, cáncer de cabeza y cuello, o cáncer de glándula salival. En algunos ejemplos, el tumor sólido es el cáncer de tiroides. En algunas realizaciones, el tumor sólido es un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC). En algunos ejemplos, el tumor sólido es el cáncer de glándula salival.

El carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC, por sus siglas en inglés) es el sexto cáncer más común en el mundo, con cerca de 650.000 casos y 200.000 muertes al año en todo el mundo, y aproximadamente 54.000 casos nuevos por año en los Estados Unidos. También es el cáncer más común en Asia central.

10 El HNSCC tiene 2 diferentes etiologías y tipos de tumores correspondientes. El primer subtipo está asociado con el consumo de tabaco y el consumo de alcohol, y no está relacionado con el virus del papiloma humano (HPV- o HPV negativo). El segundo subtipo está asociado con la infección por VPH de alto riesgo (VPH+ o VPH positivo). El segundo subtipo se limita en gran medida a los cánceres de orofaringe. Los tumores HPV+ son entidades distintas con mejor pronóstico y pueden requerir tratamientos diferenciales.

15 Una proporción significativa de HNSCC, particularmente los cánceres de orofaringe, son causados por la infección por VPH. El subtipo 16 del VPH de alto riesgo representa el 85% de todos los tumores del VPH+ en el HNSCC. P16 se puede usar como marcador sustituto de la infección por VPH en HNSCC, particularmente en la orofaringe. Se dispone de pruebas de HPV más precisas y se basan en la detección E6/E7 (Liang C, et al. Cancer Res. 2012; 72:5004-5013).

20 HPV+ HNSCC muestra niveles de expresión de EGFR significativamente más bajos que HPV-HNSCC. La amplificación de EGFR solo ocurre en HPV-HNSCC. El alto número de copias del gen EGFR y la expresión de proteínas se asocian con un resultado clínico deficiente en HNSCC avanzado.

Actualmente, el tratamiento más utilizado para el HNSCC recurrente/metastásico incluye doblete basado en platino (por ejemplo, cisplatino/5-FU o carboplatino/paclitaxel), opcionalmente en combinación con terapia de anticuerpos anti-EGFR (por ejemplo, Cetuximab, Panitumumab, Afatinib). La terapia en segunda línea incluye taxanos, metotrexato y/o cetuximab. La terapia con anticuerpos anti-EGFR, como Cetuximab (un IgG1 quimérico) o Panitumumab se puede usar como un solo agente, con quimioterapia (por ejemplo, Platino/5-FU, Cisplatino), o con radioterapia. A pesar de los altos niveles de expresión de EGFR en HNSCC, la tasa de respuesta de un solo agente para Cetuximab es solo del 13%, con una tasa de SD del 33%, y actualmente no hay biomarcadores predictivos disponibles.

Los fármacos en desarrollo para HNSCC incluyen aquellos dirigidos a la ruta PI3K: BKM120 (buparlisib) + cetuximab, BYL719 + cetuximab, Temsirolimus + cetuximab, Rigosertib + cetuximab; aquellos dirigidos a la ruta MET: Tivantinib + cetuximab, Ficlatusumab + cetuximab; aquellos dirigidos a la ruta de EGFR/HER3, ruta Afatinib + cetuximab ± paclitaxel, Patritumab; aquellos dirigidos a la ruta FGFR: BGJ398; aquellos dirigidos a la ruta del ciclo celular de CDK4/6: Palbociclib, LEE011; Inhibidor de la RTK: Anlotinib y quimioterapia: Azacitidina oral. Las opciones terapéuticas más recientes para el HNSCC incluyen inmunoterapia, como los anticuerpos anti-PD1 o anti-PDL1.

Si bien se han logrado altas tasas de curación para la enfermedad localizada y loco-regional con cirugía, radiación, quimiorradiación y quimioterapia de inducción, las tasas de supervivencia para las enfermedades recurrentes/metastásicas siguen siendo muy bajas, y se necesitan mejores opciones de tratamiento.

40 En algunas realizaciones, en este documento se proporciona un método para tratar un HNSCC en un sujeto basándose en la presencia de una mutación H-Ras. En algunas realizaciones, el HNSCC puede ser negativo para HPV. En algunas realizaciones, el HNSCC puede ser un HNSCC recidivante/recurrente. En algunas realizaciones, el HNSCC puede ser HNSCC metastásico. El método proporcionado en este documento incluye (a) determinar la presencia o ausencia de una mutación H-Ras en una muestra del sujeto y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI al sujeto si se determina que la muestra tiene una mutación H-Ras. La muestra puede ser una muestra tumoral. En algunas realizaciones, los métodos incluyen (a) determinar que un paciente con HNSCC tenga una mutación H-Ras y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI al sujeto. En algunas realizaciones, el FTI es el tipifarnib.

50 En algunos ejemplos, en este documento se describe un método para tratar un cáncer de glándula salival en un sujeto basándose en la presencia de una mutación H-Ras. En algunos ejemplos, el cáncer de glándula salival puede ser un cáncer de glándula salival avanzado. En algunos ejemplos, el cáncer de glándula salival puede ser cáncer de glándula salival metastásico. El método descrito en este documento incluye (a) determinar la presencia o ausencia de una mutación H-Ras en una muestra del sujeto y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI al sujeto si se determina que la muestra tiene una mutación H-Ras. La muestra puede ser una muestra tumoral. En algunos ejemplos, los métodos incluyen (a) determinar si un paciente con cáncer de glándula salival tiene una mutación H-Ras y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un FTI al sujeto. En algunos ejemplos, el FTI es el tipifarnib.

En algunos ejemplos, en este documento se describe un método para tratar un cáncer de tiroides en un sujeto basándose en la presencia de una mutación H-Ras. En algunos ejemplos, el cáncer de tiroides puede ser un cáncer de tiroides recidivante/recurrente. En algunos ejemplos, el cáncer de tiroides puede ser un cáncer de tiroides metastásico. En algunos ejemplos, el cáncer de tiroides puede ser un cáncer de tiroides avanzado. El método descrito en este documento incluye (a) determinar la presencia o ausencia de una mutación H-Ras en una muestra del sujeto y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI al sujeto si se determina que la muestra tiene una mutación H-Ras. La muestra puede ser una muestra tumoral. En algunas realizaciones, los métodos incluyen (a) determinar si un paciente con HNSCC tiene una mutación H-Ras y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un FTI al sujeto. En algunos ejemplos, el FTI es el tipifarnib.

5.4. FTI y dosificaciones ejemplares

En el presente documento se proporcionan métodos para tratar un cáncer en un sujeto con un tipifarnib o seleccionar pacientes con cáncer para el tratamiento con tipifarnib basándose en la presencia de una mutación H-Ras de acuerdo con las reivindicaciones. En algunas realizaciones, los métodos incluyen tratar al sujeto con otro FTI descrito en el presente documento o conocido de otro modo en la técnica. En algunos ejemplos, el FTI se selecciona del grupo que consiste en arglabin, alcohol perrílico, lonafarnib (SCH-66336), L778123, L739749, FTI-277, L744832, CP-609.754, R208176, AZD3409 y BMS-214662.

En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra por vía oral, parenteral, rectal o tópica. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra por vía oral.

En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra a una dosis de 1-1000 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra dos veces al día. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra en una dosis de 200-1200 mg dos veces al día. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra a una dosis de 600 mg dos veces al día. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra a una dosis de 900 mg dos veces al día.

En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra en ciclos de tratamiento. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra en semanas alternas. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra en los días 1-7 y 15-21 de un ciclo de tratamiento de 28 días. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra por vía oral a una dosis de 900 mg dos veces al día en los días 1-7 y 15-21 de un ciclo de tratamiento de 28 días.

En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra durante al menos 3 ciclos. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra durante al menos 6 ciclos. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra hasta 12 ciclos. En algunas realizaciones, el tipifarnib se administra por vía oral a una dosis de 900 mg dos veces al día en los días 1-7 y 15-21 de un ciclo de tratamiento de 28 días durante al menos tres ciclos.

En algunas realizaciones, en este documento se proporciona un método para tratar un HNSCC en un sujeto con tipifarnib basado en la presencia de una mutación H-Ras. En algunas realizaciones, el HNSCC puede ser negativo para HPV. En algunas realizaciones, el HNSCC puede ser un HNSCC recidivante/recurrente. En algunas realizaciones, el HNSCC puede ser HNSCC metastásico. El método proporcionado en este documento incluye (a) determinar la presencia o ausencia de una mutación H-Ras en una muestra del sujeto y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un tipifarnib al sujeto si se determina que la muestra tiene una mutación H-Ras. La muestra puede ser una muestra tumoral. En algunas realizaciones, los métodos incluyen (a) determinar si un paciente con HNSCC tiene una mutación H-Ras y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un tipifarnib al sujeto.

En algunos ejemplos, en este documento se describe el tipifarnib para usar en un método para tratar un cáncer de glándula salival en un sujeto con tipifarnib basado en la presencia de una mutación H-Ras. En algunos ejemplos, el cáncer de glándula salival puede ser un cáncer de glándula salival avanzado. En algunos ejemplos, el cáncer de glándula salival puede ser un cáncer de glándula salival metastásico. El método descrito en este documento incluye (a) determinar la presencia o ausencia de una mutación H-Ras en una muestra del sujeto y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de tipifarnib al sujeto si se determina que la muestra tiene una mutación H-Ras. La muestra puede ser una muestra tumoral. En algunos ejemplos, los métodos incluyen (a) determinar si un paciente con cáncer de glándula salival tiene una mutación H-Ras y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de tipifarnib al sujeto. En algunos ejemplos, los métodos incluyen administrar al sujeto otro FTI descrito en el presente documento o conocido de otro modo en la técnica. En algunos ejemplos, el FTI se selecciona del grupo que consiste en tipifarnib, arglabin, alcohol perrílico, lonafarnib (SCH-66336), L778123, L739749, FTI-277, L744832, CP-609.754, R208176, AZD3409 y BMS-214662.

En algunos ejemplos, en este documento se describe el tipifarnib para usar en un método para tratar un cáncer de tiroides en un sujeto con tipifarnib basándose en la presencia de una mutación H-Ras. En algunos ejemplos, el cáncer de tiroides puede ser un cáncer de tiroides recidivante/recurrente. En algunos ejemplos, el cáncer de tiroides puede ser un cáncer de tiroides metastásico. En algunos ejemplos, el cáncer de tiroides puede ser un cáncer de tiroides avanzado. El método descrito en este documento incluye (a) determinar la presencia o ausencia de una mutación H-Ras en una muestra del sujeto y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva

de tipifarnib al sujeto si se determina que la muestra tiene una mutación H-Ras. La muestra puede ser una muestra tumoral. En algunos ejemplos, los métodos incluyen (a) determinar si un paciente con HNSCC tiene una mutación H-Ras y, posteriormente, (b) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de tipifarnib al sujeto. En algunos ejemplos, los métodos incluyen administrar al sujeto otro FTI descrito en el presente documento o conocido de otro modo en la técnica. En algunos ejemplos, el FTI se selecciona del grupo que consiste en tipifarnib, arglabin, alcohol perrílico, lonafarnib (SCH-66336), L778123, L739749, FTI-277, L744832, CP-609.754, R208176, AZD3409 y BMS-214662.

En algunas realizaciones, los métodos incluyen (a) determinar si un paciente con HNSCC tiene una mutación H-Ras y, posteriormente, (b) administrar el tipifarnib al sujeto, en donde el tipifarnib se administra por vía oral a una dosis de 900 mg dos veces al día los días 1-7 y 15-21 de un ciclo de tratamiento de 28 días. En algunas realizaciones, el paciente con HNSCC tiene HNSCC recidivante/refractario. En algunas realizaciones, el paciente con HNSCC tiene HNSCC negativo para HPV.

En algunos ejemplos, los métodos incluyen (a) determinar si un paciente con cáncer de glándula salival tiene una mutación H-Ras y, posteriormente, (b) administrar tipifarnib al sujeto, en el que se administra por vía oral a una dosis de 900 mg dos veces al día en los días 1-7 y 15-21 de un ciclo de tratamiento de 28 días.

En algunos ejemplos, los métodos incluyen (a) determinar si un paciente con cáncer de tiroides tiene una mutación H-Ras y, posteriormente, (b) administrar tipifarnib al sujeto, en el que el tipifarnib se administra por vía oral a una dosis de 900 mg dos veces al día en los días 1-7 y 15-21 de un ciclo de tratamiento de 28 días.

Los métodos pueden comprender además administrar una segunda terapia al paciente que tiene un tumor sólido con una mutación H-Ras. En algunas realizaciones, la segunda terapia es una quimioterapia, como cisplatino, 5-FU, carboplatino, paclitaxel o doblete basado en platino (por ejemplo, cisplatino/5-FU o carboplatino/paclitaxel). En algunas realizaciones, la segunda terapia es una terapia con anticuerpos anti-EGFR (por ejemplo, Cetuximab, Panitumumab, Afatinib). En algunas realizaciones, la segunda terapia es taxanos, metotrexato y/o cetuximab. En algunas realizaciones, la segunda terapia es una radioterapia. En algunas realizaciones, la segunda terapia incluye aquellas dirigidas a la ruta de PI3K: BKM120 (buparlisib) + cetuximab, BYL719 + cetuximab, Temsirolimus + cetuximab, Rigosertib + cetuximab; aquellas dirigidos a la ruta MET: Tivantinib + cetuximab, Ficlaturumab + cetuximab; aquellas dirigidos a la ruta de EGFR/HER3, ruta Afatinib + cetuximab ± paclitaxel, Patritumab; aquellas dirigidos a la ruta FGFR: BGJ398; aquellas dirigidos a la ruta del ciclo celular de CDK4/6: Palbociclib, LEE011; inhibidor de la RTK: Anlotinib y quimioterapia: Azacitidina oral. En algunos ejemplos, la segunda terapia es una inmunoterapia, tal como anticuerpos anti-PD1 o anti-PDL1.

6. Ejemplos

Se entiende que las modificaciones que no afectan sustancialmente a la actividad de las diversas realizaciones de esta invención también se proporcionan dentro de la definición de la invención proporcionada en este documento. Por consiguiente, los siguientes ejemplos pretenden ilustrar, pero no limitar, la presente invención.

Ejemplo I (Ejemplo de referencia)

Identificación de biomarcadores inmunológicos asociados con el beneficio clínico de Tipifarnib

Los análisis de perfiles de expresión génica en muestras de médula ósea de dos estudios de AML, así como los datos de IC50 de tipifarnib en múltiples líneas celulares describieron que múltiples genes relacionados inmunológicamente, especialmente genes relacionados con células NK, se asociaron con un mejor pronóstico para tipifarnib. Si bien algunos de estos genes parecían no ser específicos para el tratamiento con tipifarnib, otros, como KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 y GZMM se asociaron específicamente con los beneficios clínicos del tipifarnib, pero no con otros agentes quimioterapéuticos que no son FTI, tales como la citarabina y la mitoxantrona.

El estudio actual utilizó datos de micromatrices generados a partir de un ensayo de expresión génica global de muestras de médula ósea recolectadas en dos estudios clínicos que investigaban la eficacia y seguridad del FTI tipifarnib. Se realizó un estudio clínico en pacientes adultos de 65 años o más con LMA sin tratar previamente, y el otro se realizó en AML recidivante y refractario. Los resultados clínicos de estos estudios se han publicado previamente (Lancet et al., Blood 109: 1387-1394 (2007); Harousseau et al., Blood 9: 9 (2007); Raponi et al., Clin. Cancer Res. 13: 2254-2260 (2007)), y los datos de perfiles genéticos están disponibles públicamente en Gene Expression Omnibus del NCBI (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) y se pueden evaluar a través de los números de entrada de la serie GSE8970 y GSE5122.

Como se describe en Raponi et al., Blood 111: 2589-96 (2008), se recolectaron muestras de BM de pacientes que habían dado su consentimiento antes del tratamiento con tipifarnib y se procesaron células mononucleares en el sitio. El ARN total se extrajo de muestras celulares, se controló su calidad y se procesó adicionalmente para el análisis de micromatrices. El ADN se aisló de la misma muestra. Las muestras se analizaron para determinar la expresión génica global y/o la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (QPCR) de genes específicos).

La respuesta respecto a tipifarnib se muestra en el informe del estudio clínico y se definió como pacientes que tuvieron una remisión completa (CR), una remisión parcial (PR) o una mejoría hematológica (HI). Los pacientes con PR y HI se incluyeron como respondedores, ya que se demostró anteriormente que tenían un beneficio de supervivencia similar a los que lograban una CR. Brevemente, la CR se definió como BM que mostraba menos del 5% de mieloblastos con maduración normal de todas las líneas celulares, recuento absoluto de neutrófilos (ANC) de al menos $10^9/L$ ($1000/\mu L$) y un recuento de plaquetas de $100 \times 10^9/L$ ($100.000/\mu L$). La PR se definió como la presencia de recuperación de ANC y plaquetas a los niveles indicados anteriormente, pero con blastos de BM del 5% al 19% y una disminución de más del 50% en el porcentaje de blastos de BM desde el inicio. HI se definió como lo mismo que PR, excepto con la recuperación de ANC a $0,5$ a $1 \times 10^9/L$ (de 500 a $1000/\mu L$) y el recuento de plaquetas a 20 a $100 \times 10^9/L$ (de 20.000 a $100.000/\mu L$). La enfermedad progresiva (PD) se definió como cualquiera de los siguientes: aumento de más del 50% en el porcentaje de blastos de BM desde el inicio (más de 5% de blastos si el nivel de referencia es menor al 5%, más de 10% de blastos si el nivel de referencia es del 5% a 10 %, y más de 20% de blastos si la línea base es del 10% al 20%); más del 50% de aumento en los blastos circulantes; nueva aparición de blastos circulantes en al menos 2 ocasiones consecutivas; o desarrollo de leucemia extramedular. La enfermedad estable (SD) se definió como cualquier respuesta que no cumpliera con los criterios de CR, PR, HI o PD.

Las curvas de Kaplan Meier se utilizaron para investigar la relación entre los valores de biomarcadores y el beneficio clínico. La identificación de múltiples genes relacionados con las células NK, la larga duración de la respuesta observada en algunos pacientes con tipifarnib, y el papel de la transducción de señales mediada por RAS en las células NK respaldan que la capacidad de respuesta de los pacientes con AML respecto al tratamiento con tipifarnib podría ser el resultado de infiltrados de médula ósea de células inmune.

1. Correlación del nivel de expresión de KIR2DS5 con el beneficio clínico de Tipifarnib

Como se muestra en la FIG. 1A, el nivel de expresión de KIR2DS5 se asocia con un resultado de pacientes con AML tratados con tipifarnib. Al clasificar a los pacientes en función de diferentes respuestas clínicas, se encontró que los pacientes con PD se agruparon en el extremo inferior del continuo de expresión KIR2DS5; los pacientes con CR se agruparon en el extremo superior del continuo de expresión KIR2DS5; y los pacientes HI y SD se agruparon entre los grupos CR y PD.

Además, se identificó una fuerte correlación entre el nivel de expresión de KIR2DS5 y la PFS de los pacientes con AML tratados con tipifarnib (Figura 1B). Los pacientes cuyos niveles de expresión de KIR2DS5 estaban en el cuartil más alto (4°) tenían una PFS más larga estadísticamente significativa en comparación con el resto de los pacientes. La correlación apoya que los pacientes con AML pueden seleccionarse según el nivel de expresión de KIR2DS5 para el tratamiento con tipifarnib a fin de aumentar la probabilidad de respuesta al tratamiento.

2. Correlación específica entre la relación de expresión de KIR2DS2 y KIR2DL2 con el beneficio clínico de Tipifarnib

Como se muestra en las Figs. 2A y 2B, la relación entre el nivel de expresión de KIR2DS2 y el nivel de expresión de KIR2DL2 (la relación 2DS2/2DL2) se correlacionó fuertemente tanto con la PFS (Figura 2A) como con la OS (Figura 2B) de los pacientes con AML tratados con tipifarnib. Como se muestra, los pacientes con la proporción 2DS2/2DL2 en el cuartil más alto (cuarto) tenían una SLP (media = 431 días) y una SG (media = 750 días) estadísticamente significativamente mayores en comparación con el resto de la población de pacientes.

Además, la correlación entre la proporción 2DS2/2DL2 y el beneficio clínico fue específica para tipifarnib y no se observó para otros agentes quimioterapéuticos sin FTI, como citarabina y mitoxantrona (datos de quimioterapia de Metzeler KH et al., Blood, 112: 4193-201 (2008)). Como se muestra en las Figs. 3A y 3B, así como en la tabla a continuación, la probabilidad de supervivencia de los pacientes con AML tratados con citarabina y mitoxantrona en dosis altas no fue distinguible entre aquellos con la proporción 2DS2/2DL2 en el quintil más alto y el resto de los pacientes.

Estudio	Media 5° Q/1-4° Q/todos (días)	Configuración	Tratamiento	HR	N/5° Q
GSE12417-GPL96	233/321/294	Línea frontal	citorabina a alta dosis más mitoxantrona	1,39	163/33
GSE12417-GPL570	308/624/538	Línea frontal	citorabina a alta dosis más mitoxantrona/quimio intenso en 17 pts	1,38	79/16
GSE8970 (CTEP-20)	754/179/233	Línea frontal mayores	Tipifarnib	0,21	34/7

45

La correlación específica entre la proporción 2DS2/2DL2 y el beneficio clínico de tipifarnib indican que los pacientes con AML puedan seleccionarse según la proporción 2DS2/2DL2 para el tratamiento con tipifarnib a fin de aumentar la respuesta general al tratamiento.

3. Correlación específica entre la relación de expresión de KIR2DS5 y KIR2DL5 con el beneficio clínico de Tipifarnib

- 5 Como se muestra en la FIG. 4A, la relación entre el nivel de expresión de KIR2DS5 y el nivel de expresión de KIR2DL5A (la proporción de 2DS5/2DL5) se correlacionó fuertemente tanto con la PFS como con la OS de los pacientes de AML tratados con tipifarnib. Como se muestra, los pacientes con el cociente 2DS5/2DL5A en el cuartil más alto (cuarto) tenían PFS y OS estadísticamente significativamente más largos en comparación con el resto de la población de pacientes.
- 10 Además, la correlación entre la proporción 2DS5/2DL5 y el beneficio clínico fue específica para tipifarnib y no se observó para otros agentes quimioterapéuticos que no eran FTI, como la citarabina y la mitoxantrona (datos de quimioterapia de Metzeler KH et al., Blood, 112: 4193-201 (2008)) (Figura 4B). Como se muestra en la FIG. 4B, la probabilidad de supervivencia de los pacientes con AML tratados con dosis altas de citarabina y mitoxantrona no fue distinguible entre los pacientes con una proporción diferente de 2DS5/2DL5.
- 15 La correlación específica entre la proporción 2DS5/2DL5 y el beneficio clínico de tipifarnib apoya que los pacientes con AML puedan seleccionarse según la proporción 2DS5/2DL5 para el tratamiento con tipifarnib a fin de aumentar la respuesta general al tratamiento.

4. Correlación específica del nivel de expresión de GZMM con el beneficio clínico de Tipifarnib

- 20 Como se muestra en la FIG. 5, el nivel de expresión de GZMM está asociado con el resultado de los pacientes con AML tratados con tipifarnib. Al categorizar a los pacientes según diferentes respuestas clínicas, se encontró que los pacientes con PD se agrupaban en el extremo inferior del continuo de expresión de GZMM y tenían el nivel de expresión de GZMM más bajo en los cuatro grupos (CR, HI, SD y PD). Los pacientes con CR se agruparon en el extremo superior del continuo de expresión de GZMM y tuvieron el nivel de expresión de GZMM más alto entre los cuatro grupos.
- 25 Además, también se identificó una fuerte correlación entre el nivel de expresión de GZMM y el OS y la PFS de los pacientes con AML tratados con tipifarnib (Figura 6A). Los pacientes cuyos niveles de expresión de GZMM se encontraban en el cuartil más alto (4º) tenían una SG y una PFS más largas y estadísticamente significativas en comparación con el resto de los pacientes. La correlación entre el nivel de expresión de GZMM y el beneficio clínico fue específica para tipifarnib y no se observó para otros agentes quimioterapéuticos que no eran FTI, como la citarabina y la mitoxantrona (Figura 6B). La correlación específica admite que los pacientes con AML pueden seleccionarse según el nivel de expresión de GZMM para el tratamiento con tipifarnib a fin de aumentar la respuesta general al tratamiento.
- 30

5. Correlación específica del nivel de expresión de KIR2DS2 con el beneficio clínico de Tipifarnib

- 35 Como se muestra en la FIG. 7A, el nivel de expresión de KIR2DS2 se asocia con el resultado de los pacientes con AML tratados con tipifarnib. Se identificó una fuerte correlación entre el nivel de expresión de KIR2DS2 y el OS de los pacientes con AML tratados con tipifarnib (Figura 7A). Los pacientes cuyos niveles de expresión de KIR2DS2 estaban en el cuartil más alto (4º) tenían una OS más larga estadísticamente significativa en comparación con el resto de los pacientes (Figura 7A y Figura 7B, panel superior izquierdo).
- 40 Como se muestra en la FIG. 7B y la tabla a continuación, la expresión de KIR2DS2 se correlaciona fuertemente con el beneficio clínico, incluidos la tasa de respuesta completa y los puntos finales de supervivencia. Los pacientes en el cuartil superior (4º) de la expresión de KIR2DS2 tuvieron una supervivencia media de 564 días, mientras que los del primer - tercer cuartil de la expresión de KIR2DS2 tuvieron una supervivencia media de 153 días. En contraste, no se identificó ninguna correlación entre la expresión de los marcadores de células NK, incluido KIR2DS2, y el beneficio clínico derivado del tratamiento de quimioterapia en un subconjunto de 51 pacientes de AML sin tratamiento previo y ancianos (> 65 años) inscritos en el estudio del grupo 1999 de cooperación de la AML alemana (AMLCG 1999) (FIG. 7B, panel derecho). De los 34 pacientes con AML de edad avanzada y sin riesgo que no fueron tratados y que fueron tratados con tipifarnib en un ensayo clínico de Fase 2 anterior, 25 tenían MDS previo. Esta correlación específica admite que los pacientes con cáncer pueden seleccionarse en función del nivel de expresión de KIR2DS2 para el tratamiento con tipifarnib a fin de aumentar la probabilidad de respuesta al tratamiento para la AML y el MDS.
- 45
- 50

Tratamiento	Supervivencia media global (días)	KIR2DS2 Baja Supervivencia media 1er-3er cuartil	KIR2DS2 Alta Supervivencia media 4º cuartil (Superior) (días)	Cociente de riesgos
Tipifarnib (34)	233	153	564	0,303

Quimioterapia (51)	240	176	284	0,83
--------------------	-----	-----	-----	------

Ejemplo II (Ejemplo de referencia)

A. Estratificación de pacientes con AML para ensayos clínicos con Tipifarnib

5 Se puede realizar un ensayo clínico que incluya el genotipado de KIR como parte del criterio de inclusión del paciente. Por ejemplo, se puede realizar un estudio para el tratamiento con tipifarnib en pacientes con AML que tengan más de 60 años o que no sean aptos para la quimioterapia estándar, o que tengan AML refractaria o recidivante.

10 Antes de que un paciente con AML sea admitido en el ensayo clínico, se obtiene una muestra de su médula ósea o una muestra de sangre del paciente. La muestra se somete entonces a análisis de micromatrices. El ADN se aísla de la muestra de médula ósea procesada con Trizol según las instrucciones del fabricante (Qiagen). Las muestras se analizan para determinar la expresión génica global y la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (QPCR) de genes específicos, incluidos KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5 y KIR2DL5. Entre otras cosas, el análisis de micromatrices proporciona el genotipo de los genes KIR del paciente. Si se identifica al paciente como portador del gen KIR2DS2, o portador del gen KIR2DS5, el paciente ingresa para el ensayo con tipifarnib. Un criterio de inclusión
15 ejemplar puede ser el siguiente:

- Confirmación anatomopatológica del diagnóstico de AML ($\geq 20\%$ de blastos de médula)
- Estado de desempeño ECOG 0 ó 1
- Los pacientes deben poder dar su consentimiento informado
- SGOT y SGPT = $< 2,5 \times$ límites normales (grado 1)
- 20 - Creatinina sérica = $< 1,5 \times$ límites normales (grado 1)
- AML (cualquiera de los siguientes):
 - AML recién diagnosticada en adultos > 70 años
 - AML recién diagnosticada derivada de MDS en adultos > 60 años
 - AML recurrente o refractaria demostrada por biopsia
 - 25 - Hiperleucocitosis con > 30.000 blastos leucémicos/uL
- Portador de KIR2DS2 o KIR2DS5, confirmado por biopsia de médula ósea.

Un régimen de dosificación ejemplar puede ser: Los pacientes reciben 600 mg de tipifarnib por vía oral (PO) dos veces al día (B.I.D.) en los días 1-21. Los cursos se repiten cada 28 días en ausencia de progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable.

30 La tasa de remisión completa (RC) y la tasa de remisión parcial (RP) pueden ser medidas del resultado primario del ensayo.

B. Pacientes con MDS para ensayos clínicos de tipifarnib con marcadores de células inmunes como criterios de valoración secundarios

35 Se puede realizar un ensayo clínico que incluya el genotipado de KIR como parte del criterio de inclusión del paciente. Por ejemplo, se puede realizar un estudio para el tratamiento con tipifarnib en pacientes con AML que tienen MDS, o específicamente MDS de menor riesgo. El criterio de valoración principal del estudio es la independencia de la transfusión según los criterios del Grupo de trabajo internacional de neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas de adultos o el sistema de evaluación de respuesta relacionado. Los puntos finales secundarios podrían incluir el análisis de marcadores de células inmunes, especialmente marcadores de
40 células NK como KIR2DS2, KIR2DS5, KIR2DL2, KIR2DL5 y GZMM.

45 Cuando un paciente con MDS de menor riesgo es admitido en el ensayo clínico, se obtiene una muestra de médula ósea o una muestra de sangre del paciente. La muestra se somete entonces a análisis de micromatrices. El ADN se aísla de la muestra de médula ósea procesada con Trizol según las instrucciones del fabricante (Qiagen). Las muestras se analizan para determinar la expresión génica global y la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (QPCR) de genes específicos, como KIR2DS2, KIR2DS5, KIR2DL2, KIR2DL5 y GZMM. Entre otras cosas, el análisis de micromatrices proporciona el genotipo de los genes KIR del paciente.

Un régimen de dosificación ejemplar puede ser: Los pacientes reciben 600 mg de tipifarnib por vía oral (PO) dos veces al día (B.I.D.) en los días 1-21. Los cursos se repiten cada 28 días en ausencia de progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable.

- 5 También se puede utilizar una prueba diagnóstica complementaria para ayudar en la selección de pacientes en ensayos clínicos de tipifarnib en la población de pacientes con MDS de menor riesgo. Se pueden usar ensayos genéticos que detectan la presencia o ausencia de los genes KIR en células NK como se describe en el presente documento o de otro modo conocido en la técnica. Los ensayos descritos en el presente documento (por ejemplo, un ensayo basado en PCR), o también conocido en la técnica para determinar los niveles de expresión de biomarcadores, también se pueden usar, y el criterio de corte óptimo de biomarcadores para la selección de
10 pacientes puede determinarse para estudios clínicos de subsecuencia.

Ejemplo III (Ejemplo de referencia)

Decisiones de tratamiento individualizadas para pacientes con CMML

Se pueden tomar los siguientes procedimientos para determinar si un paciente con CMML es adecuado para un tratamiento con FTI, como un tratamiento con tipifarnib.

- 15 La muestra de BM se extrae del paciente antes del tratamiento y las células mononucleares se procesaron en el sitio. El ARN total se extrae de muestras de células utilizando el kit de Trizol (Qiagen, Santa Clarita, California). La calidad del ARN se determina al evaluar la presencia de bandas ribosómicas en un bioanalizador Agilent (Agilent, Palo Alto, California). Las muestras de buena calidad se procesan para el análisis de micromatrices.

- 20 Para cada muestra, 1 g de ARN total (según lo evaluado por OD260) se transcribe a la inversa utilizando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems, Foster City, California) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras pueden incubarse entonces a 25°C durante 10 minutos y luego a 37°C durante 30 minutos para una conversión óptima del ARN. La QPCR se realiza utilizando el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems) con todas las muestras realizadas por triplicado. Cada reacción contiene 5 µL de la mezcla maestra de PCR Taqman Universal que contiene uracil-N-glicosilasa (Applied
25 Biosystems), una plantilla de cADN de 4,5 µL y 0,5 µL de 20 × Ensayo a pedido de mezcla de ensayo de expresión génica (Applied Biosystems) o 9 pmol tanto con cebador directo como inverso y sonda de 2,5 pmol en un volumen de reacción total de 10 µL. Todos los conjuntos de sondas fluorogénicas de cebador y amidita de fluoresceína (FAM) se eligen para generar amplicones de menos de 100 nucleótidos lo que permite la amplificación de transcritos de
30 muestras de ARN degradadas. Los cebadores y las sondas están diseñados para la amplificación específica de KIR2DS2 y KIR2DL2. Todos los conjuntos de cebadores abarcan los límites de los exones y, por lo tanto, amplifican específicamente las transcripciones de ARNm y no el ADN genómico.

- 35 La relación de expresión KIR2DS2/KIR2DL2 se calcula luego utilizando métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, Ma et al., Cancer Cell, 5: 607-616 (2004)). Los valores brutos de Ct se normalizan restando la media de Ct del conjunto de muestras, dividiendo por la desviación estándar, y luego calculando la diferencia de los valores de Ct normalizados de cada gen.

- 40 Como se describe en este documento, una relación de expresión de referencia de KIR2DS2/KIR2DL2 se puede determinar mediante análisis estadístico. Como se muestra en las Figs. 2A y 2B (Ejemplo I. II anterior), por ejemplo, una relación de expresión de referencia puede ser la relación de expresión que distingue a los pacientes con una relación 2DS2/2DL2 en el cuartil más alto (4º) del resto de los pacientes. Por consiguiente, si se determina que la proporción 2DS2/2DL2 del paciente con CMML es más alta que la relación de referencia (es decir, la relación 2DS2/2DL2 del paciente con CMML está en el cuartil más alto (4º)), y el paciente no evita de otro modo recibir un tratamiento con tipifarnib, entonces se prescribe un tratamiento con tipifarnib. Por otro lado, si se determina que la proporción 2DS2/2DL2 del paciente con CMML es más baja que la relación de referencia, no se recomienda un tratamiento con tipifarnib.

- 45 Si se prescribe un tratamiento con tipifarnib al paciente con CMML, el paciente con CMML puede recibir simultáneamente otro tratamiento, como radiación ionizante, o un segundo agente activo o una terapia de apoyo, según lo considere adecuado el oncólogo. El segundo agente activo puede ser un agente de hipometilación del ADN, como la azacitidina o la decitabina.

Ejemplo IV (Ejemplo de referencia)

- 50 IC50 inferior para Tipifarnib en líneas celulares mieloides y linfoides con estado natural de K-RAS/N-RAS

Como se muestra en la tabla a continuación, los análisis de los datos de IC50 de tipifarnib en múltiples líneas celulares mieloides y linfoides describieron que las líneas celulares que llevaban las mutaciones N-RAS o K-RAS del códon 12, 13 y/o 61 son resistentes al tipifarnib, mientras que las líneas celulares que no llevan estas mutaciones, incluidas aquellas que tienen N-RAS natural y K-RAS son más sensibles a los tratamientos con tipifarnib.

- 55 IC50 de Tipifarnib para líneas celulares mieloides y linfoides.

Línea celular	NRAS	KRAS	Tipifarnib IC50 (log µM)
ML-2	wt	A146T	-4,29
SIG-M5	wt	wt	-4,23
QIMR-WIL	wt	wt	-4,12
CMK	wt	wt	-1,89
GDM-1	wt	wt	-1,04
HEL	wt	wt	-0,93
NKM-1	wt	wt	-0,26
CESS	wt	wt	0,70
OCI-AML2	wt	wt	0,71
KG-1	wt	wt	1,12
MONO-MAC-6	wt	wt	1,21
CTV-1	wt	wt	1,52
HL-60	Q61L	wt	1,94
KMOE-2	Q61R	wt	2,14
K052	G13R	wt	2,77
NOMO-1	wt	G13D	6,84
THP-1	G12D	wt	7,67
P31-FUJ	G12C	wt	7,76

Datos de la genómica de Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (“GDSC”).

Ejemplo V (Ejemplo de referencia)

5 Respuestas duraderas en pacientes con MDS/CMML con estado de tumor natural N-RAS/K-RAS tratado con tipifarnib

Veintiún pacientes con MDS fueron tratados con tipifarnib en el estudio de aumento de la dosis en Fase 1. El Tipifarnib se administró dos veces al día (programa de 3 semanas/1 semana de descanso durante 8 semanas) (dosis inicial, 300 mg por vía oral dos veces al día; total, 600 mg).

10 Respuesta objetiva. Se observaron 3 HI, 2PR y 1 CR en 6 de 20 (30%) pacientes evaluables. Como se muestra en la Tabla 2 a continuación, los pacientes con MDS con N-RAS natural y K-RAS tienen más probabilidades de tener respuestas duraderas (Kurzrock et al., Blood, 102 (13): 4527-34 (2003)).

Diagnóstico	Respuesta	Duración (Mes)	Dosis diaria total, mg	Mutación Ras
RAEB	HI	16	300*	No
CMML	HI	2	600	Sí (K-RAS)
CMML	PR	6	600	Sí (N-RAS)
CMML	PR	16+	800	No
RAEB	HI	3	900	No
RAEB-T	CR	9+	800	No

* El paciente comenzó con una dosis total diaria de 600 mg/d, pero la dosis se redujo después de 2 semanas.

RAEB: anemia refractaria con exceso de blastos.

Ejemplo VI (Ejemplo de referencia)

PFS prolongado y mayor tasa de respuesta en pacientes con AML con estado natural N-RAS tratados con Tipifarnib

5 CTEP-20 fue un ensayo clínico en fase 2 de tipifarnib en pacientes con AML ancianos o no aptos no tratados previamente. (Raponi et al., Blood 111: 2589-96 (2008)).

10 El estado del gen N-RAS se determinó para 32 pacientes. Como se muestra en la FIG. 8, se observó una tendencia a una mejor PFS en pacientes con AML con N-RAS natural (PFS = 157 días) en comparación con aquellos con N-RAS mutante (PFS = 65 días). Como se muestra en la FIG. 9, los pacientes con N-RAS natural (43% ORR) tienen una tasa de respuesta más alta en comparación con aquellos con N-RAS mutante (27% ORR). En consecuencia, los pacientes con AML pueden seleccionarse según el estado de mutación del gen RAS para el tratamiento con tipifarnib a fin de aumentar la capacidad de respuesta frente al tratamiento.

Ejemplo VII (Ejemplo de referencia)

Ensayo clínico de Tipifarnib en pacientes con CMML estratificado según el estado de mutación Ras

15 Este ejemplo describe un estudio clínico en Fase 2 de tipifarnib con el objetivo principal de evaluar la actividad antitumoral de tipifarnib, en términos de la tasa de respuesta objetiva (ORR, por sus siglas en inglés) utilizando los criterios del grupo de trabajo mielodisplásico/mieloproliferativo (MDS/MPN IWG) de tipifarnib en sujetos con leucemia mielomonocítica crónica (CMML) y en sujetos con CMML cuya enfermedad es natural KRAS/NRAS. Los objetivos secundarios incluyen el acceso al efecto de tipifarnib en la tasa de RC, la remisión citogenética completa, la remisión parcial, la respuesta medular y el beneficio clínico; duración de la respuesta; tasa de PFS a 1 año; tasa de supervivencia a 1 año; perfil de eventos adversos (AE) de acuerdo con los Criterios Comunes de Terminología del Instituto Nacional del Cáncer para Eventos Adversos, versión 4.03 (NCI CTCAE v 4.03).

20 Este estudio en Fase 2 investiga la actividad antitumoral en términos de ORR de tipifarnib en sujetos con CMML. Hasta 20 sujetos elegibles se inscriben y se estratifican retrospectivamente en uno de dos estratos (aproximadamente 10 sujetos por estrato) según el estado mutacional de KRAS y/o NRAS del sujeto. El primer estrato puede inscribir a sujetos con tumores KRAS y NRAS natural. El segundo estrato puede inscribir a sujetos con el mutante KRAS tumoral, el mutante NRAS o un doble mutante.

30 Los sujetos pueden recibir tipifarnib administrado a una dosis inicial de 900 mg, por vía oral con alimentos, dos veces al día (b.i.d.) durante 7 días en semanas alternas (días 1-7 y 15-21) en ciclos de 28 días. A discreción del investigador, la dosis de tipifarnib se puede aumentar a 1200 mg b.i.d. si el sujeto no ha experimentado toxicidad limitante de dosis al nivel de dosis de 900 mg. Los sujetos que desarrollen eventos adversos graves (SAE) o eventos adversos emergentes del tratamiento de grado ≥ 2 (TEAE, por sus siglas en inglés) que se consideren relacionados con tipifarnib y que duren ≥ 14 días no experimentarán ningún aumento de la dosis. También se permiten reducciones de dosis escalonadas de 300 mg para controlar las toxicidades emergentes del tratamiento y las relacionadas con el tratamiento.

35 En ausencia de toxicidades inmanejables, los sujetos pueden continuar recibiendo tratamiento con tipifarnib hasta la progresión de la enfermedad. Si se observa una respuesta completa, la terapia con tipifarnib puede mantenerse durante al menos 6 meses después del inicio de la respuesta.

40 Las evaluaciones de la enfermedad (médula ósea, hematología y evaluaciones de la calidad de vida) se pueden realizar en la selección y en la visita del Día 22 (± 5 días) realizadas durante los Ciclos 2, 4, 6 y cada 12 semanas aproximadamente a partir de entonces (Ciclos 9, 12, 15), etc.). Las evaluaciones hematológicas, incluidas las evaluaciones de sangre periférica y la revisión de los requisitos de transfusión, se pueden realizar en la selección y al menos mensualmente hasta la progresión de la enfermedad. No es necesario realizar ningún aspirado/biopsia de médula ósea para iniciar el tratamiento en sujetos que hayan recibido un aspirado/biopsia de médula ósea que confirme su diagnóstico dentro de las 4 semanas anteriores al Ciclo 1, Día 1 y puede proporcionar muestras para completar los objetivos del estudio. Si el aspirado de médula ósea es inadecuado para la evaluación programada de la enfermedad, se puede realizar una biopsia de médula ósea. Se pueden realizar evaluaciones hematológicas o de otras enfermedades si el investigador lo considera necesario. El momento de la enfermedad y las evaluaciones hematológicas se mantienen tanto como sea posible, independientemente de los posibles retrasos del ciclo de tratamiento.

50 Ejemplo VIII (Ejemplo de referencia)

Decisiones de tratamiento individualizadas para pacientes con CMML

Se pueden tomar los siguientes procedimientos para determinar si un paciente con CMML es adecuado para un tratamiento con FTI, como un tratamiento con tipifarnib.

5 El ADN se puede extraer predominantemente de las células de la médula ósea (células mononucleares o capa leucocitaria) o de la sangre periférica del paciente en la presentación de CMML. El estado de mutación de N-Ras y K-Ras se determina por secuenciación de ADN, utilizando un método de terminación de cadena adaptado con cebador fluorescente en un secuenciador ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, California). Cuando la secuenciación directa es negativa, los productos de la PCR se clonan (Original TA Cloning Kit; Invitrogen, Groningen, Países Bajos) y se secuencian.

10 Si se determina que el paciente con CMML no tiene ninguna mutación en los codones 12, 13 y 61 de K-Ras o N-Ras, o si se determina que el paciente con CMML tiene K-Ras y N-Ras natural, y si el paciente de lo contrario no se le impide recibir un tratamiento con tipifarnib, se prescribe un tratamiento con tipifarnib. Por otro lado, si se determina que el paciente con CMML tiene una mutación N-Ras o K-Ras que resulta en la activación de N-Ras o K-Ras, no se recomienda ningún tratamiento con tipifarnib.

15 Si se prescribe un tratamiento con tipifarnib al paciente con CMML, el paciente con CMML puede recibir simultáneamente otro tratamiento, como radiación ionizante, o un segundo agente activo o una terapia de apoyo, según lo considere adecuado el oncólogo. El segundo agente activo puede ser un agente de hipometilación del ADN, como la azacitidina o la decitabina.

Ejemplo IX

Ensayo clínico de tipifarnib en pacientes con tumores sólidos estratificados según la mutación HRAS

20 Se inició un ensayo clínico en Fase 2 para usar tipifarnib en el tratamiento de tumores avanzados con una mutación HRAS conocida. El diseño del ensayo clínico incluye la inscripción de 2 cohortes de 18 pacientes cada uno. La cohorte 1 inscribe a sujetos con tumores malignos de tiroides con mutaciones HRAS, independientemente de la histología de la tiroides. La cohorte 2 inscribe a cualquier sujeto con un tumor mutante HRAS no hematológico que no sea cáncer de tiroides que cumpla con los criterios de elegibilidad.

25 Este ensayo clínico se diseñó para incluir dos etapas: la primera etapa incluyó 11 pacientes evaluables y la segunda etapa incluyó 7 pacientes evaluables más, y una cohorte que no pasa a la segunda etapa si se observa alguna o ninguna respuesta objetiva en la cohorte en la primera etapa. El ensayo clínico se considera positivo si se observan al menos 4 respuestas en una cohorte de 18 sujetos. El criterio de valoración principal es la tasa de respuesta objetiva, y las evaluaciones de respuesta tumoral se llevan a cabo de acuerdo con los Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos, versión 1.1 (se requiere confirmación de la respuesta).

30 De acuerdo con el protocolo, el tipifarnib se administra a pacientes incluidos en una dosis inicial de 900 mg, por vía oral con alimentos, dos veces al día (b.i.d.) durante 7 días en semanas alternas (días 1-7 y 15-21) en ciclos de 28 días. A discreción del investigador, la dosis de tipifarnib se puede aumentar a 1200 mg b.i.d. si el sujeto no ha experimentado toxicidad limitante de dosis al nivel de dosis de 900 mg. Los sujetos que desarrollen eventos adversos graves (SAE) o eventos adversos emergentes del tratamiento de grado ≥ 2 (TEAE, por sus siglas en inglés) que se consideren relacionados con tipifarnib y que duren ≥ 14 días no experimentarán un aumento de la dosis. También se permiten reducciones de dosis escalonadas de 300 mg para controlar las toxicidades emergentes del tratamiento relacionadas con el tratamiento.

35 Cuatro (4) pacientes evaluables se inscribieron en la primera cohorte (pacientes con tumores malignos de tiroides con mutaciones HRAS) y once (11) pacientes evaluables se inscribieron en la segunda cohorte (pacientes con tumores malignos no hematológicos distintos del cáncer de tiroides con mutaciones HRAS). En la segunda cohorte, tres (3) de esos pacientes tienen carcinoma de cabeza y cuello recidivante/refractario y dos (2) de esos tres (3) experimentaron respuestas parciales objetivas (RP) confirmadas y un tercer paciente experimentó una estabilización de la enfermedad más allá de seis meses (> 8 meses). Los tres pacientes con carcinoma de cabeza y cuello son HPV negativos. Todos los pacientes con cáncer de cabeza y cuello permanecieron en estudio. Las respuestas se observaron en dos pacientes con PR después de 3 ciclos de tratamiento, seis ciclos para uno y tres para el otro. Además, cinco (5) pacientes reclutados tenían cánceres de glándulas salivales con mutaciones HRAS, y tres (3) de ellos experimentaron una estabilización de la enfermedad durante más allá de seis meses (> 7 , 9 y > 11 meses). La cohorte 2 pasó a la segunda etapa del ensayo para la inscripción de siete pacientes adicionales según el protocolo del ensayo.

Ejemplo X

50 Decisiones de tratamiento individualizadas para pacientes con tumores sólidos

Se pueden tomar los siguientes procedimientos para determinar si un paciente con un tumor sólido es adecuado para un tratamiento con FTI, como un tratamiento con tipifarnib. El paciente puede tener un tumor tiroideo. El paciente puede tener un tumor salival. El paciente también puede tener un tumor de cabeza y cuello. El tumor de cabeza y cuello puede ser un carcinoma escamoso de tumor de cabeza y cuello.

55 El ADN se puede extraer de la muestra tumoral del paciente. El estado de mutación de H-Ras se determina mediante secuenciación de ADN, utilizando un método de terminación de cadena adaptada con cebador

fluorescente en un secuenciador ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, California). Cuando la secuenciación directa es negativa, los productos de PCR se clonan (Original TA Cloning Kit; Invitrogen, Groningen, Países Bajos) y se secuencian.

5 Si se determina que el paciente que tiene un tumor sólido tiene una mutación en los codones 12, 13 y 61 de H-Ras, u otra mutación que resulta en la activación de H-Ras, y si al paciente no se le impide recibir un tratamiento con tipifarnib, se prescribe un tratamiento con tipifarnib. Por otro lado, si se determina que el paciente no tiene ninguna mutación que resulte en la activación de H-Ras, o que tenga H-Ras natural, no se recomienda ningún tratamiento con tipifarnib.

10 Si se prescribe un tratamiento con tipifarnib al paciente, el paciente puede recibir simultáneamente otro tratamiento, como radiación ionizante, o un segundo agente activo o una terapia de apoyo, según lo considere adecuado el oncólogo. En un paciente con carcinoma escamoso de cabeza y cuello, otro tratamiento puede ser un tratamiento con anticuerpos anti-EGFR, un tratamiento anti-PD1/PDL1.

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un compuesto para su uso en un método de tratamiento de un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello del mutante H-Ras (HNSCC) en un sujeto, en el que el compuesto es el tipifarnib y en el que el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de tipifarnib a dicho sujeto, donde dicho HNSCC se encuentra en una etapa avanzada, metastásica, recidivante o refractaria y en la que dicho HNSCC es negativo frente al virus del papiloma humano (VPH).
2. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que la mutación H-Ras de dicho sujeto comprende una sustitución de aminoácidos en un codón seleccionado del grupo que consiste en G12, G13 y Q61.
- 10 3. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que el método comprende determinar la presencia de la mutación H-Ras en una muestra de dicho sujeto.
4. El compuesto para su uso según la reivindicación 3, donde dicha muestra es una biopsia de tejido o una biopsia tumoral.
- 15 5. El compuesto para su uso según la reivindicación 3, en el que dicha mutación H-Ras está determinada por un método seleccionado del grupo que consiste en la secuenciación, reacción en cadena de polimerasa (PCR), micromatriz de ADN, espectrometría de masas (MS), ensayo de polimorfismo de nucleótido único (SNP), cromatografía líquida de alta resolución desnaturalizante (DHPLC) y polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP)
- 20 6. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, donde el tipifarnib se administra a una dosis de 1-1000 mg/kg de peso corporal o en el que el tipifarnib se administra a una dosis de 600 mg dos veces al día o a una dosis de 900 mg dos veces al día.
7. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, donde el tipifarnib se administra dos veces al día.
8. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, donde el tipifarnib se administra durante un período de uno a siete días.
- 25 9. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el tipifarnib se administra en los días 1-7 y 15-21 de un ciclo de tratamiento de 28 días.
10. El compuesto para su uso según la reivindicación 9, donde el tipifarnib se administra durante al menos 3 ciclos o durante al menos 6 ciclos.
11. El compuesto para su uso según la reivindicación 9, en el que dicho ciclo de tratamiento continúa hasta 12 meses.
- 30 12. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, donde el tipifarnib se administra a una dosis de 900 mg dos veces al día en los días 1-7 y 15-21 de un ciclo de tratamiento de 28 días.
13. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que el tipifarnib se administra antes, durante o después de la irradiación.
- 35 14. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que el método comprende además administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente activo o una terapia de atención de apoyo.
- 40 15. El compuesto para su uso según la reivindicación 14, en el que dicho segundo agente activo se selecciona del grupo que consiste en un agente hipometilante del ADN, un anticuerpo terapéutico que se une específicamente a un antígeno cancerígeno, un factor de crecimiento hematopoyético, una citoquina, un antibiótico, un inhibidor de cox-2, un agente inmunomodulador, una globulina anti-timocitos, un agente inmunosupresor, y un corticosteroide o un derivado farmacológico del mismo o en el que dicho segundo agente activo es un anticuerpo anti-PD1 o un anticuerpo anti-PDL1.

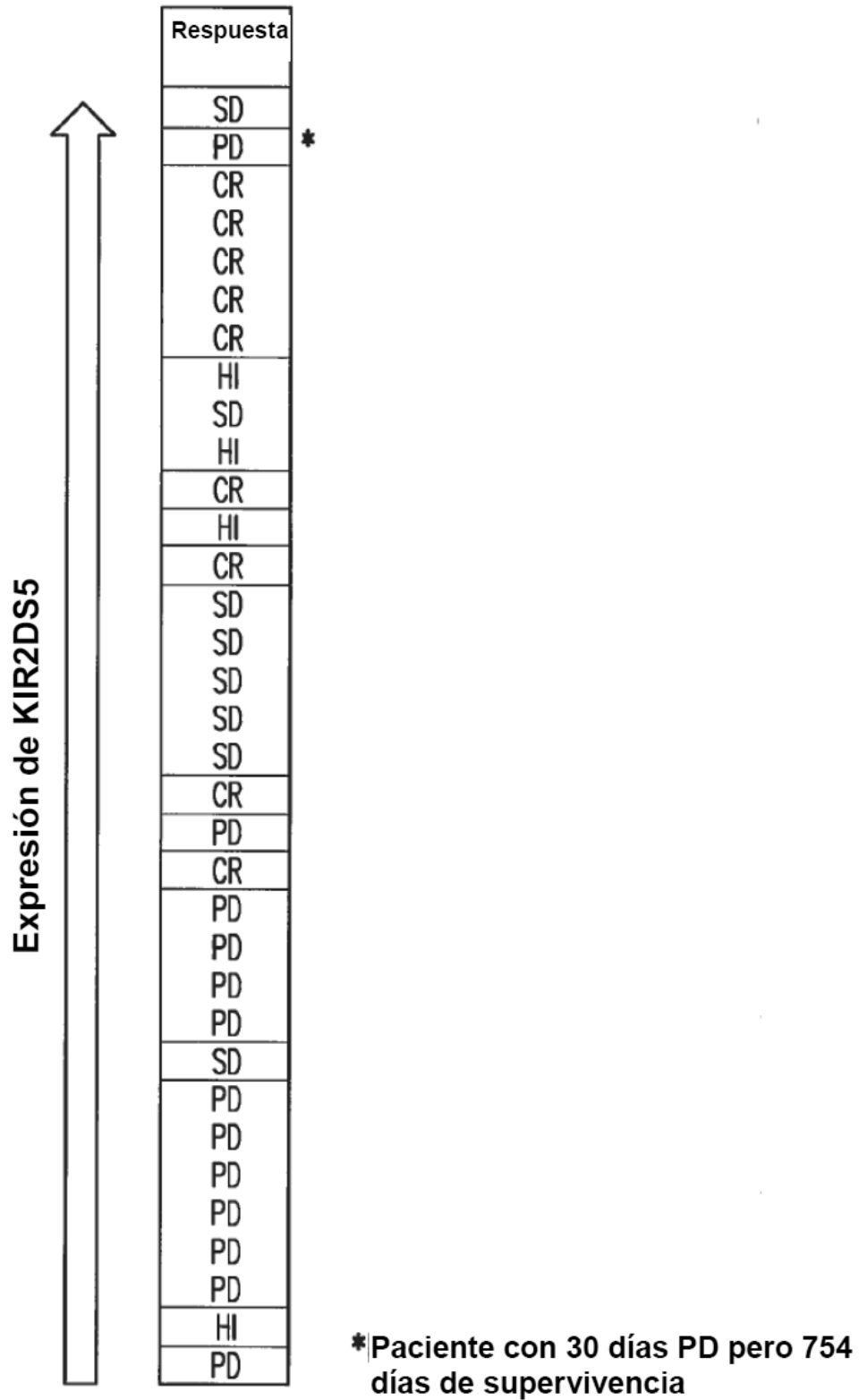


FIG. 1A

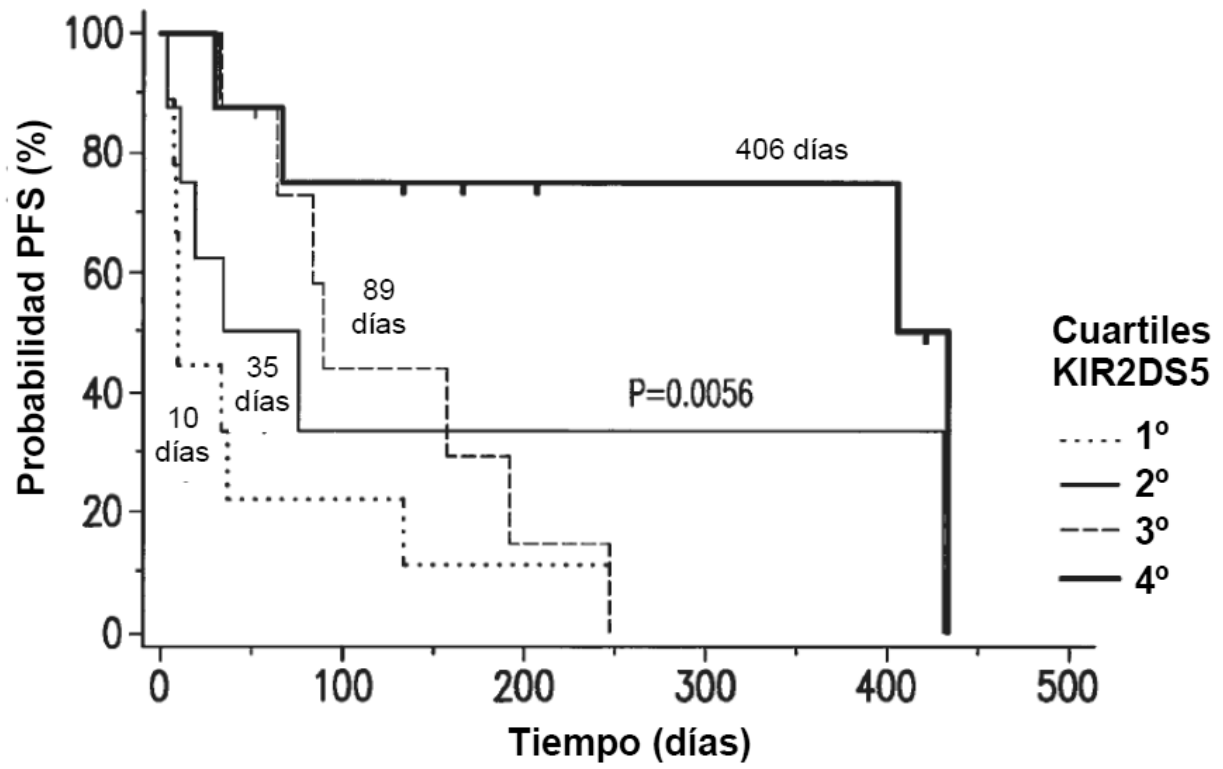


FIG. 1 B

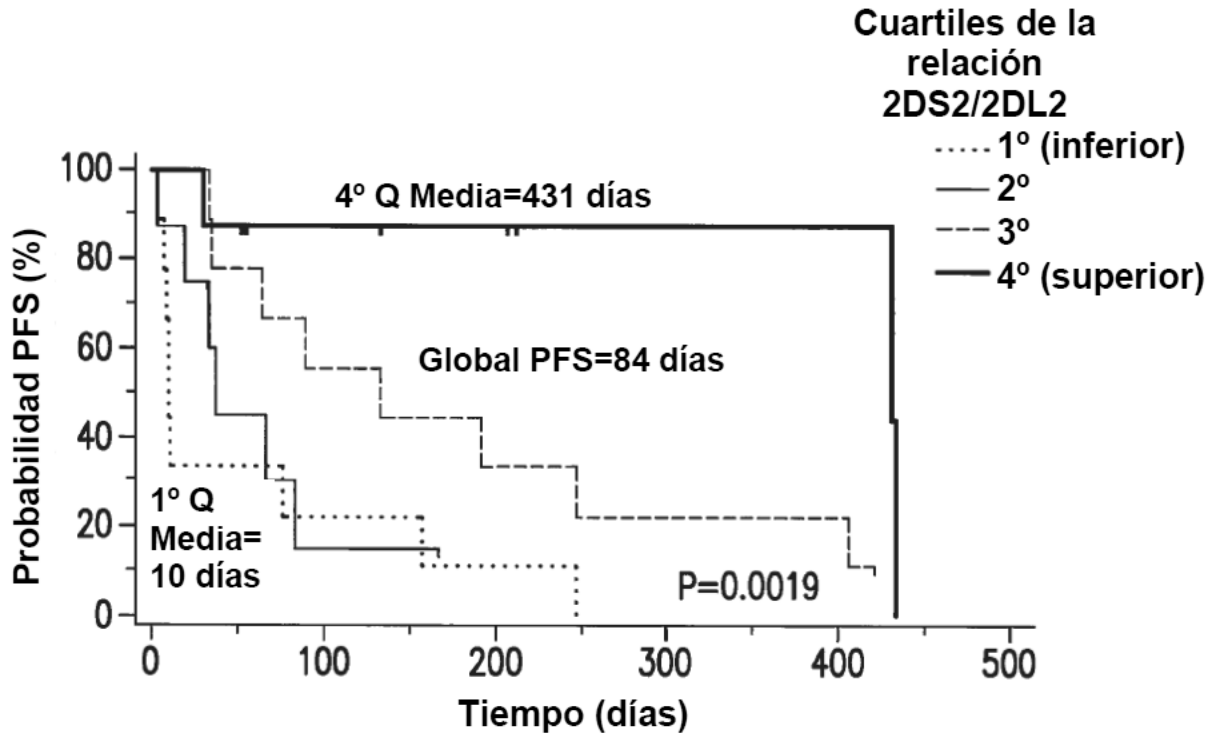


FIG.2A

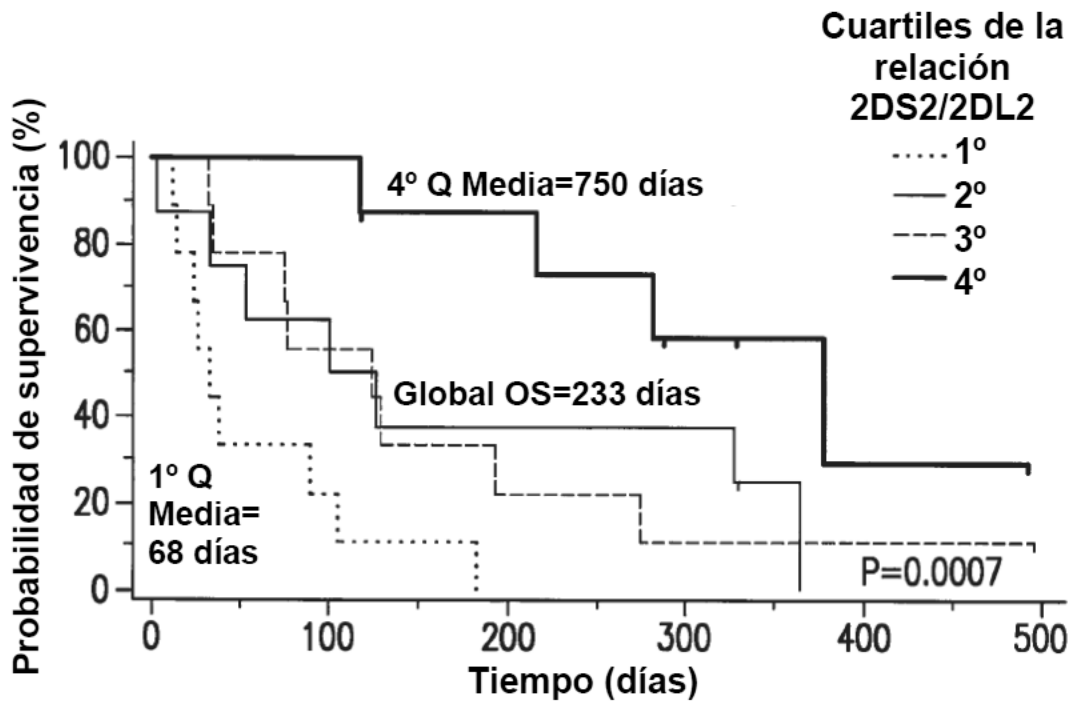


FIG.2B

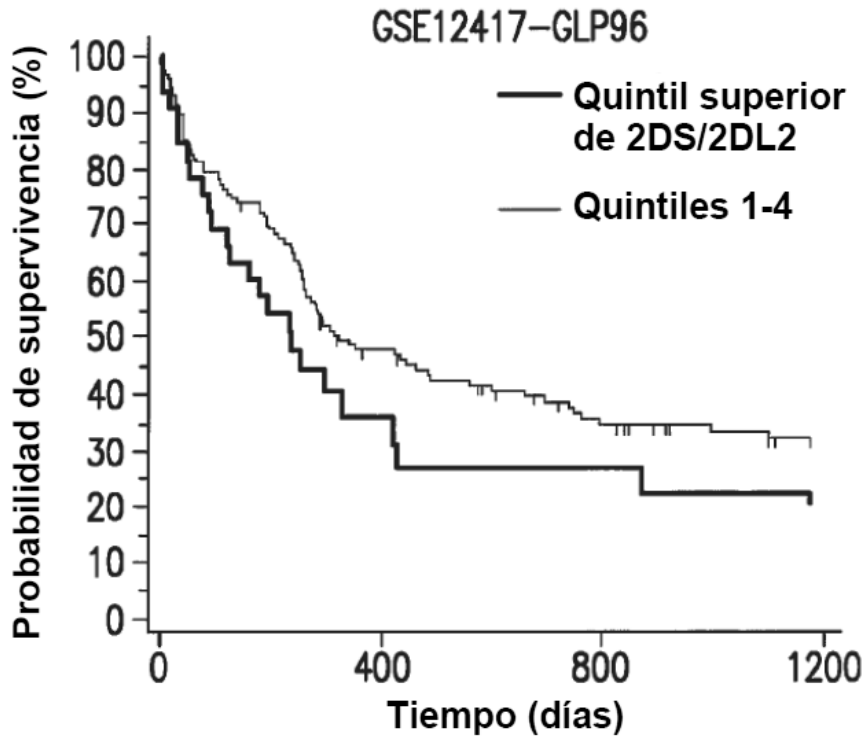


FIG.3A

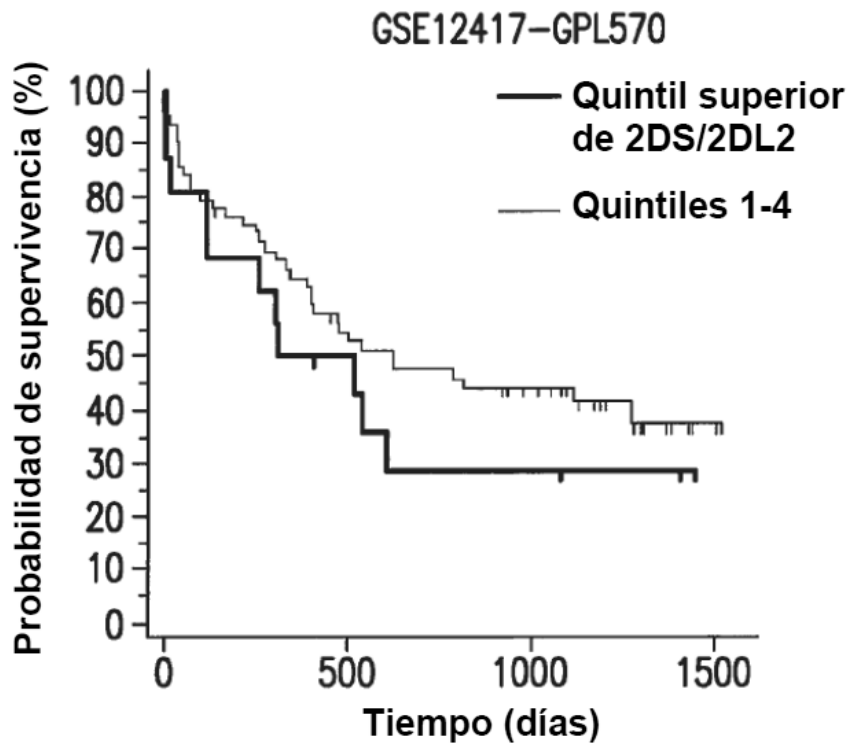


FIG.3B

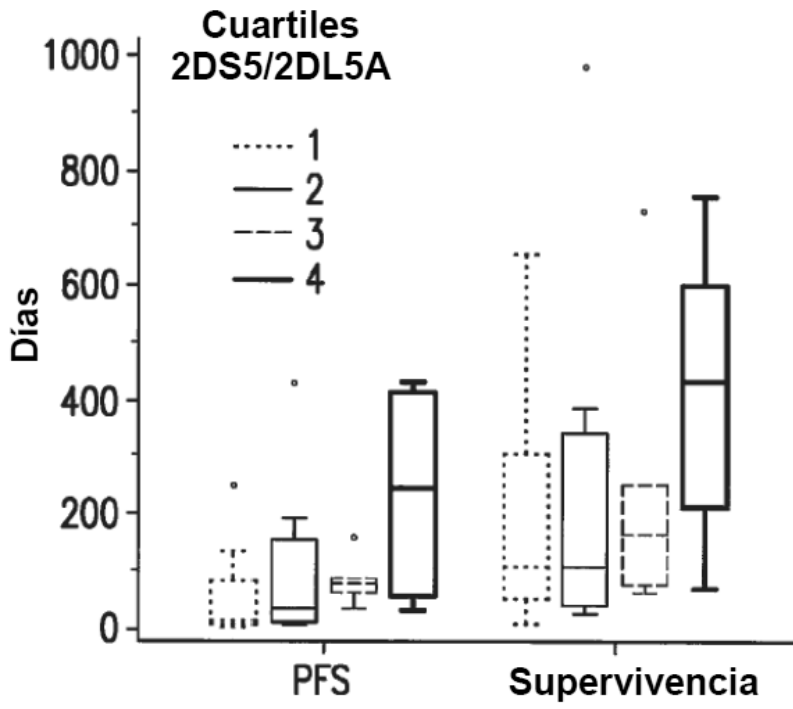


FIG.4A

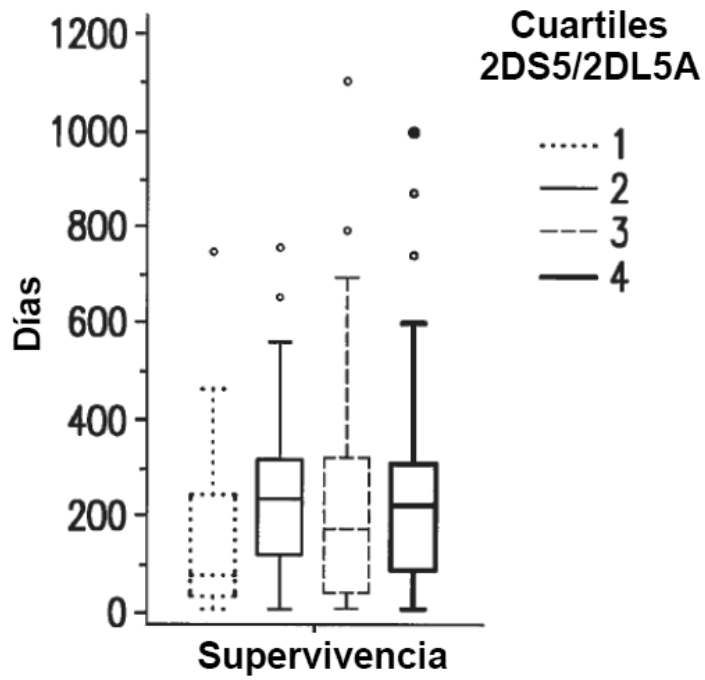


FIG.4B

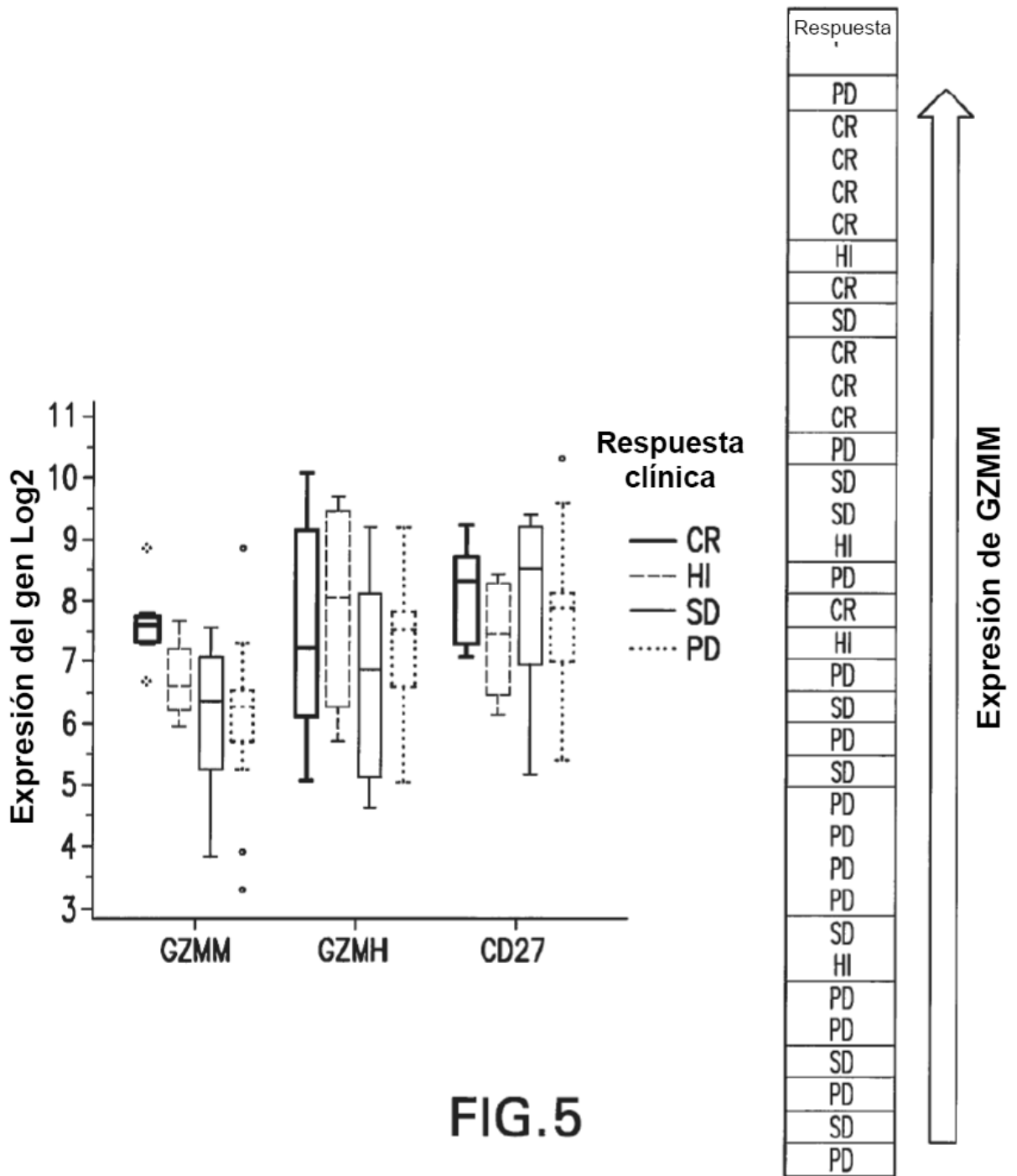


FIG.5

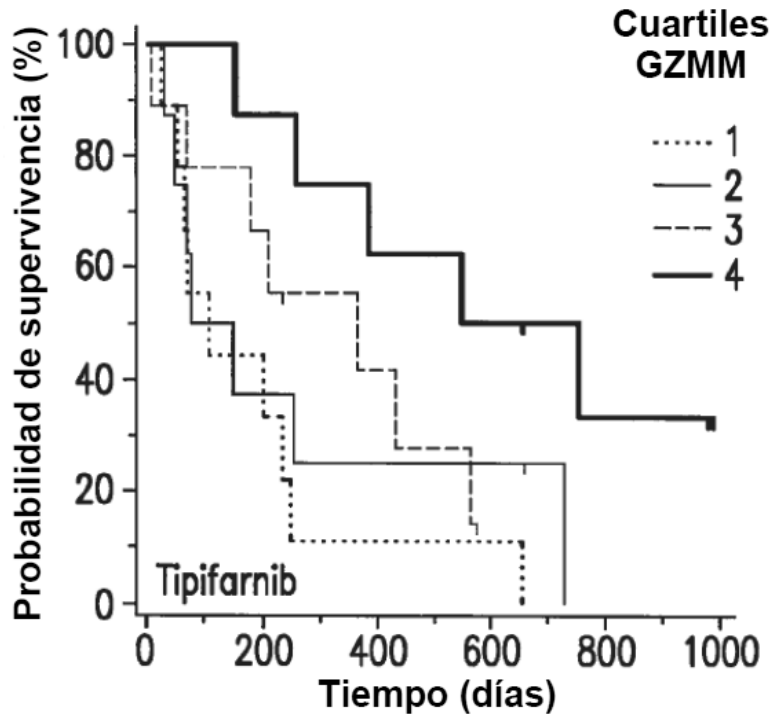


FIG.6A

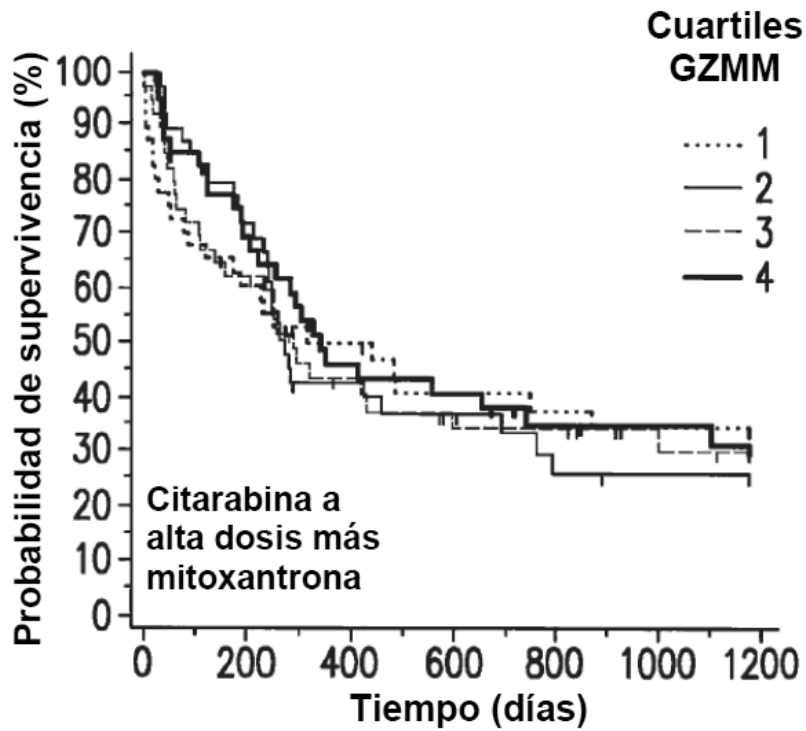


FIG.6B

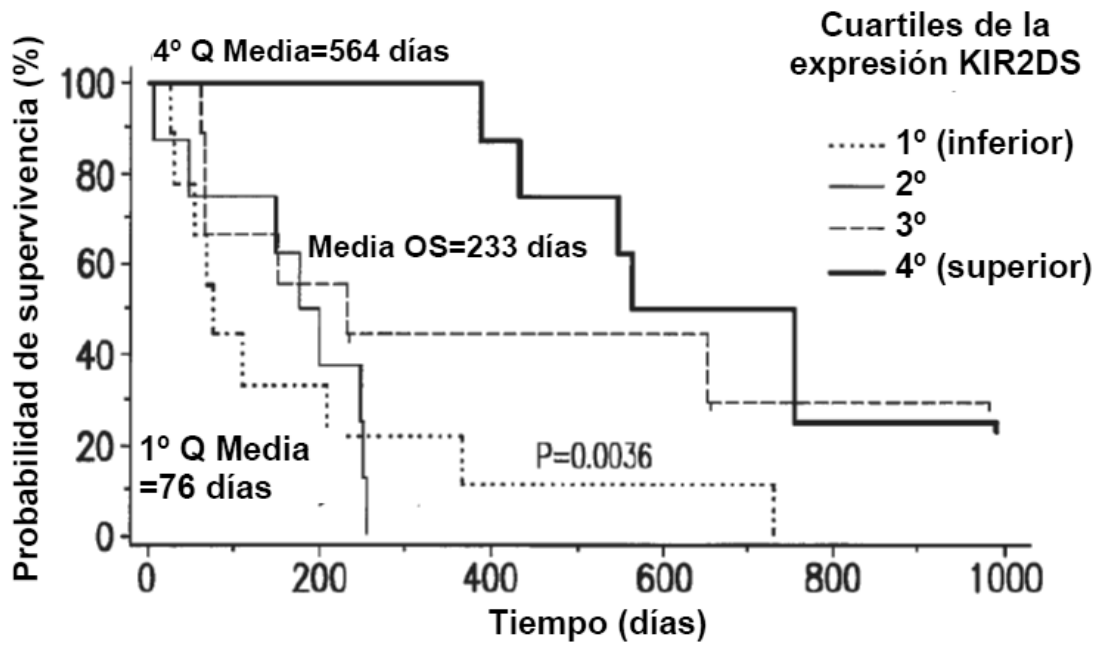


FIG.7A

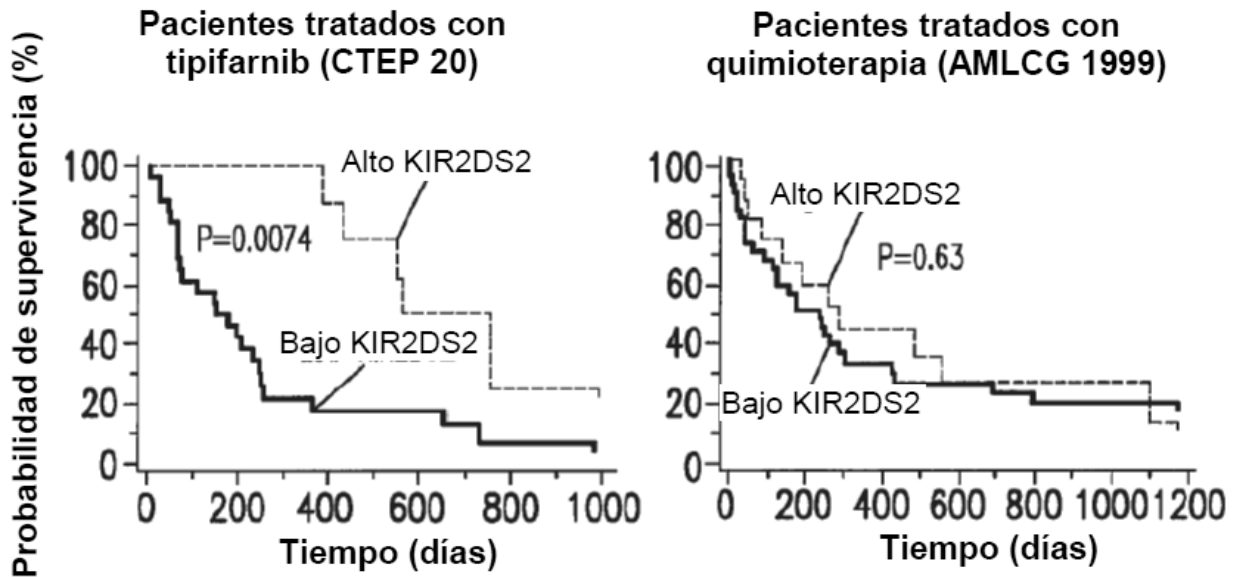


FIG.7B

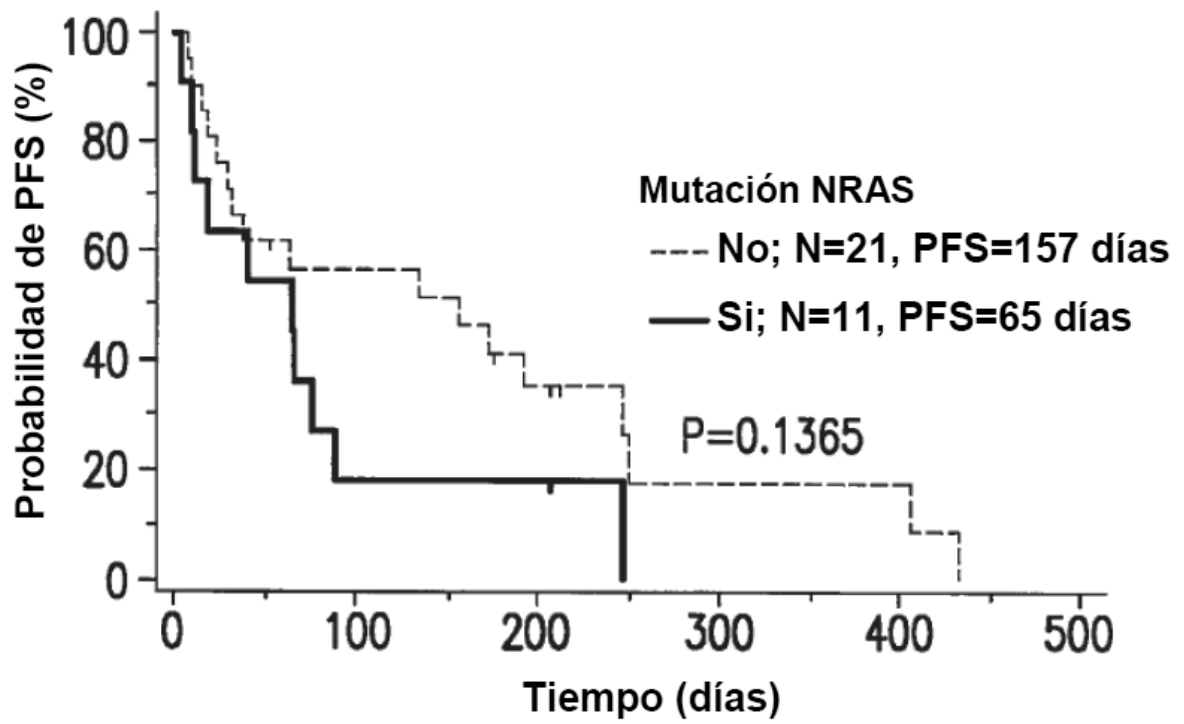


FIG.8

