

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201991091** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.11.29

(22) Дата подачи заявки
2017.11.02

(51) Int. Cl. *A61K 31/00* (2006.01)
A61K 31/4709 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)
C12Q 1/68 (2018.01)

**(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ
НОВООБРАЗОВАНИЯМИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ИНГИБИТОРОВ
ФАРНЕЗИЛТРАНСФЕРАЗЫ**

(31) 62/417,044

(32) 2016.11.03

(33) US

(86) PCT/US2017/059686

(87) WO 2018/085518 2018.05.11

(88) 2018.07.12

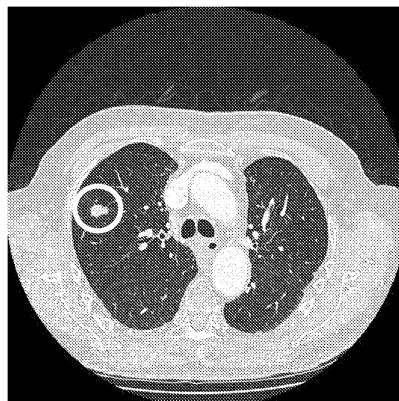
(71) Заявитель:
КУРА ОНКОЛОДЖИ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Гвальберто Антонио, Шольц Катрин
Роуз (US)

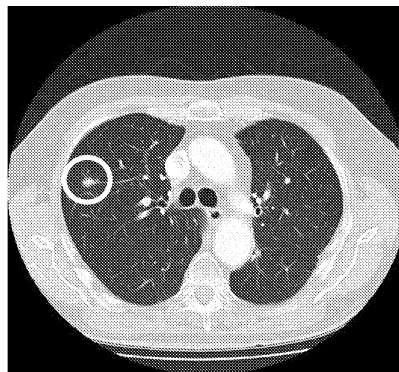
(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к области молекулярной биологии и онкобиологии. В частности, настоящее изобретение относится к способам лечения индивидуума с использованием ингибитора фарнезилтрансферазы (FTI), включающим определение того, будет ли индивидуум отвечать на лечение FTI, с учетом мутационного статуса HRAS у индивидуума.

A



B



A1

201991091

201991091

A1

**СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ
С ПРИМЕНЕНИЕМ ИНГИБИТОРОВ ФАРНЕЗИЛТРАНСФЕРАЗЫ**

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0001] Настоящее изобретение относится к области молекулярной биологии и онкобиологии. Настоящее изобретение относится к способам применения биомаркеров-мутаций HRAS для прогнозирования клинической чувствительности и терапевтического ответа на лечение с использованием ингибитора фарнезилтрансферазы у индивидуума, имеющего плоскоклеточный рак головы и шеи или плоскоклеточный рак легких, которого ранее не подвергали лечению с использованием ингибитора EGFR или являющегося рефрактерным к лечению с использованием ингибитора EGFR. Кроме того, настоящее изобретение относится к наборам для осуществления этих способов.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Стратификация популяций пациентов для улучшения частоты терапевтических ответов крайне значима при клиническом ведении пациентов со злокачественными образованиями. Ингибиторы фарнезилтрансферазы (FTI) являются терапевтическими средствами, которые можно использовать в лечении злокачественных новообразований, таких как лейкоз, лимфома и некоторые солидные опухоли. Однако различные пациенты могут по-разному отвечать на лечение FTI. Таким образом, необходимы способы прогнозирования отвечаемости пациента со злокачественным новообразованием на лечение FTI или способы выбора пациентов для лечения FTI. Способы и композиции по настоящему изобретению удовлетворяют эту потребность и обладают другими соответствующими преимуществами.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Настоящее изобретение относится к способам выбора популяции пациентов с раком головы и шеи для лечения FTI. Способы по настоящему изобретению частично основаны на обнаружении того, что мутантный статус HRAS и/или резистентность указанного злокачественного новообразования к ингибиторам EGFR можно использовать для прогнозирования отвечаемости пациента с

раком головы и шеи на лечение FTI.

[0004] Настоящее изобретение относится к способам лечения рефрактерной к ингибиторам EGFR плоскоклеточной карциномы головы и шеи (SCCHN), где SCCHN содержит мутацию HRAS, включающим введение индивидууму ингибитора фарнезилтрансферазы (FTI). В некоторых вариантах осуществления указанная мутация HRAS включает замену аминокислоты в кодоне, выбранном из группы, состоящей из G12, G13, Q61, Q22, K117, A146 и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN не содержит мутацию K-Ras или мутацию N-Ras. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN содержит амплифицированный ген HRAS или гиперэкспрессирует мРНК и/или белок HRAS. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN содержит K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN является HPV-отрицательной. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN является HPV-положительной. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN находится на поздней стадии или является метастатической. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN является рецидивирующей SCCHN. В некоторых вариантах осуществления SCCHN является SCCHN трахеи. В некоторых вариантах осуществления SCCHN является SCCHN верхней челюсти. В некоторых вариантах осуществления SCCHN является SCCHN ротовой полости. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является цетуксимабом. В некоторых вариантах осуществления FTI является типифарнибом.

[0005] Настоящее изобретение относится к способам лечения плоскоклеточной карциномы головы и шеи (SCCHN или HNSCC) у индивидуума, где SCCHN является рефрактерной к ингибитору EGFR, включающим (a) определение наличия или отсутствия мутации HRAS в образце указанного индивидуума, а затем (b) введение терапевтически эффективного количества ингибитора фарнезилтрансферазы (FTI) указанному индивидууму, если определяют, что указанный образец содержит мутацию HRAS. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам лечения плоскоклеточной карциномы головы и шеи (SCCHN) у индивидуума,

где индивидуума ранее не подвергали лечению ингибитором EGFR, включающим (a) определение наличия или отсутствия мутации HRAS в образце указанного индивидуума, а затем (b) введение указанному индивидууму терапевтически эффективного количества ингибитора фарнезилтрансферазы (FTI), если определяют, что указанный образец содержит мутацию HRAS, и отсутствие введения ингибитора EGFR. В некоторых вариантах осуществления указанная мутация HRAS включает замену аминокислоты в кодоне, выбранном из группы, состоящей из G12, G13, Q61, Q22, K117, A146 и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления указанный FTI вводят в комбинации с химиотерапией. В некоторых вариантах осуществления указанная химиотерапия включает средство на основе платины, таксан или их комбинацию.

[0006] В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают определение наличия или отсутствия мутации K-Ras или мутации N-Ras, где указанный образец не содержит мутацию K-Ras или мутацию N-Ras. В некоторых вариантах осуществления указанный образец содержит K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа. В некоторых вариантах осуществления образец является биоптатом ткани. В некоторых вариантах осуществления образец является биоптатом опухоли. В некоторых вариантах осуществления определение наличия или отсутствия мутации Ras включает анализ нуклеиновых кислот, полученных из указанного образца.

[0007] В некоторых вариантах осуществления мутацию Ras определяют посредством секвенирования, полимеразной цепной реакции (ПЦР), ДНК-микрочипа, масс-спектрометрии (MS), анализа однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), денатурирующей высокоэффективной жидкостной хроматографии (DHPLC) или анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP). В некоторых вариантах осуществления мутацию Ras определяют посредством ПЦР. В некоторых вариантах осуществления мутацию Ras определяют посредством секвенирования. В некоторых вариантах осуществления определение наличия или отсутствия мутации Ras включает анализ белков, полученных из указанного образца.

[0008] В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN

является HPV-отрицательной. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN является HPV-положительной. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN находится на поздней стадии или является метастатической. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN является рецидивирующей SCCHN. В некоторых вариантах осуществления SCCHN является SCCHN трахеи. В некоторых вариантах осуществления SCCHN является SCCHN верхней челюсти. В некоторых вариантах осуществления SCCHN является SCCHN ротовой полости.

[0009] В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является цетуксимабом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является эрлотинибом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является gefitinibом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является panitumumabом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор фарнезилтрансферазы (FTI) является типифарнибом.

[0010] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения SCCHN у индивидуума с учетом наличия мутации HRAS. В некоторых вариантах осуществления SCCHN может являться HPV-отрицательной SCCHN. В некоторых вариантах осуществления SCCHN может являться HPV-положительной SCCHN. В некоторых вариантах осуществления SCCHN может являться рецидивирующей SCCHN. В некоторых вариантах осуществления SCCHN может являться метастатической SCCHN. Способы, представленные в настоящем описании, включают (a) определение наличия или отсутствия мутации HRAS в образце индивидуума, имеющего SCCHN, а затем (b) введение индивидууму терапевтически эффективного количества типифарниба, если определяют, что образец содержит мутацию HRAS. В некоторых вариантах осуществления указанный типифарниб вводят в комбинации с химиотерапией. В некоторых вариантах осуществления указанная химиотерапия включает средство на основе платины, таксан или их комбинацию.

[0011] Настоящее изобретение относится к способам лечения рефрактерной к ингибитору EGFR плоскоклеточной карциномы легких (SCC легких), где SCC легких содержит мутацию HRAS, включающим введение индивидууму ингибитора фарнезилтрансферазы (FTI). В

некоторых вариантах осуществления указанная мутация HRAS включает замену аминокислоты в кодоне, выбранном из группы, состоящей из G12, G13, Q61, Q22, K117, A146 и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких не содержит мутацию K-Ras или мутацию N-Ras. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких содержит амплифицированный ген HRAS или гиперэкспрессирует мРНК и/или белок HRAS. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких содержит K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких является HPV-отрицательной. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких является HPV-положительной. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких находится на поздней стадии или является метастатической. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких является рецидивирующей SCC легких. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является цетуксимабом. В некоторых вариантах осуществления FTI является типифарнибом.

[0012] Настоящее изобретение относится к способам лечения плоскоклеточной карциномы легких (SCC легких) у индивидуума, где SCC легких является рефрактерной к ингибитору EGFR, включающим (a) определение наличия или отсутствия мутации HRAS в образце указанного индивидуума, а затем (b) введение указанному индивидууму терапевтически эффективного количества ингибитора фарнезилтрансферазы (FTI), если определяют, что указанный образец содержит мутацию HRAS. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам лечения SCC легких у индивидуума, где индивидуума ранее не подвергали лечению ингибитором EGFR, включающим (a) определение наличия или отсутствия мутации HRAS в образце указанного индивидуума, а затем (b) введение указанному индивидууму терапевтически эффективного количества ингибитора фарнезилтрансферазы (FTI), если определяют, что указанный образец содержит мутацию HRAS, и отсутствие введения ингибитора EGFR. В некоторых вариантах осуществления указанная мутация HRAS включает замену аминокислоты в кодоне, выбранном из группы, состоящей из G12, G13, Q61, Q22, K117, A146 и любой их

комбинации. В некоторых вариантах осуществления указанный FTI вводят в комбинации с химиотерапией. В некоторых вариантах осуществления указанная химиотерапия включает средство на основе платины, таксан или их комбинацию.

[0013] В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают определение наличия или отсутствия мутации K-Ras или мутации N-Ras, где указанный образец не содержит мутацию K-Ras или мутацию N-Ras. В некоторых вариантах осуществления указанный образец содержит K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа. В некоторых вариантах осуществления образец является биоптатом ткани. В некоторых вариантах осуществления образец является биоптатом опухоли. В некоторых вариантах осуществления определение наличия или отсутствия мутации Ras включает анализ нуклеиновых кислот, полученных из указанного образца.

[0014] В некоторых вариантах осуществления мутацию Ras определяют посредством секвенирования, полимеразной цепной реакции (ПЦР), ДНК-микрочипа, масс-спектрометрии (MS), анализа однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), денатурирующей высокоэффективной жидкостной хроматографии (DHPLC) или анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP). В некоторых вариантах осуществления мутацию Ras определяют посредством ПЦР. В некоторых вариантах осуществления мутацию Ras определяют посредством секвенирования. В некоторых вариантах осуществления определение наличия или отсутствия мутации Ras включает анализ белков, полученных из указанного образца.

[0015] В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких является HPV-отрицательной. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких является HPV-положительной. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких находится на поздней стадии или является метастатической. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких является рецидивирующей SCC легких.

[0016] В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является цетуксимабом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является эрлотинибом. В некоторых вариантах

осуществления ингибитор EGFR является гефитинибом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является панитумумабом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор фарнезилтрансферазы (FTI) является типифарнибом.

[0017] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения SCC легких у индивидуума с учетом наличия мутации HRAS. В некоторых вариантах осуществления SCC легких может являться HPV-отрицательной SCC легких. В некоторых вариантах осуществления SCC легких может являться HPV-положительной SCC легких. В некоторых вариантах осуществления SCC легких может являться рецидивирующей SCC легких. В некоторых вариантах осуществления SCC легких может являться метастатической SCC легких. Способы, представленные в настоящем описании, включают (a) определение наличия или отсутствия мутации HRAS в образце индивидуума, имеющего SCC легких, а затем (b) введение индивидууму терапевтически эффективного количества типифарниба, если определяют, что образец содержит мутацию HRAS. В некоторых вариантах осуществления указанный типифарниб вводят в комбинации с химиотерапией. В некоторых вариантах осуществления указанная химиотерапия включает средство на основе платины, таксан или их комбинацию.

[0018] В некоторых вариантах осуществления FTI выбран из группы, состоящей из типифарниба, лонафарниба (SCH-66336), CP-609,754, BMS-214662, L778123, L744823, L739749, R208176, AZD3409 и FTI-277. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 1-1000 мг/кг массы тела. В одном из вариантов осуществления FTI является типифарнибом. В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят в дозе 200-1200 мг дважды в сутки ("b.i.d."). В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят в дозе 600 мг ежедневно перорально. В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят в дозе 300 мг b.i.d. перорально в течение 3 из 4 недель в повторяющихся 4-недельных циклах. В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят в дозе 600 мг b.i.d. перорально в течение 3 из 4 недель в повторяющихся 4-недельных циклах. В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят в

дозе 900 мг b.i.d. перорально с недельным чередованием (в одну неделю вводят, в другую - нет) в повторяющихся 4-недельных циклах (дни 1-7 и 15-21 повторяющихся 28-дневных циклов). В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят в дозе 1200 мг b.i.d. перорально с недельным чередованием (дни 1-7 и 15-21 повторяющихся 28-дневных циклов). В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят в дозе 600 мг b.i.d. перорально с недельным чередованием (дни 1-7 и 15-21 повторяющихся 28-дневных циклов). В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят в дозе 400 мг b.i.d. перорально с недельным чередованием (дни 1-7 и 15-21 повторяющихся 28-дневных циклов). В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят в дозе 300 мг b.i.d. перорально с недельным чередованием (дни 1-7 и 15-21 повторяющихся 28-дневных циклов). В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят в дозе 200 мг b.i.d. перорально с недельным чередованием (дни 1-7 и 15-21 повторяющихся 28-дневных циклов). В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят в дозе 1200 мг b.i.d. перорально в течение дней 1-5 и 15-19 повторяющихся 28-дневных циклов. В некоторых вариантах осуществления пациентов подвергают по меньшей мере трем циклам лечения. В некоторых вариантах осуществления пациентов подвергают по меньшей мере шести циклам лечения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0019] Фиг. 1А-В. КТ-сканирование опухоли у индивидуума 1 на исходном уровне (А) и в день 22 цикла 4 (В). Опухоль указана кругом.

[0020] Фиг. 2. Объемы опухолей мышей в различных группах при лечении типифарнибом в модели ксенотрансплантата рака головы и шеи HUPRIME® HN1420, где группа 01 является группой, которой вводят носитель, и группа 02 является группой, которой вводят типифарниб.

[0021] Фиг. 3. Объемы опухолей у мышей в различных группах при лечении типифарнибом в модели ксенотрансплантата NSCLC HUPRIME® LU1513, где группа 01 является группой, которой вводят носитель, и группа 02 является группой, которой вводят

типифарниб.

[0022]

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

1. Определения

[0023] В рамках изобретения термин в единственном числе относится к одному или более грамматическим объектам. В качестве примера, термин "биомаркер" относится к одному биомаркеру или нескольким биомаркерам.

[0024] В рамках изобретения термин "индивидуум" относится к млекопитающему. Индивидуум может являться человеком или неявляющимся человеком млекопитающим, таким как собака, кошка, крупный рогатый скот, лошадь, мышь, крыса, кролик или их трансгенные особи. Индивидуум может являться пациентом или пациентом со злокачественным новообразованием.

[0025] В рамках изобретения термин "злокачественное новообразование" или "злокачественный" относится к физиологическому состоянию у млекопитающих, как правило, отличающемуся нерегулируемым ростом клеток. Неограничивающие примеры злокачественных новообразований включают гемобласты (например, множественную миелому, лимфому и лейкоз) и солидные опухоли. В рамках изобретения термин "предопухоловое состояние" относится к состоянию, ассоциированному с повышенным риском злокачественного новообразования, которое, если оставить его без лечения, может приводить к развитию злокачественного новообразования. Термин "предопухоловое состояние" также может относиться к неинвазивному злокачественному новообразованию, не прогрессирующему до агрессивной, инвазивной стадии.

[0026] В рамках изобретения термин "лечение" при использовании по отношению к пациенту со злокачественным новообразованием относится к действию, снижающему тяжесть злокачественного новообразования или замедляющему прогрессирование злокачественного новообразования, включающему (а) ингибирование роста злокачественного новообразования или прекращение развития злокачественного новообразования, и (b) вызывание регрессирования злокачественного новообразования или задержку или минимизацию одного или более симптомов,

ассоциированных с наличием злокачественного новообразования.

[0027] В рамках изобретения термин "определение" относится к использованию любой из форм измерения для оценки наличия вещества, количественной или качественной. Измерение может быть относительным или абсолютным. Измерение наличия вещества может включать определение того, присутствует ли или отсутствует вещество, или определение количества вещества.

[0028] В рамках изобретения "введение" относится к выполнению доставки соединения или фармацевтической композиции в организм индивидуума способом, представленным в настоящем описании или иным образом известным в этой области. Введение соединения или фармацевтической композиции включает предписание доставки соединения или фармацевтической композиции в организм пациента. Примеры форм введения включают пероральные лекарственные формы, такие как таблетки, капсулы, сиропы, суспензии; инъеклируемые лекарственные формы, такие как внутривенные (IV), внутримышечные (IM) или интраперитонеальные (IP) лекарственные формы; трансдермальные лекарственные формы, включая кремы, желе, порошки или патчи; буккальные лекарственные формы; ингаляционные порошки, спреи, суспензии и ректальные суппозитории.

[0029] В рамках изобретения термин "терапевтически эффективное количество" соединения при использовании в отношении заболевания или нарушения относится к количеству, достаточному для обеспечения терапевтической пользы при лечении заболевания или нарушения или для задержки или минимизации одного или более симптомов, ассоциированных с заболеванием или нарушением. Термин "терапевтически эффективное количество" соединения означает количество соединения, которое в отдельности или в комбинации с другими терапевтическими средствами обеспечивает терапевтическую пользу при лечении заболевания или нарушения. Термин включает количество, улучшающее общую терапию, снижающее или позволяющее избегать симптомов или повышающее терапевтическую эффективность другого терапевтического средства. Термин также относится к количеству соединения, в достаточной степени вызывающему биологический или медицинский ответ биологической молекулы

(например, белка, фермента, РНК или ДНК), клетки, ткани, системы, животного или человека, которого желает достичь исследователь, ветеринар, врач или клиницист.

[0030] В рамках изобретения термин "образец" относится к материалу или смеси материалов, содержащих один или более интересующих компонентов. Термин "образец" индивидуума относится к образцу, полученному из индивидуума, включая образцы биологической ткани или биологической жидкости, полученной или собранной *in vivo* или *in situ*. Образец можно получать из части индивидуума, содержащей предопухолевые или злокачественные клетки или ткани. Такие образцы, в качестве неограничивающих примеров, могут являться органами, тканями, фракциями и клетками, выделенными из млекопитающих. Примеры образцов включают костный мозг, цельную кровь, частично очищенную кровь, моноклеарные клетки периферической крови ("РВМС") и биоптаты ткани. Примеры образцов также включают лизат клеток, культуру клеток, линию клеток, ткань, ткань ротовой полости, ткань желудочно-кишечного тракта, орган, органеллу, биологическую жидкость, образец крови, образец мочи, образец кожи и т.п.

[0031] В рамках изобретения термин "биомаркер" относится к гену, который может присутствовать или отсутствовать у отдельных индивидуумов, или может присутствовать у отдельных индивидуумов, но экспрессироваться дифференциально. Наличие биомаркера, включая уровень экспрессии биомаркера, в образце индивидуума может свидетельствовать об ответственности индивидуума на конкретное лечение, такое как лечение FTI.

[0032] В рамках изобретения термин "экспрессия" при использовании в отношении гена относится к процессу, посредством которого информация, переносимая геном, проявляется в виде фенотипа, включая транскрипцию гена в матричную РНК (мРНК), последующую трансляцию молекулы мРНК в полипептидную цепь и ее сборку в конечный белок.

[0033] В рамках изобретения термин "РНК-продукт биомаркера" относится к транскрипту РНК, транскрибируемому с биомаркера, и термин "белковый продукт биомаркера" относится к белку или полипептиду, транслируемому из РНК-продукта биомаркера.

[0034] В рамках изобретения термин "уровень экспрессии" биомаркера относится к количеству или накоплению продукта экспрессии биомаркера, такому как, например, количество РНК-продукта биомаркера (уровень РНК биомаркера) или количество белкового продукта биомаркера (уровень белка биомаркера). Если биомаркер является геном с несколькими аллелями, термин "уровень экспрессии" биомаркера относится к общему количеству накапливаемого продукта экспрессии всех существующих аллелей этого гена, если не указано иначе.

[0035] В рамках изобретения термин "референсный уровень экспрессии" относится к заранее определенному уровню экспрессии биомаркера, который можно использовать для определения значимости уровня экспрессии биомаркера в образце индивидуума. Референсный уровень экспрессии биомаркера может являться уровнем экспрессии биомаркера в образце здорового индивидуума. Референсный уровень экспрессии биомаркера также может являться пороговым значением, определяемым специалистом в этой области посредством статистического анализа уровней экспрессии биомаркера в выборке и отвечаемости на лечение индивидуумов в выборке.

[0036] В рамках изобретения термин "отвечаемость" или "отвечающий" при использовании в контексте лечения относится к эффективности лечения в отношении уменьшения или снижении симптомов заболевания, подвергаемого лечению. Например, пациент со злокачественным новообразованием отвечает на лечение FTI, если лечение FTI эффективно ингибирует рост злокачественного новообразования, прекращает развитие злокачественного новообразования, вызывает регрессирование злокачественного новообразования или замедляет или минимизирует один или более симптомов, ассоциированных с наличием злокачественного новообразования у этого пациента.

[0037] Отвечаемость на конкретное лечение пациента со злокачественным новообразованием можно охарактеризовать как полный или частичный ответ. Термин "полный ответ" или "CR" относится к отсутствию клинически определяемого заболевания с нормализацией ранее аномальных рентгенографических показателей,

костного мозга и спинномозговой жидкости (CSF) или аномальных показателей моноклонального белка. Термин "частичный ответ" или "PR" относится по меньшей мере к приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% снижению всей измеряемой опухолевой нагрузки (т.е. количества злокачественных клеток, присутствующих у индивидуума, или измеренного объема опухолевых масс, или количества аномального моноклонального белка) в отсутствие новых очагов повреждения.

[0038] Специалисту в этой области будет понятно, что клинические стандарты, используемые для определения CR, PR или другого уровня отвечаемости пациента на лечение, могут варьироваться при различных типах злокачественных новообразований. Например, в случае гемобластозов пациентов, "отвечающих" на конкретное лечение, можно определять как пациентов, имеющих полный ответ (CR), частичный ответ (PR) или гематологическое улучшение (HI) (Lancet et al., Blood 2:2 (2006)). В случае солидных опухолей пациента, "отвечающего" на конкретное лечение, можно определять с помощью критериев RECIST (см. Therasse et al., "New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors," JNCI 92(3):205-216 (2000)). HI можно определять как любое количество бластных клеток в костном мозге менее 5% или снижение количества бластных клеток в костном мозге по меньшей мере наполовину. С другой стороны, пациентов, "не отвечающих" на конкретное лечение, можно определять как пациентов, имеющих прогрессирующее заболевание (PD) или стабильное заболевание (SD). Прогрессирующее заболевание (PD) можно определять как >50% повышение % бластных клеток в костном мозге или кровотоке относительно исходного уровня или новое появление циркулирующих бластных клеток (по меньшей мере в 2 последовательных случаях). Стабильное заболевание (SD) можно определять как любой ответ, не соответствующий критериям CR, PR, HI или PD.

[0039] В рамках изобретения термин "вероятность" относится к вероятности события. Индивидуум "вероятно" будет отвечать на конкретное лечение, если условие удовлетворено, что означает, что вероятность ответа индивидуума на конкретное лечение

является более высокой, если условие удовлетворено, чем если бы условие не было удовлетворено. Вероятность ответа на конкретное лечение может быть выше, например, на 5%, 10%, 25%, 50%, 100%, 200% или более у индивидуума, удовлетворяющего конкретному условию, по сравнению с индивидуумом, не удовлетворяющим условию. Например, пациент со злокачественным новообразованием "вероятно" ответит на лечение FTI, если индивидуум является носителем мутации HRAS, что означает, что вероятность ответа индивидуума на лечение FTI на 5%, 10%, 25%, 50%, 100%, 200% или более выше у индивидуума, являющегося носителем мутации HRAS, чем у индивидуума, не являющегося носителем мутации HRAS.

[0040] Белки Ras являются ГТФазами, регулирующими пролиферацию и передачу биологической информации от внеклеточных сигналов в ядро. Клетки млекопитающих экспрессируют три гена *ras*, кодирующих четыре белка Ras, представляющих собой HRAS, N-Ras, K_A-Ras и K_B-Ras. K_A-Ras и K_B-Ras, как правило, также обозначают как K-Ras. Белки Ras существуют в активном ГТФ-связанном или неактивном ГДФ-связанном состоянии. Мутантные белки RAS накапливаются в ГТФ-связанной конформации по причине дефективной ГТФазной активности и/или резистентности к инактивации ГТФаза-активирующими белками (GAP). Конститутивная передача сигнала RAS опосредована мутациями, предотвращающими гидролиз GTP, блокирующими RAS в постоянно активном состоянии. Кроме того, для активности ГТФаз RAS в отношении злокачественной трансформации необходима липидная посттрансляционная модификация в форме фарнезилирования или геранилгеранилирования. Из трех типов RAS (HRAS, KRAS, NRAS) HRAS является уникальным в том, что он может быть фарнезилированным, но не геранилгеранилированным. Таким образом, показано, что ингибиторы фарнезилтрансферазы (FTI) ингибируют фарнезилирование HRAS, предотвращают его ассоциацию с плазматической мембраной, ингибируют нижележащие пути передачи сигнала и ингибируют рост опухоли (обзор в Berndt et al. Nature Reviews Cancer 11:775-91). Мутацию Q22K HRAS определяли при синдроме Костелло (Sheffield et al. Ped Dev Pathology 18, 237-244, 2015), нарушении развития и предрасположенности к образованию опухолей, вызванном мутацией

HRAS в зародышевой линии, и, хотя ее способность запускать неопластическую трансформацию еще не определена, эта мутация находится в высококонсервативной области в белках RAS, и установлено, что Q22K KRAS является драйверной мутацией (Tsukuda et al. Biochem Biophys Res Commun 2000; 278:653-58).

[0041] Примеры аминокислотной последовательности и соответствующей кодирующей последовательности нуклеиновой кислоты HRAS человека (GENBANK: CR536579.1 GI:49168641) представлены ниже:

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

(SEQ ID NO:1)

```
ATGACGGAAT ATAAGCTGGT GGTGGTGGGC GCCGGCGGTG TGGGCAAGAG
TGCGCTGACC ATCCAGCTGA TCCAGAACCA CTTTGTGGAC GAATACGACC
CCACTATAGA GGATTCCTAC CGGAAGCAGG TGGTCATTGA TGGGGAGACG
TGCCTGTTGG ACATCCTGGA TACCGCCGGC CAGGAGGAGT ACAGCGCCAT
GCGGGACCAG TACATGCGCA CCGGGGAGGG CTTCTGTGT GTGTTTGCCA
TCAACAACAC CAAGTCTTTT GAGGACATCC ACCAGTACAG GGAGCAGATC
AAACGGGTGA AGGACTCGGA TGACGTGCCC 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:2).

[0042] Изоформы Ras фарнезилированы. Фарнезилтрансфераза (FTase) играет ключевую роль в посттрансляционных модификациях белков Ras. Одним из способов противодействия функции Ras является ингибирование FTase, фермента, присоединяющего 15-углеродную изопрениловую группу к белкам Ras, с помощью ингибиторов фарнезилтрансферазы ("FTI"). FTI представляют собой класс биологически активных противоопухолевых лекарственных средств, ингибирующих фарнезилирование широкого спектра белков-мишеней, включая Ras. FTI блокируют активацию Ras посредством

ингибирования FTase, что в конечном итоге приводит к прекращению роста клетки. Таким образом, ожидают, что FTI будут эффективными терапевтическими средствами при лечении злокачественных новообразований.

[0043] Тридцать процентов всех злокачественных новообразований человека экспрессирует онкогенно активированный Ras. Высокая частота мутантного Ras, обнаруживаемого в 30% всех злокачественных новообразований человека, делает этот путь привлекательной мишенью для разработки противоопухолевых лекарственных средств. Исходно прогнозировали, что мутации Ras, приводящие к конститутивно активному пути RAS, могут служить в качестве биомаркера ответа пациента на FTI, что основано на доклинических данных о том, что FTI могут блокировать RAS-трансформированные клетки (Raponi et al., *Blood* 111:2589-96 (2008)).

[0044] В рамках изобретения термин "мутация HRAS" относится к активационной мутации в гене *HRAS* или белке HRAS. Термин "мутация HRAS" может относиться к генетическому изменению последовательности ДНК гена *HRAS*, приводящему к активации соответствующего белка HRAS, или изменению аминокислотной последовательности белка HRAS, приводящему к его активации. Таким образом, в рамках изобретения термин "мутация HRAS" не включает изменение в гене *HRAS*, не приводящее к активации белка HRAS, или изменение последовательности белка HRAS, не приводящее к его активации. Таким образом, образец или индивидуум, не имеющий в рамках изобретения какую-либо "мутацию HRAS", все равно может иметь мутацию в гене *HRAS*, не влияющую на активность белка HRAS, или мутацию, нарушающую активность белка HRAS, или может иметь мутацию в белке HRAS, не влияющую на его активность, или мутацию, нарушающую его активность. Образец или индивидуум может содержать множество копий гена *HRAS*. Образец или индивидуум также может содержать белки HRAS дикого типа и мутантные белки HRAS. В рамках изобретения образец или индивидуум, содержащий мутацию HRAS, также может содержать копию гена *HRAS* дикого типа и/или белка HRAS дикого типа. Образец или индивидуум, определяемый в рамках изобретения как "содержащий

HRAS дикого типа", является образцом или индивидуумом, содержащим только ген *HRAS* дикого типа и белок HRAS дикого типа, но не мутацию HRAS.

[0045] В некоторых вариантах осуществления мутация HRAS может включать по меньшей мере одну мутацию в кодоне, выбранном из группы, состоящей из G12, G13, Q61, Q22, K117 и A146.

2. Ингибиторы фарнезилтрансферазы для лечения злокачественных опухолей

2.1. Ингибиторы фарнезилтрансферазы

[0046] Настоящее изобретение относится к способам лечения плоскоклеточной карциномы головы и шеи с использованием FTI у выбранного пациента со злокачественным новообразованием или выбранной популяции пациентов со злокачественными новообразованиями. Типичные FTI, в общем, принадлежат к двум классам (Shen et al., Drug Disc. Today 20:2 (2015)). FTI первого класса имеют основной каркас из фарнезилдифосфата (FPP). Например, сообщают, что аналоги FPP с малоновой кислотой группой (Ta) являются FTI, конкурирующими с FPP (Duez, S. et al. Bioorg. Med. Chem. 18:543-556(2010)). Кроме того, имидазол-содержащие производные, соединенные кислотным заместителем и пептидиловой цепью, также синтезировали как бисубстратные FTI, и созданные бисубстратные ингибиторы имеют лучшие аффинности, чем FPP. FTI второго класса являются молекулами-пептидомиметиками, которые можно разделить на две группы, а именно, тиоловые и нетиоловые FTI. Что касается тиоловых FTI, например, L-739749, селективный пептидомиметический FTI, демонстрирует мощную противоопухолевую активность у голых мышей Nude без системной токсичности (Kohl, N.E. et al. PNAS 91:9141-9145(1994)). Кроме того, также разработано множество тиоловых ингибиторов, таких как трипептидилные FTI (Lee, H-Y. et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 12:1599-1602(2002)).

[0047] Что касается нетиоловых FTI, для замены тиоловой группы для контакта с ионом цинка в участке связывания широко используют гетероциклы. В соответствии со структурами фармакофорных групп, нетиоловые FTI можно разделять на три класса. К первому классу относятся различные моноциклические

кольца, такие как L-778123, FTI, проходящий клинические испытания фазы I для солидных опухолей и лимфомы. L-778123 связывается с участком пептида СААХ и конкурирует с субстратом СААХ фарнезилтрансферазы. Второй класс представлен типифарнибом, проходящим клинические испытания фазы III, и BMS-214662, проходящим клинические испытания фазы III, состоящими из различных моноциклических колец и бициклических колец (Narousseau et al. Blood 114:1166-1173 (2009)). Типичным ингибитором третьего класса является лонафарниб, являющийся активным в Ras-зависимых и -независимых злокачественных опухолях и проходящий клинические испытания фазы III для карциномы, лейкоза и миелодиспластического синдрома. Лонафарниб является FTI с трициклической основой, содержащим центральное семичленное кольцо, конденсированное с двумя шестичленными ароматическими кольцами.

[0048] Таким образом, FTI, как представлено в настоящем описании, могут иметь множество форм, но обладают общей важной ингибиторной функцией, противодействуя или уменьшая фарнезилирование белков, связанных со злокачественными новообразованиями и пролиферативными заболеваниями.

[0049] Многочисленные FTI входят в объем настоящего изобретения и включают FTI, описанные в патентах США № 5976851; 5972984; 5972966; 5968965; 5968952; 6187786; 6169096; 6037350; 6177432; 5965578; 5965539; 5958939; 5939557; 5936097; 5891889; 5889053; 5880140; 5872135; 5869682; 5861529; 5859015; 5856439; 5856326; 5852010; 5843941; 5807852; 5780492; 5773455; 5767274; 5756528; 5750567; 5721236; 5700806; 5661161; 5602098; 5585359; 5578629; 5534537; 5532359; 5523430; 5504212; 5491164; 5420245 и 5238922, описания которых включены, таким образом, в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

[0050] FTI, входящие в объем настоящего изобретения, также включают FTI, описанные в 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), описания которых включены, таким образом, в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

[0051] В некоторых вариантах осуществления FTI включают арглабин (т.е. 1(R)-10-эпокси-5(S),7(S)-гвайя-3(4),11(13)-диен-6,12-олид, описанный в WO-98/28303 (NuOncology Labs); периллиловый спирт, описанный в WO-99/45912 (Wisconsin Genetics); SCH-66336 (лонафарниб), т.е. (+)-(R)-4-[2-[4-(3,10-дибромо-8-хлоро-5,6-дигидро-11H-бензо[5,6]циклогепта[1,2-b]пиридин-11-ил)пиперидин-1-ил]-2-оксоэтил]пиперидин-1-карбоксамид, описанный в патенте США № 5874442 (Schering); L778123, т.е. 1-(3-хлорфенил)-4-[1-(4-цианобензил)-5-имидазолилметил]-2-пиперазинон, описанный в WO-00/01691 (Merck); L739749, т.е. соединение 2(S)-[2(S)-[2(R)-амино-3-меркапто]пропиламино-3(S)-метил]-пентилокси-3-фенилпропионил-метионин сульфон, описанный в WO-94/10138 (Merck); FTI-277, т.е. метил{N-[2-фенил-4-N[2(R)-амино-3-меркаптопропиламино]бензоил]}-метионат (Calbiochem); L744832, т.е. 1-метилэтиловый сложный эфир 2S)-2-[[2S)-2-[[2S,3S)-2-[(2R)-2-амино-3-меркаптопропил]амино]-3-метилпентил]окси]-1-оксо-3-фенилпропил]амино]-4-(метилсульфонил)-бутановой кислоты (Biomol International L.P.); CP-609,754 (Pfizer), т.е. (R)-6-[(4-хлорфенил)-гидроксил-(1-метил-1H-имидазол-5-ил)-метил]-4-(3-этинилфенил)-1-метил-2-(1H)-хинолинон и (R)-6-[(4-хлорфенил)-гидроксил-(3-метил-3H-имидазол-4-ил)-метил]-4-(3-этинилфенил)-1-метил-2-(1H)-хинолинон; R208176 (Johnson & Johnson), т.е. JNJ-17305457 или (R)-1-(4-хлорфенил)-1-[5-(3-хлорфенил)тетразоло[1,5-a]хиназолин-7-ил]-1-(1-метил-1H-имидазол-5-ил)метанамин; AZD3409 (AstraZeneca), т.е. (S)-изопропил 2-(2-(4-фторфенэтил)-5-(((2S,4S)-4-(никотиноилтио)пирролидин-2-ил)метил)амино)бензамидо)-4-(метилтио)бутаноат; BMS 214662 (Bristol-Myers Squibb), т.е. (R)-2,3,4,5-тетрагидро-1-(1H-имидазол-4-илметил)-3-(фенилметил)-4-(2-тиенилсульфонил)-1H-1,4-бензодиазепин-7-карбонитрил, описанный в WO 97/30992 (Bristol Myers Squibb), и соединения Pfizer (A) и (B), описанные в WO-00/12498 и WO-00/12499.

[0052] В некоторых вариантах осуществления FTI являются непептидными, так называемыми "низкомолекулярными" терапевтическими средствами, такими как хинолины или производные

хинолинов, включая:

[0053] 7-(3-хлорфенил)-9-[(4-хлорфенил)-1H-имидазол-1-илметил]-2,3-дигидро-о-1H,5H-бензо[*ij*]хинолизин-5-он,

[0054] 7-(3-хлорфенил)-9-[(4-хлорфенил)-1H-имидазол-1-илметил]-1,2-дигидро-о-4H-пирроло[3,2,1-*ij*]хинолин-4-он,

[0055] 8-[амино(4-хлорфенил)(1-метил-1H-имидазол-5-ил)метил]-6-(3-хлорфенил)-1,2-дигидро-4H-пирроло[3,2,1-*ij*]хинолин-4-он и

[0056] 8-[амино(4-хлорфенил)(1-метил-1H-имидазол-5-ил)метил]-6-(3-хлорфенил)-2,3-дигидро-1H,5H-бензо[*ij*]хинолизин-5-он.

[0057] Типифарниб является непептидомиметическим FTI (Thomas et al., *Biologics* 1: 415-424 (2007)). Он является 4,6-дизамещенным производным 1-метилхинолин-2-она ((В)-6-[амино(4-хлорфенил)(1-метил-1H-имидазол-5-ил)метил]-4-(3-хлорфенил)-1-метил-2(1H)-хинолиноном)), полученным посредством оптимизации хинолоновой основы, идентифицированной при скрининге библиотеки соединений. Типифарниб конкурентно ингибирует участок связывания FTase пептида СААХ и является очень мощным и высокоселективным ингибитором фарнезилирования. Типифарниб имеет контролируемый профиль безопасности в качестве монотерапии и хорошо переносится людьми.

[0058] Типифарниб синтезируют посредством конденсации аниона 1-метилимидазола с производным 6-(4-хлорбензоил)хинолона с последующей дегидратацией. Промежуточное хинолоновое соединение получают в четыре стадии посредством циклизации N-фенил-3-(3-хлорфенил)-2-пропенамида, ацилирования, окисления и N-метиляции. Типифарниб является мощным ингибитором FTase *in vitro* и перорально активен в различных моделях на животных.

[0059] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения злокачественного новообразования у индивидуума с использованием FTI или фармацевтической композиции, содержащей FTI, или выбора пациента со злокачественным новообразованием для лечения FTI. Фармацевтические композиции, представленные в настоящем описании, содержат терапевтически эффективные количества FTI и

фармацевтически приемлемый носитель, дилуент или эксципиент. В некоторых вариантах осуществления FTI является типифарнибом; арглабином; периллиловым спиртом; лонафарнибом (SCH-66336); L778123; L739749; FTI-277; L744832; R208176; BMS 214662; AZD3409 или CP-609,754. В некоторых вариантах осуществления FTI является типифарнибом.

2.2. Составы

[0060] FTI можно составлять в подходящих фармацевтических препаратах, таких как растворы, суспензии, таблетки, диспергируемые таблетки, пилюли, капсулы, порошки, составы с замедленным высвобождением или эликсиры для перорального введения или в стерильных растворах или суспензиях для глазного или парентерального введения, а также трансдермальных патчах и порошковых ингаляторах. Как правило, FTI составляют в фармацевтических композициях способами, хорошо известными в этой области (см., например, Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, Seventh Edition 1999).

[0061] В композициях эффективные концентрации FTI и фармацевтически приемлемых солей смешивают с подходящим фармацевтическим носителем. В некоторых вариантах осуществления концентрации FTI в композициях являются эффективными после введения в отношении доставки количества, с помощью которого лечат, предотвращают или улучшают один или более симптомов и/или прогрессирование злокачественного новообразования, включая гемобластозы и солидные опухоли.

[0062] Композиции можно составлять для однократного введения. Для составления композиции массовую долю FTI растворяют, суспендируют, диспергируют или иначе смешивают в выбранном носителе в эффективной концентрации таким образом, что подвергнутое лечению состояние облегчают или улучшают. Фармацевтические носители, подходящие для введения FTI, представленного в настоящем описании, включают любые такие носители, которые, как известно специалистам в этой области, подходят для конкретного способа введения.

[0063] Кроме того, FTI можно составлять в виде единственного фармацевтически активного ингредиента в композиции

или его можно комбинировать с другими активными ингредиентами. В качестве фармацевтически приемлемых носителей также можно использовать липосомные суспензии, включая липосомы направленного действия, такие как липосомы, направленно воздействующие на опухоль. Их можно получать способами, известными специалистам в этой области. Например, липосомные составы можно получать, как известно в этой области. В кратком изложении, липосомы, такие как многослойные везикулы (MLV), можно получать посредством высушивания фосфатидилхолина яйца и фосфатидилсерина головного мозга (молярное соотношение 7:3) внутри колбы. Добавляют раствор FTI, представленного в настоящем описании, в фосфатно-солевом буфере без двухвалентных катионов (PBS) и встряхивают колбу до диспергирования липидной пленки. Полученные везикулы промывают для удаления неинкапсулированного соединения, осаждают посредством центрифугирования, а затем ресуспендируют в PBS.

[0064] FTI включают в фармацевтически приемлемый носитель в количестве, достаточном для вызывания терапевтически полезного эффекта в отсутствие нежелательных побочных эффектов у пациента, подвергаемого лечению. Терапевтически эффективную концентрацию можно определять эмпирически, тестируя соединения в системах *in vitro* и *in vivo*, представленных в настоящем описании, а затем экстраполируя эти дозы в отношении людей.

[0065] Концентрация FTI в фармацевтической композиции будет зависеть от абсорбции, распределения в тканях, инактивации и скорости экскреции FTI, физико-химических характеристик FTI, режима дозирования и вводимого количества, а также других факторов, известных специалистам в этой области. Например, доставляемое количество является достаточным для улучшения одного или более симптомов злокачественного новообразования, включая гемобластозы и солидные опухоли.

[0066] В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза должна приводить к концентрации активного ингредиента в сыворотке от приблизительно 0,1 нг/мл до приблизительно 50-100 мкг/мл. В одном из вариантов осуществления фармацевтические композиции соответствуют дозе от приблизительно

0,001 мг до приблизительно 2000 мг соединения на килограмм массы тела в сутки. Фармацевтические стандартные лекарственные формы составляют для получения от приблизительно 1 мг до приблизительно 1000 мг и в некоторых вариантах осуществления от приблизительно 10 до приблизительно 500 мг основного активного ингредиента или комбинации основных ингредиентов на стандартную лекарственную форму.

[0067] FTI можно вводить за один раз или можно разделять на ряд меньших доз, подлежащих введению с временными интервалами. Следует понимать, что точная дозировка и длительность лечения зависят от заболевания, подвергаемого лечению, и их можно определять эмпирически с использованием известных способов тестирования или посредством экстраполяции из данных тестирования *in vivo* или *in vitro*. Следует отметить, что концентрации и значения доз также могут варьироваться в зависимости от тяжести состояния, подлежащего облегчению. Также следует понимать, что в случае любого конкретного индивидуума конкретные режимы дозирования с течением времени необходимо корректировать в соответствии с индивидуальными потребностями и профессиональным мнением специалиста, осуществляющего введение композиций или руководящего введением композиций, и что диапазоны концентраций, приведенные в настоящем описании, являются исключительно примерами и не предназначены для ограничения объема или практического использования композиций по изобретению.

[0068] Таким образом, эффективные концентрации или количества одного или более соединений, представленных в настоящем описании, или их фармацевтически приемлемых солей смешивают с подходящим фармацевтическим носителем для системного или местного введения для получения фармацевтических композиций. Соединения включают в количестве, эффективном для улучшения одного или более симптомов или для лечения, замедления прогрессирования или профилактики заболевания. Концентрация активного соединения в композиции будет зависеть от абсорбции, распределения в тканях, инактивации, скорости экскреции активного соединения, режима дозирования, вводимого количества,

конкретного состава, а также других факторов, известных специалистам в этой области.

[0069] Композиции предназначены для введения подходящим путем, включая, в качестве неограничивающих примеров, пероральный, парентеральный, ректальный и местный. Для перорального введения можно составлять капсулы, таблетки, суспензии и растворы. Композиции находятся в жидкой, полужидкой или твердой форме, и их составляют способом, подходящим для каждого пути введения.

[0070] Растворы или суспензии, используемые для парентерального, внутрикожного, подкожного или местного введения, могут включать любой из следующих компонентов: стерильный дилуент, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, жирное масло, полиэтиленгликоль, глицерин, пропиленгликоль, диметилацетамид или другой синтетический растворитель; противомикробные средства, такие как бензиловый спирт и метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота и бисульфит натрия; хелатирующие средства, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА); буферы, такие как ацетаты, цитраты и фосфаты; и средства для регуляции тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Парентеральные препараты можно заключать в ампулы, шприц-ручки, одноразовые шприцы или флаконы с однократными или многократными дозами, сделанные из стекла, пластика или другого подходящего материала.

[0071] В случаях, когда FТI имеет недостаточную растворимость, можно использовать способы солюбилизации соединений. Такие способы известны специалистам в этой области и включают, в качестве неограничивающих примеров, использование сорастворителей, таких как диметилсульфоксид (DMSO), использование поверхностно-активных веществ, таких как TWEEN®, или растворение в водном растворе бикарбоната натрия.

[0072] После смешивания или добавления соединений полученная смесь может являться раствором, суспензией, эмульсией или т.п. Форма полученной смеси зависит от ряда факторов, включая предполагаемый способ введения и растворимость

соединения в выбранном носителе. Эффективная концентрация является достаточной для улучшения симптомов заболевания, нарушения или состояния, подвергаемого лечению, и ее можно определять эмпирически.

[0073] Фармацевтические композиции получают для введения людям и животным в стандартных лекарственных формах, таких как таблетки, капсулы, пилюли, порошки, гранулы, стерильные парентеральные растворы или суспензии, пероральные растворы или суспензии и масляно-водные эмульсии, содержащие подходящие количества соединений или их фармацевтически приемлемых солей. Фармацевтически и терапевтически активные соединения и их соли составляют и вводят в стандартных лекарственных формах или лекарственных формах для многократного введения. В рамках изобретения термин "стандартные лекарственные формы" относится к физически дискретным единицам, подходящим для людей и животных и упакованным индивидуально, как известно в этой области. Каждая однократная доза содержит заранее определенное количество терапевтически активного соединения, достаточное для достижения желаемого терапевтического эффекта, вместе с необходимым фармацевтическим носителем или дилуентом. Примеры стандартных лекарственных форм включают ампулы и шприцы и индивидуально упакованные таблетки или капсулы. Стандартные лекарственные формы можно вводить фракционно или многократно. Лекарственные формы для многократного введения представляют собой множество идентичных стандартных лекарственных форм, упакованных в один контейнер, предназначенных для введения в отдельных стандартных лекарственных формах. Примеры лекарственных форм для многократного введения включают флаконы, бутылки таблеток или капсул или бутылях с емкостью, измеряемой в пинтах или галлонах. Таким образом, лекарственная форма для многократного введения представляет собой множество однократных доз, не разделенных при упаковывании.

[0074] Также можно получать препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащих соединение, представленное в

настоящем описании, при этом матрицы находятся в форме профилированных изделий, например, пленок или микрокапсул. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают ионтофоретические патчи, полиэферы, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтил-метакрилат) или поливиниловый спирт), полилактиды, сополимеры L-глутаминовой кислоты и этил-L-глутамата, недеградируемые этилен-винилацетат, деградируемые сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT™ (инъецируемые микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты и гликолевой кислоты и лейпролида ацетата), и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту. Хотя полимеры, такие как этилен-винилацетат и молочная кислота-гликолевая кислота, могут высвобождать молекулы в течение более 100 дней, конкретные гидрогели высвобождают белки в течение меньших периодов времени. Если инкапсулированное соединение остается в организме в течение длительного периода времени, они могут денатурировать или агрегировать в результате воздействия влаги при 37°C, что приводит к утрате биологической активности и возможным изменениям их структуры. Можно разрабатывать рациональные стратегии стабилизации в зависимости от используемого механизма действия. Например, если обнаруживают, что механизмом агрегации является образование межмолекулярных S-S связей посредством тиол-дисульфидного обмена, стабилизации можно достигать посредством модификации сульфгидрильных остатков, лиофилизации из кислых растворов, контроля влажности, использования подходящих добавок и разработки конкретных композиций полимерных матриц.

[0075] Можно получать лекарственные формы или композиции, содержащие активный ингредиент в диапазоне от 0,005% до 100% с добавлением нетоксичного носителя. В случае перорального введения фармацевтически приемлемую нетоксичную композицию получают посредством включения любого из общепринято используемых эксципиентов, таких как, например маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, тальк, производные целлюлозы, кроскармеллоза натрия, глюкоза, сахароза, карбонат магния или

сахарин натрия фармацевтической категории. Такие композиции включают растворы, суспензии, таблетки, капсулы, порошки и составы с замедленным высвобождением, в качестве неограничивающих примеров, такие как, имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки, и биodeградируемые, биосовместимые полимеры, такие как коллаген, этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, полиортоэфиры, полимолочная кислота и др. Способы получения этих композиций известны специалистам в этой области. Предполагаемые композиции могут содержать приблизительно 0,001-100% активного ингредиента, в некоторых вариантах осуществления приблизительно 0,1-85% или приблизительно 75-95% активного ингредиента.

[0076] FTI или фармацевтически приемлемые соли можно получать с использованием носителей, защищающих соединение от быстрого выведения из организма, таких как составы или покрытия с замедленным высвобождением.

[0077] Композиции могут включать другие активные соединения для получения желаемых комбинаций свойств. Соединения, представленные в настоящем описании, или их фармацевтически приемлемые соли, как представлено в настоящем описании, также можно вводить вместе с другим фармакологическим средством, которое, как известно в этой области, имеет значение при лечении одного или более заболеваний или медицинских показаний, упомянутых выше, таких как заболевания, связанные с оксидативным стрессом.

[0078] Несодержащие лактозу композиции, представленные в настоящем описании, могут содержать эксципиенты, хорошо известные в этой области и указанные, например, в Фармакопее США (USP) SP (XXI)/NF (XVI). В основном, несодержащие лактозу композиции содержат активный ингредиент, связывающее средство/носитель и смазочное средство в фармацевтически совместимых и фармацевтически приемлемых количествах. Примеры несодержащих лактозу лекарственных форм содержат активный ингредиент, микрокристаллическую целлюлозу, прежелатинизированный крахмал и стеарат магния.

[0079] Кроме того, предусмотрены безводные фармацевтические

композиции и лекарственные формы, содержащие соединение, представленное в настоящем описании. Например, в области фармацевтики широко используют добавление воды (например, 5%) для симуляции длительного хранения для определения таких характеристик, как срок годности или стабильность составов с течением времени. См., например, Jens T. Carstensen, *Drug Stability: Principles & Practice*, 2d. Ed., Marcel Dekker, NY, NY, 1995, pp. 379-80. Фактически, вода и тепло ускоряют разложение некоторых соединений. Таким образом, действие воды на состав может иметь большое значение, т.к. влага встречается повсеместно при производстве, обработке, упаковке, хранении, транспортировке и использовании составов.

[0080] Безводные фармацевтические композиции и лекарственные формы, представленные в настоящем описании, можно получать с использованием безводных ингредиентов или ингредиентов с низким содержанием влаги и в условиях низкой влажности. Фармацевтические композиции и лекарственные формы, содержащие лактозу и по меньшей мере один активный ингредиент, содержащий первичный или вторичный амин, являются безводными, если ожидают существенного контакта с влагой при производстве, упаковке и/или хранении.

[0081] Безводную фармацевтическую композицию следует получать и хранить таким образом, что поддерживают ее безводную природу. Таким образом, безводные композиции упаковывают с использованием материалов, как известно, предотвращающих воздействие воды, таким образом, что их можно включать в подходящие фармацевтические наборы. Неограничивающие примеры подходящей упаковки включают герметично запаянную фольгу, пластик, односторонние контейнеры (например, флаконы), блистерные упаковки и контурные упаковки.

[0082] Пероральные фармацевтические лекарственные формы являются твердыми, гелеобразными или жидкими. Твердые лекарственные формы являются таблетками, капсулами, гранулами и нерасфасованными порошками. Типы пероральных таблеток включают прессованные таблетки, жевательные пастилки и таблетки, которые могут иметь растворяющееся в кишечнике покрытие, сахарное

покрытие или пленочное покрытие. Капсулы могут являться твердыми или мягкими желатиновыми капсулами, в то время как гранулы и порошки можно предоставлять в нешипучей или шипучей форме в комбинации с другими ингредиентами, известными специалистам в этой области.

[0083] В некоторых вариантах осуществления составы являются твердыми лекарственными формами, такими как капсулы или таблетки. Таблетки, пилюли, капсулы, пастилки и т.п. могут содержать любые из следующих ингредиентов или соединений схожей природы: связывающее средство; диллюент; разрыхлитель; смазочное средство; глидант; подсластитель и ароматизатор.

[0084] Примеры связывающих средств включают микрокристаллическую целлюлозу, трагакантовую камедь, раствор глюкозы, гуммиарабик, раствор желатина, сахарозу и крахмальный клейстер. Смазочные средства включают тальк, крахмал, стеарат магния или кальция, ликоподий и стеариновую кислоту. Диллюенты включают, например, лактозу, сахарозу, крахмал, каолин, соль, маннит и гидроортофосфат кальция. Глиданты включают, в качестве неограничивающих примеров, коллоидный диоксид кремния. Разрыхлители включают кроскармеллозу натрия, крахмалгликолят натрия, альгиновую кислоту, кукурузный крахмал, картофельный крахмал, бентонит, метилцеллюлозу, агар и карбоксиметилцеллюлозу. Красители включают, например, любые из одобренных, сертифицированных водорастворимых красителей FD и C, их смеси; и нерастворимые в воде красители FD и C, суспендированные в гидрате оксида алюминия. Подсластители включают сахарозу, лактозу, маннит и искусственные подсластители, такие как сахарин и любое количество высушенных распылением вкусовых добавок. Ароматизаторы включают природные ароматизаторы, выделенные из растений, таких как фрукты, и синтетические смеси соединений, приводящих к приятным ощущениям, в качестве неограничивающих примеров, такие как перечная мята и метилсалицилат. Увлажнители включают пропиленгликоль моностеарат, сорбитан моноолеат, диэтиленгликоль монолаурат и лауриловый простой эфир полиоксиэтилена. Покрытия рвотного действия включают жирные кислоты, жиры, воски, шеллак,

аммониевый шеллак и ацетатфталаты целлюлозы. Пленочные покрытия включают гидроксипропилцеллюлозу, натрий-карбоксиметилцеллюлозу, полиэтиленгликоль 4000 и ацетатфталат целлюлозы.

[0085] Если стандартная лекарственная форма является капсулой, она может содержать, в дополнение к материалу указанного выше типа, жидкий носитель, такой как жирное масло. Кроме того, стандартные лекарственные формы могут содержать различные другие материалы, модифицирующие физическую форму единицы дозирования, например, покрытия из сахара и других растворяющихся в кишечнике средств. Соединения также можно вводить в качестве компонента эликсира, суспензии, сиропа, таблетки, раствора для опрыскивания, жевательной резинки или т.п. Сироп может содержать, в дополнение к активным соединениям, сахарозу в качестве подсластителя и конкретные консерванты, красители и ароматизаторы.

[0086] Фармацевтически приемлемые носители, включенные в таблетки, являются связывающими средствами, смазочными средствами, дилуентами, разрыхлителями, красителями, ароматизаторами и увлажнителями. Таблетки с растворяющимся в кишечнике покрытием, благодаря ему, устойчивы к действию желудочного сока и растворяются или распадаются в нейтральной или щелочной среде кишечника. Таблетки с сахарным покрытием являются прессованными таблетками, на которые наносят различные слои фармацевтически приемлемых веществ. Таблетки с пленочным покрытием являются прессованными таблетками, покрытыми полимером или другим подходящим покрытием. Многократно прессованные таблетки являются прессованными таблетками, полученными посредством нескольких циклов прессования с использованием фармацевтически приемлемых веществ, указанных выше. В указанных выше лекарственных формах также можно использовать красители. В прессованных таблетках, таблетках с сахарным покрытием, многократно прессованных и жевательных таблетках используют вкусовые добавки и подсластители. Вкусовые добавки и подсластители особенно полезны при получении жевательных таблеток и пастилок.

[0087] Жидкие пероральные лекарственные формы включают

водные растворы, эмульсии, суспензии, растворы и/или суспензии, восстановленные из нешипучих гранул, и шипучие препараты, восстановленные из шипучих гранул. Водные растворы включают, например, эликсиры и сиропы. Эмульсии являются эмульсиями "масло-в-воде" или "вода-в-масле".

[0088] Эликсиры являются прозрачными, подслащенными, водно-спиртовыми препаратами. Фармацевтически приемлемые носители, используемые в эликсирах, включают растворители. Сиропы являются концентрированными водными растворами сахара, например, сахарозы, и могут содержать консервант. Эмульсия является двухфазной системой, в которой одна жидкость диспергирована в форме небольших глобул во всей другой жидкости. Фармацевтически приемлемые носители, используемые в эмульсиях, являются неводными жидкостями, эмульгаторами и консервантами. В суспензиях используют фармацевтически приемлемые суспендирующие средства и консерванты. Фармацевтически приемлемые вещества, используемые в нешипучих гранулах, предназначенных для восстановления в жидкую пероральную лекарственную форму, включают дилуенты, подсластители и увлажнители. Фармацевтически приемлемые вещества, используемые в шипучих гранулах, предназначенных для восстановления в жидкую пероральную лекарственную форму, включают органические кислоты и источник диоксида углерода. Красители и ароматизаторы используют во всех из указанных выше лекарственных формах.

[0089] Растворители включают глицерин, сорбит, этиловый спирт и сироп. Примеры консервантов включают глицерин, метил- и пропилпарабен, бензойную кислоту, бензоат натрия и спирт. Примеры неводных жидкостей, используемых в эмульсиях, включают минеральное масло и хлопковое масло. Примеры эмульгаторов включают желатин, гуммиарабик, трагакантовую камедь, бентонит и поверхностно-активные вещества, такие как полиоксиэтилен сорбитан моноолеат. Суспендирующие средства включают натрий-карбоксиметилцеллюлозу, пектин, трагакантовую камедь, вигум и гуммиарабик. Дилуенты включают лактозу и сахарозу. Подсластители включают сахарозу, сиропы, глицерин и искусственные подсластители, такие как сахарин. Увлажнители включают

пропиленгликоль моностеарат, сорбитан моноолеат, диэтиленгликоль монолаурат и лауриловый простой эфир полиоксиэтилена. Органические кислоты включают лимонную и винную кислоту. Источники диоксида углерода включают бикарбонат натрия и карбонат натрия. Красители включают любые из одобренных, сертифицированных водорастворимых красителей FD и C и их смесей. Ароматизаторы включают природные ароматизаторы, выделенные из растений, таких как фрукты, и синтетические смеси соединений, приводящие к приятным вкусовым ощущениям.

[0090] В случае твердой лекарственной формы, раствор или суспензию, например, в пропиленкарбонате, растительных маслах или триглицеридах, инкапсулируют в желатиновой капсуле. Такие растворы и их получение и инкапсуляцию описывают в патентах США № 4328245; 4409239 и 4410545. В случае жидкой лекарственной формы, раствор, например, например, в полиэтиленгликоле, можно разбавлять достаточным количеством фармацевтически приемлемого жидкого носителя, например, воды, чтобы легко отмерять его для введения.

[0091] Альтернативно, жидкие или полутвердые пероральные составы можно получать посредством растворения или диспергирования активного соединения или соли в растительных маслах, гликолях, триглицеридах, сложных эфирах пропиленгликоля (например, пропиленкарбонате) и других таких носителях и инкапсуляции этих растворов или суспензий в твердых или мягких желатиновых капсулах. Другие составы, которые можно использовать, включают, в качестве неограничивающих примеров, составы, содержащие соединение, представленное в настоящем описании, диалкилированный моно- или полиалкиленгликоль, включая, в качестве неограничивающих примеров, 1,2-диметоксиметан, диглим, триглим, тетраглим, диметиловый простой эфир полиэтиленгликоля 350, диметиловый простой эфир полиэтиленгликоля 550, диметиловый простой эфир полиэтиленгликоля 750, где числа "350", "550" и "750" относятся к приблизительной средней молекулярной массе полиэтиленгликоля, и один или более антиоксидантов, таких как бутилированный гидрокситолуол (BHT), бутилированный гидроксианизол (BHA),

пропилгаллат, витамин Е, гидрохинон, гидроксикумарины, этаноламин, лецитин, цефалин, аскорбиновая кислота, яблочная кислота, сорбит, фосфорная кислота, тиодипропионовая кислота и ее сложные эфиры и дитиокарбаматы.

[0092] Другие составы включают, в качестве неограничивающих примеров, водно-спиртовые растворы, включающие фармацевтически приемлемый ацеталь. Спирты, используемые в этих составах, являются любыми фармацевтически приемлемыми, смешиваемыми с водой растворителями, содержащими одну или более гидроксильных групп, включая, в качестве неограничивающих примеров, пропиленгликоль и этанол. Ацетали включают, в качестве неограничивающих примеров, диацетали низших альдегидов, такие как диэтилацеталь ацетальдегида.

[0093] Во всех вариантах осуществления составы таблеток и капсул можно покрывать, как известно специалистам в этой области, для модификации или поддержания растворения активного ингредиента. Таким образом, например, их можно покрывать общепринятым растворяющимся в кишечнике покрытием, таким как фенилсалицилат, воски и ацетатфталат целлюлозы.

[0094] В настоящем описании также представлено парентеральное введение, как правило, осуществляемое посредством инъекции, подкожной, внутримышечной или внутривенной. Инъектируемые средства можно получать в общепринятых формах в виде жидких растворов или суспензий, твердых форм, подходящих для растворения или суспендирования в жидкости перед инъекцией, или эмульсий. Подходящими эксципиентами являются, например, вода, физиологический раствор, декстроза, глицерин или этанол. Кроме того, при желании, фармацевтические композиции, предназначенные для введения, также могут содержать незначительные количества нетоксических вспомогательных веществ, таких как увлажнители или эмульгаторы, pH-буферные средства, стабилизаторы, усилители растворимости и другие средства, такие как, например, ацетат натрия, сорбитан монолаурат, триэтаноламин олеат и циклодекстрины. В настоящем описании также предусмотрена имплантация системы с медленным высвобождением или замедленным высвобождением для поддержания постоянного уровня дозы. В

кратком изложении, соединение по изобретению диспергируют в твердой внутренней матрице, например, полиметилметакрилате, полибутилметакрилате, пластифицированном или непластифицированном поливинилхлориде, пластифицированном нейлоне, пластифицированном полиэтилентерефталате, натуральном каучуке, полиизопрене, полиизобутилене, полибутадиене, полиэтилене, сополимерах этилен-винилацетат, силиконовом каучуке, полидиметилсилоксанах, сополимерах карбоната кремния, гидрофильных полимерах, таких как гидрогели сложных эфиров акриловой и метакриловой кислоты, коллаген, поперечно сшитом поливинилом спирте и поперечно сшитом частично гидролизованном поливинилацетате, окруженной внешней полимерной мембраной, например, полиэтиленом, полипропиленом, сополимерами этилена/пропилена, сополимерами этилена/этилакрилата, сополимерами этилена/винилацетата, силиконовым каучуком, полидиметилсилоксанами, неопреновой резиной, хлорированным полиэтиленом, поливинилхлоридом, сополимерами винилхлорида с винилацетатом, винилиденхлоридом, этиленом и пропиленом, иономером полиэтилентерефталата, бутилкаучуком, эпихлоргидриновым каучуком, сополимером этилена/винилового спирта, терполимером этилена/винилацетата/винилового спирта и сополимером этилена/винилоксиэтанола, нерастворимым в физиологических жидкостях. Соединение диффундирует через внешнюю полимерную мембрану на стадии контроля скорости высвобождения. Процент активного соединения, содержащегося в таких парентеральных композициях, в значительной степени зависит от его конкретной природы, а также активности соединения и потребностей индивидуума.

[0095] Парентеральное введение композиций включает внутривенное, подкожное и внутримышечное введение. Препараты для парентерального введения включают стерильные растворы, готовые для инъекции, стерильные сухие растворимые продукты, такие как лиофилизированные порошки, готовые для комбинирования с растворителем перед использованием, включая подкожные таблетки, стерильные суспензии, готовые для инъекции, стерильные сухие нерастворимые продукты, готовые для комбинирования с носителем

непосредственно перед использованием, и стерильные эмульсии. Растворы могут быть водными или неводными.

[0096] В случае внутривенного введения, подходящие носители включают физиологический раствор или фосфатно-солевой буфер (PBS) и растворы, содержащие загустители и солюбилизаторы, такие как глюкоза, полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль и их смеси.

[0097] Фармацевтически приемлемые носители, используемые в парентеральных препаратах, включают водные носители, неводные носители, противомикробные средства, изотонические средства, буферы, антиоксиданты, местные анестетики, суспендирующие и диспергирующие средства, эмульгаторы, секвестранты или хелатирующие средства и другие фармацевтически приемлемые вещества.

[0098] Примеры водных носителей включают хлорид натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, изотонический раствор декстрозы для инъекций, стерильную воду для инъекций, декстрозу и лактат Рингера для инъекций. Неводные парентеральные носители включают жирные масла растительного происхождения, хлопковое масло, кукурузное масло, сезамовое масло и арахисовое масло. В парентеральные препараты, упаковываемые в контейнеры для многократного использования, необходимо добавлять противомикробные средства в бактериостатических или фунгистатических концентрациях, включающие фенолы или крезолы, соединения ртути, бензиловый спирт, хлорбутанол, метиловые и пропиловые сложные эфиры р-гидроксibenзойной кислоты, тиомерсал, хлорид бензалкония и хлорид бензетония. Изотонические средства включают хлорид натрия и декстрозу. Буферы включают фосфат и цитрат. Антиоксиданты включают бисульфат натрия. Местные анестетики включают прокаин гидрохлорид. Суспендирующие и диспергирующие средства включают натрий-карбоксиметилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу и поливинилпирролидон. Эмульгаторы включают полисорбат 80 (TWEEN® 80). Секвестрант или хелатирующее средство для ионов металлов включает ЭДТА. Фармацевтические носители также включают этиловый спирт, полиэтиленгликоль и пропиленгликоль в случае смешиваемых с водой носителей и

гидроксид натрия, соляную кислоту, лимонную кислоту или молочную кислоту для коррекции pH.

[0099] Концентрацию FTI корректируют таким образом, что посредством инъекции достигают эффективного количества для получения желаемого фармакологического эффекта. Точная доза зависит от возраста, массы и состояния пациента или животного, как известно в этой области. Парентеральные препараты в однократной дозе упаковывают в ампулу, флакон или шприц с иглой. Все препараты для парентерального введения должны быть стерильными, как известно и на практике осуществляется в этой области.

[00100] В качестве иллюстрации, эффективным способом введения является внутривенная или внутриартериальная инфузия стерильного водного раствора, содержащего FTI. Другим вариантом осуществления является стерильный водный или масляный раствор или суспензия, содержащие активный материал, инъектируемый, при необходимости, для достижения желаемого фармакологического эффекта.

[00101] Инъектируемые средства предназначены для местного и системного введения. Как правило терапевтически эффективную дозу составляют так, чтобы она содержала концентрацию по меньшей мере от приблизительно 0,1% масс./масс. до приблизительно 90% масс./масс. или более, например, более 1% масс./масс. активного соединения для подвергаемых лечению тканей. Активный ингредиент можно вводить за один раз или можно разделять на ряд меньших доз, предназначенных для введения с временными интервалами. Следует понимать, что точная доза и длительность лечения зависят от ткани, подвергаемой лечению, и их можно определять эмпирически с использованием известных способов тестирования или посредством экстраполяции из данных тестирования *in vivo* или *in vitro*. Следует отметить, что концентрации и значения доз также могут варьироваться в зависимости от возраста индивидуума, подвергаемого лечению. Также следует понимать, что для любого конкретного индивидуума конкретные режимы дозирования необходимо корректировать с течением времени в соответствии с индивидуальными потребностями и профессиональным мнением

специалиста, осуществляющего введение или руководящего введением составом, и что диапазоны концентраций, приведенные в настоящем описании, являются исключительно примерами и не предназначены для ограничения объема или практического использования составов по изобретению.

[00102] FTI можно суспендировать в тонкодисперсной или другой подходящей форме или его можно дериватизировать для получения более растворимого активного продукта или получения пролекарства. Форма полученной смеси зависит от ряда факторов, включая предполагаемый способ введения и растворимость соединения в выбранном носителе. Эффективная концентрация является достаточной для улучшения симптомов состояния, и ее можно определять эмпирически.

[00103] Интерес также представляют лиофилизированные порошки, которые можно восстанавливать для введения в виде растворов, эмульсий и их смесей. Их также можно восстанавливать и составлять в виде твердых веществ или гелей.

[00104] Стерильный, лиофилизированный порошок получают посредством растворения FTI, представленного в настоящем описании, или его фармацевтически приемлемой соли в подходящем растворителе. Растворитель может содержать эксципиент, улучшающий стабильность, или другой фармакологический компонент порошка или восстановленного раствора, полученного из порошка. Эксципиенты, которые можно использовать, включают, в качестве неограничивающих примеров, декстроза, сорбитан, фруктозу, кукурузный сироп, ксилит, глицерин, глюкозу, сахарозу или другое подходящее средство. Растворитель также может содержать буфер, такой как цитрат, фосфат натрия или калия или другой такой буфер, известный специалистам в этой области, при приблизительно нейтральном pH в одном из вариантов осуществления. Желаемый состав получают с помощью последующей стерилизующей фильтрации раствора с последующей лиофилизацией в стандартных условиях, известных специалистам в этой области. Как правило, полученный раствор для лиофилизации будут распределять по флаконам. Каждый флакон будет содержать однократную дозу (включая, в качестве неограничивающих примеров, 10-1000 мг или 100-500 мг) или

многократные дозы соединения. Лиофилизированный порошок можно хранить в подходящих условиях, например, от приблизительно 4°C до комнатной температуры.

[00105] При восстановлении этого лиофилизированного порошка водой для инъекций получают состав для парентерального введения. Для восстановления добавляют приблизительно 1-50 мг, приблизительно 5-35 мг или приблизительно 9-30 мг лиофилизированного порошка на мл стерильной воды или другого подходящего носителя. Точное количество зависит от выбранного соединения. Такое количество можно определять эмпирически.

[00106] Смеси для местного использования получают, как описано для местного и системного введения. Полученная смесь может являться раствором, суспензией, эмульсией или т.п., и ее составляют в виде кремов, гелей, мазей, эмульсий, растворов, эликсиров, лосьонов, суспензий, тинктур, паст, пен, аэрозолей, средств для промывания, спреев, суппозиторий, бандажей, дермальных патчей или любых других составов, подходящих для местного введения.

[00107] FTI или фармацевтическую композицию, содержащую FTI, можно составлять в виде аэрозолей для местного использования, например, посредством ингаляции (см., например, патенты США №№ 4044126, 4414209 и 4364923, в которых описывают аэрозоли для доставки стероида, который можно использовать в лечении воспалительных заболеваний, в частности, астмы). Эти составы для введения в дыхательные пути могут находиться в форме аэрозоля или раствора для небулайзера или тонкодисперсного порошка для инсуффляции в отдельности или в комбинации с инертным носителем, таким как лактоза. В этом случае частицы в составе будут иметь диаметр менее 50 мкм или менее 10 мкм.

[00108] FTI или фармацевтическую композицию, содержащую FTI, можно составлять для местного использования, такого как местное нанесение на кожу и слизистые оболочки, например, в глаз, в форме гелей, кремов и лосьонов и для нанесения на глаз или для интракостерального или интраспинального введения. Местное введение предназначено для трансдермальной доставки, а

также для введения в глаза или слизистые оболочки или для ингаляции. Также можно вводить назальные растворы активного соединения в отдельности или в комбинации с другими фармацевтически приемлемыми эксципиентами. Эти растворы, в частности, предназначенные для глазного использования, можно составлять с подходящими солями в виде 0,01–10% изотонических растворов с pH приблизительно 5–7.

[00109] В настоящем описании также предусмотрены другие пути введения, такие как трансдермальные патчи и ректальное введение. Например, фармацевтические лекарственные формы для ректального введения являются ректальными суппозиториями, капсулами и таблетками для системного эффекта. Ректальные суппозитории, используемые в настоящем описании, означают твердые тела для введения в прямую кишку, где они плавятся или размягчаются при температуре тела, высвобождая один или более фармакологически или терапевтически активных ингредиентов. Фармацевтически приемлемые вещества, используемые в ректальных суппозиториях, являются основами или носителями и средствами для повышения температуры плавления. Примеры основ включают масло какао, глицерин-желатин, карбовакс (полиоксиэтиленгликоль) и соответствующие смеси моно-, ди- и триглицеридов жирных кислот. Можно использовать комбинации различных основ. Средства для повышения температуры плавления суппозиторий включают спермацет и воск. Ректальные суппозитории можно получать способом прессования или формования. Например, масса ректального суппозитория может составлять приблизительно от 2 до 3 граммов. Таблетки и капсулы для ректального введения производят с использованием того же фармацевтически приемлемого вещества и теми же способами, что и составы для перорального введения.

[00110] FTI или фармацевтическую композицию, содержащую FTI, представленный в настоящем описании, можно вводить с помощью средств с контролируемым высвобождением или устройств для доставки, хорошо известных специалистам в этой области. Неограничивающие примеры включают средства, описываемые в патентах США №№: 3845770; 3916899; 3536809; 3598123; 4008719 и 5674 года⁵³³, 5059595, 5591767, 5120548, 5073543, 5639476,

5354556, 5639480, 5733566, 5739108, 5891474, 5922356, 5972891, 5980945, 5993855, 6045830, 6087324, 6113943, 6197350, 6248363, 6264970, 6267981, 6376461, 6419961, 6589548, 6613358, 6699500 и 6740634, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки. Такие лекарственные формы можно использовать для обеспечения замедленного или контролируемого высвобождения FTI с использованием, например, гидропропилметилцеллюлозы, других полимерных матриц, гелей, проницаемых мембран, осмотических систем, многослойных покрытий, микрочастиц, липосом, микросфер или их комбинаций для обеспечения желаемого профиля высвобождения при различных пропорциях. Подходящие составы с контролируемым высвобождением, известные специалистам в этой области, включая составы, представленные в настоящем описании, легко можно выбирать для использования с активными ингредиентами, представленными в настоящем описании.

[00111] Все фармацевтические препараты с контролируемым высвобождением предназначены для улучшения медикаментозной терапии по сравнению с результатом, достигаемым при использовании средств без контролируемого высвобождения. В одном из вариантов осуществления использование оптимально разработанного препарата с контролируемым высвобождением в лечении отличается использованием минимума лекарственного средства для излечения или контроля состояния за минимальное количество времени. В некоторых вариантах осуществления преимущества составов с контролируемым высвобождением включают длительную активность лекарственного средства, сниженную частоту введения и улучшенное соблюдение пациентом схемы лечения. Кроме того, составы с контролируемым высвобождением можно использовать для влияния на время начала действия или другие характеристики, такие как уровни лекарственного средства в крови, и, таким образом, можно влиять на возникновение побочных (например, неблагоприятных) эффектов.

[00112] Большинство составов с контролируемым высвобождением создано для начального высвобождения количества лекарственного средства (активного ингредиента), незамедлительно приводящего к желаемому терапевтическому эффекту, и постепенного

и непрерывного высвобождения других количеств лекарственного средства для поддержания этого уровня терапевтического эффекта в течение длительного периода времени. Для поддержания этого постоянного уровня лекарственного средства в организме лекарственное средство должно высвобождаться из лекарственной формы со скоростью, которая будет приводить к замещению количества лекарственного средства, метаболизируемого и экскретируемого организмом. Контролируемое высвобождение активного ингредиента можно стимулировать с использованием различных условий, включая, в качестве неограничивающих примеров, pH, температуру, ферменты, воду или другие физиологические условия или соединения.

[00113] В некоторых вариантах осуществления FTI можно вводить с помощью внутривенной инфузии, имплантируемого осмотического насоса, трансдермального патча, липосом или других способов введения. В одном из вариантов осуществления можно использовать насос (см., 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)). В другом варианте осуществления можно использовать полимерные материалы. В еще одном варианте осуществления систему контролируемого высвобождения можно помещать вблизи терапевтической мишени, т.е., таким образом, необходима лишь часть системной дозы (см., например, Goodson, Medical Applications of Controlled Release, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

[00114] В некоторых вариантах осуществления устройство для контролируемого высвобождения вводят индивидууму вблизи участка неправильной активации иммунной системы или опухоли. Другие системы для контролируемого высвобождения описаны в обзоре Langer (Science 249:1527-1533 (1990)). FTI можно диспергировать в твердой внутренней матрице, например, полиметилметакрилате, полибутилметакрилате, пластифицированном или непластифицированном поливинилхлориде, пластифицированном нейлоне, пластифицированном полиэтилентерефталате, натуральном каучуке, полиизопрене, полиизобутилене, полибутадиене, полиэтилене, сополимерах этилен-винилацетат, силиконовом

каучуке, полидиметилсилоксанах, сополимерах карбоната кремния, гидрофильных полимерах, таких как гидрогели сложных эфиров акриловой и метакриловой кислоты, коллагене, поперечно сшитом поливинилом спирте и поперечно сшитом частично гидролизованном поливинилацетате, окруженной внешней полимерной мембраной, например, полиэтиленом, полипропиленом, сополимерами этилен/пропилен, сополимерами этилен/этилакрилат, сополимерами этилен/винилацетат, силиконовым каучуком, полидиметилсилоксанами, неопреновой резиной, хлорированным полиэтиленом, поливинилхлоридом, сополимерами винилхлорида с винилацетатом, винилиденхлоридом, этиленом и пропиленом, иономером полиэтилентерефталата, бутилкаучуком, эпихлоргидриновым каучуком, сополимером этилена/винилового спирта, терполимером этилена/винилацетата/винилового спирта и сополимером этилена/винилоксиэтанола, нерастворимым в физиологических жидкостях. Активный ингредиент диффундирует через внешнюю полимерную мембрану на стадии контроля скорости высвобождения. Процент активного ингредиента, содержащегося в таких парентеральных композициях, в значительной степени зависит от его конкретной природы, а также потребностей индивидуума.

[00115] FTI или фармацевтическую композицию FTI можно упаковывать в виде промышленных изделий, содержащих упаковочный материал, соединение или его фармацевтически приемлемую соль, представленные в настоящем описании, используемые для лечения, профилактики или улучшения одного или более симптомов или прогрессирования злокачественного новообразования, включая гемобластозы и солидные опухоли, и ярлык, на котором указано, что соединение или его фармацевтически приемлемую соль используют для лечения, профилактики или улучшения одного или более симптомов или прогрессирования злокачественного новообразования, включая гемобластозы и солидные опухоли.

[00116] Промышленные изделия, представленные в настоящем описании, содержат упаковочные материалы. Упаковочные материалы для использования в упаковывании фармацевтических препаратов хорошо известны специалистам в этой области. См., например, патенты США №№ 5323907, 5052558 и 5033252. Неограничивающие

примеры фармацевтических упаковочных материалов включают блистерные упаковки, бутылки, пробирки, ингаляторы, насосы, мешки, флаконы, контейнеры, шприцы, шприц-ручки, бутылки и любой упаковочный материал, подходящий для выбранного состава и предполагаемого способа введения и лечения. В настоящем изобретении предусмотрен широкий спектр составов соединений и композиций.

2.3. Дозы

[00117] В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции, содержащей FTI, вводят перорально или парентерально. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит типифарниб в качестве активного ингредиента, и ее вводят перорально в количестве от 1 до 1500 мг/кг/сутки в виде однократной дозы или разделяют на несколько доз или более конкретно в количестве от 10 до 1200 мг/кг/сутки. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит типифарниб в качестве активного ингредиента, и ее вводят перорально в количестве 100 мг/кг/сутки, 200 мг/кг/сутки, 300 мг/кг/сутки, 400 мг/кг/сутки, 500 мг/кг/сутки, 600 мг/кг/сутки, 700 мг/кг/сутки, 800 мг/кг/сутки, 900 мг/кг/сутки, 1000 мг/кг/сутки, 1100 мг/кг/сутки или 1200 мг/кг/сутки. В некоторых вариантах осуществления FTI является типифарнибом.

[00118] В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 200–1500 мг в сутки. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 200–1200 мг в сутки. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 200 мг в сутки. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 300 мг в сутки. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 400 мг в сутки. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 500 мг в сутки. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 600 мг в сутки. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 700 мг в сутки. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 800 мг в сутки. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 900 мг в сутки. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 1000 мг в

сутки. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 1100 мг в сутки. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 1200 мг в сутки. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 1300 мг в сутки. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 1400 мг в сутки. В некоторых вариантах осуществления FTI является типифарнибом.

[00119] В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 200-1400 мг b.i.d. (т.е. дважды в сутки). В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 300-1200 мг b.i.d. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 300-900 мг b.i.d. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 600 мг b.i.d. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 700 мг b.i.d. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 800 мг b.i.d. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 900 мг b.i.d. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 1000 мг b.i.d. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 1100 мг b.i.d. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 1200 мг b.i.d. В некоторых вариантах осуществления FTI является типифарнибом.

[00120] Как будет понятно специалисту в этой области, доза варьируется в зависимости от используемой лекарственной формы, состояния и чувствительности пациента, пути введения и других факторов. Точную дозу будет определять специалист в этой области с учетом факторов, касающихся индивидуума, нуждающегося в лечении. Дозу и введение корректируют для достижения достаточных уровней активного ингредиента или для поддержания желаемого эффекта. Факторы, которые можно учитывать, включают тяжесть заболевания, общее состояние здоровья индивидуума, возраст, массу тела и пол индивидуума, питание, время и частоту введения, комбинации лекарственных средств, реакции чувствительности и толерантности/ответ на терапию. В течение цикла лечения суточную дозу можно варьировать. В некоторых вариантах осуществления в рамках цикла лечения можно снижать начальную дозу. В некоторых вариантах осуществления в рамках цикла лечения начальную дозу можно повышать. Конечная доза может зависеть от возникновения дозопонижающей токсичности и других факторов. В некоторых

вариантах осуществления FTI вводят в начальной дозе 300 мг в сутки и повышают до максимальной дозы 400 мг, 500 мг, 600 мг, 700 мг, 800 мг, 900 мг, 1000 мг, 1100 мг или 1200 мг в сутки. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в начальной дозе 400 мг в сутки и повышают до максимальной дозы 500 мг, 600 мг, 700 мг, 800 мг, 900 мг, 1000 мг, 1100 мг или 1200 мг в сутки. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в начальной дозе 500 мг в сутки и повышают до максимальной дозы 600 мг, 700 мг, 800 мг, 900 мг, 1000 мг, 1100 мг или 1200 мг в сутки. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в начальной дозе 600 мг в сутки и повышают до максимальной дозы 700 мг, 800 мг, 900 мг, 1000 мг, 1100 мг или 1200 мг в сутки. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в начальной дозе 700 мг в сутки и повышают до максимальной дозы 800 мг, 900 мг, 1000 мг, 1100 мг или 1200 мг в сутки. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в начальной дозе 800 мг в сутки и повышают до максимальной дозы 900 мг, 1000 мг, 1100 мг или 1200 мг в сутки. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в начальной дозе 900 мг в сутки и повышают до максимальной дозы 1000 мг, 1100 мг или 1200 мг в сутки. Повышение дозы можно осуществлять за один раз или постепенно. Например, начальную дозу 600 мг в сутки можно повышать до конечной дозы 1000 мг в сутки, повышая дозу на 100 мг в сутки в течение 4 дней, или на 200 мг в сутки в течение 2 дней, или на 400 мг за один раз. В некоторых вариантах осуществления FTI является типифарнибом.

[00121] В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в относительно высокой начальной дозе и снижают до более низкой дозы в зависимости от ответа пациента и других факторов. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в начальной дозе 1200 мг в сутки и снижают до конечной дозы 1100 мг, 1000 мг, 900 мг, 800 мг, 700 мг, 600 мг, 500 мг, 400 мг или 300 мг в сутки. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в начальной дозе 1100 мг в сутки и снижают до конечной дозы 1000 мг, 900 мг, 800 мг, 700 мг, 600 мг, 500 мг, 400 мг или 300 мг в сутки. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в начальной дозе 1000 мг в сутки и снижают до конечной дозы 900 мг, 800 мг, 700

мг, 600 мг, 500 мг, 400 мг или 300 мг в сутки. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в начальной дозе 900 мг в сутки и снижают до конечной дозы 800 мг, 700 мг, 600 мг, 500 мг, 400 мг или 300 мг в сутки. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в начальной дозе 800 мг в сутки и снижают до конечной дозы 700 мг, 600 мг, 500 мг, 400 мг или 300 мг в сутки. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в начальной дозе 600 мг в сутки и снижают до конечной дозы 500 мг, 400 мг или 300 мг в сутки. Снижение дозы можно осуществлять за один раз или постепенно. В некоторых вариантах осуществления FTI является типифарнибом. Например, начальную дозу 900 мг в сутки можно снижать до конечной дозы 600 мг в сутки, снижая дозу на 100 мг в сутки в течение 3 дней или на 300 мг за один раз.

[00122] Цикл лечения может иметь разную продолжительность. В некоторых вариантах осуществления цикл лечения может составлять одну неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 3 месяца, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев или 12 месяцев. В некоторых вариантах осуществления цикл лечения составляет 4 недели. Цикл лечения может иметь прерывистую схему. В некоторых вариантах осуществления 2-недельный цикл лечения может включать 5-дневный период введения с последующим 9-дневным периодом отдыха. В некоторых вариантах осуществления 2-недельный цикл лечения может включать 6-дневный период введения с последующим 8-дневным периодом отдыха. В некоторых вариантах осуществления 2-недельный цикл лечения может включать 7-дневный период введения с последующим 7-дневным периодом отдыха. В некоторых вариантах осуществления 2-недельный цикл лечения может включать 8-дневный период введения с последующим 6-дневным периодом отдыха. В некоторых вариантах осуществления 2-недельный цикл лечения может включать 9-дневный период введения с последующим 5-дневным периодом отдыха.

[00123] В некоторых вариантах осуществления FTI вводят ежедневно в течение 3 из 4 недель в повторяющихся 4-недельных циклах. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят ежедневно с недельным чередованием (в одну неделю вводят, в другую - нет)

в повторяющихся 4-недельных циклах. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 300 мг b.i.d. перорально в течение 3 из 4 недель в повторяющихся 4-недельных циклах. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 600 мг b.i.d. перорально в течение 3 из 4 недель в повторяющихся 4-недельных циклах. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 900 мг b.i.d. перорально с недельным чередованием (в одну неделю вводят, в другую - нет) в повторяющихся 4-недельных циклах. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 1200 мг b.i.d. перорально с недельным чередованием (дни 1-7 и 15-21 повторяющихся 28-дневных циклов). В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 1200 мг b.i.d. перорально в течение дней 1-5 и 15-19 повторяющихся 28-дневных циклов.

[00124] В некоторых вариантах осуществления можно использовать адаптированную схему с недельным чередованием с введением 900 мг b.i.d. типифарниба. По схеме лечения пациентам вводят начальную дозу 900 мг, po, b.i.d. в дни 1-7 и 15-21 28-дневных циклов лечения. В некоторых вариантах осуществления пациентам подвергают двум циклам лечения. В некоторых вариантах осуществления пациентов подвергают трем циклам лечения. В некоторых вариантах осуществления пациентов подвергают четырем циклам лечения. В некоторых вариантах осуществления пациентов подвергают пяти циклам лечения. В некоторых вариантах осуществления пациентов подвергают шести циклам лечения. В некоторых вариантах осуществления пациентов подвергают семи циклам лечения. В некоторых вариантах осуществления пациентов подвергают восьми циклам лечения. В некоторых вариантах осуществления пациентов подвергают девяти циклам лечения. В некоторых вариантах осуществления пациентов подвергают десяти циклам лечения. В некоторых вариантах осуществления пациентов подвергают одиннадцати циклам лечения. В некоторых вариантах осуществления пациентов подвергают двенадцати циклам лечения. В некоторых вариантах осуществления пациентов подвергают более двенадцати циклам лечения.

[00125] В отсутствие трудноконтролируемой токсичности можно продолжать вводить типифарниб индивидуумам в течение до 12

месяцев или более. Дозу также можно повышать до 1200 мг b.i.d., если индивидуум хорошо переносит лечение. Также можно включать постепенные снижения дозы на 300 мг для контроля связанной с лечением, появившейся во время лечения токсичности.

[00126] В некоторых других вариантах осуществления типифарниб вводят перорально в дозе 300 мг b.i.d. ежедневно в течение 21 дня с последующей 1 неделей периода отдыха в 28-дневных циклах лечения (21-дневная схема; Cheng DT, et al., *J Mol Diagn.* (2015) 17(3):251-64). В некоторых вариантах осуществления используют 5-дневный период введения дозы в диапазоне от 25 до 1300 мг b.i.d. с последующим 9-дневным периодом отдыха (5-дневная схема; Zujewski J., *J Clin Oncol.*, (2000) Feb;18(4):927-41). В некоторых вариантах осуществления используют 7-дневный период введения b.i.d. с последующим 7-дневным периодом отдыха (7-дневная схема; Lara PN Jr., *Anticancer Drugs*, (2005) 16(3):317-21; Kirschbaum MH, *Leukemia.*, (2011) Oct;25(10):1543-7; Kurzrock, *Clin Cancer Res* (2008), 14(2):509). В 7-дневной схеме пациентам можно вводить начальную дозу 300 мг b.i.d. с повышениями дозы на 300 мг до максимальной запланированной дозы 1800 мг b.i.d. В исследовании 7-дневной схемы пациентам также можно вводить типифарниб b.i.d. в дни 1-7 и дни 15-21 28-дневных циклов в дозах до 1600 мг b.i.d.

[00127] FTI может ингибировать рост опухолей у млекопитающих при введении по схеме дважды в день. Введение FTI один раз в сутки в течение 1-5 дней может приводить к значительной супрессии роста опухоли продолжительностью до по меньшей мере 21 дня. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в диапазоне доз 50-400 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 200 мг/кг. Схема дозирования для конкретных FTI также хорошо известна в этой области (например, патент США № 6838467, включенный в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). Например, подходящие дозы соединений арглабин (WO98/28303), периллиловый спирт (WO 99/45712), SCH-66336 (патент США № 5874442), L778123 (WO 00/01691), 2(S)-[2(S)-[2(R)-амино-3-меркапто]пропиламино-3(S)-метил]-пентилокси-3-фенилпропионил-метионин сульфон (WO94/10138), BMS 214662 (WO

97/30992), AZD3409; соединений Pfizer А и В (WO 00/12499 и WO 00/12498) приведены в указанных выше патентных публикациях, включенных в настоящее описание в качестве ссылки, или известны или легко могут быть определены специалистом в этой области.

[00128] Что касается периллилового спирта, лекарственное средство можно вводить в дозе 1-4 г в сутки на человека массой 150 фунтов (68 кг). Предпочтительно, 1-2 г в сутки на человека массой 150 фунтов (68 кг). SCH-66336, как правило, можно вводить в однократной дозе приблизительно от 0,1 мг до 100 мг, более предпочтительно - приблизительно от 1 мг до 300 мг в соответствии с конкретным использованием. Соединения L778123 и 1-(3-хлорфенил)-4-[1-(4-цианобензил)-5-имидазолилметил]-2-пиперазинон можно вводить пациенту-человеку в количестве от приблизительно 0,1 мг/кг массы тела до приблизительно 20 мг/кг массы тела в сутки, предпочтительно - от 0,5 мг/кг массы тела до приблизительно 10 мг/кг массы тела в сутки.

[00129] Соединения Pfizer А и В можно вводить в дозах в диапазоне от приблизительно 1,0 мг до приблизительно 500 мг в сутки, предпочтительно - от приблизительно 1 до приблизительно 100 мг в сутки в однократной или дробных (т.е. многократных) дозах. Терапевтические соединения, как правило, будут вводить в суточных дозах в диапазоне от приблизительно 0,01 до приблизительно 10 мг на кг массы тела в сутки в однократной или дробных дозах. BMS 214662 можно вводить в диапазоне доз приблизительно от 0,05 до 200 мг/кг/сутки, предпочтительно - менее 100 мг/кг/сутки в однократной дозе или в 2-4 дробных дозах.

2.4. Способы комбинированного лечения

[00130] В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство FTI вводят в комбинации с лучевой терапией. Лучевая терапия включает использование гамма-излучения, рентгеновского излучения и/или направленной доставки радиоактивных изотопов в опухолевые клетки. Также предусмотрены другие формы ДНК-повреждающих факторов, такие как микроволновое излучение, протонное излучение (патенты США № 5760395 и 4870287; все из которых включены, таким образом, в настоящее описание в качестве

ссылки в полном объеме) и УФ-излучение. Скорее всего, все эти факторы оказывают влияние широкого спектра, вызывая повреждение ДНК, предшественников ДНК, репликации и репарации ДНК и сборки и поддержания хромосом.

[00131] В некоторых вариантах осуществления вводят терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции, содержащей FTI, эффективно сенсibiliзирующей опухоль в организме, подвергаемом облучению (патент США № 6545020, включенный, таким образом, в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). Излучение может являться ионизирующим излучением и, в частности, гамма-излучением. В некоторых вариантах осуществления гамма-излучение испускается линейными ускорителями или радионуклидами. Облучение опухоли радионуклидами может быть внешним или внутренним.

[00132] Излучение также может являться рентгеновским излучением. Дозы рентгеновского излучения находятся в диапазоне от суточных доз 50-200 рентген в течение длительных периодов времени (от 3 до 4 недель) до однократных доз 2000-6000 рентген. Диапазоны доз радиоактивных изотопов варьируются в широких пределах и зависят от времени полужизни изотопа, интенсивности и типа испускаемого излучения и захвата неопластическими клетками.

[00133] В некоторых вариантах осуществления введение фармацевтической композиции начинают за период до месяца, в частности, до 10 дней или недели до облучения опухоли. Кроме того, если облучение опухоли является фракционированным, сохраняют введение фармацевтической композиции в интервале между первым и последним сеансом облучения.

[00134] Количество FTI, доза облучения и периодичность доз облучения будут зависеть от ряда параметров, таких как тип опухоли, ее положение, реакция пациента на химиотерапию или лучевую терапию, и в конечном итоге их будет определять лечащий врач и врач-радиолог в каждом отдельном случае.

[00135] В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в настоящем описании, дополнительно включают введение терапевтически эффективного количества второго активного средства или средства поддерживающей терапии. Второе

активное средство может являться химиотерапевтическим средством. Химиотерапевтическое средство или лекарственное средство можно классифицировать по механизму активности в клетке, например, по тому, влияет ли оно на клеточный цикл и, если влияет, то на какую стадию клеточного цикла. Альтернативно, средство можно охарактеризовывать по его способности напрямую перекрестно сшивать ДНК, интеркалировать в ДНК или индуцировать хромосомные и митотические aberrации, влияя на синтез нуклеиновых кислот.

[00136] Примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамида, триэтилентифосфорамида и триметилмеламин; ацетогенины (в частности, буллатацин и буллатацинон); камптотецин (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; СС-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги, KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, мехлоретамин оксид гидрохлорид, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид и урамустин; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как эндиеновые антибиотики (например, калихимицин, в частности, калихимицин гамма II и калихимицин омега II); динемин, включая динемин А; бисфосфонаты, такие как клодронат; эсперамицин; а также хромофор неокарциностатина и родственные хромопротеиновые хромофоры эндиеновых антибиотиков, аклациномицин, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, кацинофилин, хромомицин, дактиномицин, даунорубин, деторубин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубин (включая морфолино-доксорубин, цианоморфолино-

доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, порфиروмицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин и зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, птероптерин и триметрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн и тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин и флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, пропионат дромостанолон, эпителиостанол, мепителиостан и тестолактон; антиадреналовые средства, такие как митотан и трилостан; добавку для восполнения фолиевой кислоты, такую как фолиевая кислота; ацеглатон; альдофосфамид гликозид; аминолевулиновую кислоту; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатрексат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элфорнитин; ацетат эллиптиния; эпотилон; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидаинин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитразерин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK; разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (в частности, токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангуидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ara-C"); циклофосфамид; таксоиды, например, паклитаксел и доцетаксел гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; координационные комплексы платины, такие как цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин; винбластин; препараты платины; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; винорелбин; новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; иринотекан (например, СРТ-11); ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (DMFO); ретиноиды,

такие как ретиноевая кислота; капецитабин; карбоплатин, прокарбазин, пликамицин, гемцитабин, навельбин, транс-соединения платины и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любых из указанных выше соединений.

[00137] Вторые активные средства могут являться высокомолекулярными (например, белками) или низкомолекулярными соединениями (например, синтетическими неорганическими, металлоорганическими или органическими молекулами). В некоторых вариантах осуществления второе активное средство является ДНК-гипометилирующим средством, терапевтическим антителом, специфически связывающимся с антигеном злокачественной опухоли, гемопоетическим фактором роста, цитокином, противоопухолевым средством, антибиотиком, ингибитором сох-2, иммуномодулирующим средством, антитимоцитарным глобулином, иммуносупрессирующим средством, кортикостероидом или его фармакологически активной мутантной формой или производным.

[00138] В некоторых вариантах осуществления второе активное средство является ДНК-гипометилирующим средством, таким как аналог цитидина (например, азацитидин) или 5-азадезоксцитидин (например, децитабин). В некоторых вариантах осуществления второе активное средство является циторедуктивным средством, включая, в качестве неограничивающих примеров индукционную химиотерапию, топотекан, гидреа, PO этопозид, леналидомид, LDAC и тиогуанин. В некоторых вариантах осуществления второе активное средство является митоксантроном, этопозидом, цитарабином или вальсподаром. В некоторых вариантах осуществления второе активное средство представляет собой митоксантрон+вальсподар, этопозид+вальсподар или цитарабин+вальсподар. В некоторых вариантах осуществления второе активное средство является идарубицином, флударабином, топотеканом или ara-C. В некоторых других вариантах осуществления второе активное средство представляет собой идарубицин+ara-C, флударабин+ara-C, митоксантрон+ara-C или топотекан+ara-C. В некоторых вариантах осуществления второе активное средство является хинином. Можно использовать другие комбинации описанных выше средств, и лечащий врач может определять их дозы.

[00139] В некоторых вариантах осуществления второе активное средство является иммунотерапевтическим средством. В некоторых вариантах осуществления второе активное средство является антителом против PD1 или антителом против PDL1.

[00140] В некоторых вариантах осуществления предусмотрено, что второе активное средство или второе терапевтическое средство, используемое в комбинации с FTI, можно вводить до, одновременно или после FTI. В некоторых вариантах осуществления второе активное средство или второе терапевтическое средство, используемое в комбинации с FTI, можно вводить до FTI. В некоторых вариантах осуществления второе активное средство или второе терапевтическое средство, используемое в комбинации с FTI, можно вводить одновременно с FTI. В некоторых вариантах осуществления второе активное средство или второе терапевтическое средство, используемое в комбинации с FTI, можно вводить после FTI.

[00141] FTI также можно вводить в комбинации с трансплантацией костного мозга. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят до трансплантации костного мозга. В других вариантах осуществления FTI вводят после трансплантации костного мозга.

3. Биомаркеры для лечения FTI

[00142] Настоящее изобретение относится к способам выбора пациентов с плоскоклеточной карциномой головы и шеи (SCCHN) и плоскоклеточной карциномой легких (SCC легких) для лечения с использованием ингибитора фарнезилтрансферазы (FTI). Фарнезилтрансфераза (FTase) играет ключевую роль в посттрансляционных модификациях белков Ras. FTI представляют собой класс биологически активных противоопухолевых лекарственных средств, ингибирующих фарнезилирование широкого спектра белков-мишеней, включая Ras. Белки Ras играют ключевую роль в передаче сигнала, стимулирующего рост, в клетке, и мутация гена *ras* приводит к постоянной активации белка, в конечном итоге приводя к неконтролируемой пролиферации клеток. Высокая частота мутантных генов *ras*, обнаруживаемых в 30% всех злокачественных новообразований человека, делает этот путь

привлекательной мишенью для разработки противоопухолевых лекарственных средств. Одним из путей противодействия функции Ras является ингибирование FTase, фермента, присоединяющего 15-углеродную изопрениловую группу к белкам Ras, с помощью FTI. FTI блокируют активацию Ras посредством ингибирования FTase, что в конечном итоге приводит к прекращению роста клеток. Таким образом, ожидают, что FTI станут эффективными терапевтическими средствами для лечения злокачественных новообразований.

[00143] Однако, в клинических исследованиях не обнаружено корреляции мутаций ras с ответом на FTI (Karp et al. Blood 97:3361-3369 (2001); и патентная публикация США № 20070048782)). Некоторые более ранние клинические исследования были сфокусированы на злокачественных новообразованиях, при которых наблюдали высокие частоты мутаций ras, но частота ответов в них была разочаровывающе низкой (Mesa Lancet Oncol 6:279-286 (2006); Rao et al. J Clin Oncol 22:3950-3957 (2004)).

[00144] Ранние исследования типифарниба, являющегося FTI, осуществляли на пациентах с AML высокого риска, ранее не подвергавшихся лечению (СТЕР-20 фазы II), и пациентах с AML с рецидивирующим/рефрактерным AML (INT-17 фазы II). В исследовании фазы III типифарниба по сравнению с оптимальной поддерживающей терапией (BSC) не наблюдали улучшения общей выживаемости. По литературным данным, множество генов/белков ассоциировано с активностью FTI (AKAP13, mDIA и т.д.) (Raponi et al. Clin Cancer Res. 13:2254-60 (2007); Kamasani et al. Cancer Biology & Therapy, 6:1418-1423 (2007)), и с помощью анализов для определения профиля экспрессии генов в образцах костного мозга из 2 исследований AML (СТЕР-20, INT-17) идентифицировали соотношение экспрессии 2 генов, RASGRP1 (Т-клеточного трансдуктора сигнала) и APTX (белка репарации ДНК), в качестве потенциального биомаркера активности типифарниба при AML (Raponi et al. Blood. 111:2589-96(2008)). Однако в последующем проспективном исследовании с использованием соотношения 2 генов в бластных клетках костного мозга, используемого в качестве критерия включения, не смогли продемонстрировать значимого клинического преимущества типифарниба при AML (Lancet et al.

Blood (ASH) 120: Abstract 1508(2012)).

[00145] В настоящем изобретении мутации *HRAS* определены в качестве биомаркеров, ассоциированных с улучшенным прогнозом в случае лечения *FTI*, и настоящее изобретение относится к новым способам выбора пациентов для лечения *FTI*. Мутации *HRAS*, определенные в настоящей заявке, конкретно ассоциированы с клиническим преимуществом при лечении *FTI*, но не с клиническим преимуществом средств из других стандартных способов химиотерапии.

[00146] Как представлено в настоящем описании, способы также можно использовать вместе с другими подходами стратификации пациентов для дополнительного повышения частоты ответов на лечение *FTI* в популяции пациентов. Например, в некоторых вариантах осуществления способы, представленные в настоящем описании, дополнительно включают определение мутационного статуса гена *HRAS* и выбор пациента для лечения *FTI*, как более подробно описано ниже. В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в настоящем описании, дополнительно включают определение мутационного статуса генов *ras* и выбор пациента для лечения *FTI*, если пациент имеет мутацию *HRAS* с *K-ras* дикого типа и *N-ras* дикого типа. В других вариантах осуществления способы, представленные в настоящем описании, могут дополнительно включать использование соотношения 2 генов *RASGRP1* и *APTX* в качестве дополнительного критерия выбора пациента для лечения *FTI* (патент США № 7932036, включенный, таким образом, в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). Способы, представленные в настоящем описании или иным образом известные в этой области, можно использовать для определения мутационного статуса гена *ras*, такого как ген *HRAS*. В некоторых вариантах осуществления мутационный статус гена *ras*, такого как *HRAS*, можно определять с помощью NGS.

[00147] В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в настоящем описании, включают определение уровня экспрессии биомаркера. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии биомаркера может являться уровнем белка биомаркера. В некоторых вариантах осуществления уровень

экспрессии биомаркера может являться уровнем РНК биомаркера. Любой способ, представленный в настоящем описании или иным образом известный в этой области для определения уровня белка или уровня РНК гена, можно использовать для определения уровня экспрессии биомаркера по настоящему изобретению.

[00148] Неограничивающие примеры способов определения или количественного анализа уровней мРНК включают способы на основе ПЦР, нозерн-блоттинг, анализы защиты от рибонуклеазы и т.п. Последовательность мРНК (например, мРНК биомаркера, такого как CRBN или CAP, или ее фрагмента) можно использовать для получения зонда, являющегося по меньшей мере частично комплементарным. Затем зонд можно использовать для детекции последовательности мРНК в образце с использованием любого подходящего анализа, такого как способам на основе ПЦР, нозерн-блоттинг, анализ с помощью тест-полосок и т.п.

[00149] Общеупотребительные, известные в этой области способы количественного анализа экспрессии мРНК в образце включают нозерн-блоттинг и гибридизацию *in situ* (Parker & Barnes, *Methods in Molecular biology* 106:247-283 (1999)), анализы защиты от РНКазы (Hod, *Biotechniques* 13:852-854 (1992)) и полимеразную цепную реакцию (ПЦР) (Weis et al, *Trends in Genetics* 8:263-264 (1992)). Альтернативно, можно использовать антитела, которые могут распознавать специфические дуплексы, включая ДНК-дуплексы, РНК-дуплексы, и гибридные дуплексы ДНК-РНК или дуплексы ДНК-белок. Типичные способы анализа экспрессии генов на основе секвенирования включают серийный анализ экспрессии генов (SAGE) и массивно-параллельное опознавательное секвенирование (MPSS).

[00150] Чувствительным и гибким количественным способом является ПЦР. Примеры способов ПЦР можно найти в литературе. Примеры анализов ПЦР можно найти в патенте США № 6927024, включенном в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Примеры способов RT-ПЦР можно найти в патенте США № 7122799, включенном в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Способ флуоресцентной ПЦР *in situ* описан в патенте США № 7186507, включенном в настоящее описание в

качестве ссылки в полном объеме.

[00151] Однако следует отметить, что в способах анализа нуклеиновых кислот, представленных в настоящем описании, также можно использовать другие способы амплификации нуклеиновых кислот (т.е. иные, чем ПЦР). Например, подходящие способы амплификации включают лигазную цепную реакцию (см., например, Wu & Wallace, *Genomics* 4:560-569, 1988), амплификацию с замещением цепи (см., например, Walker et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:392-396, 1992; патент США № 5455166) и несколько систем амплификации на основе транскрипции, включая способы, описанные в патентах США №№ 5437990; 5409818 и 5399491; систему опосредованной транскрипцией амплификации (TAS) (Kwoh et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1173-1177, 1989); и самоподдерживающуюся репликацию последовательностей (3SR) (Guatelli et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1874-1878, 1990; WO 92/08800). Альтернативно, можно использовать способы, с помощью которых зонд амплифицирует до детектируемых уровней, такие как амплификация с использованием Q-репликазы (Kramer & Lizardi, *Nature* 339:401-402, 1989; Lomeli et al., *Clin. Chem.* 35: 1826-1831, 1989). Обзор известных способов амплификации представлен, например, Abramson и Myers в *Current Opinion in Biotechnology* 4:41-47 (1993).

[00152] Можно выделять мРНК из исходного образца ткани. Общие способы выделения мРНК хорошо известны в этой области и описаны в стандартных руководствах по молекулярной биологии, включая Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular biology*, John Wiley and Sons (1997). В частности, выделение РНК можно осуществлять с использованием набора для очистки, набора буферов и протеазы от коммерческих поставщиков, таких как Qiagen, по инструкциям производителя. Например, тотальную РНК из клеток в культуре можно выделять с использованием колонок Qiagen RNeasy mini. Другие коммерчески доступные наборы для выделения РНК включают набор для очистки ДНК и РНК MASTERPURE® Complete (EPICENTRE®, Madison, Wis.) и набор для выделения РНК из парафиновых блоков (Ambion, Inc.). Тотальную РНК из образцов

ткани можно выделять с использованием RNA Stat-60 (Tel-Test). РНК, полученную из опухоли, можно выделять, например, посредством центрифугирования в градиенте плотности хлорида цезия.

[00153] В некоторых вариантах осуществления первой стадией определения профиля экспрессии генов посредством ПЦР является обратная транскрипция матрицы РНК в кДНК с последующей экспоненциальной амплификацией кДНК посредством реакции ПЦР. В других вариантах осуществления можно использовать комбинированную полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (RT-ПЦР), например, как описано в патенты США № 5310652; 5322770; 5561058; 5641864 и 5693517. Двумя общеупотребительными обратными транскриптазами являются обратная транскриптаза вируса миелобластома птиц (AMV-RT) и обратная транскриптаза вируса лейкоза мышей Молони (MMLV-RT). Стадию обратной транскрипции, как правило, инициируют с использованием специфических праймеров, случайных гексамеров или олиго-dT-праймеров в зависимости от обстоятельств и цели определения профиля экспрессии. Например, выделенную РНК можно подвергать обратной транскрипции с использованием набора для ПЦР РНК GENEAMP™ (Perkin Elmer, Calif, USA) по инструкциям производителя. Полученную кДНК затем можно использовать в качестве матрицы для последующей реакции ПЦР.

[00154] В некоторых вариантах осуществления для детекции и количественного анализа РНК-мишеней можно использовать ПЦР с обратной транскрипции в реальном времени (qRT-ПЦР) (Bustin, *et al.*, 2005, *Clin. Sci.*, 109:365-379). Примеры способов на основе qRT-ПЦР можно найти, например, в патенте США № 7101663, включенном в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Устройства для ПЦР в реальном времени, такие как Applied Biosystems 7500, доступны в коммерческих источниках, как и реагенты, такие как реагенты для детекции последовательностей TaqMan.

[00155] Например, можно использовать анализы экспрессии генов TaqMan® по инструкциям производителя. Эти наборы

представляют собой заранее составленные анализы экспрессии генов для быстрой, надежной детекции и количественного анализа транскриптов мРНК человека, мыши и крысы. Можно использовать анализ TaqMan® или 5'-нуклеазный анализ, как описано в патентах США №№ 5210015; 5487972; и 5804375; и Holland et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7276-7280. В ПЦР TAQMAN®, как правило, используют 5'-нуклеазную активность полимеразы Taq или Tth для гидролиза зонда для гибридизации, связанного с ампликоном-мишенью, но можно использовать любой фермент с эквивалентной 5'-нуклеазной активностью. Для получения ампликона, типичного для реакции ПЦР, используют два олигонуклеотидных праймера. Третий олигонуклеотид, или зонд, предназначен для детекции нуклеотидной последовательности, находящейся между двумя праймерами для ПЦР. Зонд не подвергается элонгации под действием ДНК-полимеразы Taq, и его метят репортерным флуоресцентным красителем и красителем-гасителем флуоресценции. Любое индуцируемое лазером испускание флуоресценции репортерного красителя гасится гасителем, когда два красителя расположены вблизи друг друга, как, например, на зонде. В ходе реакции амплификации ДНК-полимераза Taq расщепляет зонд в зависимости от матрицы. Образующиеся фрагменты зонда диссоциируют в растворе, и сигнал высвобождающегося репортерного красителя больше не подвергается гасящему воздействию второго флуорофора. Из каждой новой синтезированной молекулы высвобождается одна молекула репортерного красителя, и детекция неподвергающегося гасящему воздействию репортерного красителя является основой для количественной интерпретации данных.

[00156] В 5'-нуклеазном анализе можно использовать любой способ, подходящий для детекции продукта деградации. Зачастую зонд для детекции метят двумя флуоресцентными красителями, один из которых может гасить флуоресценцию другого красителя. Красители присоединяют к зонду, при этом, предпочтительно, один из них присоединяют к 5'-концу, а другой присоединяют к внутреннему участку таким образом, что гашение происходит, когда зонд находится в негибридизованном состоянии, и расщепление

зонда в результате 5'-3'-экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы происходит между двумя красителями.

[00157] Амплификация приводит к расщеплению зонда между красителями с сопутствующим устранением гашения и повышением флуоресценции исходно подвергающегося гашению красителя. Накопление продукта деградации подвергают мониторингу посредством измерения повышения флуоресценции. В патентах США №№ 5491063 и 5571673, включенных в настоящее описание в качестве ссылки, описаны альтернативные способы детекции деградации зонда, происходящей одновременно с амплификацией. Данные 5'-нуклеазного анализа исходно можно выражать в виде C_t или порогового цикла. Как указано выше, значения флуоресценции регистрируют при каждом цикле, и они представляют собой количество продукта, амплифицированного по достижении этого момента в реакции амплификации. Момент, когда впервые регистрируют статистически значимый сигнал флуоресценции, представляет собой пороговый цикл (C_t).

[00158] Для минимизации ошибок и эффекта вариабельности от образца к образцу, как правило, ПЦР осуществляют с использованием внутреннего стандарта. Идеальный внутренний стандарт экспрессируется на постоянном уровне в различных тканях, и на него не влияют условия эксперимента. РНК, чаще всего используемой для нормализации профилей экспрессии генов, является мРНК генов "домашнего хозяйства" глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (GAPDH) и β -актина.

[00159] Праймеры и зонды для ПЦР конструируют с учетом последовательностей интронов, присутствующих в гене, подлежащем амплификации. В этом варианте осуществления первой стадией дизайна праймеров/зондов является определение границ последовательностей интронов в генах. Это можно осуществлять с помощью общедоступного программного обеспечения, такое как программное обеспечение DNA BLAT, разработанное по Kent, W., Genome Res. 12(4):656-64 (2002), или программное обеспечение BLAST, включая его варианты. Последующие стадии представляют собой хорошо известные способы дизайна праймеров и зондов для

ПЦР.

[00160] Во избежание получения неспецифических сигналов, важным может быть маскирование повторяющихся последовательностей в интронах при дизайне праймеров и зондов. Это легко можно осуществлять с использованием программы Repeat Masker, доступной он-лайн в Baylor College of Medicine, с помощью которой осуществляют скрининг последовательностей ДНК относительно библиотеки повторяющихся элементов и обратно получают последовательность запроса, в которой повторяющиеся элементы маскированы. Маскированные последовательности интронов затем можно использовать для дизайна последовательностей праймеров и зондов с использованием коммерческих или иным образом доступных пакетов программ для дизайна праймеров/зондов, таких как Primer Express (Applied Biosystems); MGB assay-by-design (Applied Biosystems); Primer3 (Rozen and Skaletsky (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. В: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular biology. Humana Press, Totowa, N.J., pp 365-386).

[00161] Факторы, учитываемые при дизайне праймеров для ПЦР, включают длину праймера, температуру плавления (T_m) и содержание G/C-оснований, специфичность, комплементарные последовательности праймеров и 3'-концевая последовательность. В основном, оптимальные праймеры для ПЦР, как правило, имеют длину 17-30 оснований и содержат приблизительно 20-80%, например, приблизительно 50-60% G+C-оснований. Предпочтительной, как правило, является T_m от 50 до 80°C, например, приблизительно от 50 до 70°C. Дополнительные руководства по дизайну праймеров и зондов для ПЦР см., например, Dieffenbach et al, "General Concepts for PCR Primer Design" в: PCR Primer, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1995, pp. 133-155; Innis and Gelfand, "Optimization of PCRs" в: PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, CRC Press, London, 1994, pp. 5-11; и Plasterer, T. N. Primerselect: Primer and probe design. Methods Mol. Biol. 70:520-527 (1997), полное содержание которых включено, таким образом, в настоящее описание

в качестве ссылки.

[00162] Пример программы ПЦР представляет собой 50°C в течение 2 минут, 95°C в течение 10 минут, 40 циклов 95°C в течение 15 секунд, затем 60°C в течение 1 минуты. Для определения количества циклов, при котором сигнал флуоресценции, ассоциированный с пересечением накоплением конкретного ампликона порогового значения (обозначаемого как СТ), данные можно анализировать, например, с использованием программного обеспечения для детекции последовательностей версии 1.3 для системы ПЦР в реальном времени 7500 с использованием сравнительного способа относительно вычисления СТ. При использовании этого способа выходные данные выражают как кратное изменение уровней экспрессии. В некоторых вариантах осуществления можно выбирать пороговый уровень так, чтобы он автоматически определялся программным обеспечением. В некоторых вариантах осуществления пороговый уровень устанавливают так, чтобы он был выше базового уровня, но при этом был достаточно низким, чтобы оставаться в области экспоненциального роста на кривой амплификации.

[00163] РНК-Seq, также названное полнотранскриптомным секвенированием способом дробовика (WTSS), относится к использованию высокопроизводительных технологий секвенирования последовательности кДНК для получения информации о содержимом образца РНК. Публикации, в которых описывают РНК-Seq, включают: Wang et al., *Nature Reviews Genetics* 10 (1): 57-63 (January 2009); Ryan et al. *BioTechniques* 45 (1): 81-94 (2008); и Maher et al., *Nature* 458 (7234): 97-101 (January 2009); включенные, таким образом, в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

[00164] Дифференциальную экспрессию генов также можно определять или подтверждать с использованием микрочипов. В этом способе интересующие полинуклеотидные последовательности (включая кДНК и олигонуклеотиды) помещают или группируют на микрочипе-субстрате. Затем сгруппированные последовательности гибридизуются со специфическими зондами ДНК из интересующих

клеток или тканей.

[00165] В варианте осуществления микрочипа ПЦР-амплифицированные вставки клонов кДНК наносят на субстрат в виде плотной решетки. Предпочтительно, на субстрат наносят по меньшей мере 10000 нуклеотидных последовательностей. Сгруппированные гены, иммобилизованные на микрочипе по 10000 элементов на каждом, подходят для гибридизации в строгих условиях. Флуоресцентно меченые зонды кДНК можно получать с помощью встраивания флуоресцентных нуклеотидов посредством обратной транскрипции РНК, выделенной из интересующих тканей. Меченые зонды кДНК, нанесенные на чип, гибридизуются со специфичностью с каждым пятном ДНК на чипе. После промывки в строгих условиях для удаления неспецифически связавшихся зондов чип сканируют с помощью конфокальной лазерной микроскопии или другого способа детекции, например, с помощью камеры CCD. Количественный анализ гибридизации каждого расположенного элемента делает возможной оценку избытка соответствующей мРНК. При двухцветной флуоресценции отдельно меченые зонды кДНК, полученные из двух источников РНК, попарно гибридизуются с чипом. Таким образом, одновременно определяют относительный избыток транскриптов из двух источников, соответствующих каждому определенному гену. Миниатюризованный масштаб гибридизации делает возможной удобную и быструю оценку профиля экспрессии для большого количества генов. Показано, что такие способы обладают чувствительностью, необходимой для детекции редких транскриптов, экспрессирующихся в нескольких копиях на клетку, и для воспроизводимой детекции по меньшей мере приблизительно двукратных различий уровней экспрессии (Schena et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(2): 106-149 (1996)). Анализ на микрочипах можно осуществлять с помощью коммерчески доступного оборудования по инструкциям производителя, например, с использованием технологии Affymetrix GENCHIP™ или технологии Incyte.

[00166] Серийный анализ экспрессии генов (SAGE) является способом, позволяющим одновременно и количественно анализировать большое количество транскриптов генов без необходимости

получения отдельного зонда для гибридизации для каждого транскрипта. Сначала получают короткую последовательность-метку (приблизительно 10-14 п.н.), содержащую достаточную информацию для уникальной идентификации транскрипта при условии, что метку получают из уникального положения в каждом транскрипте. Затем многие транскрипты соединяют вместе для получения длинных серийных молекул, которые можно секвенировать, одновременно определяя идентичность множества меток. Профиль экспрессии любой выборки транскриптов можно количественно оценивать посредством определения избытка отдельных меток и идентификации гена, соответствующего каждой метке. Более подробно см., например, Velculescu et al, Science 270:484-487 (1995); и Velculescu et al, Cell 88:243-51 (1997).

[00167] Технология MassARRAY (Sequenom, San Diego, Calif.) является автоматизированным, высокопроизводительным способом анализа экспрессии генов с использованием масс-спектрометрии (MS) для детекции. В этом способе после выделения РНК, обратной транскрипции и ПЦР-амплификации кДНК подвергают достройке праймера. Полученные из кДНК продукты элонгации праймеров очищают и наносят на чип, предварительно нагруженный компонентами, необходимыми для получения образца для MALDI-TOF MS. Различные кДНК, присутствующие в реакционной смеси, количественно анализируют по площадям пиков в полученном массовом спектре.

[00168] Уровень мРНК также можно определять с помощью анализа на основе гибридизации. Типичный способ анализа мРНК может включать стадии 1) получения связанных с поверхностью исследовательских зондов; 2) гибридизации популяции мРНК со связанными с поверхностью зондами в условиях, достаточных для обеспечения специфического связывания, (3) промывки после гибридизации для удаления нуклеиновых кислот, несвязавшихся при гибридизации; и (4) детекции гибридизованной мРНК. Реагенты, использованные на каждой из этих стадий, и условия их использования могут варьироваться в зависимости от конкретного назначения.

[00169] Для определения уровня мРНК в образце можно

использовать любую подходящую аналитическую платформу. Например, анализ может иметь форму тест-полоски, мембраны, чипа, диска, индикаторной полоски, фильтра, микросферы, предметного стекла, многолуночного планшета или оптического. Аналитическая система может включать твердую подложку, на которую прикрепляют нуклеиновую кислоту, соответствующую мРНК. Твердая подложка может включать, например, пластик, силикон, металл, смолу, стекло, мембрану, частицу, преципитат, гель, полимер, лист, сферу, полисахарид, капилляр, пленку, планшет или предметное стекло. Компоненты анализа можно получать и упаковывать вместе в виде набора для детекции мРНК.

[00170] Нуклеиновую кислоту можно метить, при желании, для получения популяции меченых мРНК. В основном, образец можно метить способами, хорошо известными в этой области (например, с использованием ДНК-лигазы, терминальной трансферазы или посредством мечения остова РНК и т.д.; см., например, Ausubel, *et al.*, *Short Protocols in Molecular biology*, 3rd ed., Wiley & Sons 1995 и Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition, 2001 Cold Spring Harbor, N.Y.). В некоторых вариантах осуществления образец метят флуоресцентной меткой. Неограничивающие примеры флуоресцентных красителей включают ксантеновые красители, флуоресцеиновые красители, родаминовые красители, флуоресцеинизотиоцианат (FITC), 6-карбоксифлуоресцеин (FAM), 6-карбокси-2',4',7',4,7-гексахлорфлуоресцеин (HEX), 6-карбокси-4',5'-дихлор-2',7'-диметоксифлуоресцеин (JOE или J), N,N,N',N'-тетраметил-6-карбоксиродамин (TAMRA или T), 6-карбокси-X-родамин (ROX или R), 5-карбоксиродамин 6G (R6G5 или G5), 6-карбоксиродамин 6G (R6G6 или G6) и родамин 110; цианиновые красители, например, красители Cy3, Cy5 и Cy7; красители Alexa, например, Alexa-fluor-555; кумарин, диэтиламинокумарин, умбеллиферон; бензимидазные красители, например, Hexst 33258; фенантридиновые красители, например, Texas Red; этидиевые красители; акридиновые красители; карбазоловые красители; феноксазиновые красители; порфириновые красители; полиметиновые красители, красители BODIPY,

хинолиновые красители, пирен, флуоресцеин хлортриазинил, R110, эозин, JOE, R6G, тетраметилродамин, лиссамин, ROX, нафтофлуоресцеин и т.п.

[00171] Гибридизацию можно осуществлять в подходящих условиях гибридизации, строгость которых, при желании, можно варьировать. Типичные условия являются достаточными для образования комплексов зонда/мишени на твердой поверхности между комплементарными связывающимися средствами, т.е. между связанными с твердой поверхностью исследовательскими зондами и комплементарной мРНК в образце. В некоторых вариантах осуществления можно использовать строгие условия гибридизации.

[00172] Гибридизацию, как правило, осуществляют в строгих условиях гибридизации. Стандартные способы гибридизации (например, в условиях, достаточных для обеспечения специфического связывания мРНК-мишени в образце с зондами) описаны в Kallioniemi et al., *Science* 258:818-821 (1992) и WO 93/18186. Доступно несколько руководств по общим способам, например, Tijssen, *Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Parts I and II (Elsevier, Amsterdam 1993). Описание способов, подходящих для гибридизации *in situ* см. в Gall et al. *Meth. Enzymol.*, 21:470-480 (1981); и Angerer et al. в *Genetic Engineering: Principles and Methods* (Setlow and Hollaender, Eds.) Vol 7, pgs 43-65 (Plenum Press, New York 1985). Выбор подходящих условий, включая температуру, концентрацию соли, концентрацию полинуклеотида, время гибридизации, строгость условий промывки и т.п., будет зависеть от дизайна эксперимента, включая источник образца, тип средств захвата, ожидаемую степень комплементарности и т.д., и специалисты в этой области могут определять их в ходе рутинного экспериментирования. Специалистам в этой области будет понятно, что можно использовать альтернативные, но сравнимые условия гибридизации и промывки для обеспечения условий схожей строгости.

[00173] После гибридизации мРНК связанные с поверхностью полинуклеотиды, как правило, промывают для удаления несвязавшихся нуклеиновых кислот. Промывку можно осуществлять любым общепринятым способом, при котором условия промывки, как

правило, являются строгими, как описано выше. Затем гибридизацию мРНК-мишени с зондами определяют стандартными способами.

[00174] Показано, что ИНС-окрашивание тканевых срезов является надежным способом анализа или детекции наличия белков в образце. В способах иммуногистохимии используют антитело против зонда и визуализируют клеточные антигены *in situ*, как правило, хромогенными или флуоресцентными способами. Таким образом, для детекции экспрессии используют антитела или антисыворотки, предпочтительно – поликлональные антисыворотки, и наиболее предпочтительно – моноклональные антитела, специфические для каждого маркера. Как описано ниже, антитела можно определять посредством прямого мечения самих антител, например, с использованием радиоактивных меток, флуоресцентных меток, гаптеновых меток, таких как биотин, или фермента, такого как пероксидаза хрена или щелочная фосфатаза. Альтернативно, немеченое первичное антитело используют в комбинации с меченым вторичным антителом, включающим антисыворотки, поликлональные антисыворотки или моноклональное антитело, специфическое для первичного антитела. Способы и наборы для иммуногистохимии хорошо известны в этой области и являются коммерчески доступными. Автоматизированные системы для подготовки препаратов и обработки ИНС являются коммерчески доступными. Система Ventana® BenchMark XT является примером такой автоматизированной системы.

[00175] Стандартные иммунологические способы и иммунологические анализы можно найти в *Basic and Clinical Immunology* (Stites & Terr eds., 7th ed. 1991). Кроме того, иммунологические анализы можно осуществлять в любой из нескольких конфигураций, обзор которых представлен в *Enzyme Immunoassay* (Maggio, ed., 1980); и Harlow & Lane, выше. Обзор общих иммунологических анализов также см. в *Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology*, volume 37 (Asai, ed. 1993); *Basic and Clinical Immunology* (Stites & Ten, eds., 7th ed. 1991).

[00176] Общеупотребительные анализы для детекции уровня

белка биомаркера включают неконкурентные анализы, например, анализы сэндвич-типа, и конкурентные анализы. Как правило, можно использовать такой анализ, как ELISA. Анализы ELISA известны в этой области, например, для анализа широкого спектра тканей и образцов, включая кровь, плазму, сыворотку или костный мозг.

[00177] Доступен широкий спектр способов иммунологических анализов с использованием такого формата анализа, см., например, патенты США № 4016043, 4424279 и 4018653, включенные, таким образом, в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Они включают одностадийный и двухстадийный анализ или "сэндвич"-анализ неконкурентного типа, а также общепринятые анализы конкурентного связывания. Эти анализы также включают прямое связывание меченого антитела с биомаркером-мишенью. Анализы сэндвич-типа являются общеупотребительными анализами. Существует ряд вариантов анализа сэндвич-типа. Например, в типичном прямом анализе немеченое антитело иммобилизуют на твердой подложке и тестируемый образец приводят в контакт со связанной молекулой. После подходящего периода инкубации, достаточного для образования комплекса антитело-антиген, добавляют второе антитело, специфическое для антигена, меченого репортерной молекулой, способной обеспечивать детектируемый сигнал, и инкубируют в течение периода, достаточного для образования другого комплекса антитело-антиген-меченое антитело. Вымывают любой непрореагировавший материал и определяют наличие антигена, наблюдая сигнал, продуцируемый репортерной молекулой. Результаты могут быть качественными при простом наблюдении видимого сигнала или количественными при сравнении с контрольным образцом, содержащим известные количества биомаркера.

[00178] Варианты прямого анализа включают одновременный анализ, в котором образец и меченое антитело добавляют к связанному антителу одновременно. Эти способы хорошо известны специалистам в этой области, включая, как будет понятно, любые второстепенные варианты. При типичном прямом анализе сэндвич-типа первое антитело, имеющее специфичность для биомаркера, ковалентно или пассивно связывают с твердой поверхностью. Твердая поверхность может представлять собой стекло или полимер,

при этом общеупотребительными полимерами являются целлюлоза, полиакриламид, нейлон, полистирол, поливинилхлорид или полипропилен. Твердые подложки могут иметь форму пробирок, частиц, дисков, микропланшетов или любой другой поверхности, подходящей для осуществления иммунологического анализа. Процесс связывания хорошо известен в этой области и, как правило, состоит из поперечного сшивания, ковалентного связывания или физической адсорбции, комплекс полимер-антитело промывают при подготовке к тестируемому образцу. Затем аликвоту тестируемого образца добавляют к комплексу на твердой фазе и инкубируют в течение достаточного периода времени (например, 2-40 минут или в течение ночи, если это удобнее) и в подходящих условиях (например, при температуре от комнатной температуры до 40°C, такой как от 25°C до 32°C, включительно), чтобы сделать возможным связывание любой субъединицы, присутствующей в антителе. После периода инкубации субъединицу антитела на твердой фазе промывают, сушат и инкубируют со вторым антителом, специфическим для части биомаркера. Второе антитело связано с репортерной молекулой, используемой для индикации связывания второго антитела с молекулярным маркером.

[00179] В некоторых вариантах осуществления для детекции уровня белка биомаркера можно использовать проточную цитометрию (FACS). Поверхностные белки можно определять с использованием антител против специфических биомаркеров. С помощью проточного цитометра определяют и регистрируют интенсивность меченого флуорохромом антитела, свидетельствующую об уровне экспрессии биомаркера. Нефлуоресцентные цитоплазматические белки также можно определять посредством окрашивания пермеабелизованных клеток. Краситель может являться флуоресцентным соединением, способным связываться с конкретными молекулами, или меченым флуорохромом антителом, связывающимся с выбранной молекулой.

[00180] Альтернативный способ включает иммобилизацию биомаркеров-мишеней в образце, а затем подвергание иммобилизованной мишени воздействию специфического антитела, которое можно метить или не метить репортерной молекулой. В

зависимости от количества мишени и силы сигнала репортерной молекулы, связанную мишень можно определять посредством прямого мечения антителом. Альтернативно, второе меченое антитело, специфическое для первого антитела, подвергают воздействию комплекса мишень-первое антитело для получения третичного комплекса мишень-первое антитело-второе антитело. Комплекс определяют по сигналу, испускаемому меченой репортерной молекулой.

[00181] В случае ферментативного иммунологического анализа фермент конъюгируют со вторым антителом, как правило, с помощью глутаральдегида или периодата. Однако, как будет понятно, существует широкий спектр различных способов конъюгации, доступных специалистам в этой области. Общеупотребительные ферменты включают пероксидазу хрена, глюкооксидазу, бета-галактозидазу и щелочную фосфатазу и другие ферменты, представленные в настоящем описании. Субстраты, подлежащие использованию с конкретными ферментами, как правило, выбирают по возникновению детектируемого изменения цвета после гидролиза соответствующим ферментом. Примеры подходящих ферментов включают щелочную фосфатазу и пероксидазу. Также можно использовать флуорогенные субстраты, приводящие к образованию флуоресцентного продукта, а не хромогенные субстраты, описанные выше. Во всех случаях меченое ферментом антитело добавляют к комплексам первое антитело-молекулярный маркер, позволяют им связываться, а затем вымывают избыток реагента. Затем к комплексу антитело-антиген-антитело добавляют раствор, содержащий соответствующий субстрат. Субстрат будет реагировать с ферментом, связанным со вторым антителом, что приводит к получению качественного видимого сигнала, затем их можно подвергать количественному анализу, как правило, спектрофотометрическому, для определения количества биомаркера, присутствующего в образце. Альтернативно, флуоресцентные соединения, такие как флуоресцеин и родамин, можно химически соединять с антителами без изменения их связывающей способности. При активации посредством облучения светом с конкретной длиной волны, меченое флуорохромом антитело поглощает световую энергию, индуцируя состояние возбудимости в

молекуле, с последующим испусканием света с характерным цветом, визуально детектируемым с помощью светового микроскопа. Как и при EIA, флуоресцентно меченому антителу позволяют связываться с комплексом первое антитело-молекулярный маркер. После промывки несвязавшегося реагента оставшийся третичный комплекс облучают светом с подходящей длиной волны, наблюдаемая флуоресценция свидетельствует о наличии интересующего молекулярного маркера. Способы иммунофлуоресценции и EIA хорошо известны в этой области и представлены в настоящем описании.

[00182] В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в настоящем описании, включают определение уровней белка двух или более из этих биомаркеров. В некоторых вариантах осуществления способы включают определение уровней белка трех или более из этих биомаркеров. В некоторых вариантах осуществления способы включают определение уровней белка четырех или более из этих биомаркеров. В некоторых вариантах осуществления способы включают определение уровней белка пяти из этих биомаркеров.

3.4. Референсные уровни и референсные соотношения

[00183] В некоторых вариантах осуществления референсный уровень экспрессии биомаркера или референсное соотношение между уровнями экспрессии двух биомаркеров можно определять посредством статистического анализа данных предыдущих клинических испытаний, включая исход в группе пациентов, а именно отвечаемость пациентов на лечение FTI, а также уровни экспрессии биомаркера или соотношение уровней экспрессии между биомаркерами в группе пациентов. В этой области хорошо известен ряд статистических способов для определения референсного уровня (также обозначаемого как "пороговое значение") одного или более биомаркеров при использовании для прогнозирования отвечаемости пациента на конкретное лечение или стратификации пациентов для конкретного лечения.

[00184] Один из способов по изобретению включает анализ профилей экспрессии генов биомаркеров, определенных в настоящем описании, с помощью которых отличают отвечающих и не отвечающих индивидуумов, для определения референсного уровня экспрессии для

одного или более биомаркеров. Сравнение отвечающих и неответающих индивидуумов можно осуществлять с использованием критерия Манна-Уитни, критерия хи-квадрат или точного критерия Фишера. Анализ описательной статистики и сравнение можно осуществлять с использованием программного обеспечения SigmaStat (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA).

[00185] В некоторых вариантах осуществления для определения референсного уровня можно использовать алгоритм бинарного дерева решений (CART). Анализ CART основан на бинарном рекурсивном парциальном алгоритме и позволяет обнаруживать комплексные взаимодействия прогностических переменных, которые могут быть неочевидными при использовании более общепринятых способов, таких как множественная линейная регрессия. Термин "бинарный рекурсивный парциальный анализ" относится к анализу, являющемуся: 1) бинарным, что означает, что есть две возможные переменные исхода, а именно "отвечающие" и "неотвечающие", с эффектом разбиения пациентов на 2 группы; 2) рекурсивным, что означает, что анализ можно осуществлять многократно; и 3) парциальным, что означает, что весь массив данных можно разбивать на секции. С помощью этого анализа также можно устранять прогностические переменные с плохими свойствами. Дерево решений можно строить с использованием программного обеспечения Salford Predictive Modeler v6.6 (Salford Systems, San Diego, CA, USA).

[00186] Изделия по настоящему изобретению соответствуют профилям экспрессии генов, которые можно использовать для прогнозирования ответа пациента со злокачественным новообразованием на лечение FTI, приведенным на носителе, который можно автоматически считывать, таком как машиночитаемый носитель (магнитный, оптический и т.п.). Изделия также могут включать инструкции для оценки профилей экспрессии генов на таких носителях. Например, изделия могут включать CD-ROM с машиночитаемыми инструкциями для сравнения профилей экспрессии генов описанных выше биомаркеров. Изделия также могут включать профили экспрессии генов, записанные на них в цифровом виде, таким образом, что их можно сравнивать с данными об экспрессии

генов в образцах пациентов. Альтернативно, профили можно записывать в различных форматах презентации. При визуализации таких данных можно использовать алгоритмы кластеризации, такие как алгоритмы, включенные в компьютерные программы "OMNIVIZ" и "TREE VIEW".

[00187] Анализ зависимости чувствительности от частоты ложноположительных результатов (ROC) можно использовать для определения референсного уровня экспрессии или референсного соотношения экспрессии или тестирования общего прогностического значения отдельных генов и/или мультигенных классификаторов. Обзор анализа ROC можно найти в Soreide, J Clin Pathol 10,1136 (2008), включенной в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

[00188] Референсный уровень можно определять из кривой ROC для обучающей выборки для достижения высокой чувствительности и высокой специфичности. Для определения того, сколько биомаркеров необходимо включить в прогностический параметр, можно использовать перекрестную проверку с исключением (LOOCV). Регистрируют баллы ответов для "исключенных" образцов с учетом разного количества генов. Свойства прогностических параметров с различными количествами генов можно оценивать с учетом частоты ошибок неправильной классификации, чувствительности, специфичности, значений p , измеряя разделение кривых Каплана-Мейер для двух групп прогнозирования.

[00189] Можно использовать алгоритм пар с наибольшим счетом (TSP), предложенный Geman et al. (2004). По существу, с помощью алгоритма ранжируют все пары генов (гены i и j) с учетом абсолютной разницы (D_{ij}) частоты события, где ген i имеет более высокое значение экспрессии, чем ген j в образцах среди классов C1-C2. В случае наличия множества пар с наибольшим счетом (все из которых имеют общую D_{ij}), выбирают лучшую пару по вторичному рангу, с помощью которого измеряют величину, с которой возникают инверсии уровней экспрессии генов из одного класса в другой в пределах пары генов. Лучшую пару с наибольшей частотой абсолютной $D_{ij} > 2$ во всех образцах будут выбирать в качестве пары-кандидата. Затем пару-кандидата можно оценивать в

независимой тестовой выборке. Перекрестную проверку с исключением (LOOCV) можно осуществлять на обучающей выборке для оценки работы алгоритма. Свойства прогностических параметров можно оценивать с учетом максимальной частоты ошибки неправильной классификации. Все статистические анализы можно осуществлять с использованием R (R Development Core Team, 2006).

[00190] Обзор способов и статистических инструментов, которые можно использовать для определения референсного уровня, можно найти в James Westgard, Ph.D., Basic Methods Validation, 3d edition (2008), включенном, таким образом, в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Конкретно можно упомянуть Главу 9 ("How is reportable range of method determined") и Главу 15 ("How is a reference interval verified").

[00191] Клинически регистрируемый диапазон (CRR) представляет собой диапазон значений аналитов, которые можно измерять с помощью способа, учитывая разведение образца, концентрацию или другую предварительную обработку, используемую для расширения прямой диапазон аналитических измерений. Как описано в Basic Methods Validation авторства Dr. Westgard, осуществляемый эксперимент часто называют "экспериментом линейности", хотя технически не требуется того, чтобы способ приводил к линейной характеристике, если не используют калибровку по двум точкам. Этот диапазон также можно обозначать как "линейный диапазон", "аналитический диапазон" или "рабочий диапазон" способа.

[00192] Регистрируемый диапазон оценивают, анализируя график линейности. Этот анализ может включать черчение вручную оптимальной прямой линии через линейную часть точек, черчение линии от точки к точке через все точки, а затем сравнение с оптимальной прямой линией, или аппроксимацию линии регрессии через точки в линейном диапазоне. Существуют более сложные статистические вычисления, рекомендуемые в некоторых руководствах, таких как протокол EP-6 Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) для оценки линейности аналитических способов. Но обычно принято считать, что регистрируемый диапазон

можно соответствующим образом определять при "визуальной" оценке, т.е. посредством черчения вручную оптимальной прямой линии, соответствующей самым низким точкам в серии. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) рекомендует минимум, составляющий по меньшей мере 4, предпочтительно - 5 различных уровней концентраций. Можно использовать более 5, в частности, если верхний предел регистрируемого диапазона необходимо максимизировать, но использование 5 уровней является удобным и почти всегда достаточным.

[00193] Референсный интервал, как правило, определяют посредством анализа образцов, полученных из индивидуумов, соответствующих тщательно определенным критериям (референсная выборка). С помощью протоколов, таких как протоколы International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) Expert Panel on Theory of Reference Values и CLSI, разграничить комплексные систематические процессы, в которых используют тщательно выбранные референсные группы для определения референсных интервалов. Для этих протоколов, как правило, необходимо минимум 120 референсных индивидуумов для каждой группы (или подгруппы), которых необходимо охарактеризовать.

[00194] В одобренном CLSI руководстве C28-A2 описаны различные способы, с помощью которых лаборатория может валидировать перенос установленных референсных интервалов для использования в отдельной лаборатории, включающие 1. Принятие по умолчанию, где лаборатория просто рассматривает поданную информацию и субъективно проверяет, подходят ли референсные интервалы для использования для выборки пациентов и способов тестирования в этой лаборатории; 2. Проверку с использованием 20 образцов, где экспериментальную валидацию осуществляют посредством сбора и анализа образцов 20 индивидуумов, представляющих собой референсную выборку; 3. Оценку с использованием 60 образцов, где экспериментальную валидацию осуществляют посредством сбора и анализа образцов 60 индивидуумов, представляющих собой референсную выборку, и точный референсный интервал оценивают и сравнивают с заявленным или приведенным интервалом с использованием статистической формулы,

с помощью которой сравнивают средние значения и стандартные отклонения для двух выборок; и 4. Вычисление сравнительным способом, при котором можно корректировать заявленные или приведенные референсные интервалы с учетом наблюдаемого методологического расхождения и математической зависимости между используемыми аналитическими способами.

[00195] Специалисту в этой области будет понятно, что референсный уровень экспрессии биомаркеров, представленных в настоящем описании, а также референсные соотношения двух биомаркеров можно определять одним или более способами, представленными в настоящем описании или иным образом известными в этой области способы.

5. Мутантный HRAS в качестве биомаркера для лечения FTI

5.1. Мутационный статус HRAS

[00196] Белок HRAS участвует в регуляции деления клеток в ответ на стимуляцию факторами роста. Факторы роста действуют, связывая рецепторы поверхности клетки, распределенные по плазматической мембране клетки. После активации рецепторы стимулируют события передачи сигнала в цитоплазме, посредством чего белки и вторичные мессенджеры передают сигналы из среды за пределами клетки в ядро клетки и заставляют клетку расти или делиться. HRAS локализуется на плазматической мембране и является ранним элементом во многих путях передачи сигнала. HRAS действует как молекулярным переключатель, т.к. при его включении он рекрутирует и активирует белки, необходимые для распространения сигнала рецептора. В некоторых опухолях мутации в HRAS или его вышележащих эффекторах вызывают его непрерывное включение, что приводит к постоянной активации нижележащих сигналов роста и пролиферации, запускающих рост опухолевых клеток. FTI предотвращают аномальный рост и пролиферацию клеток, зависящих от этих путей передачи сигнала, ингибируя фарнезилирование белков и последующую мембранную локализацию HRAS, таким образом, выключая HRAS.

[00197] FTI, такие как типифарниб, предотвращают фарнезилирование белков, тип модификации белков, известный как пренилирование, который вместе с другими модификациями белков

делает возможной мембранную локализацию HRAS, где он может принимать и передавать внеклеточные сигналы, вносящие свой вклад в возникновение и развитие злокачественного новообразования. FTI, такие как типифарниб, могут блокировать фарнезилирование и последующую мембранную локализацию HRAS и ингибируют онкогенную, запускаемую HRAS трансформацию клеток *in vitro* и *in vivo*. Хотя K-ras и N-ras схожим образом используют фарнезилирование белков, они также могут использовать родственный путь пренилирования, что также приводит к мембранной локализации. При этом мембранная локализация HRAS зависит исключительно от фарнезилирования белков.

[00198] Рак головы и шеи и рак легких, подлежащие лечению способами, представленными в настоящем описании, имеют мутации HRAS. Способы, представленные в настоящем описании или иным образом известные в этой области, можно использовать для определения мутационного статуса гена HRAS. В некоторых вариантах осуществления мутационный статус гена HRAS можно определять с помощью анализа на основе NGS. В некоторых вариантах осуществления мутационный статус гена HRAS можно определять посредством качественного анализа на основе ПЦР. Качественный анализ на основе ПЦР технически может быть схожим с анализами на основе ПЦР, уже разработанными и одобренными FDA для K-ras. В некоторых вариантах осуществления мутационный статус гена HRAS можно определять в форме диагностики, сопутствующей лечению FTI, такому как лечение типифарнибом. Сопутствующую диагностику можно осуществлять в лечебном учреждении, где пациента подвергают лечению типифарнибом, или в отдельном учреждении.

[00199] Настоящее изобретение относится к способам лечения рефрактерной к ингибитору EGFR плоскоклеточной карциномы головы и шеи (SCCHN), где SCCHN содержит мутацию HRAS, включающим введение индивидууму ингибитора фарнезилтрансферазы (FTI). В некоторых вариантах осуществления указанная мутация HRAS включает замену аминокислоты в кодоне, выбранном из группы, состоящей из G12, G13, Q61, Q22, K117, A146 и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN

не содержит мутацию K-Ras или мутацию N-Ras. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN содержит K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN является HPV-отрицательной. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN является HPV-положительной. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN находится на поздней стадии или является метастатической. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN является рецидивирующей SCCHN. В некоторых вариантах осуществления SCCHN является SCCHN трахеи. В некоторых вариантах осуществления SCCHN является SCCHN верхней челюсти. В некоторых вариантах осуществления SCCHN является SCCHN ротовой полости. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является цетуксимабом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является эрлотинибом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является gefitinибом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является панитумумабом. В некоторых вариантах осуществления FTI является типифарнибом. В некоторых вариантах осуществления указанный FTI вводят в комбинации с химиотерапией. В некоторых вариантах осуществления указанная химиотерапия включает средство на основе платины, таксан или их комбинация.

[00200] Настоящее изобретение относится к способам лечения SCCHN у индивидуума с использованием FTI или выбора пациентов с SCCHN для лечения FTI с учетом наличия мутации HRAS, где SCCHN является рефрактерным к лечению ингибитором EGFR. В некоторых вариантах осуществления SCCHN является HPV-отрицательной. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN является HPV-положительной. В некоторых вариантах осуществления способы включают (a) определение SCCHN как рефрактерной к лечению ингибитором EGFR, (b) определение наличия мутации HRAS у пациента с SCCHN, а затем (c) введение пациенту терапевтически эффективного количества типифарниба. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения резистентной к ингибитору EGFR плоскоклеточной карциномы головы и шеи у индивидуума с FTI. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является цетуксимабом. В некоторых вариантах

осуществления ингибитор EGFR является эрлотинибом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является гефитинибом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является панитумумабом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является панитумумабом. В некоторых вариантах осуществления указанный типифарниб вводят в комбинации с химиотерапией. В некоторых вариантах осуществления указанная химиотерапия включает средство на основе платины, таксан или их комбинацию.

[00201] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения SCCHN у индивидуума с использованием FTI или выбора пациентов с SCCHN для лечения FTI с учетом наличия мутации HRAS, где пациента ранее не подвергали лечению ингибитором EGFR. В некоторых вариантах осуществления SCCHN является HPV-отрицательной. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN является HPV-положительной. В некоторых вариантах осуществления способы включают (a) определение того, что пациента ранее не подвергали лечению ингибитором EGFR, (b) определение наличия мутации HRAS у пациента с SCCHN, а затем (c) введение пациенту терапевтически эффективного количества типифарниба и отсутствие введения ингибитора EGFR. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является цетуксимабом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является эрлотинибом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является гефитинибом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является панитумумабом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является панитумумабом. В некоторых вариантах осуществления указанный типифарниб вводят в комбинации с химиотерапией. В некоторых вариантах осуществления указанная химиотерапия включает средство на основе платины, таксан или их комбинацию.

[00202] Настоящее изобретение относится к способам лечения рефрактерной к ингибитору EGFR плоскоклеточной карциномы легких (SCC легких), где SCC легких содержит мутацию HRAS, включающим введение индивидууму ингибитора фарнезилтрансферазы (FTI). В некоторых вариантах осуществления указанная мутация HRAS включает замену аминокислоты в кодоне, выбранном из группы,

состоящей из G12, G13, Q61, Q22, K117, A146 и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких не содержит мутацию K-Ras или мутацию N-Ras. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких содержит K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких является HPV-отрицательной. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких является HPV-положительной. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких находится на поздней стадии или является метастатической. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких является рецидивирующей SCC легких. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является цетуксимабом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является эрлотинибом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является gefitinibом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является panitumumabом. В некоторых вариантах осуществления FTI является типифарнибом. В некоторых вариантах осуществления указанный FTI вводят в комбинации с химиотерапией. В некоторых вариантах осуществления указанная химиотерапия включает средство на основе платины, таксан или их комбинацию.

[00203] Настоящее изобретение относится к способам лечения SCC легких у индивидуума с использованием FTI или выбора пациентов с SCC легких для лечения FTI с учетом наличия мутации HRAS, где SCC легких является рефрактерной к лечению ингибитором EGFR. В некоторых вариантах осуществления SCC легких является HPV-отрицательной. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких является HPV-положительной. В некоторых вариантах осуществления способы включают (a) определение SCC легких как рефрактерной к лечению ингибитором EGFR, (b) определение наличия мутации HRAS у пациента с SCC легких, а затем (c) введение пациенту терапевтически эффективного количества типифарниба. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения резистентной к ингибитору EGFR плоскоклеточной карциномы легких у индивидуума с FTI. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является цетуксимабом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR

является эрлотинибом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является гефитинибом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является панитумумабом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является панитумумабом. В некоторых вариантах осуществления указанный типифарниб вводят в комбинации с химиотерапией. В некоторых вариантах осуществления указанная химиотерапия включает средство на основе платины, таксан или их комбинацию.

[00204] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения SCC легких у индивидуума с использованием FTI или выбора пациентов с SCC легких для лечения FTI с учетом наличия мутации HRAS, где пациента ранее не подвергали лечению ингибитором EGFR. В некоторых вариантах осуществления SCC легких является HPV-отрицательной. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких является HPV-положительной. В некоторых вариантах осуществления способы включают (a) определение того, что пациента ранее не подвергали лечению ингибитором EGFR, (b) определение наличия мутации HRAS у пациента с SCC легких, а затем (c) введение пациенту терапевтически эффективного количества типифарниба и отсутствие введения ингибитора EGFR. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является цетуксимабом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является эрлотинибом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является гефитинибом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является панитумумабом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является панитумумабом. В некоторых вариантах осуществления указанный типифарниб вводят в комбинации с химиотерапией. В некоторых вариантах осуществления указанная химиотерапия включает средство на основе платины, таксан или их комбинацию.

[00205] В некоторых вариантах осуществления мутация HRAS является мутацией в кодоне, выбранном из группы, состоящей из G12, G13, Q61, Q22, K117 и A146. В некоторых вариантах осуществления мутация HRAS может являться мутацией, выбранной из группы, состоящей из замены аминокислот G12R, G12V, G13C, G13R,

Q61L, Q61R, Q22K, K117N и A146P. В некоторых вариантах осуществления мутация может являться мутацией в другом кодоне, приводящей к активации белка HRAS.

[00206] В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в настоящем описании, дополнительно включают (а) определение наличия или отсутствия мутации K-Ras и мутации N-Ras в образце индивидуума, а затем (b) введение индивидууму терапевтически эффективного количества FTI, если образец не содержит мутацию K-Ras или мутацию N-Ras. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение индивидууму терапевтически эффективного количества FTI, если образец содержит K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа. В некоторых вариантах осуществления указанный FTI вводят в комбинации с химиотерапией. В некоторых вариантах осуществления указанная химиотерапия включает средство на основе платины, таксан или их комбинацию.

[00207] В некоторых вариантах осуществления мутация K-Ras является мутацией K_A-Ras. В некоторых вариантах осуществления мутация K-Ras является мутацией K_B-Ras. В некоторых вариантах осуществления мутация K-Ras является комбинацией мутации K_A-Ras и мутации K_B-Ras. Мутация K-Ras может включать мутацию в кодоне, выбранном из группы, состоящей из G12, G13 и Q61 K_A-Ras, K_B-Ras или и того, и другого. В некоторых вариантах осуществления мутация K_A-Ras может включать мутацию, выбранную из группы, состоящей из замены аминокислот G12C, G12D, G12A, G12V, G12S, G12F, G12R, G12N, G13C, G13D, G13R, G13S, G13N, Q61K, Q61H, Q61L, Q61P, Q61R и A146V. В некоторых вариантах осуществления мутация K_B-Ras может включать мутацию, выбранную из группы, состоящей из замены аминокислот G12C, G12D, G12A, G12V, G12S, G12F, G12R, G12N, G13C, G13D, G13R, G13S, G13N, Q61K, Q61H, Q61L, Q61P, Q61R и A146V.

[00208] В некоторых вариантах осуществления мутация N-Ras может включать по меньшей мере одну мутацию в кодоне, выбранном из группы, состоящей из G12, G13, G15, G60 и Q61. В некоторых вариантах осуществления мутация N-Ras может включать по меньшей мере одну мутацию в кодоне, выбранном из группы, состоящей из

G12, G13 и Q61. В некоторых вариантах осуществления мутация N-Ras может включать по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из замен аминокислот G12C, G12D, G12F, G12S, G12A, G12V, G12R, G13C, G13R, G13A, G13D, G13V, G15W, G60E, Q61P, Q61L, Q61R, Q61K, Q61H и Q61E.

[00209] В некоторых вариантах осуществления определяют, что образец не содержит замену аминокислоты в G12, G13 и Q61 K-Ras, а также не содержит замену аминокислоты в G12, G13 и Q61 N-Ras. В некоторых вариантах осуществления определяют, что образец не содержит какую-либо мутацию K-Ras или какую-либо мутацию N-Ras. В некоторых вариантах осуществления определяют, что образец содержит K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа.

[00210] В некоторых вариантах осуществления способ, представленный в настоящем описании, включает (a) определение наличия или отсутствия мутации HRAS, мутации K-Ras и мутации N-Ras в образце индивидуума, а затем (b) введение индивидууму терапевтически эффективного количества FTI, если определяют, что образец содержит мутацию HRAS, но не мутацию K-Ras или мутацию N-Ras. Образец может являться образцом опухоли. В некоторых вариантах осуществления способы включают (a) определение наличия мутации HRAS и K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа у пациента SCCHN, а затем (b) введение индивидууму терапевтически эффективного количества FTI. В некоторых вариантах осуществления FTI является типифарнибом. В некоторых вариантах осуществления указанный FTI вводят в комбинации с химиотерапией. В некоторых вариантах осуществления указанная химиотерапия включает средство на основе платины, таксан или их комбинацию.

[00211] Настоящее изобретение относится к способам лечения SCCHN у индивидуума с использованием FTI и способам выбора пациентов со злокачественными новообразованиями для лечения FTI с учетом наличия мутации HRAS. Настоящее изобретение также относится к способам лечения предзлокачественного состояния головы и шеи у индивидуума с использованием FTI и способам выбора пациентов с предзлокачественным состоянием головы и шеи для лечения FTI с учетом мутационного статуса HRAS.

[00212] В некоторых вариантах осуществления настоящее

изобретение относится к способам лечения SCCHN у индивидуума с использованием FTI или выбора пациентов с SCCHN для лечения FTI с учетом наличия мутации HRAS. Злокачественное новообразование может быть связано с папилломавирусом человека (HPV+ или HPV-положительное) или не связано с HPV (HPV- или HPV-отрицательное).

[00213] Настоящее изобретение относится к способам прогнозирования отвечаемости пациента SCCHN на лечение FTI, способам выбора популяции пациентов с SCCHN для лечения FTI и способам лечения SCCHN у индивидуума с использованием терапевтически эффективного количества FTI с учетом наличия мутации HRAS в образце пациента. Мутационный статус HRAS можно определять на уровне нуклеиновой кислоты или белка. В некоторых вариантах осуществления мутационный статус HRAS определяют посредством анализа нуклеиновых кислот, полученных из образца. В некоторых вариантах осуществления мутационный статус HRAS определяют посредством анализа белка, полученного из образца.

[00214] В некоторых вариантах осуществления способы включают (a) определение наличия легких мутации HRAS, K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа у пациента с SCC, а затем (b) введение индивидууму терапевтически эффективного количества FTI. В некоторых вариантах осуществления FTI является типифарнибом. В некоторых вариантах осуществления указанный FTI вводят в комбинации с химиотерапией. В некоторых вариантах осуществления указанная химиотерапия включает средство на основе платины, таксан или их комбинацию.

[00215] Настоящее изобретение относится к способам лечения SCC легких у индивидуума с использованием FTI и способам выбора пациентов со злокачественными новообразованиями для лечения FTI с учетом наличия мутации HRAS. Настоящее изобретение также относится к способам лечения предзлокачественного состояния легких у индивидуума с использованием FTI и способам выбора пациентов с предзлокачественным состоянием легких для лечения FTI с учетом мутационного статуса HRAS.

[00216] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения SCC легких у

индивидуума с использованием FTI или выбора пациентов с SCC легких для лечения FTI с учетом наличия мутации HRAS. Злокачественное новообразование может быть связано с папилломавирусом человека (HPV+ или HPV-положительное) или не связано с HPV (HPV- или HPV-отрицательное).

[00217] Настоящее изобретение относится к способам прогнозирования отвечаемости пациента с SCC легких на лечение FTI, способам выбора популяции пациентов с SCC легких для лечения FTI и способам лечения SCC легких у индивидуума с использованием терапевтически эффективного количества FTI с учетом наличия мутации HRAS в образце пациента. Мутационный статус HRAS можно определять на уровне нуклеиновой кислоты или белка. В некоторых вариантах осуществления мутационный статус HRAS определяют посредством анализа нуклеиновых кислот, полученных из образца. В некоторых вариантах осуществления мутационный статус HRAS определяют посредством анализа белка, полученного из образца.

[00218] В некоторых вариантах осуществления мутационный статус HRAS определяют посредством анализа нуклеиновых кислот, полученных из образца. Нуклеиновые кислоты могут представлять собой молекулы мРНК или геномной ДНК тестируемого индивидуума. Способы определения мутационного статуса Ras посредством анализа нуклеиновых кислот хорошо известны в этой области. В некоторых вариантах осуществления способы включают секвенирование, полимеразную цепную реакцию (ПЦР), ДНК-микрочип, масс-спектрометрию (MS), анализ однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), денатурирующую высокоэффективную жидкостную хроматографию (DHPLC) или анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP). В некоторых вариантах осуществления мутационный статус Ras определяют стандартными способами секвенирования, включая, например, секвенирование по Сэнгеру, секвенирование нового поколения (NGS). В некоторых вариантах осуществления мутационный статус Ras определяют с использованием MS.

[00219] В некоторых вариантах осуществления мутационный статус HRAS определяют посредством анализа белка, полученного из образца. Мутантный Н-белок Ras можно определять с помощью

различных подходов иммуногистохимии (IHC), иммуноблоттинга, твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) или других иммунологических анализов, известных в этой области.

[00220] Как будет понятно специалисту в этой области, для определения наличия или отсутствия мутации HRAS можно использовать любые способы, представленные в настоящем описании или иным образом известные в этой области для анализа мутаций Ras.

5.2. Образцы

[00221] В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в настоящем описании, включают получение образца из индивидуума. В некоторых вариантах осуществления образец является образцом опухоли. В некоторых вариантах осуществления образец, используемый в способах по изобретению, включает биоптат (например, биоптат опухоли). Биоптат можно получать из любого органа или ткани, например, кожи, печени, легких, сердца, толстого кишечника, почки, костного мозга, зубов, лимфоузла, волос, селезенки, головного мозга, молочной железы или других органов. Для получения образца из индивидуума можно использовать любой способ биопсии, известный специалистам в этой области, например, открытую биопсию, закрытую биопсию, пункционную биопсию, инцизионную биопсию, эксцизионную биопсию или тонкоигольную аспирационную пункционную биопсию.

[00222] Образец, используемый в способах, представленных в настоящем описании, включает физиологические жидкости индивидуума. Неограничивающие примеры физиологических жидкостей включают кровь (например, цельную периферическую кровь, периферическую кровь), плазму крови, костный мозг, амниотическую жидкость, водянистую влагу, желчь, лимфу, менструальные выделения, сыворотку, мочу, спинномозговую жидкость, окружающую головной и спинной мозг, синовиальную жидкость, окружающую суставы.

[00223] В одном из вариантов осуществления образец является образцом костного мозга. Способы получения образца костного мозга хорошо известны в этой области, включая, в качестве неограничивающих примеров, биопсию костного мозга и аспирацию

костного мозга. Костный мозг содержит жидкую часть и более твердую часть. При биопсии костного мозга получают образец твердой части. При аспирации костного мозга получают образец жидкой части. Биопсию костного мозга и аспирацию костного мозга можно осуществлять одновременно и обозначать как исследование костного мозга.

[00224] В некоторых вариантах осуществления образец является образцом крови. Образец крови можно получать общепринятыми способами, как описано, например, в *Innis et al*, editors, *PCR Protocols* (Academic Press, 1990). Лейкоциты можно отделять от образцов крови общепринятыми способами или с помощью коммерчески доступных наборов, например, набора RosetteSep (Stein Cell Technologies, Vancouver, Canada). Субпопуляции лейкоцитов, например, моноклеарные клетки, NK-клетки, В-клетки, Т-клетки, моноциты, гранулоциты или лимфоциты, также можно выделять общепринятыми способами, например, посредством магнитно-активированной сортировки клеток (MACS) (Miltenyi Biotec, Auburn, California) или активируемой флуоресценцией сортировки клеток (FACS) (Becton Dickinson, San Jose, California).

[00225] В некоторых вариантах осуществления образец, используемый в способах, представленных в настоящем описании, включает множество клеток. Такие клетки могут включать любой тип клеток, например, стволовые клетки, клетки крови (например, PBMC), лимфоциты, NK-клетки, В-клетки, Т-клетки, моноциты, гранулоциты, иммунные клетки или опухолевые или злокачественные клетки. Конкретные популяции клеток можно получать с использованием комбинации коммерчески доступных антител (например, Quest Diagnostic (San Juan Capistrano, Calif.); Dako (Denmark)).

[00226] В некоторых вариантах осуществления образец, используемый в способах по изобретению, получают из пораженной ткани, например, из индивидуума, имеющего SCCHN. В некоторых вариантах осуществления клетки можно получать из опухоли, или злокачественных клеток, или опухолевой ткани, такой как биоптат опухоли или эксплантат опухоли. В некоторых вариантах

осуществления количество клеток, используемых в способах, представленных в настоящем описании, может находиться в диапазоне от отдельной клетки до приблизительно 10^9 клеток. В некоторых вариантах осуществления количество клеток, используемых в способах по изобретению, составляет приблизительно 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 или 5×10^8 .

[00227] Количество и тип клеток, полученных из индивидуума, можно подвергать мониторингу, например, измеряя изменения морфологии и поверхностных клеточных маркеров с использованием стандартных способов детекции клеток, таких как проточная цитометрия, сортировка клеток, иммуноцитохимия (например, окрашивание тканеспецифическими или специфическими для клеточных маркеров антителами), активируемая флуоресценцией сортировка клеток (FACS), магнитно-активируемая сортировка клеток (MACS), посредством исследования морфологии клеток с использованием световой или конфокальной микроскопии и/или измерения изменений экспрессии генов способами, хорошо известными в этой области, такими как ПЦР и определение профиля экспрессии генов. Эти способы также можно использовать для идентификации клеток, положительных по одному или более конкретным маркерам. Активируемая флуоресценцией сортировка клеток (FACS) является хорошо известным способом разделения частиц, включая клетки, с учетом флуоресцентных свойств частиц (Kamarch, 1987, Methods Enzymol, 151:150-165). Лазерное возбуждение флуоресцентных веществ в отдельных частицах приводит к возникновению небольшого электрического заряда, делающего возможным электромагнитное разделение положительных и отрицательных частиц в смеси. В одном из вариантов осуществления специфические для поверхностного клеточного маркера антитела или лиганды метят разными флуоресцентными метками. Клетки пропускают через клеточный сортер, делая возможным разделение клеток по их способности связываться с используемыми антителами. Сортированные с помощью FACS частицы можно помещать непосредственно в отдельные лунки 96-луночных или 384-луночных планшетов для облегчения разделения

и клонирования.

[00228] В некоторых вариантах осуществления субпопуляции клеток используют в способах, представленных в настоящем описании. Способы сортировки и выделения конкретных популяций клеток хорошо известны в этой области и могут быть основаны на размере клеток, их морфологии или внутриклеточных или внеклеточных маркерах. Такие способы включают, в качестве неограничивающих примеров, проточную цитометрию, проточную сортировку, FACS, разделение с использованием частиц, такое как магнитная сортировка клеток, разделение по размеру (например, с помощью сита, набора барьеров или фильтра), сортировку с помощью микрофлюидного устройства, разделение с помощью антитела, седиментацию, аффинную адсорбцию, аффинную экстракцию, центрифугирование в градиенте плотности, лазерную захватывающую микродиссекцию и т.д.

5.3. Злокачественные новообразования

[00229] Настоящее изобретение относится к способам лечения рефрактерной к ингибитору EGFR плоскоклеточной карциномы головы и шеи (SCCHN), где SCCHN содержит мутацию HRAS, включающим введение индивидууму ингибитора фарнезилтрансферазы (FTI). В некоторых вариантах осуществления указанная мутация HRAS включает замену аминокислоты в кодоне, выбранном из группы, состоящей из G12, G13, Q61, Q22, K117, A146 и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN не содержит мутацию K-Ras или мутацию N-Ras. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN содержит K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN является HPV-отрицательной. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN является HPV-положительной. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN находится на поздней стадии или является метастатической. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN является рецидивирующей SCCHN. В некоторых вариантах осуществления SCCHN является SCCHN трахеи. В некоторых вариантах осуществления SCCHN является SCCHN верхней челюсти. В некоторых вариантах осуществления SCCHN является SCCHN ротовой полости. В некоторых

вариантах осуществления ингибитор EGFR является цетуксимабом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является эрлотинибом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является гефитинибом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является панитумумабом. В некоторых вариантах осуществления FTI является типифарнибом. В некоторых вариантах осуществления указанный FTI вводят в комбинации с химиотерапией. В некоторых вариантах осуществления указанная химиотерапия включает средство на основе платины, таксан или их комбинацию.

[00230] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения рефрактерной к ингибитору EGFR SCCHN у индивидуума, имеющего мутацию HRAS, включающим введение индивидууму FTI. В некоторых вариантах осуществления указанная мутация HRAS включает замену аминокислоты в кодоне, выбранном из группы, состоящей из G12, G13, Q61, Q22, K117, A146 и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN не содержит мутацию K-Ras или мутацию N-Ras. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN содержит K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN является HPV-отрицательной. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN является HPV-положительной. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN находится на поздней стадии или является метастатической. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN является рецидивирующей SCCHN. В некоторых вариантах осуществления SCCHN является SCCHN трахеи. В некоторых вариантах осуществления SCCHN является SCCHN верхней челюсти. В некоторых вариантах осуществления SCCHN является SCCHN ротовой полости. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является цетуксимабом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является эрлотинибом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является гефитинибом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является панитумумабом. В некоторых вариантах осуществления FTI является типифарнибом. В некоторых вариантах осуществления указанный FTI вводят в комбинации с химиотерапией. В некоторых вариантах осуществления

указанная химиотерапия включает средство на основе платины, таксан или их комбинацию.

[00231] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения SCCHN у индивидуума с использованием FTI или выбора пациентов с SCCHN для лечения FTI с учетом наличия мутации HRAS. В некоторых вариантах осуществления SCCHN является HPV-отрицательной. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN является HPV-положительной. В некоторых вариантах осуществления способы включают (a) определение наличия мутации HRAS у пациента с HPV-отрицательной SCCHN, а затем (b) введение пациенту терапевтически эффективного количества типифарниба. В некоторых вариантах осуществления указанный типифарниб вводят в комбинации с химиотерапией. В некоторых вариантах осуществления указанная химиотерапия включает средство на основе платины, таксан или их комбинацию.

[00232] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения SCCHN у индивидуума с использованием FTI или выбора пациентов SCCHN для лечения FTI с учетом наличия мутации HRAS и резистентности к ингибитору EGFR. В некоторых вариантах осуществления SCCHN является HPV-отрицательной. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN является HPV-положительной. В некоторых вариантах осуществления способы включают (a) определение наличия мутации HRAS и резистентности к ингибитору EGFR у пациента с HPV-отрицательной SCCHN, а затем (b) введение пациенту терапевтически эффективного количества типифарниба. В некоторых вариантах осуществления указанный типифарниб вводят в комбинации с химиотерапией. В некоторых вариантах осуществления указанная химиотерапия включает средство на основе платины, таксан или их комбинацию.

[00233] Плоскоклеточная карцинома головы и шеи (SCCHN) является 6-ым по частоте злокачественным новообразованием во всем мире с приблизительно 650000 случаями и 200000 случаями гибели в год по всему миру и приблизительно 54000 новыми случаями в год в США. Она также является наиболее

распространенным злокачественным новообразованием в Центральной Азии.

[00234] SCCHN имеет 2 разные этиологии и соответствующие типы опухолей. Первый подтип ассоциирован с курением и потреблением алкоголя и не связан с папилломавирусом человека (HPV- или HPV-отрицательный). Второй подтип ассоциирован с инфекцией HPV высокого риска (HPV+ или HPV-положительный). Второй подтип в значительной степени ограничен злокачественными новообразованиями ротоглотки. HPV+ опухоли представляют собой отдельный тип с лучшим прогнозом, и в их случае может потребоваться другое лечение.

[00235] Значительная доля SCCHN, в частности, злокачественные новообразования ротоглотки, вызваны инфекцией HPV. На HPV высокого риска подтипа 16 приходится 85% всех HPV+ опухолей среди SCCHN. P16 можно использовать в качестве суррогатного маркера инфекции HPV при SCCHN, в частности, в ротоглотке. Доступно более точное тестирование HPV, основанное на детекции E6/E7 (Liang C, et al. Cancer Res. 2012;72:5004-5013).

[00236] При HPV+ SCCHN наблюдают значимо более низкие уровни экспрессии EGFR, чем при HPV- SCCHN. Амплификация EGFR происходит только при HPV- SCCHN. Высокое число копий гена EGFR и экспрессия белка ассоциированы с плохим клиническим исходом при SCCHN на поздних стадиях.

[00237] В настоящее время, терапия первой линии для рецидивирующей/метастатической SCCHN включают двухкомпонентную терапию препаратами платины (например, цисплатин/5-FU или карбоплатин/паклитаксел), необязательно, в комбинации с терапией антителом против EGFR (например, цетуксимабом, панитумумабом, афатинибом). Терапия второй линии включает таксаны, метотрексат, и/или цетуксимаб. Терапию антителом против EGFR, таким как цетуксимаб (химерный IgG1) или панитумумаб, можно использовать в качестве монотерапии, с химиотерапией (например, платина/5-FU, цисплатин) или с лучевой терапией. Несмотря на высокие уровни экспрессии EGFR при SCCHN, частота ответов при монотерапии в случае цетуксимаба составляет лишь 13% с SD 33%, и в настоящее

время нет доступного прогностического биомаркера.

[00238] Лекарственные средства от SCCHN на стадии разработки включают средства, воздействующие на путь PI3K: BKM120 (бупарлисиб)+цетуксимаб, BYL719+цетуксимаб, темсиролимус+цетуксимаб, ригосертиб+цетуксимаб; средства, воздействующие на путь MET: тивантиниб+цетуксимаб, фиклатузумаб+цетуксимаб; средства, воздействующие на путь EGFR/HER3: афатиниб+цетуксимаб $\pm$ паклитаксел, патритумаб; средства, воздействующие на путь FGFR: BGJ398; средства, воздействующие на путь CDK4/6 в клеточном цикле: палбоциклиб, LEE011; ингибитор RTK: анлотиниб, и химиотерапевтическое средство: пероральный азацитидин. Другие варианты терапии SCCHN, предложенные за последнее время, включают иммунотерапевтические средства, такие как антитела против PD1 или против PDL1.

[00239] Хотя в случае локализованного и местно-регионального заболевания при использовании хирургического вмешательства, лучевой терапии, химиолучевой терапии и индукционной химиотерапии достигали высокого показателя излечения, показатели выживаемости в случае рецидивирующего/метастатического заболевания остаются очень плохими, и необходимы более подходящие варианты лечения.

[00240] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения SCCHN у индивидуума с использованием FTI или выбора пациентов с SCCHN для лечения FTI с учетом наличия мутации HRAS, где SCCHN является рефрактерной к лечению ингибитором EGFR. В некоторых вариантах осуществления SCCHN является HPV-отрицательной. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN является HPV-положительной. В некоторых вариантах осуществления способы включают (a) определение SCCHN как рефрактерной к лечению ингибитором EGFR, (b) определение наличия мутации HRAS у пациента с SCCHN, а затем (c) введение пациенту терапевтически эффективного количества типифарниба. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения резистентной к ингибитору EGFR плоскоклеточной карциномы у индивидуума с

использованием FTI. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является цетуксимабом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является эрлотинибом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является gefitinibом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является panitumumabом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является panitumumabом. В некоторых вариантах осуществления пациента подвергали лечению ингибитором EGFR, что привело к развитию прогрессирующего заболевания. В некоторых вариантах осуществления указанный типифарниб вводят в комбинации с химиотерапией. В некоторых вариантах осуществления указанная химиотерапия включает средство на основе платины, таксан или их комбинацию.

[00241] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения SCCHN у индивидуума с использованием FTI или выбора пациентов с SCCHN для лечения FTI с учетом наличия мутации HRAS, где пациента ранее не подвергали лечению ингибитором EGFR. В некоторых вариантах осуществления SCCHN является HPV-отрицательной. В некоторых вариантах осуществления указанная SCCHN является HPV-положительной. В некоторых вариантах осуществления способы включают (a) определение того, что пациента ранее не подвергали лечению ингибитором EGFR, (b) определение наличия мутации HRAS у пациента с SCCHN, а затем (c) введение пациенту терапевтически эффективного количества типифарниба и отсутствие введения ингибитора EGFR. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является цетуксимабом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является эрлотинибом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является gefitinibом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является panitumumabом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является panitumumabом. В некоторых вариантах осуществления указанный типифарниб вводят в комбинации с химиотерапией. В некоторых вариантах осуществления указанная химиотерапия включает средство на основе платины, таксан или их комбинацию.

[00242] Ингибитор EGFR, к которому SCCHN является

рефрактерной, может являться любым ингибитором EGFR, известным в этой области. Ингибитор EGFR может являться антителом против EGFR или его антигенсвязывающим фрагментом, например, цетуксимабом (ERBITUX®; Bristol-Myers Squibb/Lilly), панитумумабом (VECTIBIX®; Amgen) или залутумумабом (Genmab). Ингибитор EGFR также может являться низкомолекулярным ингибитором. Неограничивающие примеры ингибиторов EGFR включают обратимые и необратимые ингибиторы, такие как эрлотиниб (TARCEVA®; Genentech/Astellas Oncology), AZD9291 (AstraZeneca), гефитиниб (IRESSA®; AstraZeneca), икотиниб (BPI-2009H; Beta Pharma), роцитиниб (CO-1686, AVL-301; Clovis Oncology), позиотиниб, (NOV120101, HM781-36B; Hanmi Pharmaceuticals/Spectrum Pharmaceuticals), афатиниб (BIBW2292; Boehringer Ingelheim), пелитиниб (EKB-569; Wyeth Pharmaceuticals), ASP8273 (Astellas), луминеспиб (AUY922; Vernalis/Novartis) и XL647 (Exelixis).

[00243] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения SCCHN у индивидуума с учетом наличия мутации HRAS и резистентности к ингибитору EGFR. В некоторых вариантах осуществления SCCHN может являться HPV-отрицательной SCCHN. В некоторых вариантах осуществления SCCHN может являться HPV-положительной SCCHN. В некоторых вариантах осуществления SCCHN может являться рецидивирующей SCCHN. В некоторых вариантах осуществления SCCHN может являться метастатической SCCHN. Способ, представленный в настоящем описании, включает (а) определение наличия или отсутствия мутации HRAS в образце индивидуума, а затем (b) введение терапевтически эффективного количества FTI индивидууму, если определяют, что образец содержит мутацию HRAS. Способ, представленный в настоящем описании, включает (а) определение наличия или отсутствия мутации HRAS в образце индивидуума, (b) определение резистентности к ингибитору EGFR, а затем (c) введение терапевтически эффективного количества FTI индивидууму, если определяют, что образец содержит мутацию HRAS, и определяют резистентность к ингибитору EGFR. Образец может являться

образцом опухоли. В некоторых вариантах осуществления способы включают (a) определение наличия мутации HRAS у пациента с SCCHN, а затем (b) введение индивидууму терапевтически эффективного количества FTI. В некоторых вариантах осуществления способы включают (a) определение наличия мутации HRAS у пациента с SCCHN и (b) определение резистентности к ингибитору EGFR, а затем (c) введение индивидууму терапевтически эффективного количества FTI. В некоторых вариантах осуществления FTI является типифарнибом. В некоторых вариантах осуществления указанный FTI вводят в комбинации с химиотерапией. В некоторых вариантах осуществления указанная химиотерапия включает средство на основе платины, таксан или их комбинацию.

[00244] Настоящее изобретение относится к способам лечения рефрактерной к ингибитору EGFR плоскоклеточной карциномы легких (SCC легких), где SCC легких содержит мутацию HRAS, включающим введение индивидууму ингибитора фарнезилтрансферазы (FTI). В некоторых вариантах осуществления указанная мутация HRAS включает замену аминокислоты в кодоне, выбранном из группы, состоящей из G12, G13, Q61, Q22, K117, A146 и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких не содержит мутацию K-Ras или мутацию N-Ras. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких содержит K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких является HPV-отрицательной. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких является HPV-положительной. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких находится на поздней стадии или является метастатической. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких является рецидивирующей SCC легких. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является цетуксимабом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является эрлотинибом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является гефитинибом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является панитумумабом. В некоторых вариантах осуществления FTI является типифарнибом. В некоторых вариантах осуществления указанный FTI вводят в комбинации с химиотерапией.

В некоторых вариантах осуществления указанная химиотерапия включает средство на основе платины, таксан или их комбинацию.

[00245] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения рефрактерной к ингибитору EGFR SCC легких у индивидуума, имеющего мутацию HRAS, включающим введение индивидууму FTI. В некоторых вариантах осуществления указанная мутация HRAS включает замену аминокислоты в кодоне, выбранном из группы, состоящей из G12, G13, Q61, Q22, K117, A146 и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких не содержит мутацию K-Ras или мутацию N-Ras. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких содержит K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких является HPV-отрицательной. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких является HPV-положительной. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких находится на поздней стадии или является метастатической. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких является рецидивирующей SCC легких. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является цетуксимабом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является эрлотинибом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является gefitinibом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является панитумумабом. В некоторых вариантах осуществления FTI является типифарнибом. В некоторых вариантах осуществления указанный FTI вводят в комбинации с химиотерапией. В некоторых вариантах осуществления указанная химиотерапия включает средство на основе платины, таксан или их комбинацию.

[00246] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения SCC легких у индивидуума с использованием FTI или выбора пациентов с SCC легких для лечения FTI с учетом наличия мутации HRAS. В некоторых вариантах осуществления SCC легких является HPV-отрицательной. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких является HPV-положительной. В некоторых вариантах осуществления способы включают (а) определение наличия мутации

HRAS у пациента с HPV-отрицательной SCC легких, а затем (b) введение пациенту терапевтически эффективного количества типифарниба. В некоторых вариантах осуществления указанный типифарниб вводят в комбинации с химиотерапией. В некоторых вариантах осуществления указанная химиотерапия включает средство на основе платины, таксан или их комбинацию.

[00247] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения SCC легких у индивидуума с использованием FTI или выбора пациентов с SCC легких для лечения FTI с учетом наличия мутации HRAS и резистентности к ингибитору EGFR. В некоторых вариантах осуществления SCC легких является HPV-отрицательной. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких является HPV-положительной. В некоторых вариантах осуществления способы включают (a) определение наличия мутации HRAS и резистентности к ингибитору EGFR у пациента с HPV-отрицательной SCC легких, а затем (b) введение пациенту терапевтически эффективного количества типифарниба. В некоторых вариантах осуществления указанный типифарниб вводят в комбинации с химиотерапией. В некоторых вариантах осуществления указанная химиотерапия включает средство на основе платины, таксан или их комбинацию.

[00248] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения SCC легких у индивидуума с использованием FTI или выбора пациентов с SCC легких для лечения FTI с учетом наличия мутации HRAS, где SCC легких является рефрактерной к лечению ингибитором EGFR. В некоторых вариантах осуществления SCC легких является HPV-отрицательной. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких является HPV-положительной. В некоторых вариантах осуществления способы включают (a) определение SCC легких как рефрактерной к лечению ингибитором EGFR, (b) определение наличия мутации HRAS у пациента с SCC легких, а затем (c) введение пациенту терапевтически эффективного количества типифарниба. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения резистентной к ингибитору EGFR плоскоклеточной карциномы у индивидуума с использованием FTI. В

некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является цетуксимабом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является эрлотинибом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является гефитинибом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является панитумумабом. В некоторых вариантах осуществления пациента подвергали лечению ингибитором EGFR, что привело к развитию прогрессирующего заболевания. В некоторых вариантах осуществления указанный типифарниб вводят в комбинации с химиотерапией. В некоторых вариантах осуществления указанная химиотерапия включает средство на основе платины, таксан или их комбинацию.

[00249] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения SCC легких у индивидуума с использованием FTI или выбора пациентов с SCC легких для лечения FTI с учетом наличия мутации HRAS, где пациента ранее не подвергали лечению ингибитором EGFR. В некоторых вариантах осуществления SCC легких является HPV-отрицательной. В некоторых вариантах осуществления указанная SCC легких является HPV-положительной. В некоторых вариантах осуществления способы включают (а) определение того, что пациента ранее не подвергали лечению ингибитором EGFR, (b) определение наличия мутации HRAS у пациента с SCC легких, а затем (с) введение пациенту терапевтически эффективного количества типифарниба и отсутствие введения ингибитора EGFR. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является цетуксимабом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является эрлотинибом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является гефитинибом. В некоторых вариантах осуществления ингибитор EGFR является панитумумабом. В некоторых вариантах осуществления указанный типифарниб вводят в комбинации с химиотерапией. В некоторых вариантах осуществления указанная химиотерапия включает средство на основе платины, таксан или их комбинацию.

[00250] Ингибитор EGFR, к которому SCC легких является рефрактерной, может являться любым ингибитором EGFR, известным в этой области. Ингибитор EGFR может являться антителом против

EGFR или его антигенсвязывающим фрагментом, например, цетуксимабом (ERBITUX®; Bristol-Myers Squibb/Lilly), панитумумабом (VECTIBIX®; Amgen) или залутумумабом (Genmab). Ингибитор EGFR также может являться низкомолекулярным ингибитором. Неограничивающие примеры ингибиторов EGFR включают обратимые и необратимые ингибиторы, такие как эрлотиниб (TARCEVA®; Genentech/Astellas Oncology), AZD9291 (AstraZeneca), гефитиниб (IRESSA®; AstraZeneca), икотиниб (BPI-2009H; Beta Pharma), роцилетиниб (CO-1686, AVL-301; Clovis Oncology), позиотиниб (NOV120101, HM781-36B; Hanmi Pharmaceuticals/Spectrum Pharmaceuticals), афатиниб (BIBW2292; Boehringer Ingelheim), пелитиниб (EKB-569; Wyeth Pharmaceuticals), ASP8273 (Astellas), луминеспиб (AUY922; Vernalis/Novartis) и XL647 (Exelixis).

[00251] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения SCC легких у индивидуума с учетом наличия мутации HRAS и резистентности к ингибитору EGFR. В некоторых вариантах осуществления SCC легких может являться HPV-отрицательной SCC легких. В некоторых вариантах осуществления SCC легких может являться HPV-положительной SCC легких. В некоторых вариантах осуществления SCC легких может являться рецидивирующей SCC легких. В некоторых вариантах осуществления SCC легких может являться метастатической SCC легких. Способ, представленный в настоящем описании, включает (а) определение наличия или отсутствия мутации HRAS в образце индивидуума, а затем (b) введение индивидууму терапевтически эффективного количества FTI, если определяют, что образец содержит мутацию HRAS. Способ, представленный в настоящем описании, включает (а) определение наличия или отсутствия мутации HRAS в образце индивидуума, (b) определение резистентности к ингибитору EGFR, а затем (c) введение индивидууму терапевтически эффективного количества FTI, если определяют, что образец содержит мутацию HRAS, и определяют резистентность к ингибитору EGFR. Образец может являться образцом опухоли. В некоторых вариантах осуществления способы включают (а) определение наличия мутации HRAS у пациента с SCC

легких, а затем (b) введение индивидууму терапевтически эффективного количества FTI. В некоторых вариантах осуществления способы включают (a) определение наличия мутации HRAS у пациента с SCC легких и (b) определение резистентности к ингибитору EGFR, а затем (c) введение индивидууму терапевтически эффективного количества FTI. В некоторых вариантах осуществления FTI является типифарнибом. В некоторых вариантах осуществления указанный FTI вводят в комбинации с химиотерапией. В некоторых вариантах осуществления указанная химиотерапия включает средство на основе платины, таксан или их комбинацию.

5.4. Примеры FTI и дозы

[00252] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения SCCHN у индивидуума с использованием типифарниба или выбора пациентов с SCCHN для лечения типифарнибом с учетом наличия мутации HRAS. В некоторых вариантах осуществления способы включают лечение индивидуума с использованием другого FTI, представленного в настоящем описании или иным образом известного в этой области. В некоторых вариантах осуществления FTI выбран из группы, состоящей из типифарниба, арглабина, периллилового спирта, лонафарниба (SCH-66336), L778123, L739749, FTI-277, L744832, CP-609,754, R208176, AZD3409 и BMS-214662.

[00253] В некоторых вариантах осуществления FTI вводят перорально, парентерально, ректально или местно. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят перорально, парентерально, ректально или местно. В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят перорально.

[00254] В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 1-1000 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят дважды в сутки. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 200-1200 мг дважды в сутки. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 600 мг дважды в сутки. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 900 мг дважды в сутки. В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят в дозе 1-1000 мг/кг массы тела. В некоторых

вариантах осуществления типифарниб вводят дважды в сутки. В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят в дозе 200-1200 мг дважды в сутки. В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят в дозе 600 мг дважды в сутки. В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят в дозе 900 мг дважды в сутки.

[00255] В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в циклах лечения. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят с недельными чередованиями. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дни 1-7 и 15-21 28-дневного цикла лечения. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят перорально в дозе 900 мг дважды в сутки в дни 1-7 и 15-21 28-дневного цикла лечения. В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят в циклах лечения. В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят с недельными чередованиями. В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят в дни 1-7 и 15-21 28-дневного цикла лечения. В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят перорально в дозе 900 мг дважды в сутки в дни 1-7 и 15-21 28-дневного цикла лечения.

[00256] В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в течение по меньшей мере 3 циклов. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в течение по меньшей мере 6 циклов. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в течение до 12 циклов. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят перорально в дозе 900 мг дважды в сутки в дни 1-7 и 15-21 28-дневного цикла лечения в течение по меньшей мере трех циклов. В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят в течение по меньшей мере 3 циклов. В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят в течение по меньшей мере 6 циклов. В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят в течение 12 циклов. В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят перорально в дозе 900 мг дважды в сутки в дни 1-7 и 15-21 28-дневного цикла лечения в течение по меньшей мере трех циклов.

[00257] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения SCCHN у индивидуума с использованием типифарниба с учетом наличия мутации HRAS. В

некоторых вариантах осуществления SCCHN может являться HPV-отрицательной SCCHN. В некоторых вариантах осуществления SCCHN может являться HPV-положительной SCCHN. В некоторых вариантах осуществления SCCHN может являться рецидивирующей SCCHN. В некоторых вариантах осуществления SCCHN может являться метастатической SCCHN. Способ, представленный в настоящем описании, включает (a) определение наличия или отсутствия мутации HRAS в образце индивидуума, а затем (b) введение индивидууму терапевтически эффективного количества типифарниба, если определяют, что образец содержит мутацию HRAS. Образец может являться образцом опухоли. В некоторых вариантах осуществления способы включают (a) определение наличия мутации HRAS у пациента с SCCHN, а затем (b) введение индивидууму терапевтически эффективного количества типифарниба. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение индивидууму другого FTI, представленного в настоящем описании или иным образом известного в этой области. В некоторых вариантах осуществления FTI выбран из группы, состоящей из типифарниба, арглабина, периллилового спирта, лонафарниба (SCH-66336), L778123, L739749, FTI-277, L744832, CP-609,754, R208176, AZD3409 и BMS-214662.

[00258] В некоторых вариантах осуществления способы включают (a) определение пациента SCCHN как резистентного к ингибитору EGFR и имеющего мутацию HRAS, а затем (b) введение индивидууму типифарниба, где типифарниб вводят перорально в дозе 900 мг дважды в сутки в дни 1-7 и 15-21 28-дневного цикла лечения. В некоторых вариантах осуществления пациент SCCHN имеет рецидивирующую/рефрактерную SCCHN. В некоторых вариантах осуществления пациент с SCCHN имеет HPV-отрицательную SCCHN. В некоторых вариантах осуществления пациент с SCCHN имеет HPV-положительную SCCHN.

[00259] В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают введение второго терапевтического средства пациенту, имеющему SCCHN с мутацией HRAS. В некоторых вариантах осуществления второе терапевтическое средство является химиотерапевтическим средством, таким как цисплатин, 5-FU,

карбоплатин, паклитаксел или двухкомпонентная терапия препаратами платины (например, цисплатин/5-FU или карбоплатин/паклитаксел). В некоторых вариантах осуществления второе терапевтическое средство является таксанами и/или метотрексат. В некоторых вариантах осуществления вторая терапия является лучевой терапией. В некоторых вариантах осуществления вторая терапия включают средства, воздействующие на путь PI3K: BKM120 (бупарлисиб), BYL719, темсиролимус, ригосертиб; средства, воздействующие на путь MET: тивантиниб, фиклатузумаб; средства, воздействующие на путь HER3, патритумаб; средства, воздействующие на путь FGFR: BGJ398; средства, воздействующие на путь CDK4/6 в клеточном цикле: палбоциклиб, LEE011; ингибитор RTK: анлотиниб, и химиотерапевтическое средство: пероральный азацитидин. В некоторых вариантах осуществления второе терапевтическое средство является иммунотерапевтическим средством, таким как антитела против PD1 или против PDL1. В некоторых вариантах осуществления второе терапевтическое средство является таксаном.

[00260] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения SCC легких у индивидуума с использованием типифарниба с учетом наличия мутации HRAS. В некоторых вариантах осуществления SCC легких может являться HPV-отрицательной SCC легких. В некоторых вариантах осуществления SCC легких может являться HPV-положительной SCC легких. В некоторых вариантах осуществления SCC легких может являться рецидивирующей SCC легких. В некоторых вариантах осуществления SCC легких может являться метастатической SCC легких. Способ, представленный в настоящем описании, включает (а) определение наличия или отсутствия мутации HRAS в образце индивидуума, а затем (b) введение индивидууму терапевтически эффективного количества типифарниба, если определяют, что образец содержит мутацию HRAS. Образец может являться образцом опухоли. В некоторых вариантах осуществления способы включают (а) определение наличия мутации HRAS у пациента с SCC легких, а затем (b) введение индивидууму терапевтически эффективного количества типифарниба. В некоторых вариантах осуществления

способы включают введение индивидууму другого FTI, представленного в настоящем описании или иным образом известного в этой области. В некоторых вариантах осуществления FTI выбран из группы, состоящей из типифарниба, арглабина, периллилового спирта, лонафарниба (SCH-66336), L778123, L739749, FTI-277, L744832, CP-609,754, R208176, AZD3409 и BMS-214662.

[00261] В некоторых вариантах осуществления способы включают (a) определение пациента с SCC легких как резистентного к ингибитору EGFR и имеющего мутацию HRAS, а затем (b) введение индивидууму типифарниба, где типифарниб вводят перорально в дозе 900 мг дважды в сутки в дни 1-7 и 15-21 28-дневного цикла лечения. В некоторых вариантах осуществления пациент с SCC легких имеет рецидивирующую/рефрактерную SCC легких. В некоторых вариантах осуществления пациент с SCC легких имеет HPV-отрицательную SCC легких. В некоторых вариантах осуществления пациент с SCC легких имеет HPV-положительную SCC легких.

[00262] В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают введение второго терапевтического средства пациенту, имеющему SCC легких с мутацией HRAS. В некоторых вариантах осуществления второе терапевтическое средство является химиотерапевтическим средством, таким как цисплатин, 5-FU, карбоплатин, паклитаксел или двухкомпонентная терапия препаратами платины (например, цисплатин/5-FU или карбоплатин/паклитаксел). В некоторых вариантах осуществления второе терапевтическое средство является таксанами и/или метотрексатом. В некоторых вариантах осуществления вторая терапия является лучевой терапией. В некоторых вариантах осуществления вторая терапия включает средства, воздействующие на путь PI3K: BKM120 (бупарлисиб), BYL719, темсиролимус, ригосертиб; средства, воздействующие на путь MET: тивантиниб, фиклатузумаб; средства, воздействующие на путь HER3, патритумаб; средства, воздействующие на путь FGFR: BGJ398; средства, воздействующие на путь CDK4/6 в клеточном цикле: палбоциклиб, LEE011; ингибитор RTK: анлотиниб, и химиотерапевтическое средство: пероральный азациитидин. В некоторых вариантах осуществления второе терапевтическое средство является

иммунотерапевтическим средством, таким как антитела против PD1 или против PDL1. В некоторых вариантах осуществления второе терапевтическое средство является таксаном.

6. Примеры

[00263] Следует понимать, что модификации, по существу, не влияющие на активность различных вариантов осуществления настоящего изобретения, также входят в определение изобретения, представленное в настоящем описании. Таким образом, следующие примеры представлены в иллюстративных целях, а не для ограничения настоящего изобретения. Все ссылки, процитированные в настоящем описании, включены в него в качестве ссылок в полном объеме.

ПРИМЕР I

Клиническое испытание типифарниба на пациентах с солидными опухолями, стратифицированных с учетом мутации HRAS

[00264] Клиническое испытание фазы 2 начинали для исследования использования типифарниба в лечении местно-распространенных нерезектабельных или метастатических, рецидивирующих и/или рефрактерных негематологических злокачественных новообразований с известной мутацией HRAS. Вторичные цели включают безопасность и переносимость в случае указанных злокачественных новообразований. Первой поисковой целью является исследование противоопухолевой активности в терминах выживаемости без прогрессирования (PFS) и длительности ответа (DOR) в случае типифарниба при указанных злокачественных новообразованиях. Второй поисковой целью является исследование пригодности сбора архивных биоптатов и анализ этих биоптатов для детекции тканевых биомаркеров, потенциально связанных с активностью типифарниба.

[00265] Дизайн клинического испытания включает включение 2 когорт по 18 пациентов каждая. В когорту 1 включали индивидуумов со злокачественными новообразованиями щитовидной железы с мутациями HRAS, независимо от гистологии щитовидной железы. В когорту 2 на стадии 1 включали любого индивидуума с негематологической опухолью с мутантным HRAS, иной, чем рак щитовидной железы, соответствующего критериям включения, а на

стадии 2 включали пациентов с плоскоклеточными карциномами головы и шеи (SCCHN/HNSCC). Учитывая противоопухолевую активность, наблюдаемую в случае стадии 1 когорты 2, протокол исследования улучшали, ограничивая включение на стадии 2 когорты 2 только индивидуумами с SCCHN с мутациями HRAS.

[00266] Это клиническое испытание планировали так, чтобы оно включало две стадии, при этом первая стадия включала 11 оцениваемых пациентов, и вторая стадия включала 7 дополнительных оцениваемых пациентов, и когорту не переводили на вторую стадию, если в когорте наблюдали один объективный ответ или не наблюдали объективных ответов на первой стадии. Клиническое испытание считали положительным, если наблюдали по меньшей мере 4 ответа в когорте из 18 индивидуумов. Первичной конечной точкой являлась частота объективных ответов, и осуществляли оценку ответа опухоли в соответствии с Критериями оценки ответа при солидных опухолях версии 1.1 (необходимо подтверждение ответа).

[00267] В соответствии с протоколом, типифарниб вводят включенным пациентам в начальной дозе 900 мг перорально с пищей, дважды в сутки (b.i.d.) в течение 7 дней с недельным чередованием (дни 1-7 и 15-21) в 28-дневных циклах. В отсутствие неконтролируемой токсичности и прогрессирования заболевания индивидуумам могли продолжать вводить типифарниб в течение до 12 месяцев. Лечение можно продолжать в течение более 12 месяцев по согласованию с исследователем и спонсором. На усмотрение исследователя, дозу типифарниба можно повышать до 1200 мг b.i.d., если у индивидуума не наблюдают дозолимитирующей токсичности при уровне дозы 900 мг.

[00268] Оценку опухоли осуществляют при скрининге и приблизительно каждые 8 недель в течение первых 6 месяцев (циклы 2, 4, 6), а затем каждые 12 недель (циклы 9, 12, 15 и т.д.) до прогрессирования заболевания, начиная с конца цикла 2.

[00269] Индивидуумов, у которых развивались серьезные нежелательные явления (SAE) или нежелательные явления, возникшие в ходе лечения (TEAE) степени ≥ 2 , которые посчитали связанными с типифарнибом и длившиеся ≥ 14 дней, не будут подвергаться повышению

дозы. Также допустимы постепенные снижения дозы на 300 мг для контроля связанной с лечением, возникшей в ходе лечения токсичности.

[00270] Индивидуумов, у которых развивались серьезные нежелательные явления (SAE) или нежелательные явления, возникшие в ходе лечения (TEAE) степени ≥ 2 , которые посчитали связанными с типифарнибом и длившиеся ≥ 14 дней, не будут подвергать повышению дозы. Также допустимы постепенные снижения дозы на 300 мг для контроля связанной с лечением, возникшей в ходе лечения токсичности.

[00271] Предусмотренные исследованием оценки:

[00272] Скрининг. В качестве части скрининга, всех исследуемых индивидуумов подвергали следующему: заполнению формы информированного согласия (ICF), оценке в соответствии с критериями включения/исключения, сбору информации о статусе HRAS опухоли, выяснению анамнеза, включая исход и длительность ответа при последней предшествующей противоопухолевой терапии, полному физикальному осмотру, включая взвешивание и оценку показателей жизнедеятельности, выяснению использования сопутствующих лекарственных средств, оценке нежелательных явлений, ЭКГ в 12 отведениях, оценке общего состояния по шкале ECOG, стандартным лабораторным анализам, включая общий анализ крови, биохимический анализ крови, анализ свертывания и анализ мочи, тесту на беременность для женщин детородного возраста и исходной визуализации опухоли. В этой временной точке также можно получать маркеры опухолевой нагрузки в сыворотке, если они представляют интерес для исследователя. Рекомендуют анализ тиреоглобулина и антител против тиреоглобулина для дифференцированного рака щитовидной железы и кальцитонина и СЕА для медуллярного рака щитовидной железы.

[00273] Фаза лечения. Оценка, которую необходимо выполнить в день 1 (+/- 2 дней) каждого цикла лечения, включает: физикальный осмотр с учетом симптомов, ЭКГ в 12 отведениях (только для цикла 1), оценку общего состояния по шкале ECOG, стандартные лабораторные анализы, тест на беременность для

женщин детородного возраста и оценку сопутствующих лекарственных средств и нежелательных явлений. Визуализацию опухоли будут повторять приблизительно каждые 8 недель в течение первых 6 месяцев (циклы 2, 4, 6), а затем каждые 12 недель (циклы 9, 12, 15 и т.д.) до наблюдения признаков прогрессирования заболевания, начиная с конца цикла 2 (день 22+/- 5 дней) или чаще, если исследователь считает это необходимым. Образцы крови для оценки маркеров опухолевой нагрузки в сыворотке также будут получать в те же временные точки, в которых будут осуществлять визуализацию опухоли, если образцы получали ранее в ходе скрининга.

[00274] Посещение конца лечения. Посещение конца лечения будет происходить в пределах приблизительно 30 дней после введения последней дозы исследуемого лекарственного средства или непосредственно перед началом другой противоопухолевой терапии, в зависимости от того, что произойдет раньше. Индивидуумов подвергают полному физикальному осмотру, оценке общего состояния по шкале ECOG, ЭКГ в 12 отведениях, стандартным лабораторным анализам, тесту на беременность для женщин детородного возраста и оценке сопутствующих лекарственных средств и нежелательных явлений. В отсутствие восстановления после связанных с лечением нежелательных явлений запланировано дополнительное последующее наблюдения для определения безопасности.

[00275] Дополнительное последующее наблюдение. Визуализацию опухоли и оценку образцов на маркеры опухолевой нагрузки в сыворотке продолжают повторять с интервалами приблизительно 8 недель в течение первых 6 месяцев (циклы 2, 4, 6), а затем каждые 12 недель (циклы 9, 12, 15 и т.д.) до наблюдения признаков прогрессирования заболевания. После прогрессирования заболевания с индивидуумами контактируют для оценки выживаемости и использования другой противоопухолевой терапии каждые 12 недель до гибели пациента или достижения 12 месяцев после завершения набора в исследовательскую когорту, в которую входит индивидуум.

ПРИМЕР II

Объективные ответы на типифарниб при плоскоклеточной карциноме головы и шеи с мутациями HRAS после безуспешного

лечения цетуксимабом

[00276] Трех индивидуумов с диагнозом плоскоклеточная карцинома головы и шеи (SCCHN) включали в поисковое открытое исследование фазы 2 из примера I. Индивидуум 1 является мужчиной-европеоидом возрастом 77 лет с диагнозом карцинома цилиндрического типа/переходноклеточная карцинома носовой полости и SCCHN трахеи в качестве второй первичной опухоли, включенным в исследование типифарниба после локального рецидива после предшествующей терапии паклитакселом, карбоплатином и цетуксимабом. Наилучшим ответом на терапию цетуксимабом с химиотерапией в случае этого индивидуума являлась стабилизация заболевания. Индивидуум 2 является мужчиной-европеоидом возрастом 21 год с диагнозом SCC верхней челюсти и SCCHN ротовой полости в качестве второй первичной опухоли и метастазами в легких. Индивидуум 3 является мужчиной-европеоидом возрастом 59 лет с SCCHN ротовой полости. Индивидуумов 2 и 3 подвергали терапии цетуксимабом в отдельности или в комбинации с химиотерапией, соответственно, при этом у индивидуума 2 наблюдали кратковременное прогрессирование (2 цикла) с последующим развитием прогрессирующего заболевания и у индивидуума 3 наблюдали наилучший ответ развития прогрессирующего заболевания. При подвергании опухолевого материала секвенированию нового поколения выявляли наличие мутации Q22K в HRAS в опухоли индивидуума 1 и мутации Q61K в HRAS у индивидуумов 2 и 3. Не обнаруживали мутации CASP8, TP53 или PIK3CA. В опухоли индивидуума 2 также определяли мутацию E322K MAPK1, а также точечные мутации в ABL1, NOTCH3, RET и ROS1. В случае этих индивидуумов рассматривали статус HPV.

[00277] Как часть испытания типифарниба фазы 2, индивидуумов подвергали лечению типифарнибом в начальной дозе 900 мг, po, b.i.d. ежедневно в дни 1-7 и 15-21 28-дневных циклов лечения. Индивидууму 1 вводили 900 мг b.i.d. в течение 11 циклов, после чего дозу типифарниба снижали до 600 мг b.i.d. по причине возникновения периферической невропатии степени 2 по NCI CTCAE версии 4.03. Продолжали лечение этого индивидуума, к настоящему моменту он участвует в исследовании в течение более

одного года. Дозу для индивидуума 2 снижали до 600 мг b.i.d., а затем до 300 мг b.i.d. в течение цикла 1 по причине периферической невропатии степени 2, и продолжали лечение еще в течение 6 дополнительных циклов до ухудшения симптомов/исключения индивидуума в цикле 7. Индивидуума 3 подвергали 8 циклам лечения с использованием дозы 900 мг b.i.d., и он продолжает участие в исследовании. Другая токсичность, наблюдаемая у этих индивидуумов, соответствовала общему профилю безопасности, ранее описанному для типифарниба (Mesa. Expert Rev Anticancer Ther. 2006; 6:313-90).

[00278] Оценку опухоли осуществляли при скрининге индивидуумов и приблизительно каждые 8 недель в течение первых 6 месяцев (циклы 2, 4, 6), а затем каждые 12 недель (циклы 9, 12, 15 и т.д.) до прогрессирования заболевания, начиная с конца цикла 2. Дополнительную оценку опухоли можно осуществлять, если исследователь считает это необходимым или для подтверждения объективного ответа. У индивидуумов 1 и 3 наблюдали подтвержденные объективные частичные ответы в соответствии с критериями RECIST 1.1. Ответы соответствовали критериям после 6 и 2 циклов лечения, соответственно. У индивидуума 2 наблюдали стабилизацию заболевания с незначительной регрессией 8%. В случае этого пациента последнее сканирование опухоли в рамках исследования не соответствовало критериям визуализации для прогрессирования заболевания, но пациент покинул исследование после семи месяцев стабилизации заболевания по причине ухудшения симптомов. Изображения КТ ответа опухоли у пациента 1 на исходном уровне и в день 22 цикла 4 представлены на фигурах 1A-B.

[00279] В целом, в настоящем описании приведены исходы для трех индивидуумов с SCCHN на поздних стадиях с мутантным HRAS, достигавших значительного клинического преимущества при терапии типифарнибом. Известно, что HRAS играет более важную роль при SCCHN, чем другие виды RAS, в частности, при опухолях ротовой полости и HPV-отрицательных опухолях (Saranath et al. Br J Cancer. 1991;63:573-578; Anderson et al. J Otolaryngol. 1992;21:321-326; Anderson et al. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1994;120:755-760). В целом, среди HPV-отрицательных

карцином ротовой полости карциномы SCCHN составляют приблизительно 5%, но до 16% (Nat Commun. 2013;4:2873). Недавняя комплексная геномная характеристика SCCHN, проведенная исследовательской сетью Атласа ракового генома (Nature 517, 576–582, 2015), показала существование подгруппы опухолей ротовой полости с редко встречающимися изменениями числа копий в комбинации с активирующими мутациями HRAS или PIK3CA, сопряженными с инактивирующими мутациями CASP8, NOTCH1 и TP53. В соответствии с этой группой, трехгенная комбинация TP53 дикого типа с мутантными HRAS и/или CASP8 может представлять собой альтернативный путь онкогенеза.

[00280] В настоящее время цетуксимаб одобрен для использования в качестве терапии первой линии SCCHN в комбинации с химиотерапией или лучевой терапией или в условиях второй линии в качестве монотерапии после безуспешной терапии препаратами платины. Не существует ограничений или рекомендаций, касающихся его использования при SCCHN в соответствии со статусом гена RAS. В настоящем исследовании у индивидуума 1 наблюдали наилучший ответ на последнюю предшествующую схему противоопухолевого лечения (комбинации химиотерапии и цетуксимаба) в виде стабильного заболевания, в то время как индивидуумы 2 и 3 были рефрактерными к предшествующему лечению цетуксимабом в виде монотерапии или в комбинации с химиотерапией, соответственно. Примечательно, что индивидуумы 2 и 3 имели опухоли ротовой полости, несущие мутацию в "горячей точке" Q61K, в то время как индивидуум 1 имел нераспространенную мутацию Q22K. Неясно, может ли дифференциальный исход лечения цетуксимабом быть частично связан с гистологией или типом мутации HRAS.

[00281] Типифарниб является мощным и селективным FTI. Испытания фазы II и III этого средства в виде монотерапии солидных опухолей вызвали разочарование, хотя наблюдали некоторую многообещающую активность у пациентов с миелодиспластическим синдромом и острым миелолейкозом (Mesa. Expert Rev Anticancer Ther. 2006;6:313–90). Аналогично, предшествующее исследование другого FTI, лонафарниба, на пациентах с рецидивирующей SCCHN после средства на основе

платины завершали на стадии промежуточного анализа по причине отсутствия объективных ответов (Hanrahan et al. Am J Clin Oncol. 2009;32:274-9). Результаты, полученные авторами настоящего изобретения, в значительной степени подтверждают гипотезу о том, что мутация HRAS в опухоли может вносить свой вклад в идентификацию пациентов с SCCHN, которые могут получить пользу при лечении типифарнибом. Мутации HRAS также могут регулировать первичную или приобретенную резистентность к стандартному лечению на основе цетуксимаба. Дальнейшее исследование этих гипотез является обоснованным.

ПРИМЕР III

Эксперименты по определению эффективности, осуществленные с использованием типифарниба в модели полученного из пациентов ксенотрансплантата плоскоклеточной карциномы головы и шеи человека с мутантным HRAS

[00282] **Экспериментальные способы и исследования.** Собирали фрагменты опухолей из исходных мышей, инокулированных выбранными тканями первичного рака головы и шеи человека, и использовали их для инокуляции голых мышей BALB/c Nude. Каждой мышке подкожно в правый бок инокулировали фрагмент модели HN1420 первичного рака головы и шеи человека (R4P5, диаметр 2-4 мм) в день -26 для развития опухоли. HN1420 содержит мутацию A146P HRAS и TP53 дикого типа и является резистентным к цетуксимабу. Мышей распределяли по группам, когда средний размер опухоли достигал приблизительно 224 мм³ в день 0. Мышей случайным образом распределяли по 2 экспериментальным группам в соответствии с размерами опухолей. Каждая группа состояла из 3 мышей, 3 мыши на клетку. Этот день обозначали как день 0. Испытательные образцы вводили несущим опухоли мышам со дня 1 по день 21 по схеме дважды в день (B.I.D.)×21 в соответствии с заранее определенной схемой лечения, представленной в таблице 1.

[00283] Таблица 1. Дизайн исследования

Группа	N	Вводимое средство	Уровень дозы (мг/кг)	Путь введения	Частота введения
1	3	Носитель	-	р.о.	B.I.D.×21

2	3	Типифарниб (R115777)	80	р.о.	В.І.Д.×21
---	---	-------------------------	----	------	-----------

Примечание: N: количество животных на группу. При введении В.І.Д. интервал между введениями составлял 6–8 ч.

[00284] Размер опухоли измеряли дважды в неделю в двух измерениях с использованием калипера и выражали объем в мм³ по формуле: $TV=0,5 \cdot a \times b^2$, где а и b представляют собой длинный и короткий диаметры опухоли, соответственно. Затем размер опухоли использовали для вычисления ингибирования роста опухоли (TGI) и T/C, как описано ниже.

[00285] Ингибирование роста опухоли, $\%TGI = (1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)) \times 100$; T_i представляет собой средний объем опухоли в исследуемой группе в день измерения; T_0 представляет собой средний объем опухоли в исследуемой группе в день 1; V_i представляет собой средний объем опухоли в контрольной группе в день измерения; V_0 представляет собой объем опухоли в контрольной группе в день 1.

[00286] Значение T/C (%) является показателем ответа опухоли на лечение и одной из общеупотребительных конечных точек противоопухолевой активности; T и C представляют собой средний объем опухоли в исследуемой и контрольной группах, соответственно, в указанный день.

[00287] Представлена сводная статистика, включающая среднее значение и стандартная ошибка среднего (SEM), для объема опухоли для каждой группы в каждый момент времени. Статистический анализ различий объема опухоли в группах в конце исследования осуществляли с использованием t-критерия для независимых выборок. Все данные анализировали с использованием SPSS 16.0. $P < 0,05$ считали статистически значимым.

[00288] **Результаты и обсуждение.** Эффективность типифарниба (R115777) оценивали с использованием модели ксенотрансплантата рака головы и шеи HUPRIME® HN1420 на самках голых мышей BALB/c Nude.

[00289] В группе 1 (носитель, р.о., В.І.Д.×21) и группе 2 (типифарниб, 80 мг/кг, р.о., В.І.Д.×21) изменение массы тела в

конце исследования через 1 неделю после введения последней дозы составляло 6,95% и 1,12%, соответственно (не представлено). Не наблюдали гибели животных, значительной потери массы тела или перерывов во введении в течение исследования. Таким образом, тестируемое соединение типифарниб хорошо переносилось несущими опухоль HN1420 мышами.

[00290] Как показано в таблице 2, размеры опухолей быстро увеличивались у животных, которым вводили носитель, достигая в среднем приблизительно 650 мм³ через одну неделю, более 1000 мм³ в пределах двух недель и более 1700 мм³ к концу исследования. В отличие от этого, опухоли у животных, которым вводили типифарниб, оставались, по существу, неизменными в течение первых двух недель, и их размер повышался лишь в среднем на 150 мм³ за четыре недели эксперимента.

[00291] Таблица 2. Размеры опухолей HN1420 в различных исследуемых группах

Дни	Объем опухоли (мм ³)	
	Носитель	Типифарниб (80 мг/кг, В.І.Д.х21)
0	221,47±22,44	226,25±8,07
3	398,19±27,34	264,11±3,31
7	647,63±81,08	242,79±26,04
10	851,50±73,06	245,81±12,09
14	1025,49±64,10	240,97±45,13
17	1207,08±53,97	227,39±25,57
21	1494,10±88,38	239,26±44,42
24	1660,68±116,57	306,90±45,74
28	1720,98±115,39	376,10±54,92

Примечание: Данные выражены как среднее ± SEM.

[00292] Как показано на фигуре 2, средний размер опухоли у мышей, которым вводили носитель, достигал 1494,1 мм³ в день 21. У мышей, которым вводили типифарниб, достигали стабилизации объема опухоли с TGI 99% и Т/С 16% (P<0,001). Результаты, касающиеся размеров опухолей в различных группах в различные моменты времени после лечения, представлены в таблице 3.

[00293] Таблица 3. Противоопухолевая активность типифарниба в модели ксенотрансплантата рака головы и шеи HUPRIME® HN1420

Исследуемая группа	Размер опухоли (мм ³) ^a в день 0 исследования	Размер опухоли (мм ³) ^a в день 21 исследования	TGI (%)	T/C (%)	Значение P ^b
G1 Носитель	221,47±22,44	1494,10±88,38	–	–	–
G2 Типифарниб	226,25±8,07	239,26±44,42	99	16	<0,001

Примечание: а. Среднее ± SEM; b. Сравнение с носителем с помощью t-критерия для независимых выборок.

[00294] В заключение, в настоящем исследовании типифарниб (R115777) приводил к значительной противоопухолевой активности в модели ксенотрансплантата первичного рака головы и шеи HUPRIME® HN1420.

ПРИМЕР IV

Эксперименты по определению эффективности, осуществленные с использованием типифарниба в модели полученного из пациентов ксенотрансплантата плоскоклеточной карциномы легких с мутантным HRAS

[00295] **Экспериментальные способы и исследования.** Собирали фрагменты опухолей из исходных мышей, инокулированных выбранными тканями NSCLC человека, и использовали их для инокуляции голых мышей BALB/с Nude. Каждой мышце подкожно в правый бок инокулировали фрагмент модели первичной NSCLC человека LU1513 (R4P6, диаметр 2-4 мм) для развития опухоли. LU1513 содержит мутацию Q61K HRAS и мутацию V216M TP53 и является резистентным к цетуксимабу. Мышей распределяли по группам, когда средний размер опухоли достигал приблизительно 212 мм³ через 55 дней. Мышей случайным образом распределяли по 2 экспериментальным группам в соответствии с размерами опухолей. Каждая группа состояла из 3 мышей, 3 мыши на клетку. Этот день обозначали как день 0. Испытательные образцы вводили несущим опухоли мышам со дня 1 по день 21 по схеме дважды в день (B.I.D.)×21 в соответствии с заранее определенной схемой лечения, также используемой для модели HN1420 и представленной в таблице 1 выше. Размер опухоли измеряли дважды в неделю в двух измерениях с использованием калипера и выражали объем в мм³ по формуле: $TV=0,5 \times a \times b^2$, где а и b представляют собой длинный и короткий диаметры опухоли,

соответственно. Затем размер опухоли использовали для вычисления TGI, T/C, как описано выше в примере III. Статистический анализ осуществляли и интерпретировали так же, как и для модели HN1420.

[00296] **Результаты и обсуждение.** Эффективность типифарниба (R115777) оценивали с использованием модели ксенотрансплантата NSCLC HUPRIME® LU1513 на самках голых мышей BALB/c Nude.

[00297] В группе 1 (носитель, р.о., В.І.D.×21) и группе 2 (типифарниб, 80 мг/кг, р.о., В.і.d.×21) изменение массы тела в конце исследования составляло -5,13% и -0,54%, соответственно (фигура 3). Не наблюдали гибели животных, значительной потери массы тела или перерывов во введении в течение исследования. Таким образом, тестируемое соединение типифарниб хорошо переносилось несущими опухоль LU1513 мышами.

[00298] Как показано в таблице 4, размеры опухолей достаточно быстро увеличивались у животных, которым вводили носитель, достигая в среднем приблизительно 375 мм³ через одну неделю, более 500 мм³ в пределах двух недель и более 1000 мм³ к концу исследования. В отличие от этого, опухоли у животных, которым вводили типифарниб, росли в незначительной степени в любой момент в ходе эксперимента; фактически, через 28 дней средний размер опухоли был немного меньше среднего размера опухоли в день 1. Среди отдельных несущих опухоль животных, одна опухоль умеренно увеличивалась в размере, одна осталась неизменной, а третья регрессировала приблизительно на 75%.

[00299] Таблица 4. Размеры опухолей LU1513 в различных исследуемых группах

Дни	Объем опухоли (мм ³)	
	Носитель	Типифарниб (R115777), 80 мг/кг, В.І.D.×21
0	224,40±15,45	198,64±28,54
4	257,86±29,70	209,42±36,66
7	372,40±11,63	212,62±38,76
11	420,36±26,88	179,72±43,67
14	509,08±26,34	150,11±36,87
18	677,45±19,63	158,82±49,17
21	788,69±14,38	175,78±56,99

25	850,24±104,73	154,50±53,59
28	1058,26±152,35	189,94±70,66

[00300] Примечание: данные выражены как среднее $\pm$ SEM.

[00301] Как показано на фигуре 2, средний размер опухоли у мышей, которым вводили носитель, достигал 1058,26 мм³ к концу исследования. У мышей, которым вводили типифарниб, достигали стабилизации объема опухоли с TGI 101% и Т/С 18% ($P=0,007$). Результаты, касающиеся размеров опухолей в различных группах в различные моменты времени после лечения, представлены в таблице 5.

[00302] Таблица 5. Противоопухолевая активность типифарниба в модели ксенотрансплантата NSCLC HUPRIME® LU1513

Исследуемая группа	Размер опухоли (мм³)^а в день 0 исследования	Размер опухоли (мм³)^а в день 28 исследования	TGI (%)	Т/С (%)	Значение P^b
G1 Носитель	224,40±15,45	1058,26±152,35	–	–	–
G2 Типифарниб	198,64±28,54	189,94±70,66	101	18	0,007

[00303] Примечание: а. Среднее $\pm$ SEM; б. Сравнение с носителем с помощью t-критерия для независимых выборок.

[00304] В заключение, в настоящем исследовании тестируемое соединение типифарниб (R115777) приводил к значительной противоопухолевой активности в модели ксенотрансплантата первичной NSCLC HUPRIME® LU1513.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рефрактерной к ингибитору EGFR плоскоклеточной карциномы головы и шеи (SCCHN) у индивидуума, где SCCHN содержит мутацию HRAS, включающий введение индивидууму ингибитора фарнезилтрансферазы (FTI).

2. Способ по п.1, где указанная мутация HRAS включает замену аминокислоты в кодоне, выбранном из группы, состоящей из G12, G13, Q61, Q22, K117, A146 и любой их комбинации.

3. Способ по п.1 или 2, где указанная SCCHN не содержит мутацию K-Ras или мутацию N-Ras.

4. Способ по п.3, где указанная SCCHN содержит K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа.

5. Способ по любому из пп.1-4, где указанная SCCHN является HPV-отрицательной.

6. Способ по любому из пп.1-5, где указанная SCCHN находится на поздней стадии или является метастатической.

7. Способ по любому из пп.1-6, где указанная SCCHN является рецидивирующей SCCHN.

8. Способ по любому из пп.1-7, где SCCHN является SCCHN трахеи.

9. Способ по любому из пп.1-7, где SCCHN является SCCHN верхней челюсти.

10. Способ по любому из пп.1-7, где SCCHN является SCCHN ротовой полости.

11. Способ по любому из пп.1-10, где ингибитор EGFR является цетуксимабом.

12. Способ по любому из пп.1-11, где FTI является типифарнибом.

13. Способ лечения SCCHN у индивидуума, где SCCHN является рефрактерной к ингибитору EGFR, включающий

(a) определение наличия или отсутствия мутации HRAS в образце указанного индивидуума, а затем

(b) введение указанному индивидууму терапевтически эффективного количества FTI, если определяют, что указанный образец содержит мутацию HRAS.

14. Способ по п.13, где указанная мутация HRAS включает

замену аминокислоты в кодоне, выбранном из группы, состоящей из G12, G13, Q61, Q22, K117, A146 и любой их комбинации.

15. Способ по п.13 или 14, дополнительно включающий определение наличия или отсутствия мутации K-Ras или мутации N-Ras, где указанный образец не содержит мутацию K-Ras или мутацию N-Ras.

16. Способ по п.15, где указанный образец содержит K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа.

17. Способ по любому из пп.13-16, где указанный образец является биоптатом ткани.

18. Способ по любому из пп.13-16, где указанный образец является биоптатом опухоли.

19. Способ по любому из пп.13-18, где определение наличия или отсутствия мутации Ras включает анализ нуклеиновых кислот, полученных из указанного образца.

20. Способ по п.19, где указанную мутацию Ras определяют посредством секвенирования, полимеразной цепной реакции (ПЦР), ДНК-микрочипа, масс-спектрометрии (MS), анализа однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), денатурирующей высокоэффективной жидкостной хроматографии (DHPLC) или анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP).

21. Способ по п.20, где мутацию Ras определяют посредством ПЦР.

22. Способ по п.20, где мутацию Ras определяют посредством секвенирования.

23. Способ по любому из пп.13-18, где определение наличия или отсутствия мутации Ras включает анализ белков, полученных из указанного образца.

24. Способ по любому из пп.13-23, где указанная SCCHN является HPV-отрицательной.

25. Способ по любому из пп.13-24, где указанная SCCHN находится на поздней стадии или является метастатической.

26. Способ по любому из пп.13-25, где указанная SCCHN является рецидивирующей SCCHN.

27. Способ по любому из пп.13-26, где SCCHN является SCCHN трахеи.

28. Способ по любому из пп.13-26, где SCCHN является SCCHN верхней челюсти.

29. Способ по любому из пп.13-26, где SCCHN является SCCHN ротовой полости.

30. Способ по любому из пп.13-29, где ингибитор EGFR является цетуксимабом.

31. Способ по любому из пп.13-30, где ингибитор фарнезилтрансферазы (FTI) является типифарнибом.

32. Способ лечения SCCHN у индивидуума, где индивидуума ранее не подвергали лечению ингибитором EGFR, включающий

(a) определение наличия или отсутствия мутации HRAS в образце указанного индивидуума, а затем

(b) введение указанному индивидууму терапевтически эффективного количества FTI, если определяют, что указанный образец содержит мутацию HRAS, и отсутствие введения ингибитора EGFR.

33. Способ по п.32, где указанная мутация HRAS включает замену аминокислоты в кодоне, выбранном из группы, состоящей из G12, G13, Q61, Q22, K117, A146 и любой их комбинации.

34. Способ по п.32 или 33, дополнительно включающий определение наличия или отсутствия мутации K-Ras или мутации N-Ras, где указанный образец не содержит мутацию K-Ras или мутацию N-Ras.

35. Способ по п.34, где указанный образец содержит K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа.

36. Способ по любому из пп.32-35, где указанный образец является биоптатом ткани.

37. Способ по любому из пп.32-35, где указанный образец является биоптатом опухоли.

38. Способ по любому из пп.32-37, где определение наличия или отсутствия мутации Ras включает анализ нуклеиновых кислот, полученных из указанного образца.

39. Способ по п.38, где указанную мутацию Ras определяют посредством секвенирования, полимеразной цепной реакции (ПЦР), ДНК-микрочипа, масс-спектрометрии (MS), анализа однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), денатурирующей высокоэффективной жидкостной

хроматографии (DHPLC) или анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP).

40. Способ по п.39, где мутацию Ras определяют посредством ПЦР.

41. Способ по п.39, где мутацию Ras определяют посредством секвенирования.

42. Способ по любому из пп.32-37, где определение наличия или отсутствия мутации Ras включает анализ белков, полученных из указанного образца.

43. Способ по любому из пп.32-42, где указанная SCCHN является HPV-отрицательной.

44. Способ по любому из пп.32-43, где указанная SCCHN находится на поздней стадии или является метастатической.

45. Способ по любому из пп.32-44, где указанная SCCHN является рецидивирующей SCCHN.

46. Способ по любому из пп.32-45, где SCCHN является SCCHN трахеи.

47. Способ по любому из пп.32-46, где SCCHN является SCCHN верхней челюсти.

48. Способ по любому из пп.32-47, где SCCHN является SCCHN ротовой полости.

49. Способ по любому из пп.32-48, где ингибитор EGFR является цетуксимабом.

50. Способ по любому из пп.32-49, где FTI является типифарнибом.

51. Способ лечения рефрактерной к ингибитору EGFR плоскоклеточной карциномы легких (SCC легких) у индивидуума, где SCC легких содержит мутацию HRAS, включающий введение индивидууму ингибитора фарнезилтрансферазы (FTI).

52. Способ по п.51, где указанная мутация HRAS включает замену аминокислоты в кодоне, выбранном из группы, состоящей из G12, G13, Q61, Q22, K117, A146 и любой их комбинации.

53. Способ по п.51 или 52, где указанная SCC легких не содержит мутацию K-Ras или мутацию N-Ras.

54. Способ по п.53, где указанная SCC легких содержит K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа.

55. Способ по любому из пп.51-54, где указанная SCC легких является HPV-отрицательной.

56. Способ по любому из пп.51-55, где указанная SCC легких находится на поздней стадии или является метастатической.

57. Способ по любому из пп.51-56, где указанная SCC легких является рецидивирующей SCC легких.

58. Способ по любому из пп.51-57, где ингибитор EGFR является цетуксимабом.

59. Способ по любому из пп.51-58, где FTI является типифарнибом.

60. Способ лечения SCC легких у индивидуума, где SCC легких является рефрактерной к ингибитору EGFR, включающий

(a) определение наличия или отсутствия мутации HRAS в образце указанного индивидуума, а затем

(b) введение терапевтически эффективного количества FTI указанному индивидууму, если определяют, что указанный образец содержит мутацию HRAS.

61. Способ по п.60, где указанная мутация HRAS включает замену аминокислоты в кодоне, выбранном из группы, состоящей из G12, G13, Q61, Q22, K117, A146 и любой их комбинации.

62. Способ по п.60 или 61, дополнительно включающий определение наличия или отсутствия мутации K-Ras или мутации N-Ras, где указанный образец не содержит мутацию K-Ras или мутацию N-Ras.

63. Способ по п.62, где указанный образец содержит K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа.

64. Способ по любому из пп.60-63, где указанный образец является биоптатом ткани.

65. Способ по любому из пп.60-63, где указанный образец является биоптатом опухоли.

66. Способ по любому из пп.60-65, где определение наличия или отсутствия мутации Ras включает анализ нуклеиновых кислот, полученных из указанного образца.

67. Способ по п.66, где указанную мутацию Ras определяют посредством секвенирования, полимеразной цепной реакции (ПЦР), ДНК-микрочипа, масс-спектрометрии (MS), анализа однонуклеотидных

полиморфизмов (SNP), денатурирующей высокоэффективной жидкостной хроматографии (DHPLC) или анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP).

68. Способ по п.67, где мутацию Ras определяют посредством ПЦР.

69. Способ по п.67, где мутацию Ras определяют посредством секвенирования.

70. Способ по любому из пп.60-65, где определение наличия или отсутствия мутации Ras включает анализ белков, полученных из указанного образца.

71. Способ по любому из пп.60-70, где указанная SCC легких является HPV-отрицательной.

72. Способ по любому из пп.60-71, где указанная SCC легких находится на поздней стадии или является метастатической.

73. Способ по любому из пп.60-72, где указанная SCC легких является рецидивирующей SCC легких.

74. Способ по любому из пп.60-73, где ингибитор EGFR является цетуксимабом.

75. Способ по любому из пп.60-74, где ингибитор фарнезилтрансферазы (FTI) является типифарнибом.

76. Способ лечения SCC легких у индивидуума, где индивидуума ранее не подвергали лечению ингибитором EGFR, включающий

(a) определение наличия или отсутствия мутации HRAS в образце указанного индивидуума, а затем

(b) введение указанному индивидууму терапевтически эффективного количества FTI, если определяют, что указанный образец содержит мутацию HRAS, и отсутствие введения ингибитора EGFR.

77. Способ по п.76, где указанная мутация HRAS включает замену аминокислоты в кодоне, выбранном из группы, состоящей из G12, G13, Q61, Q22, K117, A146 и любой их комбинации.

78. Способ по п.76 или 77, дополнительно включающий определение наличия или отсутствия мутации K-Ras или мутации N-Ras, где указанный образец не содержит мутацию K-Ras или мутацию N-Ras.

79. Способ по п.78, где указанный образец содержит K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа.

80. Способ по любому из пп.76-79, где указанный образец является биоптатом ткани.

81. Способ по любому из пп.76-79, где указанный образец является биоптатом опухоли.

82. Способ по любому из пп.76-81, где определение наличия или отсутствия мутации Ras включает анализ нуклеиновых кислот, полученных из указанного образца.

83. Способ по п.82, где указанную мутацию Ras определяют посредством секвенирования, полимеразной цепной реакции (ПЦР), ДНК-микрочипа, масс-спектрометрии (MS), анализа однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), денатурирующей высокоэффективной жидкостной хроматографии (DHPLC) или анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP).

84. Способ по п.83, где мутацию Ras определяют посредством ПЦР.

85. Способ по п.83, где мутацию Ras определяют посредством секвенирования.

86. Способ по любому из пп.76-81, где определение наличия или отсутствия мутации Ras включает анализ белков, полученных из указанного образца.

87. Способ по любому из пп.76-86, где указанная SCC легких является HPV-отрицательной.

88. Способ по любому из пп.76-87, где указанная SCC легких находится на поздней стадии или является метастатической.

89. Способ по любому из пп.76-88, где указанная SCC легких является рецидивирующей SCC легких.

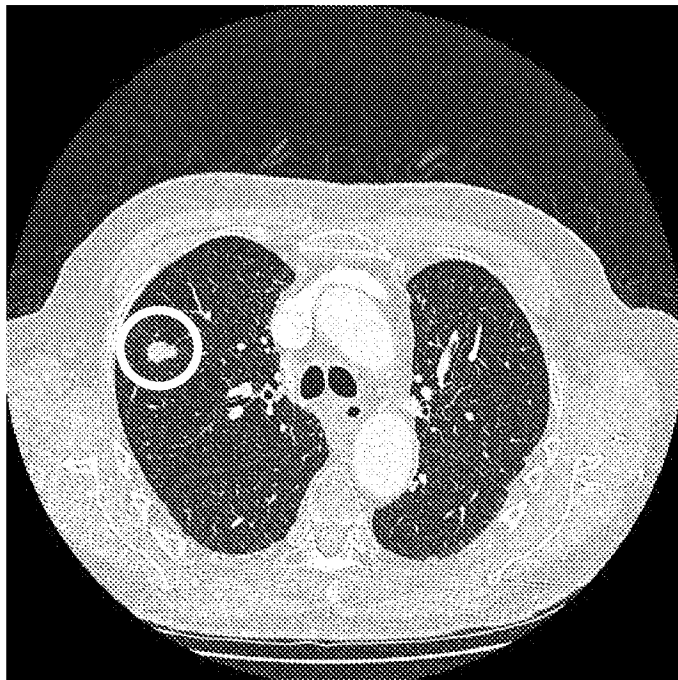
90. Способ по любому из пп.76-89, где ингибитор EGFR является цетуксимабом.

91. Способ по любому из пп.76-90, где FTI является типифарнибом.

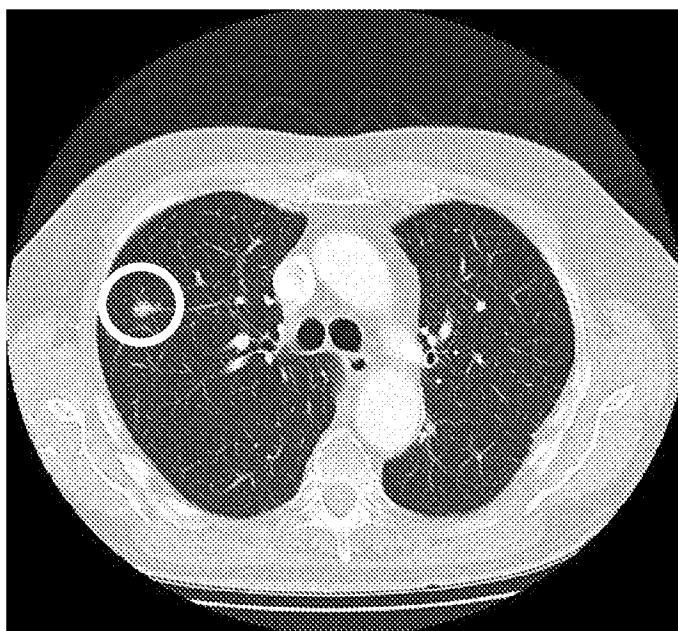
По доверенности

1/3

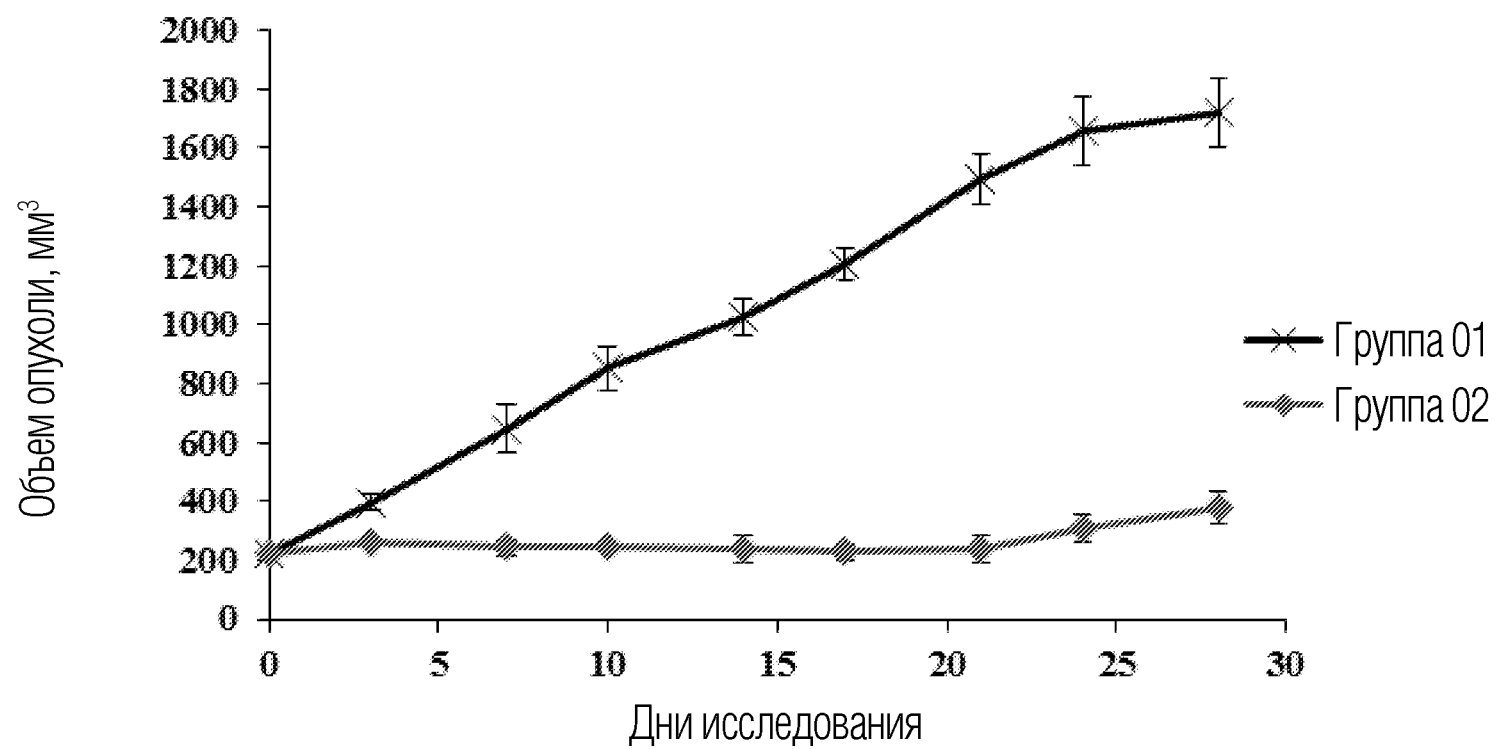
A



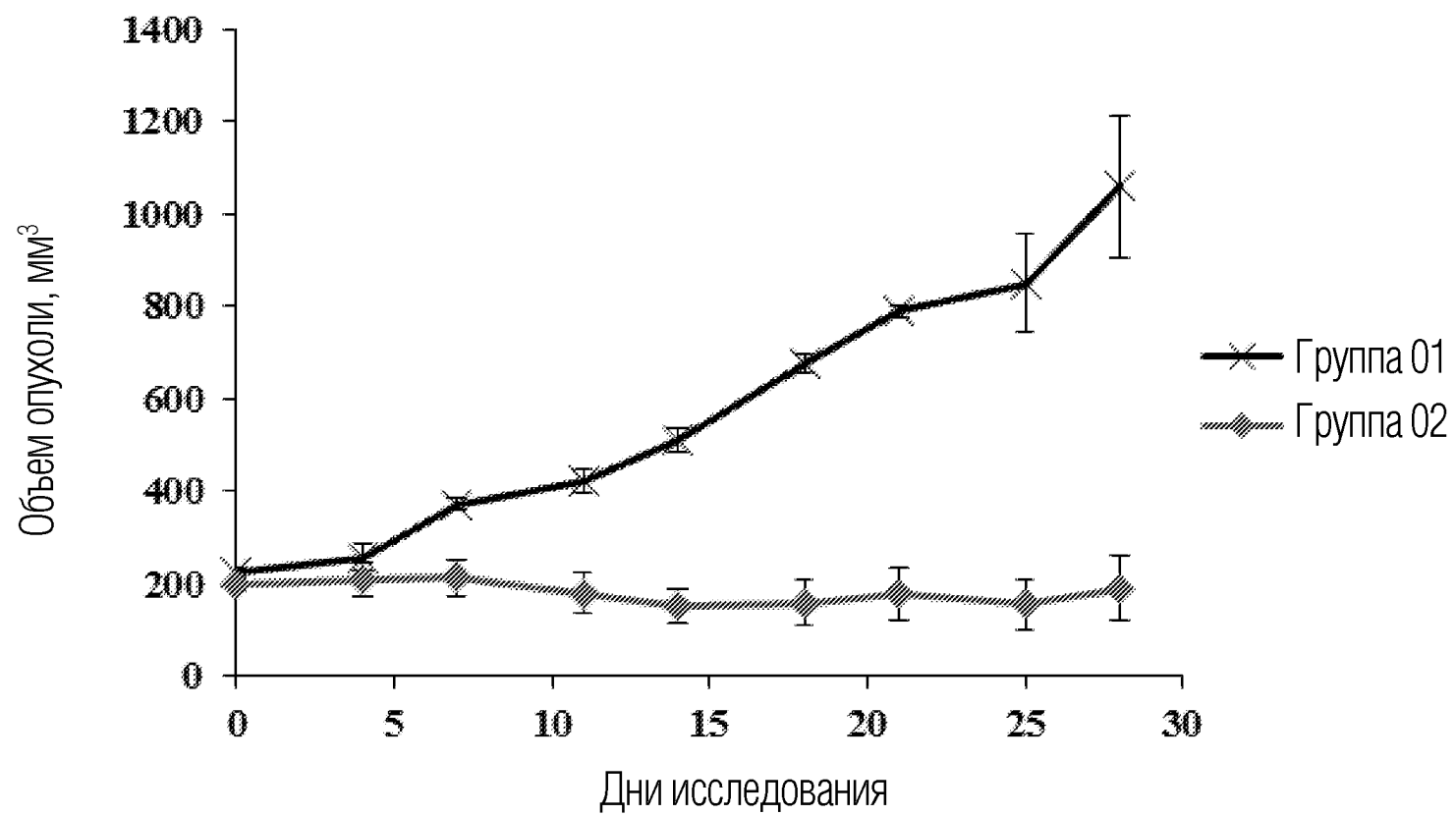
B



ФИГ. 1А-В



ФИГ. 2



ФИГ. 3