

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040014**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.04.08

(21) Номер заявки
201890512

(22) Дата подачи заявки
2016.08.16

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

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНГИБИТОРОВ ФАРНЕЗИЛТРАНСФЕРАЗЫ

(31) 62/206,194; 62/218,927; 62/241,019;
62/310,582; 62/372,662

(32) 2015.08.17; 2015.09.15; 2015.10.13;
2016.03.18; 2016.08.09

(33) US

(43) 2018.09.28

(86) PCT/US2016/047140

(87) WO 2017/031101 2017.02.23

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КУРА ОНКОЛОДЖИ, ИНК. (US)

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

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

(56) WO-A1-2015164862
WO-A2-2012016021

YAO R ET AL.: "Efficacy of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in a rat mammary tumor model: Role of Ha-ras mutations and use of microarray analysis in identifying potential targets", CARCINOGENESIS 200607 GB, vol. 27, no. 7, July 2006 (2006-07), pages 1420-1431, XP002763821, ISSN: 0143-3334, the whole document

HAMADA KENJI ET AL.: "Liver metastasis models of colon cancer for evaluation of drug efficacy using NOD/Shi-scid IL2R gamma(null) (NOG) mice", INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY, DEMETRIOS A. SPANDIDOS ED. & PUB, GR, vol. 32, no. 1, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 153-159, XP002593182, ISSN: 1019-6439, page 158

SHI YUQUAN ET AL.: "Farnesyltransferase inhibitor effects on prostate tumor micro-environment and radiation survival", PROSTATE, vol. 62, no. 1, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 69-82, XP002763822, ISSN: 0270-4137, the whole document

X CHEN ET AL.: "Transformation by HrasG12V is consistently associated with mutant allele copy gains and is reversed by farnesyl transferase inhibition", ONCOGENE, vol. 33, no. 47, 18 November 2013 (2013-11-18), pages 5442-5449, XP055232606, GB ISSN: 0950-9232, DOI: 10.1038/onc.2013.489 page 5447; figure 4

EMMA RENNEL ET AL.: "Regulation of endothelial cell differentiation and transformation by H-Ras", EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, vol. 291, no. 1, 1 November 2003 (2003-11-01), pages 189-200, XP055315857, US, ISSN: 0014-4827, DOI: 10.1016/S0014-4827(03)00347-1, the whole document

(57) Настоящее изобретение относится к области молекулярной биологии и биологии злокачественных опухолей. Конкретно настоящее изобретение относится к способам лечения субъекта с использованием ингибитора фарнезилтрансферазы (FTI), которые включают в себя определение, является ли субъект вероятно способным отвечать на лечение FTI, на основании генотипирования и получения профилей экспрессии конкретных иммунологических генов и статуса мутаций RAS у субъекта.

B1**040014****040014 B1**

Область техники

Настоящее изобретение относится к области молекулярной биологии и биологии злокачественных опухолей. Представлены способы применения конкретных, связанных с иммунитетом генов в качестве биомаркеров для прогнозирования клинической чувствительности и терапевтического ответа на лечение ингибитором фарнезилтрансферазы у субъекта, имеющего злокачественную опухоль. Кроме того, в настоящем документе представлен набор для осуществления этих способов.

Уровень техники

Стратификация популяций пациентов для улучшения частоты терапевтического ответа становится все более ценной при управлении клиническим течением заболевания у пациентов с злокачественными опухолями. Ингибиторы фарнезилтрансферазы (FTI) представляют собой лекарственные средства, полезные для лечения злокачественных опухолей, таких как лейкоз, лимфома и конкретные солидные опухоли. Однако пациенты по-разному отвечают на лечение FTI. Таким образом, способы прогнозирования способности пациента с злокачественной опухолью отвечать на лечение FTI или способы отбора пациентов для лечения FTI представляют собой неудовлетворенную необходимость. Способы и композиции по настоящему изобретению удовлетворяют эту необходимость и обеспечивают другие связанные преимущества.

Сущность изобретения

В настоящем документе представлены способы отбора популяций пациентов с злокачественными опухолями для лечения с использованием FTI. Способы, представленные в настоящем документе, основаны частично на открытии, что генотип и уровень экспрессии конкретных иммунологических генов можно использовать для прогнозирования способности пациента с злокачественной опухолью отвечать на лечение FTI.

В некоторых вариантах осуществления представленные в настоящем документе способы лечения злокачественной опухоли у субъекта включают (а) типирование KIR у субъекта, где субъект является носителем KIR2DS2 или KIR2DS5, и (b) введение терапевтически эффективного количества FTI субъекту. В некоторых вариантах осуществления субъект является носителем KIR2DS2. В некоторых вариантах осуществления субъект является носителем KIR2DS5. В некоторых вариантах осуществления субъект является носителем KIR2DS2 и KIR2DS5.

В некоторых вариантах осуществления представленные в настоящем документе способы дополнительно включают типирование HLA у субъекта перед подверганием субъекта лечению FTI, где субъект является носителем HLA-C2. В некоторых вариантах осуществления субъект является носителем как KIR2DS2, так и HLA-C2.

В некоторых вариантах осуществления типирование KIR у субъекта включает определение присутствия гена KIR в образце от субъекта. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец крови. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец костного мозга. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC). В некоторых вариантах осуществления образец является обогащенным клетками естественными киллерами (NK).

В некоторых вариантах осуществления типирование KIR проводят посредством секвенирования, полимеразной цепной реакции (ПЦР), анализа микромассива ДНК, масс-спектрометрии (MS), анализа однонуклеотидного полиморфизма (SNP), анализа иммуноблоттинга или твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). В одном варианте осуществления типирование KIR проводят посредством ПЦР. В одном варианте осуществления типирование KIR проводят посредством анализа микромассива ДНК. В одном варианте осуществления типирование KIR проводят посредством анализа иммуноблоттинга или ELISA.

В некоторых вариантах осуществления представленные в настоящем документе способы лечения злокачественной опухоли у субъекта включают (а) определение уровня экспрессии биомаркера, выбранного из группы, состоящей из KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 и GZMM, в образце от субъекта, где (i) уровень экспрессии KIR2DS2 в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS2; (ii) уровень экспрессии KIR2DL2 в образце ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL2; (iii) уровень экспрессии KIR2DS5 в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS5; (iv) уровень экспрессии KIR2DL5 в образце ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL5; или (v) уровень экспрессии GZMM в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии GZMM; или присутствует любая комбинация этого; и (b) введение терапевтически эффективного количества FTI субъекту.

В некоторых вариантах осуществления представленные в настоящем документе способы лечения злокачественной опухоли у субъекта включают (а) определение уровней экспрессии KIR2DS2 и KIR2DL2 или KIR2DS5 и KIR2DL5 в образце от субъекта, где (i) отношение уровня экспрессии KIR2DS2 к уровню экспрессии KIR2DL2 в образце выше, чем эталонное отношение; или (ii) отношение уровня экспрессии KIR2DS5 к уровню экспрессии KIR2DL5 в образце выше, чем эталонное отношение; (b) введение терапевтически эффективного количества FTI субъекту.

В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец крови. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец костного мозга. В некоторых вариантах

осуществления образец представляет собой моноклеарные клетки периферической крови (PBMС). В некоторых вариантах осуществления образец является обогащенным клетками NK. В некоторых вариантах осуществления клетки NK дополнительно размножают *in vitro*.

В некоторых вариантах осуществления определение уровня экспрессии биомаркера включает определение уровня белка биомаркера. Способы определения уровня белка биомаркера могут представлять собой способ иммуногистохимии (ИHC), анализ иммуноблоттинга, проточную цитометрию (FACS) или ELISA. В некоторых вариантах осуществления уровень белка биомаркера измеряют посредством ELISA.

В некоторых вариантах осуществления определение уровня экспрессии биомаркера включает определение уровня мРНК биомаркера. Способы определения уровня мРНК биомаркера могут представлять собой q-ПЦР, RT-ПЦР, РНК-секвенирование, анализ микромассивов, SAGE, способ MassARRAY или FISH. В некоторых вариантах осуществления, уровень мРНК биомаркера измеряют посредством q-ПЦР или RT-ПЦР.

В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой пациента с злокачественной опухолью. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет гематологическую злокачественную опухоль. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет солидную опухоль. Сольная опухоль может представлять собой доброкачественную опухоль или злокачественную опухоль. В некоторых других вариантах осуществления субъект имеет предзлокачественное состояние. Гематологическая злокачественная опухоль может представлять собой острый миелоидный лейкоз (AML), миелодиспластический синдром (MDS), хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML), лимфому клеток естественных киллеров (NK лимфома), лейкоз клеток естественных киллеров (NK лейкоз), Т-клеточную лимфому кожи (CTCL), периферическую Т-клеточную лимфому (PTCL) или хронический миелоидный лейкоз (CML). В некоторых вариантах осуществления, пациент представляет собой пациента с MDS. Пациент с MDS может иметь MDS с очень низким риском, MDS с низким риском, MDS с промежуточным риском или MDS с высоким риском. В некоторых вариантах осуществления пациент представляет собой пациента с MDS с более низким риском, который может иметь MDS с очень низким риском, MDS с низким риском, MDS с промежуточным риском. В некоторых вариантах осуществления пациент представляет собой пациента с AML. В некоторых вариантах осуществления пациент с AML представляет собой пациента после индукции ремиссии или после трансплантации. В некоторых вариантах осуществления пациент с AML имеет возраст более 60 лет или по иным причинам не подходит для индукции ремиссии.

В некоторых вариантах осуществления представленные в настоящем документе способы отбора пациента с злокачественной опухолью для лечения FTI включают (а) типирование KIR у субъекта, где субъект является носителем KIR2DS2 или KIR2DS5, и (b) введение терапевтически эффективного количества FTI субъекту. В некоторых вариантах осуществления способы а) типирование KIR у субъекта, где субъект является носителем KIR2DS2 или KIR2DS5, b) типирование HLA у субъекта, где субъект является носителем HLA-C2 и (с) введение терапевтически эффективного количества FTI субъекту. В некоторых вариантах осуществления субъект является носителем как KIR2DS2, так и HLA-C2.

В некоторых вариантах осуществления способы отбора пациента с злокачественной опухолью для лечения FTI включают (а) определение уровня экспрессии биомаркера, выбранного из группы, состоящей из KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 и GZMM, в образце от субъекта, где (i) уровень экспрессии KIR2DS2 в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS2; (ii) уровень экспрессии KIR2DL2 в образце ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL2; (iii) уровень экспрессии KIR2DS5 в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS5; (iv) уровень экспрессии KIR2DL5 в образце ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL5; или (v) уровень экспрессии GZMM в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии GZMM; или присутствует любая комбинация этого; и (b) введение терапевтически эффективного количества FTI субъекту.

В некоторых вариантах осуществления представленные в настоящем документе способы отбора пациента с злокачественной опухолью для лечения FTI включают (а) определение уровней экспрессии KIR2DS2 и KIR2DL2 или KIR2DS5 и KIR2DL5 в образце от субъекта, где (i) отношение уровня экспрессии KIR2DS2 к уровню экспрессии KIR2DL2 в образце выше, чем эталонное отношение; или (ii) отношение уровня экспрессии KIR2DS5 к уровню экспрессии KIR2DL5 в образце выше, чем эталонное отношение; (b) введение терапевтически эффективного количества FTI субъекту.

В одном варианте осуществления представленные в настоящем документе способы лечения MDS у субъекта включают (а) типирование KIR у субъекта, где субъект является носителем KIR2DS2 или KIR2DS5, и (b) введение терапевтически эффективного количества типифарниба субъекту. Способы могут дополнительно включать типирование HLA у субъекта, где субъект является носителем HLA-C2. В некоторых вариантах осуществления субъект является носителем как KIR2DS2, так и HLA-C2. В некоторых вариантах осуществления MDS представляет собой MDS с более низким риском.

В настоящем документе представлены способы отбора популяций пациентов с злокачественными опухолями для лечения с использованием FTI на основании статуса мутаций Ras. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы прогнозирования способности пациента с злокачественной опухолью отвечать на лечение FTI на основании статуса мутаций Ras в образце от пациента. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения

злокачественной опухоли у субъекта с использованием терапевтически эффективного количества FTI.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения злокачественной опухоли у субъекта, включающие (a) определение присутствия или отсутствия мутации Ras в образце от субъекта, где мутация Ras включает мутацию K-Ras или мутацию N-Ras, и затем (b) введение терапевтически эффективного количества FTI субъекту, если определено, что в образце отсутствует мутация K-Ras или мутация N-Ras.

В некоторых вариантах осуществления способы включают определение присутствия или отсутствия аминокислотной замены в кодоне, выбранном из группы, состоящий из G12, G13 и Q61 из K-Ras. В некоторых вариантах осуществления способы включают определение присутствия или отсутствия аминокислотной замены в кодоне, выбранном из группы, состоящей из G12 G13, и Q61 из N-Ras.

В некоторых вариантах осуществления пациента подвергают лечению FTI, если определено, что образец не имеет аминокислотной замены в G12, G13, и Q61 из K-Ras, а также не имеет аминокислотной замены в G12, G13, и Q61 из N-Ras. В некоторых вариантах осуществления пациента подвергают лечению FTI, если определено, что образец не обладает никакой мутацией K-Ras или никакой мутацией N-Ras. В некоторых вариантах осуществления пациента подвергают лечению FTI, если определено, что образец обладает K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой пациента с злокачественной опухолью. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет гематологическую злокачественную опухоль. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет солидную опухоль. Сольная опухоль может представлять собой доброкачественную опухоль или злокачественную опухоль. В некоторых других вариантах осуществления субъект имеет предзлокачественное состояние. Гематологическая злокачественная опухоль может представлять собой хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML), миело-пролиферативную неоплазию (MPN), миелодиспластический синдром (MDS), острый миелоидный лейкоз (AML), ювенильный миеломоноцитарный лейкоз (JMML), хронический миелоидный лейкоз (CML), лимфому клеток естественных киллеров (лимфому NK), лейкоз клеток естественных киллеров (лейкоз NK), Т-клеточную лимфому кожи (CTCL) или периферическую Т-клеточную лимфому (PTCL). В некоторых вариантах осуществления пациент представляет собой пациента с CMML. В некоторых вариантах осуществления пациент представляет собой пациента с MDS. В некоторых вариантах осуществления пациент представляет собой пациента с AML.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения CMML у субъекта: (a) определение присутствия или отсутствия мутации K-Ras в образце от субъекта и затем (b) введение терапевтически эффективного количества типифарниба субъекту, если в образце определено наличие K-Ras дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения CMML у субъекта: (a) определение присутствия или отсутствия мутации N-Ras в образце от субъекта и затем (b) введение терапевтически эффективного количества типифарниба субъекту, если в образце определено наличие N-Ras дикого типа.

В настоящем документе представлены способы отбора популяций пациентов с злокачественными опухолями для лечения с использованием FTI на основании присутствия мутации H-Ras. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы прогнозирования способности пациента с злокачественной опухолью отвечать на лечение FTI, способы отбора популяции пациентов с злокачественной опухолью для лечения FTI и способы лечения злокачественной опухоли у субъекта с использованием терапевтически эффективного количества FTI, на основании присутствия мутации H-Ras в образце от пациента.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения злокачественной опухоли у субъекта, включающие (a) определение присутствия или отсутствия мутации H-Ras в образце от субъекта, затем (b) введение терапевтически эффективного количества FTI субъекту, если в образце определено наличие мутации H-Ras. В некоторых вариантах осуществления мутация H-Ras может представлять собой аминокислотную замену в G12, G13 и Q61 из H-Ras.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения злокачественной опухоли у пациента, включающие (a) определение присутствия или отсутствия мутации H-Ras, мутации K-Ras и мутации N-Ras в образце от субъекта и затем (b) введение терапевтически эффективного количества FTI субъекту, если в образце определено наличие мутации H-Ras, но не мутации K-Ras или мутации N-Ras. В некоторых вариантах осуществления способы включают (a) определение наличия у пациента с злокачественной опухолью мутации H-Ras и K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа, затем (b) введение терапевтически эффективного количества FTI субъекту. В некоторых вариантах осуществления FTI представляет собой типифарниб.

В некоторых вариантах осуществления субъект имеет гематологическую злокачественную опухоль. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль является отрицательной по HPV. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой гепатоклеточную карциному, рак головы и шеи, опухоль слюнных желез, опухоль щитовидной железы, уротелиальный рак, рак молочной железы, меланому,

рак желудка, рак поджелудочной железы или рак легкого. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой плоскоклеточную карциному головы и шеи (HNSCC). В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой опухоль слюнных желез. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой опухоль щитовидной железы.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ лечения HNSCC у субъекта на основании присутствия мутации H-Ras. В некоторых вариантах осуществления HNSCC может представлять собой отрицательную по HPV HNSCC. В некоторых вариантах осуществления HNSCC может представлять собой рецидивирующую/повторную HNSCC. В некоторых вариантах осуществления HNSCC может представлять собой метастазирующую HNSCC. Представленные в настоящем документе способы включают (а) определение присутствия или отсутствия мутации H-Ras в образце от субъекта, имеющего HNSCC, и затем (б) введение терапевтически эффективного количества типифарниба субъекту, если в образце определено наличие мутации H-Ras.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ лечения опухоли слюнных желез у субъекта на основании присутствия мутации H-Ras. В некоторых вариантах осуществления опухоль слюнных желез может являться отрицательной по HPV. В некоторых вариантах осуществления опухоль слюнных желез может представлять собой опухоль слюнных желез на поздних стадиях. В некоторых вариантах осуществления опухоль слюнных желез может представлять собой метастазирующую опухоль слюнных желез. Представленные в настоящем документе способы включают (а) определение присутствия или отсутствия мутации H-Ras в образце от субъекта, имеющего опухоль слюнных желез, и затем (б) введение терапевтически эффективного количества типифарниба субъекту, если в образце определено наличие мутации H-Ras.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ лечения рака щитовидной железы у субъекта на основании присутствия мутации H-Ras. В некоторых вариантах осуществления рак щитовидной железы может являться отрицательным по HPV. В некоторых вариантах осуществления рак щитовидной железы может представлять собой рак щитовидной железы на поздних стадиях. В некоторых вариантах осуществления рак щитовидной железы может представлять собой метастазирующий рак щитовидной железы. Представленные в настоящем документе способы включают (а) определение присутствия или отсутствия мутации H-Ras в образце от субъекта, имеющего рак щитовидной железы, и затем (б) введение терапевтически эффективного количества типифарниба субъекту, если в образце определено наличие мутации H-Ras.

В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой биоптат опухоли. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец ткани. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец крови. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец периферической крови. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец сыворотки. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец костного мозга. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой моноклеточные клетки периферической крови (PBMC).

В некоторых вариантах осуществления статус мутаций Ras определяют посредством анализа нуклеиновых кислот, полученных из образца. В некоторых вариантах осуществления статус мутаций Ras определяют посредством анализа белков, полученных из образца. В некоторых вариантах осуществления статус мутаций Ras определяют посредством секвенирования, полимеразной цепной реакции (ПЦР), анализа микромассива ДНК, масс-спектрометрии (MS), анализа однонуклеотидного полиморфизма (SNP), денатурирующей высокоэффективной жидкостной хроматографии (DHPLC) или анализа полиморфизма длины фрагментов рестрикции (RFLP). В некоторых вариантах осуществления статус мутаций Ras определяют посредством мультиплексной ПЦР. В некоторых вариантах осуществления статус мутаций Ras определяют посредством секвенирования нового поколения.

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 варианте осуществления FTI представляет собой типифарниб. 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 в чередующиеся недели (одна неделя введения, одна неделя отдыха) в повторяющихся 4-недельных циклах (сутки 1-7 и 15-21 из повторяющихся 28-суточных циклов). В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят в дозе 1200 мг b.i.d. перорально в чередующиеся недели (сутки 1-7 и 15-21 из повторяющихся 28-суточных циклов). В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят в дозе 1200 мг b.i.d. перорально на сутки 1-5 и 15-19 из повторяющихся 28-суточных 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.

В некоторых вариантах осуществления представленные в настоящем документе способы включают также подвергание субъекта воздействию второй терапии. Вторая терапия может представлять собой радиотерапию. В некоторых вариантах осуществления представленные в настоящем документе способы включают также введение субъекту второго терапевтически эффективного количества второго действующего вещества или подвергание субъекта поддерживающей терапии. В некоторых вариантах осуществления второе действующее вещество представляет собой гипометилирующее ДНК средство, терапевтическое антитело, специфически связывающее антиген злокачественной опухоли, гематопоетический фактор роста, цитокин, противораковое средство, антибиотик, ингибитор соx-2, иммуномодулирующее средство, антитимоцитарный глобулин, иммуносупрессивное средство, кортикостероид или их фармакологическое производное. В некоторых вариантах осуществления второе действующее вещество представляет собой гипометилирующее ДНК средство, такое как азациитидин или децитабин. В некоторых вариантах осуществления, второе действующее вещество представляет собой антитело против PD1 или антитело против PDL1.

В некоторых вариантах осуществления, наборы, представленные в настоящем документе для прогнозирования способности пациента с злокачественной опухолью отвечать на лечение FTI, содержат по меньшей мере одно средство для типирования KIR у пациента с злокачественной опухолью, и вспомогательное средство, где прогнозируют, что пациент с злокачественной опухолью является способным отвечать на лечение FTI, если пациент с злокачественной опухолью является носителем KIR2DS2 или KIR2DS5. Наборы могут дополнительно содержать средство для типирования HLA, где прогнозируют, что пациент с злокачественной опухолью является способным отвечать на лечение FTI, если пациент с злокачественной опухолью является носителем HLA-C2.

В некоторых вариантах осуществления наборы, представленные в настоящем документе для прогнозирования способности пациента с злокачественной опухолью отвечать на лечение FTI, содержат по меньшей мере одно средство для определения экспрессии по меньшей мере одного биомаркера в образце от пациента с злокачественной опухолью, и вспомогательное средство, где биомаркер выбран из группы, состоящей из KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 и GZMM; и где прогнозируют, что пациент с злокачественной опухолью является способным отвечать на лечение FTI, если

- (i) уровень экспрессии KIR2DS2 в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS2;
 - (ii) уровень экспрессии KIR2DL2 в образце ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL2;
 - (iii) уровень экспрессии KIR2DS5 в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS5;
 - (iv) уровень экспрессии KIR2DL5 в образце ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL5;
 - (v) уровень экспрессии GZMM в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии GZMM;
 - (vi) отношение уровня экспрессии KIR2DS2 к уровню экспрессии KIR2DL2 в образце выше, чем эталонное отношение; или
 - (vii) отношение уровня экспрессии KIR2DS5 к уровню экспрессии KIR2DL5 в образце выше, чем эталонное отношение;
- или присутствует любая комбинация этого.

Краткое описание фигур

На фиг. 1A показана корреляция уровней экспрессии KIR2DS5 с клиническим исходом для пациентов с AML, подвергнутых лечению типифарнибом. "SD" обозначает "стабильное заболевание"; "PD" обозначает "прогрессирующее заболевание"; "CR" обозначает "полный ответ"; "HI" обозначает "улучшение гематологических показателей". На фиг. 1B показана корреляция уровней экспрессии KIR2DS5 с выживаемостью без прогрессирования ("PFS") пациентов с AML, подвергнутых лечению типифарнибом.

На фиг. 2A показана корреляция между отношением уровня экспрессии KIR2DS2 к уровню экспрессии KIR2DL2 и PFS пациентов с AML, подвергнутых лечению типифарнибом. На фиг. 2B показана корреляция между отношением уровня экспрессии KIR2DS2 к уровню экспрессии KIR2DL2 и общей выживаемостью ("OS") пациентов с AML, подвергнутых лечению типифарнибом.

Фиг. 2A: регрессионный анализ пропорциональных рисков Кокса.

Параметр	b	SE	Статистика Вальда	P	Ожид. (b)	95% CI ожид. (b)
2DS/2DL	-7,4132	2,0012	13,7227	0,0002	0,0006	0,0000-0,0299

Фиг. 2B: регрессионный анализ пропорциональных рисков Кокса.

	b	SE	Статистика Вальда	P	Ожид. (b)	95% CI ожид. (b)
Отношение 2DS2/2DL2	-5,3430	1,6871	10,0296	0,0015	0,0048	0,0002-0,1283

На обеих фиг. 3A и 3B показано отсутствие корреляции между отношением уровня экспрессии KIR2DS2 к уровню экспрессии KIR2DL2 и OS у пациентов с AML, подвергнутых лечению не относящи-

мися к FTI химиотерапевтическими средствами. На фиг. 3А: пациентов лечили высокими дозами цитарабина и митоксантрона. На фиг. 3В: пациентов лечили высокими дозами цитарабина и митоксантрона/интенсивной химиотерапией.

На фиг. 4А показана корреляция между отношением уровня экспрессии KIR2DS5 к уровню экспрессии KIR2DL5A и как PFS, так и OS пациентов с AML, подвергнутых лечению типифарнибом. На фиг. 4В показано отсутствие корреляции между отношением уровня экспрессии KIR2DS5 к уровню экспрессии KIR2DL5A и OS у пациентов с AML, подвергнутых лечению не относящимися к FTI химиотерапевтическими средствами (цитарабином и митоксантроном).

Фиг. 4А: регрессионный анализ пропорциональных рисков Кокса.

Типифарниб/PFS	b	SE	Статистика Вальда	P	Ожид. (b)	95% CI ожид. (b)
Отношение 2DS5/2DL5A	-3,5254	1,2351	8,1480	0,0043	0,0294	0,0026-0,3272

На фиг. 5 показана корреляция уровней экспрессии GZMM с клиническим исходом для пациентов с AML, подвергнутых лечению типифарнибом.

На фиг. 6А показана корреляция между уровнем экспрессии GZMM и выживаемостью пациентов с AML, подвергнутых лечению типифарнибом. На фиг. 6В показано отсутствие корреляции между уровнем экспрессии GZMM и выживаемостью пациентов с AML, подвергнутых лечению не относящимися к FTI химиотерапевтическими средствами (цитарабином и митоксантроном).

Фиг. 6А: регрессионный анализ пропорциональных рисков Кокса.

(Типифарниб)	b	SE	Статистика Вальда	P	Ожид. (b)	95% CI ожид. (b)
GZMM/OS	-0,5642	0,1652	11,6675	0,0006	0,5688	0,4122-0,7850
GZMM/PFS	-0,5856	0,1809	10,4780	0,0012	0,5568	0,3913-0,7923

На фиг. 7А показана корреляция уровней экспрессии KIR2DS2 с клиническим исходом для пациентов с AML, подвергнутых лечению типифарнибом. На фиг. 7В показана специфическая корреляция уровней экспрессии KIR2DS2 с клиническим исходом для пациентов с AML, подвергнутых лечению типифарнибом (левая панель), но не химиотерапевтическими средствами, не относящимися к FTI (правая панель).

На фиг. 8 показана корреляция между статусом N-RAS дикого типа и продленной выживаемостью без прогрессирования ("PFS") у пациентов с AML, подвергнутых лечению типифарнибом.

На фиг. 9 показана более высокая частота ответа на лечение типифарнибом у пациентов с AML, обладающих N-RAS дикого типа, по сравнению с пациентами, обладающими мутантным N-RAS.

Подробное описание

1. Определения.

Как применяют в настоящем документе, формы единственного числа относятся к одному или более чем одному грамматическому объекту. В качестве примера биомаркер относится к одному биомаркеру или более чем одному биомаркеру.

Как применяют в настоящем документе, термин "клетка NK", или "клетка естественный киллер", относится к типу происходящих из костного мозга больших гранулярных лимфоцитов, разделяющих общего предшественника с Т-клетками, но не обладающих поверхностными маркерами В-клеток или Т-клеток. Клетки NK, как правило, составляют 10-15% из всех циркулирующих лимфоцитов. Клетки NK являются защитными клетками врожденного иммунитета, узнающими структуры на поверхности инфицированных вирусом клеток или клеток опухолей и уничтожающими эти клетки посредством высвобождения цитотоксинов. Клетки NK можно активировать без предшествующего воздействия антигена.

Для избирательного уничтожения инфицированных клеток или клеток опухолей клетки NK должны отличать здоровые клетки от пораженных заболеванием клеток. Цитолитическая активность клеток NK человека модулируется взаимодействием ингибирующих и активирующих мембранных рецепторов, которые экспрессируются на поверхности клеток NK, с молекулами MHC (HLA) класса I, которые экспрессируются не относящимися к NK клетками, включая клетки опухолей, или клетки реципиента трансплантата костного мозга. Иммуноглобулиноподобные рецепторы клеток-киллеров (KIR; или CD158) картируемые на хромосоме 19q13.4.3-5, составляют семейство связывающих MHC-I (HLA-A, -B, -C) рецепторов, регулирующих порог активации клеток NK (Valiante et al., Immunity 7:739-751(1997)).

У человека комплекс HLA класса I имеет длину 2000 п.о. и содержит приблизительно 20 генов. Внутри области класса I существуют гены, кодирующие хорошо охарактеризованные молекулы MHC класса I, обозначенные HLA-A, HLA-B и HLA-C. Кроме того, существуют неклассифицированные гены класса I, которые включают HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-H, HLA-J и HLA-X, так же как новое семейство, известное как MIC. В то время как HLA-A и -B играют некоторую роль, взаимодействия между молекулами KIR и HLA-C преобладают в предотвращении атаки клеток NK на здоровые аутологичные клетки

(Colonna et al., PNAS, 90:1200-12004 (1993); Moesta AK et al., Front Immunol. 3:336(2012)).

Ген HLA-C имеет множество аллелей, включая HLA-C1 и HLA-C2, основанные на присутствии аспарагина или лизина в положении аминокислоты 80 в зрелом белке (Mandelboim et al., 1996). Более того, HLA-C1 содержит консервативный остаток серина в положении аминокислоты 77, в то время как аспарагин присутствует в HLA-C2 в таком же положении. Таким образом, по меньшей мере три генотипа можно различать по отношению к HLA-C: генотип, имеющий как HLA-C1, так и HLA-C2 (гетерозиготный HLA-C1/HLA-C2), генотип, имеющий либо HLA-C1 (гомозиготный HLA-C1/HLA-C1), либо HLA-C2 (гомозиготный HLA-C2/HLA-C2), и генотип, лишенный как HLA-C1, так и HLA-C2.

Как применяют в настоящем документе, термин "гены KIR" относится к генам, кодирующим рецепторы KIR на клетках NK. Гены KIR кластеризуются в одной из наиболее вариабельных областей в геноме человека в отношении как содержания генов, так и полиморфизма последовательностей. Эта обширная изменчивость образует репертуар клеток NK, в котором KIR экспрессируется на поверхности клеток комбинаторным образом. Взаимодействия между KIR и их соответствующими лигандами на клетках-мишенях приводит к подаче положительных или отрицательных сигналов, регулирующих функцию клеток NK.

Гены KIR наследуются в двух главных гаплотипов: А и В. Гаплотип А обладает только одним активирующим рецептором, KIR2DS4, инактивированным в большей части популяции США из-за делеции 22 п.о. Гаплотип В KIR включает 22 аллеля KIR2DS2 и 16 аллелей KIR2DS5, присутствующих у ~45% и ~25% американских европеоидов соответственно. Существует сильное неравновесное сцепление между KIR2DS2 (активирующим) и KIR2DL2 (ингибирующим). Метилирование ДНК поддерживает аллелеспецифическую экспрессию гена KIR (например, островок CpG в промоторе KIR2DS2 простирается от -160 до +26 и имеет 6 богатых цитозином участков) (Moesta AK et al., Front Immunol. 3:336(2012)).

До настоящего времени идентифицировано по меньшей мере 14 отдельных генов KIR, представляющих собой KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR3DS1. Эти гены разделяют обширную гомологию последовательностей. Каждый ген имеет длину 9-16 т.п.о., разделен на 8-9 экзонов, которые кодируют сигнальный пептид, два или три внеклеточных домена, стебель, трансмембранную область и цитоплазматический хвост. Эти гены меняются по отношению к их присутствию или отсутствию на различных гаплотипах KIR, создавая значительное разнообразие в количестве генотипов KIR, наблюдаемых в популяции. Например, некоторые индивидуумы могут являться носителями только семи из 14 генов KIR, в то время как другие индивидуумы могут являться носителями 12 из 14 генов KIR. Каждый ген KIR кодирует либо ингибирующий, либо активирующий KIR. Например, KIR2DS2 и KIR2DS5 оба являются активирующими KIR, и KIR2DL2 и KIR2DL5 оба являются ингибирующими KIR. Один конкретный ген KIR может иметь множество аллелей. Например, KIR2DL5 включает два аллеля, KIR2DL5A и KIR2DL5B. Таким образом, можно различать четыре генотипа по отношению к KIR2DL5: генотипы, имеющие как KIR2DL5A, так и KIR2DL5B, генотипы, имеющие либо KIR2DL5A, либо KIR2DL5B, и генотипы, лишенные KIR2DL5.

Иллюстративная аминокислотная последовательность и соответствующая кодирующая последовательность нуклеиновой кислоты KIR2DS2 человека (GENBANK: GQ921920.1; GI:261362473) представлены ниже.

MSLMVSMVCVGFLLQGAWPHEGVHRKPSLLAHPGPLVKSEETVILQCWSDVRFEHFL
 LHREGKYKDTLHLIGEHHDGVSKANFSIGPMMQDLAGTYRCYGSVTHSPYQLSAPSDPLDIVIT
 GLYEKPSLSAQPGPTVLAGESVTLSCSSRSSYDMYHLSREGEAHERRFSAGPKVNGTFQADFPL
 GPATHGGTYRCFGSFRDSPYEWSNSSDPLLVSVTGNPSNSWPSPTPEPSSKTGNPRHLHVLIGTS
 VVKIPFTILLFLLHRWCSNKKNAAVMDQEPAGNRTVNSEDSDEQDHEVSYA (SEQ ID
 NO:1)

ATGTCGCTCATGGTCGTCAGCATGGTGTGTGTTGGGTTCTTCTTGCTGCAGGGGGCCTG
 GCCACATGAGGGAGTCCACAGAAAACCTTCCCTCCTGGCCACCCAGGTCCCCTGGTGAAATCA
 GAAGAGACAGTCATCCTGCAATGTTGGTCAGATGTCAGGTTTGAGCACTTCCTTCTGCACAGAG
 AGGGGAAGTATAAGGACACTTTGCACCTCATTTGGAGAGCACCATGATGGGGTCTCCAAGGCCAA
 CTTCTCCATCGGTCCCATGATGCAAGACCTTGCAGGGACCTACAGATGCTACGGTTCTGTTACT
 CACTCCCCCTATCAGTTGTGACGCTCCAGTGACCCTCTGGACATCGTCATCACAGGTCTATATG
 AGAAACCTTCTCTCTCAGCCCAGCCGGGCCCCACGGTTTTTGGCAGGAGAGAGCGTGACCTTGTC
 CTGCAGCTCCCGGAGCTCCTATGACATGTACCATCTATCCAGGGAGGGGAGGCCCATGAACGT
 AGGTTCTCTGCAGGGCCCAAGGTCAACGGAACATTCCAGGCCGACTTTCCTCTGGGCCCTGCCA
 CCCACGGAGGAACCTACAGATGCTTCGGCTCTTTCCGTGACTCTCCCTATGAGTGGTCAAACCTC
 GAGTGACCCACTGCTTGTTTCTGTACAGGAAACCCTTCAAATAGTTGGCCTTCACCCACTGAA
 CCAAGCTCCAAAACCGGTAACCCAGACACCTGCATGTTCTGATTGGGACCTCAGTGGTCAAAA
 TCCCTTTTACCATCCTCCTCTTCTTTCTCCTTCATCGCTGGTGCTCCAACAAAAAAAATGCTGC
 TGTAAATGGACCAAGAGCCTGCAGGGAACAGAACAGTGAACAGCGAGGATTCTGATGAACAAGAC
 CATCAGGAGGTGTCATACGCATAA (SEQ ID NO: 2)

Иллюстративная аминокислотная последовательность и соответствующая кодирующая последова-
 тельность нуклеиновой кислоты KIR2DL2 человека (GENBANK: EU791546.1; GI:209512828) представ-
 лены ниже.

MSLMVSMACVGFLLQGAWPHEGVHRKPSLLAHPGRLVKSEETVILQCWSDVRFEHFL
 LHREGKFKDTLHLIGEHHDGVSKANFSIGPMMQDLAGTYRCYGSVTHSPYQLSAPSDPLDIVIT
 GLYEKPSLSAQPGPTVLAGESVTLSCSSRSSYDMYHLSREGEAHECRFSAGPKVNGTFQADFPL
 GPATHGGTYRCFGSFRDSPYEWSNSSDPLLVSIVGNPSNSWPSPTPEPSSKTGNPRHLHILIGTS

VVIILFILLFLLHRWCSNKKNAAVMDQESAGNRTANSEDSDEQDPQEVITYTQLNHCVFTQRKI
TRPSQRPKTPPTDIIIVYTELPNAESRSKVVSCP (SEQ ID NO:3)

ATGTCGCTCATGGTCGTCAGCATGGCGTGTGTTGGGTTCTTCTTGCTGCAGGGGGCCTG
GCCACATGAGGGAGTCCACAGAAAACCTTCCCTCCTGGCCACCCAGGTGCCTGGTGAAATCA
GAAGAGACAGTCATCCTGCAATGTTGGTCAGATGTCAGGTTTGAGCACTTCCTTCTGCACAGAG
AAGGGAAGTTTAAGGACACTTTGCACCTCATTGGAGAGCACCATGATGGGGTCTCCAAAGCCAA
CTTCTCCATCGGTCCCATGATGCAAGACCTTGCAGGGACCTACAGATGCTACGGTTCTGTTACT
CACTCCCCCTATCAGTTGTCAGCTCCCAGTGACCCTCTGGACATCGTCATCACAGGTCTATATG
AGAAACCTTCTCTCTCAGCCCAGCCGGGCCCCACGGTTCTGGCAGGAGAGAGCGTGACCTTGTC
CTGCAGCTCCCGGAGCTCCTATGACATGTACCATCTATCCAGGGAGGGGAGGCCCATGAATGT
AGGTTCTCTGCAGGGCCCAAGGTCAACGGAACATTCCAGGCCGACTTTCTCTGGGCCCTGCCA
CCCACGGAGGAACCTACAGATGCTTCGGCTCTTTCCGTGACTCTCCATACGAGTGGTCAAACCTC
GAGTGACCCACTGCTTGTTTCTGTCATAGGAAACCTTCAAATAGTTGGCCTTCACCCACTGAA
CCAAGCTCTAAAACCGGTAACCCCCGACACCTGCACATTCTGATTGGGACCTCAGTGGTCATCA
TCCTCTTCATCCTCCTCTTCTTTCTCCTTCATCGCTGGTGCTCCAACAAAAAAAATGCTGCGGT
AATGGACCAAGAGTCTGCAGGGAACAGAACAGCGAATAGCGAGGACTCTGATGAACAAGACCTT
CAGGAGGTGACATACACACAGTTGAATCACTGCGTTTTTACACAGAGAAAAATCACTCGCCCTT
CTCAGAGGCCCAAGACACCCCCAACAGATATCATCGTGACACGGAACCTCCAAATGCTGAGTC
CAGATCCAAAGTTGTCTCCTGCCCATGA (SEQ ID NO:4)

Иллюстративная аминокислотная последовательность и соответствующая кодирующая последова-
тельность нуклеиновой кислоты KIR2DS5 человека (GENBANK: AJ181015.1; GI:754367842) представле-
ны ниже.

MSLMVISMACVAFFLLQGAWPHGFRRKPSLLAHPGPLVKSEETVILQCWSDVMFEHFL
LHREGTFNHTLRLIGEHIDGVSKGNFSGRMTQDLAGTYRCYGSVTHSPYQLSAPSDPLDIVIT
GLYEKPSLSAQPGPTVLAGESVTLSCSRSSYDMYHLSREGEAHERRLPAGPKVNRTFQADFPL
DPATHGGTYRCFGSFRDSPYEWKSSDPLLVSVTGNSSNSWPSPTEPSSETGNPRHLHVLIGTS
VVKLPFTIILLFLLHRWCSNKKNASVMDQGPAGNRTVNREDSDEQDHQEVSYA (SEQ ID
NO:5)

ATGTCGCTCATGGTCATCAGCATGGCGTGTGTTGCGTTCTTCTTGCTGCAGGGGGCCTG
GCCACATGAGGGATTCCGCAGAAAACCTTCCCTCCTGGCCACCCAGGTCCCCTGGTGAAATCA
GAAGAGACAGTCATCCTGCAATGTTGGTCAGATGTCATGTTTGAGCACTTCCTTCTGCACAGAG
AGGGGACGTTTAACCACACTTTGCGCCTCATTGGAGAGCACATTGATGGGGTCTCCAAGGGCAA
CTTCTCCATCGGTGCGATGACACAAGACCTGGCAGGGACCTACAGATGCTACGGTTCTGTTACT
CACTCCCCCTATCAGTTGTCAGCGCCCAGTGACCCTCTGGACATCGTGATCACAGGTCTATATG
AGAAACCTTCTCTCTCAGCCCAGCCGGGCCCCACGGTTCTGGCAGGAGAGAGCGTGACCTTGTC

CTGCAGCTCCCGGAGCTCCTATGACATGTACCATCTATCCAGGGAAGGGGAGGCCCATGAACGT
 AGGCTCCCTGCAGGGCCCAAGGTCAACAGAACATTCCAGGCCGACTTTCCTCTGGACCCTGCCA
 CCCACGGAGGGACCTACAGATGCTTCGGCTCTTTCCGTGACTCTCCATACGAGTGGTCAAAGTC
 AAGTGACCCACTGCTTGTTTCTGTCACAGGAACTCTTCAAATAGTTGGCCTTCACCCACTGAA
 CCAAGCTCCGAAACCGGTAACCCACAGACCTACACGTTCTGATTGGGACCTCAGTGGTCAAAC
 TCCCTTTCACCATCCTCCTCTTCTTTCTCCTTCATCGCTGGTGCTCCAACAAAAAATGCATC
 TGTAATGGACCAAGGGCCTGCGGGGAACAGAACAGTGAACAGGGAGGATTCTGATGAACAGGAC
 CATCAGGAGGTGTCATACGCATAA (SEQ ID NO:6)

Иллюстративная аминокислотная последовательность и соответствующая кодирующая последова-
 тельность нуклеиновой кислоты KIR2DL5A человека (GENBANK: ABM92655.1 GI:124245538) пред-
 ставлены ниже.

MSLMVISMACVGFLLQGAWTHEGGQDKPLLSAWPSAVVPRGGHVTLRLCSRLGFTIFS
 LYKEDGVVPPELYNKIFWKSILMGPVTPAHAGTYRCRGSHPRSPIEWSAPSNNPLVIVVTGLFGK
 PSLSAQPGPTVRTGENVTLSCSSRSSFDMYHLSREGRAHEPRLPAVPSVDGTFQADFPLGPATH
 GGTYTCFSSLHDSPEYWSDPDPLLVSVTGNSSSSSSSPTEPSSKTGIRRHLHLIGTSVAIIL
 FIILFFFLHCCCSNKKNAAVMDQEPAGDRTVNREDSDDQDPQEVTYAQLDHCVFVTQTKITSPS
 QRPKTPPTDTTMYMELPNAKPRSLSPAHHHSQALRGSSRETTALSQNRVASSHVPAAGI
 (SEQ ID NO:7)

ATGTCGCTCATGGTCATCAGCATGGCGTGTGTTGGGTCTTCTTGCTGCAGGGGGCCTG
 GACACATGAGGGTGGACAGGACAAGCCCTTGCTGTCTGCCTGGCCCAGCGCTGTGGTGCCTCGA
 GGAGGACATGTGACTCTTCTGTGTCGCTCTCGTCTTGGGTTTACCATCTTCAGTCTGTACAAAG
 AAGATGGGGTGCCTGTCCCTGAGCTCTACAACAAAATATTCTGGAAGAGCATCCTCATGGGCCC
 TGTGACCCCTGCACACGCAGGGACCTACAGATGTGCGGGTTACACCCGCGCTCCCCCATTGAG
 TGGTCGGCACCCAGCAACCCCTGGTGATCGTGGTCACAGGTCTATTTGGGAAACCTTCACTCT
 CAGCCCAGCCGGGGCCCCACGGTTCGCACAGGAGAGAACGTGACCTTGTCTGCTGCAGCTCCAGGAG
 CTCATTTGACATGTACCATCTATCCAGGGAGGGGAGGGCCCATGAACCTAGGCTCCCTGCAGTG
 CCCAGCGTCGATGGAACATTCCAGGCTGACTTTCCTCTGGGCCCTGCCACCCACGGAGGGACCT
 ACACATGCTTCAGCTCTCTCCATGACTCACCTATGAGTGGTCAGACCCGAGTGACCCACTGCT
 TGTTTCTGTACAGGAACTCTTCAAGTAGTTTCATCTTCACCCACTGAACCAAGTCCAAAAC
 GGTATCCGCAGACACCTGCACATTCTGATTGGGACCTCAGTGGCTATCATCCTCTTCATCATCC
 TCTTCTTCTTCTCCTTCATTGCTGCTGCTCCAACAAAAAGAATGCTGCTGTAATGGACCAAGA
 GCCTGCCGGGGACAGAACAGTGAACAGGGAGGACTCTGATGATCAAGACCCTCAGGAGGTGACA
 TATGCACAGTTGGATCACTGCGTTTTACACAGACAAAAATCACTTCCCCTTCTCAGAGGCCCA
 AGACACCTCCAACAGATACCACCATGTACATGGAACCTCCAAATGCTAAGCCAAGATCATTGTC
 TCCTGCCCATAAGCACAGTCAGGCCTTGAGGGGATCTTCTAGGGAGACAACAGCCCTGTCT
 CAAAACCGGGTTGCTAGCTCCCATGTACCAGCAGCTGGAATCTGA (SEQ ID NO:8)

Иллюстративная аминокислотная последовательность и соответствующая кодирующая последова-
 тельность нуклеиновой кислоты KIR2DL5B человека (GENBANK: ABM92657.1 GI: 124245542) пред-
 ставлены ниже.

MSLMVVSMAVGVFFLLQGAWTHEGGQDKPLLSAWPSAVVPRGGHVTLCLSRSLGFTIFS
 LYKEDGVPVPELYNKIFWKSILMGPVTPAHAGTYRCRGSHPRSPIEWSAPSNPLVIVVTGLFGK
 PSLSAQPGPTVRTGENVTLSCSSRSSFDMYHLSREGRAHEPRLPAVPSVDGTFQADFPLGPATH
 GGTYTCFSSLHDSPIEWSDPDPLLVSVTGNSSSSSSSPTSPSSKTGILRHLHLIGTSVAIIL
 FIILFFFLHCCCSNKKNAAVMDQEPAGDRTVNRESDDDQDPQEVTYAQLDHCFTQTKITSPS
 QRPKTPPTDTTMYMELPNAKPRSLSPAHHKHSQALRGSSRETTALSQNRVASSHVPAAGI
 (SEQ ID NO:9)

ATGTCGCTCATGGTCGTCAGCATGGCGTGTGTTGGGTTCTTCTTGCTGCAGGGGGCCTG
 GACACATGAGGGTGGACAGGACAAGCCCTTGCTGTCTGCCTGGCCCAGCGCTGTGGTGCCTCGA
 GGAGGACATGTGACTCTTCTGTGTGCTCTCGTCTTGGGTTTACCATCTTCAGTCTGTACAAAG
 AAGATGGGGTGCCTGTCCCTGAGCTCTACAACAAAATATTCTGGAAGAGCATCCTCATGGGGCC
 TGTGACCCCTGCACACGCAGGGACCTACAGATGTCGGGGTTTACACCCCGCGCTCCCCATTGAG
 TGGTCGGCACCCAGCAACCCCTGGTGATCGTGGTCACAGGTCTATTTGGGAAACCTTCACTCT
 CAGCCCAGCCGGGGCCCCACGGTTCGCACAGGAGAGAACGTGACCTTGTCTGCAGCTCCAGGAG
 CTCATTTGACATGTACCATCTATCCAGGGAGGGGAGGGCCCATGAACCTAGGCTCCCTGCAGTG
 CCCAGCGTCGATGGAACATTCCAGGCTGACTTTCCTCTGGGCCCTGCCACCCACGGAGGGACCT
 ACACATGCTTCAGCTCTCTCCATGACTCACCCCTATGAGTGGTCAGACCCGAGTGACCCACTGCT
 TGTTTCTGTACAGGAACTCTTCAAGTAGTTTCTTCACTTCACTTGAACCAAGCTCCAAAAC
 GGTATCCTCAGACACCTGCACATTCTGATTGGGACCTCAGTGGCTATCATCCTCTTCATCATCC
 TCTTCTTCTTCTCCTTCATTGCTGCTGCTCCAACAAAAGAATGCTGCTGTAATGGACCAAGA
 GCCTGCCGGGGACAGAACAGTGAACAGGGAGGACTCTGATGATCAAGACCTCAGGAGGTGACA
 TATGCACAGTTGGATCACTGCGTTTTTACACAGACAAAATCACTTCCCCTTCTCAGAGGCCCA
 AGACACCTCCAACAGATAACCACCATGTACATGGAACCTCCAAATGCTAAGCCAAGATCATTGTC
 TCCTGCCCATAGCACCACAGTCAGGCCTTGAGGGGATCTTCTAGGGAGACAACAGCCCTGTCT
 CAAAACCGGGTTGCTAGCTCCCATGTACCAGCAGCTGGAATCTGA (SEQ ID NO:10)

Как применяют в настоящем документе, термин "типирование KIR" относится к способу определения генотипа генов KIR у субъекта, включающему определение присутствия или отсутствия одного или более специфических генов или аллелей KIR в геноме субъекта. Типирование KIR может включать также определение количества копий одного или более специфических генов или аллелей KIR в геноме субъекта.

Как применяют в настоящем документе, термин "типирование HLA" относится к способу определения генотипа генов HLA у субъекта, включающему определение присутствия или отсутствия одного или более специфических генов или аллелей HLA в геноме субъекта. Типирование HLA включает также определение количества копий одного или более специфических генов или аллелей HLA в геноме субъекта.

Гранзим М (GZMM) представляет собой сериновую протеазу, экспрессируемую во множестве подгрупп цитотоксических лимфоцитов. Грануляторно-экзоцитозный путь является главным механизмом, посредством которого цитотоксические лимфоциты уничтожают инфицированные вирусом клетки и клетки опухолей. В этом пути цитотоксические лимфоциты высвобождают гранулы, содержащие образующий поры белок перфорин и семейство сериновых протеаз, известных как гранзимы (GZM), в иммунный синапс. Образование пор посредством перфорины облегчает проникновение гранзимов в клетку-мишень, где они могут активировать различные пути гибели клеток. Существует пять гранзимов человека: GZMA, GZMB, GZMH, GZMK и GZMM. Из пяти GZM, GZMM является маркером клеток NK или клеток NKT, и GZMH является маркером цитотоксических Т-клеток (Poot, Cell Death and Differentiation 21:359-368 (2014)).

Иллюстративная аминокислотная последовательность и соответствующая кодирующая последовательность нуклеиновой кислоты GZMM человека (NCBI Ref: NM_020535.3 GI:65508540) представлены ниже.

MEACVSSLLVLALGALSVGSSFGTQIIIGGREVIPHSPYMASLQRNGSHLCGGVLVHPK
WVLTAAHCLAQRMAQLRLVLGLHTLDSPGLTFHIKAAIQHPRYKPVPALENDLALLQLDGKVKP
SRTIRPLALPSKRQVVAAGTRCSMAGWGLTHQGGRLSRVLRDLQVLDTRMCNNSRFWNGSL
PSMVCLAADSKDQAPCKGDSGGPLVCGKGRVLAGVLSFSSRVCTDIFKPPVATAVAPYVSWIRK
VTGRSA (SEQ ID NO:11)

ATGGAGGCCTGCGTGTCTTCACTGCTGGTGTCTGGCCCTGGGGGCCCTGTCAGTAGGCAG
CTCCTTTGGGACCCAGATCATCGGGGGCCGGGAGGTGATCCCCACTCGCGCCCGTACATGGCC
TCACTGCAGAGAAATGGCTCCACCTGTGCGGGGGTGTCTTGGTGCACCCAAAGTGGGTGCTGA
CGGCTGCCCACTGCCTGGCCCAGCGGATGGCCCAGCTGAGGCTGGTGTCTGGGGCTCCACACCT
GGACAGCCCCGGTCTCACCTTCCACATCAAGGCAGCCATCCAGCACCTCGCTACAAGCCCGTC
CCTGCCCTGGAGAACGACCTCGCGCTGCTTCACTGAGCGGAAAGTGAAGCCAGCCGGACCA
TCCGGCCGTTGGCCCTGCCAGTAAGCGCCAGGTGGTGGCAGCAGGGACTCGGTGCAGCATGGC
CGGCTGGGGGCTGACCCACCAGGGCGGGCGCTGTCCCGGTGCTGCGGGAGCTGGACCTCCAA
GTGCTGGACACCCGCATGTGTAACAACAGCCGCTTCTGGAACGGCAGCCTCTCCCCAGCATGG
TCTGCCTGGCGGCCGACTCCAAGGACCAGGCTCCCTGCAAGGGTGACTCGGGCGGGCCCTGGT
GTGTGGCAAAGGCCGGGTGTTGGCCGGAGTCTGTCTTCACTCCAGGGTCTGCACTGACATC
TTCAAGCCTCCCGTGGCCACCGCTGTGGCGCCTTACGTGTCTTGGATCAGGAAGGTCACCGGCC
GATCGGCCTGA (SEQ ID NO:12)

Как применяют в настоящем документе, термин "субъект" относится к человеку. Субъект может представлять собой человека или не относящегося к человеку млекопитающего, такого как собака, кошка, полорогие, лошадиные, мышь, крыса, кролик, или их трансгенные виды. Субъект может представлять собой пациента или пациента с злокачественной опухолью.

Как применяют в настоящем документе, термин "злокачественная опухоль" или "канцерогенный" относится к физиологическому состоянию у млекопитающих, которое, как правило, характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Примеры злокачественных опухолей включают, но без ограничения, гематологические злокачественные опухоли (например, множественную миелому, лимфому и лейкоз) и солидные опухоли. Как применяют в настоящем документе, термин "предзлокачественное состояние" относится к состоянию, ассоциированному с увеличенным риском злокачественной опухоли, которое, если оставить без лечения, может привести к злокачественной опухоли. А предзлокачественное состояние может также относиться к неинвазивной злокачественной опухоли, которая не прогрессировала до агрессивной, инвазивной стадии.

Как применяют в настоящем документе, термин "лечить", "лечение" и "обработка", при применении по отношению к пациенту с злокачественной опухолью, относятся к действию, которое уменьшает тяжесть злокачественной опухоли или задерживает или замедляет прогрессирование злокачественной опухоли, включающему (а) замедление роста злокачественной опухоли или остановку развития злокачественной опухоли и (б) вызов регрессии злокачественной опухоли, или задержку, или минимизацию одного или более симптомов, ассоциированных с присутствием злокачественной опухоли.

Как применяют в настоящем документе, термин "определение" относится к использованию любой формы измерения для оценки присутствия вещества, либо количественно, либо качественно. Измерение может являться относительным или абсолютным. Измерение присутствия вещества может включать определение того, присутствует или отсутствует вещество, или определение количества вещества.

Как применяют в настоящем документе, термин "носитель" при применении в связи с геном относится к субъекту, геном которого содержит по меньшей мере одну копию гена, и при применении в связи с аллелем гена относится к субъекту, геном которого содержит по меньшей мере одну копию специфического аллеля. Например, носитель KIR2DS2 относится к субъекту, геном которого содержит по меньшей мере одну копию KIR2DS2. Если ген имеет более одного аллеля, носитель гена относится к субъекту, геном которого содержит по меньшей мере одну копию по меньшей мере одного аллеля гена. Например, ген KIR2DL5 имеет два известных аллеля, KIR2DL5A и KIR2DL5B. Носитель KIR2DL5A относится к субъекту, геном которого содержит по меньшей мере одну копию аллеля KIR2DL5A; носитель KIR2DL5B относится к субъекту, геном которого содержит по меньшей мере одну копию аллеля KIR2DL5B. Носитель KIR2DL5 относится к субъекту, геном которого содержит по меньшей мере одну копию KIR2DL5A, KIR2DL5B или обоих. В качестве другого примера носитель HLA-C2 относится к

субъекту, геном которого содержит по меньшей мере одну копию аллеля HLA-C2. Субъект может являться гомозиготным HLA-C2/HLA-C2 или гетерозиготным HLA-C1/HLA-C2.

Как применяют в настоящем документе, термин "вводить", "ввод" или "введение" относится к акту доставки или обеспечения доставки соединения или фармацевтической композиции в организм субъекта способом, описанным в настоящем документе, или иным образом известным в данной области. Введение соединения или фармацевтической композиции включает предписание того, что соединение или фармацевтическую композицию следует доставлять в организм пациента. Иллюстративные формы введения включают пероральные лекарственные формы, такие как таблетки, капсулы, сиропы, суспензии; пригодные для инъекции лекарственные формы, такие как внутривенные (IV), внутримышечные (IM) или внутривенные (IP); чрескожные лекарственные формы, включая кремы, желе, порошки или пластыри; трансбуккальные лекарственные формы; порошки для ингаляции, спреи, суспензии и ректальные суппозитории.

Как применяют в настоящем документе, термин "терапевтически эффективное количество" соединения, при применении в связи с заболеванием или нарушением относится к количеству, достаточному для обеспечения терапевтического преимущества в лечении заболевания или нарушения, или в управлении течением заболевания или нарушения, или для задержки или минимизации одного или более симптомов, ассоциированных с заболеванием или нарушением. Терапевтически эффективное количество соединения обозначает количество соединения, отдельно или в комбинации с другими лекарственными средствами, которое обеспечивает терапевтическое преимущество в лечении заболевания или нарушения или в управлении течением заболевания или нарушения. Термин включает количество, которое улучшает общее лечение, уменьшает или прекращает симптомы или улучшает терапевтическую эффективность другого лекарственного средства. Термин относится также к количеству соединения, которое вызывает значительный биологический или медицинский ответ биологической молекулы (например, белка, фермента, РНК или ДНК), клетки, ткани, системы, животного или человека, которого добывается исследователь, ветеринар, лечащий врач или клинический персонал.

Как применяют в настоящем документе, термин "образец" относится к материалу или смеси материалов, содержащим один или более представляющих интерес компонентов. Образец от субъекта относится к образцу, полученному от субъекта, включая образцы, происходящие из биологической ткани или жидкости, полученные, доступные или собранные *in vivo* или *in situ*. Образец можно получать из области организма субъекта, содержащего предзлокачественные или злокачественные клетки или ткани. Такие образцы могут представлять собой, но без ограничения, органы, ткани, фракции и клетки, выделенные из млекопитающего. Иллюстративные образцы включают костный мозг, цельную кровь, частично очищенную кровь, мононуклеарные клетки периферической крови ("РВМС") и биоптаты тканей. Иллюстративные образцы включают также 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.

Как применяют в настоящем документе, термин "биомаркер" относится к гену, который может либо присутствовать, либо отсутствовать у индивидуальных субъектов, или может присутствовать, но обладать дифференциальной экспрессией у индивидуальных субъектов. Присутствие биомаркера, включая уровень экспрессии биомаркера, в образце от субъекта может указывать на способность субъекта отвечать на конкретное лечение, такое как лечение FTI.

Как применяют в настоящем документе, термин "экспрессирует" или "экспрессия" при применении в связи с геном относится к процессу, посредством которого информация, которую несет ген, проявляется в виде фенотипа, включая транскрипцию гена в матричную РНК (мРНК), последующую трансляцию молекулы мРНК в полипептидную цепь и ее сборку в конечный белок.

Как применяют в настоящем документе, термин "продукт РНК биомаркера" относится к транскрипту РНК, транскрибируемому с биомаркера, и термин "белковый продукт биомаркера" относится к белку или полипептиду, транслируемому с продукта РНК биомаркера.

Как применяют в настоящем документе, термин "уровень экспрессии" биомаркера относится к количеству или накоплению продукта экспрессии биомаркера, например, такому как количество продукта РНК биомаркера (уровень РНК биомаркера) или количество белкового продукта биомаркера (уровень белка биомаркера). Если биомаркер представляет собой ген с более, чем одним аллелем, уровень экспрессии биомаркера относится к общему уровню накопления продуктов экспрессии всех существующих аллелей для этого гена, если не указано иначе. Например, уровень экспрессии KIR2DL5 относится к общему уровню экспрессии как KIR2DL5A, так и KIR2DL5B, если не указано иначе.

Как применяют в настоящем документе, термин "эталонный уровень экспрессии" относится к предопределенному уровню экспрессии биомаркера, который можно использовать для определения значимости уровня экспрессии биомаркера в образце от субъекта. Эталонный уровень экспрессии биомаркера может представлять собой уровень экспрессии биомаркера в образце от здорового индивидуума. Эталонный уровень экспрессии биомаркера может представлять собой также значение отсечения, определенное специалистом в данной области посредством статистического анализа уровней экспрессии биомаркера в выборке и способности отвечать на лечение индивидуумов в выборке. Например, посредством

анализа уровней экспрессии GZMM у индивидуумов из выборки и способности этих индивидуумов отвечать на лечение FTI, специалист в данной области может определять значение отсечения в качестве эталонного уровня экспрессии GZMM, где субъект, вероятно, способен отвечать на лечение FTI, если уровень экспрессии GZMM субъекта выше, чем эталонный уровень экспрессии.

Как применяют в настоящем документе, термин "способность отвечать" или "способный отвечать", при применении в связи с лечением, относится к эффективности лечения для уменьшения или снижения симптомов заболевания, подвергаемого лечению. Например, пациент с злокачественной опухолью является способным отвечать на лечение FTI, если лечение FTI эффективно подавляет рост злокачественной опухоли или вызывает арест развития злокачественной опухоли, вызывает регрессию злокачественной опухоли, или задерживает, или минимизирует один или более симптомов, ассоциированных с присутствием злокачественной опухоли у этого пациента.

Способность пациента с злокачественной опухолью отвечать на конкретное лечение можно характеризовать как полный или частичный ответ. "Полный ответ", или "CR", относится к отсутствию поддающегося клинической детекции заболевания с нормализацией ранее аномальных результатов радиографических исследований, анализа костного мозга и спинномозговой жидкости (CSF) или аномальных количеств моноклональных белков. "Частичный ответ", или "PR", относится к, по меньшей мере, приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% уменьшению всей поддающейся измерению опухолевой нагрузки (т.е. количества злокачественных клеток, присутствующих у субъекта, или измеренного объема опухолевых масс, или количеств аномальных моноклональных белков) в отсутствие новых очагов.

Специалисту в данной области понятно, что клинические стандарты, используемые для определения CR, PR или другого уровня способности пациента отвечать на лечение, могут меняться для различных типов злокачественных опухолей. Например, для гематопозитических злокачественных опухолей, пациентов, "способных отвечать" на конкретное лечение, можно определять как пациентов, обладающих полным ответом (CR), частичным ответом (PR) или улучшением гематологических показателей (HI) (Lancet et al., Blood 2:2 (2006)). HI можно определять как любое количество бластных клеток в костном мозге менее 5% или уменьшение количества бластных клеток в костном мозге по меньшей мере наполовину. С другой стороны, пациентов, "неспособных отвечать" на конкретное лечение, можно определять как пациентов, обладающих либо прогрессирующим заболеванием (PD), либо стабильным заболеванием (SD). Прогрессирующее заболевание (PD) можно определять либо как >50% увеличение % бластных клеток в костном мозге или циркулирующих бластных клеток по сравнению с исходным, либо как появление новых 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.

Как применяют в настоящем документе, термин "вероятность" относится к возможности события. Субъект, "вероятно" являющийся способным отвечать на конкретное лечение при соблюдении условия, означает, что вероятность для субъекта являться способным отвечать на конкретное лечение выше при соблюдении условия, чем при несоблюдении условия. Вероятность являться способным отвечать на конкретное лечение может быть выше, например, на 5, 10, 25, 50, 100, 200% или более у субъекта при соблюдении конкретного условия, по сравнению с субъектом при несоблюдении условия. Например, пациент с злокачественной опухолью, "вероятно" являющийся способным отвечать на лечение FTI, когда субъект является носителем KIR2DS2, означает, что вероятность для субъекта являться способным отвечать на лечение FTI на 5, 10, 25, 50, 100, 200% или более выше у субъекта, который является носителем KIR2DS2, по сравнению с субъектом, который не является носителем KIR2DS2. В качестве другого примера субъект, "вероятно" являющийся способным отвечать на лечение типифарнибом, когда уровень экспрессии GZMM в образце от субъекта выше, чем эталонный уровень экспрессии GZMM, означает, что вероятность для субъекта являться способным отвечать на лечение типифарнибом на 5, 10, 25, 50, 100, 200% или более выше у субъекта, уровень экспрессии GZMM у которого выше, чем эталонный уровень экспрессии GZMM, по сравнению с субъектом, уровень экспрессии GZMM у которого ниже, чем эталонный уровень экспрессии.

Белки Ras представляют собой ГТФазы, регулирующие пролиферацию и перенос биологической информации от внеклеточных сигналов в ядро. Клетки млекопитающих экспрессируют три гена *gas*, кодирующие четыре белка Ras, представляющие собой H-Ras, N-Ras, K_A-Ras и K_B-Ras. K_A-Ras и K_B-Ras также, в общем, обозначают, как K-Ras. Белки Ras существуют либо в активном, связанном с ГТФ, либо в неактивном, связанном с ГДФ, состоянии. Мутантные белки RAS накапливаются в связанной с ГТФ конформации из-за дефектной собственной активности ГТФазы и/или устойчивости к инактивации посредством активирующих ГТФазу белков (GAP). Мутации, запирающие белки Ras в их связанном с ГТФ, активированном состоянии, приводит к неконтролируемому росту и злокачественной трансформации. Мутации K-Ras, приводящие к замене глицина на валин в каталитических участках K-Ras, приводящие к потере активности ГТФазы и последующему постоянному связыванию ГТФ с RAS (Yokota, Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 12:163-171(2012)). Замена других аминокислот, таких как аспарат и валин в кодоне 12 и аспарат в кодоне 13, может приводить к выступанию боковых цепей более крупной ами-

нокислоты в связывающий ГДФ/ГТФ карман белка, что мешает гидролизу ГТФ. В результате этих конформационных и структурных изменений регуляция передачи сигналов EGFR становится нарушенной в ответ на конститутивную активацию белка K-Ras (Herreros-Villanueva et al., Clinica Chimica Acta 431 (2014) 21:1-220).

Иллюстративная аминокислотная последовательность и соответствующая кодирующая последовательность нуклеиновой кислоты изоформы А K-Ras человека (K_A-Ras) (GENBANK: NM_033360.3 GI:575403058) представлены ниже.

```

MTEYKLVVVG AGGVGKSALT IQLIQNHFVD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET
CLLDILDTAG QEEYSAMRDQ YMRTGEGFLC VFAINNTKSF EDIHHYREQI
KRVKDSEDVP MVLVGKCDL PSRTVDTKQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ
RVEDAFYTLV REIRQYRLKK ISKEEKTPGC VKIKKCIIM

```

(SEQ ID NO:13)

```

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

```

(SEQ ID NO:14)

Иллюстративная аминокислотная последовательность и соответствующая кодирующая последовательность нуклеиновой кислоты изоформы В K-Ras человека (K_B-Ras) (GENBANK: NM_033360.3 GI:575403058) представлены ниже.

```

MTEYKLVVVG AGGVGKSALT IQLIQNHFVD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET
CLLDILDTAG QEEYSAMRDQ YMRTGEGFLC VFAINNTKSF EDIHHYREQI

```

KRVKDSSEDPV MVLVGNKCDL PSRTVDTKQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ
GVDDAFYTLV REIRKHKEKM SKDGKKKKKK SKTKCVIM

(SEQ ID NO: 15)

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

(SEQ ID NO: 16)

Иллюстративная аминокислотная последовательность и соответствующая кодирующая последовательность нуклеиновой кислоты N-Ras человека (GENBANK: NM_002524.4 GI:334688826) представлены ниже.

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

(SEQ ID NO: 17)

ATGACTGAGT ACAAACCTGGT GGTGGTTGGA GCAGGTGGTG TTGGGAAAAG
CGCACTGACA ATCCAGCTAA TCCAGAACCA CTTTGTAGAT GAATATGATC
CCACCATAGA GGATTCCTAC AGAAAACAAG TGGTTATAGA TGGTGAAACC
TGTTTGTGTTGG ACATACTGGA TACAGCTGGA CAAGAAGAGT ACAGTGCCAT
GAGAGACCAA TACATGAGGA CAGGCGAAGG CTTCTCTGT GTATTTGCCA
TCAATAATAG CAAGTCATTT GCGGATATTA ACCTCTACAG GGAGCAGATT
AAGCGAGTAA AAGACTCGGA TGATGTACCT ATGGTGCTAG TGGGAAACAA
GTGTGATTTG CCAACAAGGA CAGTTGATAC AAAACAAGCC CACGAACTGG
CCAAGAGTTA CGGGATTCCA TTCATTGAAA CCTCAGCCAA GACCAGACAG
GGTGTGTAAG ATGCTTTTAA CAACTGGTA AGAGAAATAC GCCAGTACCG
AATGAAAAAA CTCAACAGCA GTGATGATGG GACTCAGGGT TGTATGGGAT
TGCCATGTGT GGTGATGTAA

(SEQ ID NO: 18)

Иллюстративная аминокислотная последовательность и соответствующая кодирующая последовательность нуклеиновой кислоты H-Ras человека (GENBANK: CR536579.1 GI:49168641) представлены ниже.

```

MTEYKLVVVG AGGVGKSALT IQLIQNHFVD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET
CLLDILDITAG QEEYSAMRDQ YMRTGEGFLC VFAINNTKSF EDIHQYREQI
KRVKSDDDVP MVLVGNKCDL AARTVESRQA QDLARSYGIP YIETSAKTRQ
GVEDAFYTLV REIRQHKLRK LNPPDESGPG CMSCKCVLS

```

(SEQ ID NO:19)

```

ATGACGGAAT ATAAGCTGGT GGTGGTGGGC GCCGGCGGTG TGGGCAAGAG
TGCCTGTACC 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:20)

Изоформы Ras являются фарнезилированными.

Фарнезилтрансфераза (ФТаз) играет критические роли в пост-трансляционных модификациях белков Ras. Способом помешать функционированию Ras является ингибирование ФТазы, фермента, присоединяющего изопренильную группу из 15 атомов углерода к белкам Ras, посредством ингибиторов фарнезилтрансферазы ("FTI"). FTI представляют собой класс биологически активных противораковых лекарственных средств, которые ингибируют фарнезилирование широкого ряда белков-мишеней, включая Ras. FTI блокируют активацию Ras посредством ингибирования ФТазы, в конечном счете приводя к аресту роста клеток. Таким образом, прогнозировали, что FTI могут являться эффективными лекарственными средствами для лечения злокачественных опухолей.

Тридцать процентов из всех злокачественных опухолей экспрессируют онкогенно активированный Ras. Высокое преобладание мутантного Ras, обнаруженного в 30% всех злокачественных опухолей человека, делает этот путь привлекательной мишенью для разработки противораковых лекарственных средств. Первоначально прогнозировали, что мутация(мутации) Ras, приводящие к конститутивно активному пути RAS, могут служить в качестве биомаркера для ответа пациента на FTI, что основано на доклиническом доказательстве того, что FTI могут блокировать трансформированные посредством RAS клетки. (Raponi et al., Blood 111:2589-96 (2008)). В отличие от общепринятого понимания, описанного в настоящем документе, существуют неожиданные обнаружения, что пациенты с злокачественными опухолями, имеющие K-Ras и N-Ras дикого типа, являются более чувствительными к лечению FTI по сравнению с пациентами, имеющими мутантный K-Ras или N-Ras, и что отбор пациентов с злокачественными опухолями на основании статуса мутаций Ras может улучшать общую частоту ответа на лечение FTI, такое как лечение типифарнибом.

Как применяют в настоящем документе, термин "мутация Ras" относится к активирующей мутации в гене *gas* или белке Ras. Мутация Ras может относиться либо к генетическому изменению в последовательности ДНК одного из генов *gas*, приводящему к активации соответствующего белка Ras, либо к изменению аминокислотной последовательности белка Ras, приводящему к его активации. Таким образом, термин "мутация Ras", как применяют в настоящем документе, не включает изменение гена *gas*, которое не приводит к активации белка Ras, или изменение белковой последовательности Ras, которое не приводит к его активации. Соответственно образец или субъект, не имеющий никакой "мутации Ras", как применяют в настоящем документе, все еще может иметь мутацию в гене *gas*, которая не влияет на активность белка Ras, или мутацию, нарушающую активность белка Ras, или иметь мутацию в белке Ras, которая не влияет на его активность, или мутацию, нарушающую его активность. Образец или субъект может иметь множество копий гена *gas*. Образец или субъект может также иметь как белок Ras дикого типа, так и мутантный белок Ras. Как применяют в настоящем документе, образец или субъект, имеющий мутацию Ras, может также иметь копию гена *gas* дикого типа и/или белок Ras дикого типа. Образец или

субъект, определенный как "имеющий Ras дикого типа", как применяют в настоящем документе, относится к образцу или субъекту, который имеет только ген *ras* дикого типа и белок Ras дикого типа, и не имеет мутаций Ras. Соответственно образец или субъект, определенный как "имеющий K-Ras дикого типа", как применяют в настоящем документе, относится к образцу или субъекту, который имеет только ген *kras* дикого типа и белок K-Ras дикого типа, и не имеет мутаций K-Ras. Образец или субъект, определенный как "имеющий N-Ras дикого типа", как применяют в настоящем документе, относится к образцу или субъекту, который имеет только ген *nras* дикого типа и белок N-Ras дикого типа, и не имеет мутаций N-Ras.

Белок Ras может представлять собой K-Ras, N-Ras, H-Ras или любую их комбинацию. K-Ras может представлять собой K_A-Ras, K_B-Ras или оба. В некоторых вариантах осуществления мутация представляет собой миссенс-мутацию, запирающую белок Ras в его связанном с ГТФ активированном состоянии. В некоторых вариантах осуществления мутация приводит к аминокислотной замене в одном или более из кодонов 12, 13, 61 белка Ras.

В некоторых вариантах осуществления, мутация Ras представляет собой мутацию K-Ras. В некоторых вариантах осуществления мутация K-Ras представляет собой мутацию в K_A-Ras, K_B-Ras или обе. Мутация K-Ras может включать по меньшей мере одну мутацию в кодоне, выбранном из группы, состоящей из G12, G13 и Q61 из K_A-Ras, K_B-Ras или обоих. В некоторых вариантах осуществления мутация K_A-Ras может включать по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных замен

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 по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных замен

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 Ras представляет собой мутацию N-Ras. 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 аминокислотных замен

G12C, G12D, G12F, G12S, G12A, G12V, G12R, G13C, G13R, G13A, G13D, G13V, G15W, G60E, Q61P, Q61L, Q61R, Q61K, Q61H и Q61E.

В некоторых вариантах осуществления мутация Ras представляет собой мутацию H-Ras. В некоторых вариантах осуществления мутация H-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 аминокислотных замен G12R, G12V, G13C, G13R, Q61L и Q61R.

2. Ингибиторы фарнезилтрансферазы для лечения злокачественных опухолей.

2.1. Ингибиторы фарнезилтрансферазы.

В настоящем документе представлены способы лечения злокачественных опухолей с использованием FTI у отобранного пациента с злокачественной опухолью или в отобранной популяции пациентов с злокачественными опухолями. Репрезентативные FTI грубо принадлежат к двум классам (Shen et al., *Drug Disc. Today* 20:2 (2015)). FTI в первом классе имеют основной каркас из фарнезилдифосфата (FPP). Например, опубликовано, что аналоги FPP с группой малоновой кислоты (Ta) представляют собой FTI, конкурирующие с FPP (Duez, S. et al., *Bioorg. Med. Chem.* 18:543-556(2010)). Кроме того, содержащие имидазол производные, связанные посредством кислого заместителя и пептидильной цепи, также синтезировали как бисубстратные FTI, и разработанные бисубстратные ингибиторы обладают лучшей аффинностью, чем FPP. FTI во втором классе представляют собой молекулы пептидомиметика, которые можно разделить на две группы, а именно тиольные и нетиольные FTI. По отношению к тиольным FTI, например, L-739749, избирательному пептидомиметику FTI, показана сильная противоопухолевая активность у мышей nude без системной токсичности (Kohl, N.E. et al., *PNAS* 91:9141-9145(1994)). Кроме того, разработано также множество тиольных ингибиторов, таких как трипептидильные FTI (Lee, H-Y. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12:1599-1602(2002)).

Для нетиольных FTI гетероциклы, таким образом, широко использовали для замены тиольных групп для контакта с ионом цинка в участке связывания. В соответствии со структурами фармакофорных групп, нетиольные FTI можно разделить на три класса. Первый класс характеризуется различными мо-

ноциклическими кольцами, такими как L-778123, FTI в клинических исследованиях фазы I для солидных опухолей и лимфомы. L-778123 связывается в участке для пептида СААХ и конкурирует с субстратом СААХ фарнезилтрансферазы. Второй класс представлен типифарнибом в исследованиях фазы III и BMS-214662 в исследованиях фазы III, состоящих из разнообразных моноциклических колец и бициклических колец (Hagousseau et al., Blood 114:1166-1173 (2009)). Репрезентативным ингибитором третьего класса является лонафарниб, который является активным в зависимых и не зависимых от Ras злокачественных опухолях и входит в клинические исследования фазы III для борьбы с карциномой, лейкозом и миелодиспластическим синдромом. Лонафарниб представляет собой FTI с трициклическим кором, содержащий центральное семичленное кольцо, конденсированное с двумя шестичленными ароматическими кольцами.

Таким образом, FTI, как описано в настоящем документе, могут принимать множество форм, но разделяют необходимую ингибирующую функцию создания помех или уменьшения фарнезилирования белков, вовлеченных в злокачественные опухоли и пролиферативные заболевания.

Многочисленные FTI входят в объем изобретения и включают 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,

Полное содержание которых, таким образом, приведено в качестве ссылки.

FTI в объеме изобретения включают также описанные в Thomas et al., *Biologies* 1: 415-424 (2007); Shen et al., *Drug Disc. Today* 20:2 (2015); Appels et al., *The Oncologist* 10:565-578(2005), полное содержание которых, таким образом, приведено в качестве ссылки.

В некоторых вариантах осуществления FTI включают арглабин (т.е. 1(R)-10-эпокси-5(S),7(S)-гвай-3(4),11(13)-диен-6,12-олид, описанный в WO 98/28303 (NuOncology Labs)); перилловый спирт, описанный в WO 99/45912 (Wisconsin Genetics); SCH-66336 (лонафарниб), т.е. (+)-(R)-4-[2-[4-(3,10-дибром-8-хлор-5,6-дигидро-1H-бензо[5,6]циклогепта[1,2-b]пиридин-1-ил)пиперидин-1-ил]-оксоэтил]пиперидин-1-карбоксамид, описанный в патенте США No. 5874442 (Schering); L778123, т.е. 1-(3-хлорфенил)-4-[1-(4-цианобензил)-5-имидазолметил]-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-метионинсульфон, 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)-хинолин-он и (R)-6-[(4-хлорфенил)-гидроксил-(3-метил-3H-имидазол-4-ил)метил]-4-(3-этинилфенил)-1-метил-2-(1H)-хинолин-он; 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.

В некоторых вариантах осуществления FTI представляют собой непептидные, так называемые "низкомолекулярные" лекарственные средства, такие как хинолины или производные хинолинов, включая 7-(3-хлорфенил)-9-[(4-хлорфенил)-1H-имидазол-1-илметил]-2,3-дигидро-о-1H,5H-бензо[*ij*]хинолизин-5-он, 7-(3-хлорфенил)-9-[(4-хлорфенил)-1H-имидазол-1-илметил]-1,2-дигидро-о-4H-пирроло[3,2,1-*ij*]хинолин-4-он, 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 8-[амино(4-хлорфенил)(1-метил-1H-имидазол-5-ил)метил]-6-(3-хлорфенил)-2,3-дигидро-1H,5H-бензо[*ij*]хинолизин-5-он.

Типифарниб представляет собой не относящийся к пептидомиметикам FTI (Thomas et al., *Biologies* 1: 415-424 (2007)). Он представляет собой производное 4,6-дизамещенного-1-метилхинолин-2-она ((B)-6-[амино(4-хлорфенил)(1-метил-1H-имидазол-5-ил)метил]-4-(3-хлорфенил)-1-метил-2(1H)-хинолин-он)), полученный посредством оптимизации лидерного соединения хинолона, идентифицированного при скрининге библиотеки соединений. Типифарниб конкурентно ингибирует участок связывания пептида СААХ ФТазы и является необычайно сильным и высоко избирательным ингибитором фарнезилирова-

ния. Типифарниб не является ингибитором геранилгеранилтрансферазы I. Типифарниб обладает контролируемым профилем безопасности в качестве монотерапии, обладает приемлемо хорошей переносимостью у человека и требует дозирования дважды в сутки для получения эффективных концентраций в плазме.

Типифарниб синтезируют посредством конденсации аниона 1-метилимидазола с производным 6-(4-хлорбензоил)хинолона, с последующей дегидратацией. Промежуточное соединение хинолона получают за четыре стадии посредством циклизации N-фенил-3-(3-хлорфенил)-2-пропенамида, ацилирования, окисления и N-метилирования. Типифарниб идентифицирован из программ Janssen катаболизма кетоконазола и ретиноевой кислоты в качестве ключевого структурного признака в процессе пренилирования Ras. Типифарниб является сильным ингибитором ФТазы *in vitro* и является активным при пероральном введении во множестве моделей на животных. Активность типифарниба в качестве монотерапии наблюдали в популяции неотобранных опухолей (AML, MDS/CMML, уротелиального рака, рака молочной железы, PTCL/CTCL), хотя в клиническом исследовании фазы III не удалось показать улучшение общей выживаемости.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ лечения злокачественной опухоли у субъекта с использованием FTI или фармацевтической композиции, содержащей FTI, или отбора пациента с злокачественной опухолью для лечения FTI. Фармацевтические композиции, представленные в настоящем документе, содержат терапевтически эффективные количества FTI и фармацевтически приемлемого носителя, разбавителя или наполнителя. В некоторых вариантах осуществления, FTI представляет собой типифарниб; арглабин; перилловый спирт; лонафарниб (SCH-66336); L778123; L739749; FTI-277; L744832; R208176; BMS 214662; AZD3409; или CP-609,754. В некоторых вариантах осуществления, FTI представляет собой типифарниб.

2.2. Составы.

Можно получать составы FTI в форме пригодных фармацевтических препаратов, таких как растворы, суспензии, таблетки, диспергируемые таблетки, пилюли, капсулы, порошки, составы для замедленного высвобождения или эликсиры, для перорального введения, или в форме стерильных растворов или суспензий для офтальмологического или парентерального введения, так же как препаратов для чрескожных пластырей и ингаляторов сухого порошка. Как правило, FTI составляют в фармацевтические композиции с использованием технологий и способов, хорошо известных в данной области (см., например, Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, Seventh Edition 1999).

В композициях эффективные концентрации FTI и фармацевтически приемлемых солей смешивают с пригодным фармацевтическим носителем или основой. В конкретных вариантах осуществления концентрации FTI в композициях являются эффективными для доставки количества, которое, после введения, лечит, предотвращает или облегчает одно или более из симптомов и/или прогрессирования злокачественных опухолей, включая гематологические злокачественные опухоли и солидные опухоли.

Композиции можно составлять для введения в однократной дозе. Для составления композиции взвешенную фракцию FTI растворяют, суспендируют, диспергируют или иным образом смешивают с выбранной основой в эффективной концентрации, так что подвергаемое лечению состояние облегчают или смягчают. Фармацевтические носители или основы, пригодные для введения FTI, представленных в настоящем документе, включают любые такие носители, известные специалистам в данной области как пригодные для конкретного способа введения.

Кроме того, FTI можно составлять в качестве единственного фармацевтически активного ингредиента в композиции или можно комбинировать с другими активными ингредиентами. Липосомные суспензии, включая нацеленные на ткани липосомы, такие как нацеленные на опухоли липосомы, также могут являться пригодными в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Их можно получать в соответствии со способами, известными специалистам в данной области. Например, липосомные составы можно получать, как известно в данной области. Кратко, липосомы, такие как многослойные везикулы (MLV), можно получать посредством высушивания фосфатидилхолина яиц и фосфатидилсерина головного мозга (молярное отношение 7:3) на внутренней части флакона. Добавляют раствор FTI, представленного в настоящем документе, в фосфатно-солевом буфере, не содержащем двухвалентных катионов (PBS), и флакон встряхивают до диспергирования липидной пленки. Полученные везикулы промывают для удаления всех неинкапсулированных соединений, осаждают посредством центрифугирования и затем ресуспендируют в PBS.

FTI включают в фармацевтически приемлемый носитель в количестве, достаточном для проявления терапевтически полезного эффекта в отсутствие нежелательных побочных эффектов у подвергаемого лечению пациента. Терапевтически эффективную концентрацию можно определять эмпирически посредством тестирования соединений в системах *in vitro* и *in vivo*, описанных в настоящем документе, и затем экстраполяции из них доз для человека.

Концентрация FTI в фармацевтической композиции может зависеть от скорости абсорбции, распределения в тканях, инактивации и выведения FTI, физико-химических характеристик FTI, расписания дозирования и вводимого количества, так же как от других факторов, известных специалистам в данной области. Например, доставляемое количество является достаточным для облегчения одного или более

симптомов злокачественных опухолей, включая гематопозитические злокачественные опухоли и солидные опухоли.

В конкретных 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 варианте осуществления фармацевтические композиции обеспечивают дозу от приблизительно 0,001 мг до приблизительно 2000 мг соединения на килограмм массы тела в сутки. Фармацевтические единичные дозированные формы получают для обеспечения от приблизительно 1 мг до приблизительно 1000 мг и в конкретных вариантах осуществления, от приблизительно 10 до приблизительно 500 мг необходимого активного ингредиента или комбинации необходимых ингредиентов на единичную дозированную форму.

FTI можно вводить сразу или можно разделять на некоторое количество меньших доз для введения в некоторые интервалы времени. Понятно, что точная доза и длительность лечения являются функцией заболевания, подвергаемого лечению, и их можно определять эмпирически с использованием известных протоколов тестирования или посредством экстраполяции из данных тестирования *in vivo* или *in vitro*. Следует отметить, что значения концентраций и доз также можно менять в зависимости от тяжести состояния, подлежащего облегчению. Кроме того, следует понимать, что для любого конкретного субъекта конкретные режимы дозирования необходимо корректировать с течением времени в соответствии с потребностями индивидуума и профессиональным суждением лица, осуществляющего введение или руководящего введением композиций, и что диапазоны концентраций, представленные в настоящем документе, являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения объема или практического применения заявленных композиций.

Таким образом, эффективные концентрации или количества одного или более соединений, описанных в настоящем документе, или их фармацевтически приемлемых солей, смешивают с пригодным фармацевтическим носителем или основой для системного, местного или локального введения для получения фармацевтических композиций. Соединения включают в количестве, эффективном для облегчения одного или более симптомов или для лечения, задержки прогрессирования или предотвращения. Концентрация активного соединения в композиции может зависеть от скорости абсорбции, распределения в тканях, инактивации и выведения активного соединения, расписания дозирования, вводимого количества, конкретного состава, так же как от других факторов, известных специалистам в данной области.

Композиции предназначены для введения подходящим способом, включая, но без ограничения, пероральный, парентеральный, ректальный, местный и локальный. Для перорального введения, можно получать составы капсул и таблеток. Композиции находятся в жидкой, полужидкой или твердой форме и их составляют способом, пригодным для каждого способа введения.

Растворы или суспензии, используемые для парентерального, внутрикожного, подкожного или местного введения, могут включать любой из следующих компонентов: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, солевой 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 агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА); буферы, такие как ацетаты, цитраты и фосфаты; и средства для доведения тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Парентеральные препараты можно заключать в ампулы, шприц-ручки, одноразовые шприцы или флаконы для однократных или множественных доз, изготовленные из стекла, пластика или другого пригодного материала.

В случаях, когда FTI обладает недостаточной растворимостью, можно использовать способы для солюбилизации соединений. Такие способы известны специалистам в данной области и включают, но без ограничения, использование сорастворителей, таких как диметилсульфоксид (DMSO), использование поверхностно-активных веществ, таких как TWEEN®, или растворение в водном бикарбонате натрия.

После смешивания или добавления соединения(соединений) полученная смесь может представлять собой раствор, суспензию, эмульсию или т.п. Форма полученной смеси зависит от ряда факторов, включая намеченный способ введения и растворимость соединения в выбранном носителе или основе. Эффективная концентрация является достаточной для облегчения симптомов подвергаемого лечению заболевания, нарушения или состояния, и может быть определена эмпирически.

Фармацевтические композиции представлены для введения человеку и животным в единичных дозированных формах, таких как таблетки, капсулы, пилюли, порошки, гранулы, стерильные растворы или суспензии для парентерального введения, и растворы или суспензии для перорального введения, и масляно-водные эмульсии, содержащих пригодные количества соединений или их фармацевтически приемлемых солей. Фармацевтические терапевтически активные соединения и их соли составляют и вводят в единичных дозированных формах или множественных лекарственных формах. Единичные дозированные формы, как применяют в настоящем документе, относятся к физически дискретным единицам, пригодным для субъектов - человека и животных, и упакованным индивидуально, как известно в данной области. Каждая единичная доза содержит предопределенное количество терапевтически активного соединения, достаточного для обеспечения желательного терапевтического эффекта, в ассоциации с необходи-

мыми фармацевтическим носителем, основой или разбавителем. Примеры единичных дозированных форм включают ампулы и шприцы и индивидуально упакованные таблетки или капсулы. Единичные дозированные формы можно вводить в их долях или множествах. Множественная дозированная форма представляет собой множество идентичных единичных дозированных форм, упакованных в один контейнер для введения в форме разделенных единичных доз. Примеры множественных дозированных форм включают флаконы, бутылки с таблетками или капсулами, или бутылки емкостью в несколько пинт или галлонов. Таким образом, множественная дозированная форма представляет собой множество единичных доз, не разделенных при упаковке.

Можно получать также препараты с замедленным высвобождением. Пригодные примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие соединение, представленное в настоящем документе, где матрицы находятся в форме формованных изделий, например пленок или микрокапсул. Примеры матриц для замедленного высвобождения включают пластыри для ионтофореза, полиэферы, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтил-метакрилат), или поли(виниловый спирт)), полилактиды, сополимеры L-глутаминовой кислоты и этил-L-глутамата, не поддающийся деградации этиленвинилацетат, поддающиеся деградации сополимеры молочной кислоты-гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT™ (пригодные для инъекции микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты - гликолевой кислоты и ацетата леу-пролида) и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту. В то время как полимеры, такие как этиленвинилацетат и молочная кислота - гликолевая кислота, позволяют высвобождение молекул в течение более 100 суток, конкретные гидрогели высвобождают белки в течение более коротких периодов времени. Когда инкапсулированные соединения остаются в организме в течение длительного времени, они могут денатурировать или агрегировать в результате воздействия влажности при 37°C, что приводит к потере биологической активности и возможным изменениям в их структуре. Можно разрабатывать рациональные способы стабилизации, в зависимости от вовлеченного механизма действия. Например, если обнаружено, что механизм агрегации представляет собой формирование межмолекулярных S-S связей посредством тио-дисульфидного обмена, стабилизацию можно осуществлять посредством модификации сульфгидрильных остатков, лиофилизации из кислых растворов, контроля содержания влажности, использования подходящих добавок и разработки специфических составов полимерной матрицы.

Можно получать лекарственные формы или композиции, содержащие активный ингредиент в диапазоне 0,005-100%, с дополнением остатка с использованием нетоксичного носителя. Для перорального введения получают фармацевтически приемлемую нетоксичную композицию посредством включения любого из обычно применяемых наполнителей, например, такого как фармацевтические квалификации маннита, лактозы, крахмала, стеарата магния, талька, производных целлюлозы, кроскармеллозы натрия, глюкозы, сахарозы, карбоната магния или сахараина натрия. Такие композиции включают растворы, суспензии, таблетки, капсулы, порошки и составы для замедленного высвобождения, такие как, но без ограничения, имплантаты и микроинкапсулированные системы для доставки, и биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как коллаген, этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, полиортоэферы, полимолочная кислота и другие. Способы получения этих композиций известны специалистам в данной области. Предусмотренные композиции могут содержать приблизительно 0,001-100% активного ингредиента, в конкретных вариантах осуществления приблизительно 0,1-85% или приблизительно 75-95%.

FTI или его фармацевтически приемлемые соли можно получать с носителями, защищающими соединение от быстрого выведения из организма, такими как составы или покрытия с замедленным высвобождением.

Композиция может включать другие активные соединения для получения желательных комбинаций свойств. Соединения, представленные в настоящем документе, или их фармацевтически приемлемые соли, как описано в настоящем документе, можно также вводить вместе с другим фармакологическим средством, как, в общем, известно в данной области, имеющим ценность для лечения одного или более из заболеваний или медицинских состояний, на которые ссылаются в настоящем документе выше, такие как заболевания, связанные с окислительным стрессом.

Не содержащие лактозы композиции, представленные в настоящем документе, могут содержать наполнители, хорошо известные в данной области и перечисленные, например, в Фармакопее США (USP) SP (XXI)/NF (XVI). Как правило, не содержащие лактозы композиции содержат активный ингредиент, связующее вещество/наполнитель и смазывающее вещество в фармацевтически совместимых и фармацевтически приемлемых количествах. Иллюстративные, не содержащие лактозы лекарственные формы содержат активный ингредиент, микрокристаллическую целлюлозу, прежелатинизированный крахмал и стеарат магния.

Кроме того, включены безводные фармацевтические композиции и лекарственные формы, содержащие соединения, представленные в настоящем документе. Например, добавление воды (например, 5%) широко принято в области фармацевтики в качестве имитации длительного хранения для определения таких характеристик, как срок хранения 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 нагревание усиливают разложение некоторых соединений. Таким образом, действие воды и состав может обладать большой важностью, поскольку влагу и/или влажность обычно учитывают в ходе изготовления, манипуляций, упаковки, хранения, транспортировки и применения составов.

Безводные фармацевтические композиции и лекарственные формы, представленные в настоящем документе, можно получать с использованием безводных ингредиентов или ингредиентов с низким содержанием влажности и в условиях низкой влаги или 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 значительный контакт с влагой и/или влажностью в ходе изготовления, упаковки и/или хранения.

Безводную фармацевтическую композицию следует получать и хранить таким образом, чтобы поддерживать ее безводный характер. Соответственно безводные композиции упаковывают с использованием материалов, как известно, предотвращающих воздействие воды, так что их можно включать в соответствующие формулярные наборы. Примеры пригодной упаковки включают, но без ограничения, герметически запечатанную фольгу, пластик, контейнеры для единичных доз (например, флаконы), блистерные упаковки и контурные упаковки.

Пероральные фармацевтические лекарственные формы представляют собой твердое вещество, гель или жидкость. Твердые лекарственные формы представляют собой таблетки, капсулы, гранулы и нерасфасованные порошки. Типы пероральных таблеток включают прессованные, жевательные пастилки и таблетки, которые можно покрывать кишечнорастворимой оболочкой, покрывать сахаром или покрывать пленкой. Капсулы могут представлять собой твердые или мягкие желатиновые капсулы, в то время как гранулы и порошки можно предоставлять в не шипучей или шипучей форме в комбинации с другими ингредиентами, известными специалистам в данной области.

В конкретных вариантах осуществления составы представляют собой твердые лекарственные формы, такие как капсулы или таблетки. Таблетки, пилюли, капсулы, лепешки и т.п. могут содержать любой из следующих ингредиентов или соединений сходной природы: связующее вещество; разбавитель; дезинтегрирующее вещество; смазывающее вещество; вещество, способствующее скольжению; подсластитель; придающее вкус средство.

Примеры связующих веществ включают микрокристаллическую целлюлозу, трагакантовую камедь, раствор глюкозы, камедь акации, раствор желатина, сахарозу и крахмальный клейстер. Смазывающие средства включают тальк, крахмал, стеарат магния или кальция, линоповид и стеариновую кислоту. Разбавители включают, например, лактозу, сахарозу, крахмал, каолин, соль, маннит и фосфат дикальция. Вещества, способствующие скольжению, включают, но без ограничения, коллоидный диоксид кремния. Дезинтегрирующие средства включают кроскармеллозу натрия, натриевую соль гликолята крахмала, альгинатную кислоту, кукурузный крахмал, картофельный крахмал, бентонит, метилцеллюлозу, агар и карбоксиметилцеллюлозу. Окрашивающие средства включают, например, любой 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 ароматизаторов. Придающие вкус средства включают натуральные ароматизаторы, экстрагированные из растений, например плодов, и синтетические смеси соединений, придающие приятные ощущения, такие как, но без ограничения, перечная мята и метилсалицилат. Увлажняющие средства включают моностеарат пропиленгликоля, моноолеат сорбитана, монолаурат диэтиленгликоля и полиоксиэтиленлауриловый эфир. Противорвотные покрытия включают жирные кислоты, жиры, воски, шеллак, аммонизированный шеллак и ацетатфталаты целлюлозы. Пленочные покрытия включают гидроксиэтилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу натрия, полиэтиленгликоль 4000 и ацетатфталат целлюлозы.

Когда единичная дозированная форма представляет собой капсулу, она может содержать, в дополнение к материалу указанного выше типа, жидкий носитель, такой как жирное масло. Кроме того, единичные дозированные формы могут содержать различные другие материалы, модифицирующие физическую форму единичной дозированной формы, например покрытия из сахара и других кишечнорастворимых средств. Соединения можно вводить также в форме компонента эликсира, суспензии, сиропа, вафли, вскрываемой капсулы, жевательной резинки или т.п. Сироп может содержать, в дополнение к активным соединениям, сахарозу в качестве подсластителя и конкретные консерванты, красители, окрашивающие средства и ароматизаторы.

Фармацевтически приемлемые носители, включенные в таблетки, представляют собой связующие вещества, смазывающие средства, разбавители, дезинтегрирующие средства, окрашивающие средства, придающие вкус средства и увлажняющие средства. Таблетки с кишечнорастворимым покрытием, из-за кишечнорастворимого покрытия, выдерживают действие желудочной кислоты и растворяются или дезинтегрируют в нейтральной или щелочной среде кишечника. Таблетки с сахарным покрытием представляют собой прессованные таблетки, на которые нанесены различные слои фармацевтически приемлемых веществ. Таблетки с пленочным покрытием представляют собой прессованные таблетки, покрытые полимерным или другим подходящим покрытием. Многократно прессованные таблетки представляют собой прессованные таблетки, изготовленные посредством более одного цикла прессования с ис-

пользованием вышеупомянутых фармацевтически приемлемых веществ. Окрашивающие средства также можно использовать в вышеуказанных лекарственных формах. Ароматизаторы и подсластители используют в прессованных таблетках, покрытых сахаром, многократно прессованных и жевательных таблетках. Ароматизаторы и подсластители являются особенно полезными для получения жевательных таблеток и пастилок.

Жидкие пероральные лекарственные формы включают водные растворы, эмульсии, суспензии, растворы и/или суспензии, разведенные из нешипучих гранул, и шипучие препараты, разведенные из шипучих гранул. Водные растворы включают, например, эликсиры и сиропы. Эмульсии представляют собой либо эмульсии масло-в-воде либо эмульсии вода-в-масле.

Эликсиры представляет собой прозрачные подслащенные водно-спиртовые препараты. Фармацевтически приемлемые носители, используемые в эликсирах, включают растворители. Сиропы представляют собой концентрированные водные растворы сахара, например сахарозы, и могут содержать консервант. Эмульсия представляет собой двухфазную систему, в которой одна жидкость диспергирована в форме небольших шариков в другой жидкости. Фармацевтически приемлемые носители, используемые в эмульсиях, представляют собой неводные жидкости, эмульгаторы и консерванты. В суспензиях применяют фармацевтически приемлемые суспендирующие средства и консерванты. Фармацевтически приемлемые вещества, используемые в нешипучих гранулах, для разведения до жидких пероральных лекарственных форм включают разбавители, подсластители и увлажняющие средства. Фармацевтически приемлемые вещества, используемые в шипучих гранулах, для разведения до жидких пероральных лекарственных форм, включают органические кислоты и источник диоксида углерода. Окрашивающие и придающие вкус средства используют во всех вышеуказанных лекарственных формах.

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, трагакант, бентонит и поверхностно-активные вещества, такие как моноолеат полиоксиэтиленсорбитана. Суспендирующие средства включают карбоксиметилцеллюлозу натрия, пектин, трагакант, вигум и гуммиарабик. Разбавители включают лактозу и сахарозу. Подсластители включают сахарозу, сиропы, глицерин и искусственные подсластители, такие как сахарин. Увлажняющие средства включают моностеарат пропиленгликоля, моноолеат сорбитана, монолаурат диэтиленгликоля и полиоксиэтиленлауриловый эфир. Органические кислоты включают лимонную и виннокаменную кислоту. Источники диоксида углерода включают бикарбонат натрия и карбонат натрия. Окрашивающие средства включают любой из одобренных сертифицированных водорастворимых красителей FD и C и их смеси. Придающие вкус средства включают натуральные ароматизаторы, экстрагированные из растений, например плодов, и синтетические смеси соединений, придающие приятные вкусовые ощущения.

Для твердой лекарственной формы раствор или суспензию, например в пропиленкарбонате, растительных маслах или триглицеридах, инкапсулируют в желатиновой капсуле. Такие растворы и их получение и инкапсуляция описаны в патентах США № 4328245; 4409239; и 4410545. Для жидкой лекарственной формы, раствор, например в полиэтиленгликоле, можно разбавлять достаточным количеством фармацевтически приемлемого жидкого носителя, например воды, для легкого отмеривания для введения.

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 подобных носителях и инкапсуляции этих растворов или суспензий в оболочки твердых или мягких желатиновых капсул. Другие составы, которые можно использовать, включают, но без ограничения, составы, содержащие соединение, представленное в настоящем документе, диалкилированный моно- или полиалкиленгликоль, включая, но без ограничения, 1,2-диметоксиметан, диглим, триглим, тетраглим, диметиловый эфир полиэтиленгликоля-350, диметиловый эфир полиэтиленгликоля-550, диметиловый эфир полиэтиленгликоля-750, где 350, 550 и 750 относятся к приблизительной средней молекулярной массе полиэтиленгликоля, и один или более антиоксидантов, таких как бутилированный гидрокситолуол (БНТ), бутилированный гидроксианизол (ВНА), пропилгаллат, витамин Е, гидрохинон, гидроксикумарины, этаноламин, лецитин, цефалин, аскорбиновая кислота, яблочная кислота, сорбит, фосфорная кислота, тиодипропионовая кислота и ее сложные эфиры и дитиокарбаматы.

Другие составы включают, но без ограничения, водно-спиртовые растворы, включая фармацевтически приемлемый ацеталь. Спирты, используемые в этих составах, представляют собой любые фармацевтически приемлемые, смешивающиеся с водой растворители, содержащие одну или более гидроксильных групп, включая, но без ограничения, пропиленгликоль и этанол. Ацетали включают, но без ограничения, ди(низший алкил)ацетали низших алкиловых альдегидов, такие как диэтиловый ацеталь ацетальдегида.

Во всех вариантах осуществления составы таблеток и капсул можно покрывать, как известно специалистам в данной области, чтобы модифицировать или замедлять высвобождение активного ингредиента. Таким образом, например, их можно покрывать с использованием общепринятого кишечнорастворимого покрытия, такого как фенилсалицилат, воски и ацетатфталат целлюлозы.

Парентеральное введение, обычно характеризующееся инъекцией, подкожной, внутримышечной или внутривенной, также представлено в настоящем документе. Пригодные для инъекции препараты можно получать в общепринятых формах, в форме жидких растворов или суспензий, в твердых формах, пригодных для растворения или суспендирования в жидкости перед инъекцией, или в форме эмульсий. Пригодные наполнители представляют собой, например, воду, солевой раствор, декстрозу, глицерин или этанол. Кроме того, если желательно, фармацевтические композиции, подлежащие введению, могут также содержать незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие средства или эмульгаторы, забуферивающие pH средства, стабилизаторы, усилители растворимости и другие такие средства, например, такие как ацетат натрия, монолаурат сорбитана, олеат триэтаноламина и циклодекстрины. Имплантация системы для замедленного высвобождения или отсроченного высвобождения так, чтобы поддерживать постоянный уровень дозирования, также предусмотрена в настоящем документе. Кратко, соединение, представленное в настоящем документе, диспергируют в твердой внутренней матрице, например полиметилметакрилате, полибутилметакрилате, пластифицированном или непластифицированном поливинилхлориде, пластифицированном нейлоне, пластифицированном полиэтилентерефталате, природном каучуке, полиизопрене, полиизобутилене, полибутадиене, полиэтилене, сополимерах этилена-винилацетата, силиконовых каучуках, полидиметилсилоксанах, сополимерах силикона и карбоната, гидрофильных полимерах, таких как гидрогели сложных эфиров акриловой и метакриловой кислот, коллагене, перекрестно сшитом поливинилом спирте и перекрестно сшитом частично гидролизованном поливинилацетате, которая окружена наружной полимерной мембраной, например из полиэтилена, полипропилена, сополимеров этилена/пропилена, сополимеров этилена/этилакрилата, сополимеров этилена/винилацетата, силиконовых каучуков, полидиметилсилоксанов, неопренового каучука, хлорированного полиэтилена, поливинилхлорида, сополимеров винилхлорида и винилацетата, винилиденхлорида, этилена и пропилена, иономерного полиэтилентерефталата, бутилкаучука, эпихлоргидриновых каучуков, сополимера этилена/винилового спирта, терполимера этилена/винилацетата/винилового спирта и сополимера этилена/винилоксиэтанола, которая является нерастворимой в жидкостях организма. Соединение диффундирует через наружную полимерную мембрану на стадии контроля скорости высвобождения. Процентное содержание активного соединения, содержащегося в таких парентеральных композициях, в значительной степени зависит от его конкретной природы, так же как от активности соединения и потребностей субъекта.

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 объединения с растворителем непосредственно перед использованием, включая таблетки для получения препаратов для подкожного введения, стерильные суспензии, готовые для инъекции, стерильные сухие нерастворимые продукты, готовые для объединения с основой непосредственно перед использованием, и стерильные эмульсии. Растворы могут являться либо водными, либо неводными.

При внутривенном введении пригодные носители включают физиологический солевой раствор или фосфатно-солевой буфер (PBS) и растворы, содержащие загустители и солюбилизующие средства, такие как глюкоза, полиэтиленгликоль и полипропиленгликоль, и их смеси.

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

Примеры водных основ включают хлорид натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, изотонический раствор декстрозы для инъекций, стерильную воду для инъекций, раствор Рингера с декстрозой и лактатом для инъекций. Неводные парентеральные основы включают жирные масла растительного происхождения, хлопковое масло, кукурузное масло, кунжутное масло и арахисовое масло. Противомикробные средства в бактериостатических или фунгистатических концентрациях необходимо добавлять в парентеральные препараты, упакованные в контейнеры для множественных доз, включающие фенолы или крезолы, ртутьсодержащие вещества, бензиловый спирт, хлорбутанол, метиловый и пропиловый сложные эфиры п-гидроксibenзойной кислоты, тимеросал, хлорид бензалкония и хлорид бензэтония. Изотонические средства включают хлорид натрия и декстрозы. Буферы включают фосфат и цитрат. Антиоксиданты включают бисульфат натрия. Локальные анестетики включают гидрохлорид прокаина. Суспендирующие и диспергирующие средства включают карбоксиметилцеллюлозу натрия, гидроксипропилметилцеллюлозу и поливинилпирролидон. Эмульгаторы включают Полисорбат 80 (TWEEN® 80). Средства, секвестрирующие или хелатирующие ионы металлов, включают ЭДТА. Фармацевтические носители включают также этиловый спирт, полиэтиленгликоль и пропиленгликоль в качестве смешивающихся с водой основ и гидроксид натрия, соляную кислоту, лимонную кислоту или молочную кислоту для доведения pH.

Концентрацию ГТГ корректируют так, чтобы инъекция обеспечивала эффективное количество соединения для получения желательного фармакологического эффекта. Точная доза зависит от возраста, массы тела и состояния пациента или животного, как известно в данной области. Единичную дозу парен-

теральных препаратов упаковывают в ампулу, флакон или шприц с иглой. Все препараты для парентерального введения должны быть стерильными, как известно и как осуществляют на практике в данной области.

В качестве иллюстрации, внутривенная или внутриартериальная инфузия стерильного водного раствора, содержащего FTI, является эффективным способом введения. Другой вариант осуществления представляет собой стерильный водный или масляный раствор или суспензию, содержащие активный материал, инъекционные, как необходимо для получения желательного фармакологического эффекта.

Инъекционные препараты разработаны для местного и системного введения. Как правило, терапевтически эффективную дозу составляют, чтобы она содержала концентрацию от по меньшей мере приблизительно 0,1% мас./мас. вплоть до приблизительно 90% мас./мас. или более, например более, чем 1% мас./мас. активного соединения в подвергаемой лечению ткани(тканях). Активный ингредиент можно вводить сразу, или можно разделять на некоторое количество более мелких доз, предназначенных для введения через некоторые интервалы времени. Понятно, что точная доза и длительность лечения являются функцией ткани, подвергаемой лечению, и их можно определять эмпирически с использованием известных протоколов тестирования или посредством экстраполяции из данных тестирования *in vivo* или *in vitro*. Следует отметить, значения концентраций и доз также можно менять в зависимости от возраста индивидуума, подвергаемого лечению. Кроме того, следует понимать, что для любого конкретного субъекта, конкретные режимы дозирования необходимо корректировать с течением времени в соответствии с потребностями индивидуума и профессиональным суждением лица, осуществляющего введение или руководящего введением составов, и что диапазоны концентраций, представленные в настоящем документе, являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения объема или практического применения заявленных составов.

FTI можно суспендировать в тонко измельченной или другой пригодной форме или можно дериватизировать для получения более растворимого активного продукта или для получения пролекарства. Форма полученной смеси зависит от ряда факторов, включая намеченный способ введения и растворимость соединения в выбранном носителе или основе. Эффективная концентрация является достаточной для облегчения симптомов состояния и может быть определена эмпирически.

В настоящем документе представляют интерес также лиофилизированные порошки, которые можно разводить для введения в виде растворов, эмульсий и других смесей. Их можно также разводить и составлять в форме твердых веществ или гелей.

Стерильный лиофилизированный порошок получают растворением FTI, представленного в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли, в подходящем растворителе. Растворитель может содержать наполнитель, улучшающий стабильность или другой фармакологический компонент порошка или разведенного раствора, полученного из порошка. Наполнители, которые можно использовать, включают, но без ограничения, декстрозу, сорбит, фруктозу, кукурузный сироп, ксилит, глицерин, глюкозу, сахарозу или другое подходящее средство. Растворитель может также содержать буфер, такой как цитрат, фосфат натрия или калия или другой подобный буфер, известный специалистам в данной области, в одном варианте осуществления, при приблизительно нейтральном pH. Посредством последующей стерильной фильтрации раствора с последующей лиофилизацией в стандартных условиях, известных специалистам в данной области, получают желательный состав. Как правило, полученный раствор распределяют по флаконам для лиофилизации. Каждый флакон содержит однократную дозу (включая, но без ограничения, 10-1000 мг или 100-500 мг) или множественные дозы соединения. Лيوфилизированный порошок можно хранить в подходящих условиях, таких как температура от приблизительно 4°C до комнатной температуры.

Посредством разведения этого лиофилизованного порошка водой для инъекций получают состав для применения при парентеральном введении. Для разведения добавляют приблизительно 1-50 мг, приблизительно 5-35 мг или приблизительно 9-30 мг лиофилизованного порошка на мл стерильной воды или другого пригодного носителя. Точное количество зависит от выбранного соединения. Такое количество можно определять эмпирически.

Смеси для местного введения получают, как описано для локального или системного введения. Полученная смесь может представлять собой раствор, суспензию, эмульсию или т.п., и их составляют в форме кремов, гелей, мазей, эмульсий, растворов, эликсиров, лосьонов, суспензий, настоек, паст, пен, аэрозолей, оросителей, спреев, суппозиторий, повязок, наклеиваемых пластырей или любых других составов, пригодных для местного введения.

FTI или фармацевтическую композицию, содержащую FTI, можно составлять в форме аэрозолей для местного введения, такого как ингаляция (см., например, патенты США No. 4044126, 4414209 и 4364923, где описаны аэрозоли для доставки стероида, который можно использовать для лечения воспалительных заболеваний, в частности, астмы). Эти составы для введения в дыхательный тракт могут находиться в форме аэрозоля, или раствора для ингалятора, или в форме тонкоизмельченного порошка для вдыхания, отдельно или в комбинации с инертным носителем, таким как лактоза. В таком случае частицы состава могут иметь диаметр менее 50 или менее 10 мкм.

FTI или фармацевтическую композицию, содержащую FTI, можно составлять для локального или

местного введения, такого как местное введение на кожу и слизистые оболочки, такие как в глазу, в форме гелей, кремов и лосьонов и для введения в глаз или для интракостерального или интраспинального введения. Местное введение предусматривают для чрескожной доставки, а также для введения в глаза или слизистую оболочку или для ингаляционных способов терапии. Можно вводить также назальные растворы активного соединения, отдельно или в комбинации с другими фармацевтически приемлемыми наполнителями. Эти растворы, в частности предназначенные для офтальмологического применения, можно составлять в форме 0,01-10% изотонических растворов, pH приблизительно 5-7, с использованием подходящих солей.

Другие способы введения, такие как использование чрескожных пластырей и ректальное введение, также предусмотрены в настоящем документе. Например, фармацевтические лекарственные формы для ректального введения представляют собой ректальные суппозитории, капсулы и таблетки для системного эффекта. Ректальные суппозитории, применяемые в настоящем документе, обозначают твердые тела для вставления в прямую кишку, которые плавятся или размягчаются при температуре тела, высвобождая один или более фармацевтически или терапевтически активных ингредиентов. Фармацевтически приемлемые вещества, используемые в ректальных суппозиториях, представляют собой основы или носители и средства для повышения температуры плавления. Примеры основ включают масло какао (теобромовое масло), глицерин-желатин, карбовакс (полиоксиэтиленгликоль) и подходящие смеси моно-, ди- и триглицериды жирных кислот. Можно использовать комбинации из различных основ. Средства для повышения температуры плавления суппозиторий включают спермацет и воск. Ректальные суппозитории можно получать способом прессования или посредством формования. Иллюстративная масса ректального суппозитория составляет приблизительно 2-3 г. Таблетки и капсулы для ректального введения изготавливают с использованием таких же фармацевтически приемлемых веществ и посредством таких же способов, как для изготовления составов для перорального введения.

FTI или фармацевтическую композицию, содержащую FTI, представленные в настоящем документе, можно вводить посредством способов контролируемого высвобождения или посредством устройств для доставки, хорошо известных обычным специалистам в данной области. Примеры включают, но без ограничения, примеры, описанные в патентах США №

3845770;

3916899; 3536809; 3598123; и 4008719, 5674533, 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,

содержание каждого из которых приведено в настоящем документе 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 желательного профиля высвобождения в различных пропорциях. Пригодные составы с контролируемым высвобождением, известные обычным специалистам в данной области, включая составы, описанные в настоящем документе, можно легко выбирать для применения с активными ингредиентами, представленными в настоящем документе.

Все фармацевтические продукты с контролируемым высвобождением имеют общей целью улучшение терапии с использованием лекарственных средств по сравнению с тем, чего достигают посредством их неконтролируемым эквивалентов. В одном варианте осуществления использование оптимально разработанных препаратов с контролируемым высвобождением в медицинском лечении характеризуется минимумом лекарственного вещества, применяемого для излечения или контроля состояния за минимальное количество времени. В конкретных вариантах осуществления преимущества составов с контролируемым высвобождением включают продленную активность лекарственного средства, уменьшенную частоту дозирования и улучшенное соблюдение пациентом режима лечения. Кроме того, составы с контролируемым высвобождением можно использовать для воздействия на время начала действия или другие характеристики, такие как уровень лекарственного средства в крови, и может, таким образом, влиять на возникновение побочных (например, неблагоприятных) эффектов.

Большинство составов с контролируемым высвобождением разработаны для первоначального высвобождения количества лекарственного средства (активного ингредиента), которое быстро оказывает желательный терапевтический эффект, и постепенно и непрерывно высвобождает другие количества 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 с такой скоростью, которая будет замещать количество лекарственного средства, подвергнутое метаболизму и выведения из организма.

Контролируемое высвобождение активного ингредиента можно стимулировать посредством различных условий, включая, но без ограничения, pH, температуру, ферменты, воду или другие физиологические состояния или соединения.

В конкретных вариантах осуществления FTI можно вводить с использованием внутривенной инфузии, имплантируемого осмотического насоса, чрескожного пластыря, липосом или других способов введения. В одном варианте 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 другом варианте осуществления, систему для контролируемого высвобождения можно помещать поблизости от терапевтической мишени, т.е., таким образом, необходима только часть системной дозы (см., например, Goodson, Medical Applications of Controlled Release, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

В некоторых вариантах осуществления устройство для контролируемого высвобождения вводят субъекту поблизости от участка неприемлемой иммунной активации или опухоли. Другие системы для контролируемого высвобождения обсуждают в обзоре Langer (Science 249:1527-1533 (1990)). F можно диспергировать в твердой внутренней матрице, например полиметилметакрилате, полибутилметакрилате, пластифицированном или непластифицированном поливинилхлориде, пластифицированном нейлоне, пластифицированном полиэтилентерефталате, природном каучуке, полиизопрене, полиизобутилене, полибутadiене, полиэтилене, сополимерах этилена-винилацетата, силиконовых каучуках, полидиметилсилоксанах, сополимерах силикона и карбоната, гидрофильных полимерах, таких как гидрогели сложных эфиров акриловой и метакриловой кислот, коллагене, перекрестно сшитом поливинилом спирте и перекрестно сшитом частично гидролизованном поливинилацетате, которая окружена наружной полимерной мембраной, например из полиэтилена, полипропилена, сополимеров этилена/пропилена, сополимеров этилена/этилакрилата, сополимеров этилена/винилацетата, силиконовых каучуков, полидиметилсилоксанов, неопренового каучука, хлорированного полиэтилена, поливинилхлорида, сополимеров винилхлорида и винилацетата, винилиденхлорида, этилена и пропилена, иономерного полиэтилентерефталата, бутилкаучука, эпихлоргидриновых каучуков, сополимера этилена/винилового спирта, терполимера этилена/винилацетата/винилового спирта и сополимера этилена/винилоксиэтанола, которая является нерастворимой в жидкостях организма. Затем активный ингредиент диффундирует через наружную полимерную мембрану на стадии контроля скорости высвобождения. Процентное содержание активного ингредиента, содержащегося в таких парентеральных композициях, в значительной степени зависит от его конкретной природы, так же как от потребностей субъекта.

FTI или фармацевтическую композицию FTI можно упаковывать в форме изделий, содержащих упаковочный материал, соединение или его фармацевтически приемлемую соль, представленные в настоящем документе, которые используют для лечения, предотвращения или облегчения одного или более симптомов или прогрессирования злокачественных опухолей, включая гематологические злокачественные опухоли и солидные опухоли, и этикетку, указывающую, что соединение или его фармацевтически приемлемую соль используют для лечения, предотвращения или облегчения одного или более симптомов или прогрессирования злокачественной опухоли, включая гематологические злокачественные опухоли и солидные опухоли.

Изделия, представленные в настоящем документе, содержат упаковочные материалы. Упаковочные материалы для использования для упаковки фармацевтических продуктов хорошо известны специалистам в данной области. См., например, патенты США № 5323907, 5052558 и 5033252. Примеры фармацевтических упаковочных материалов включают, но без ограничения, блистерные упаковки, бутылки, трубки, ингаляторы, насосы, пакеты, флаконы, контейнеры, шприцы, шприц-ручки, бутылки и любые упаковочные материалы, подходящие для выбранного состава и намеченного способа введения и лечения. Предусматривают широкий диапазон составов соединений и композиций, представленных в настоящем документе.

2.3. Дозы.

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 вплоть до 1500 мг/кг ежедневно, либо в форме однократной дозы, либо разделенную на более чем одну дозу, или, более конкретно, в количестве от 10 до 1200 мг/кг ежедневно. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит типифарниб в качестве активного ингредиента, и ее вводят перорально в количестве 100 мг/кг ежедневно, 200 мг/кг ежедневно, 300 мг/кг ежедневно, 400 мг/кг ежедневно, 500 мг/кг ежедневно, 600 мг/кг ежедневно, 700 мг/кг ежедневно, 800 мг/кг ежедневно, 900 мг/кг ежедневно, 1000 мг/кг ежедневно, 1100 мг/кг ежедневно или 1200 мг/кг ежедневно. В некоторых вариантах осуществления, FTI представляет собой типифарниб.

В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 200-1200 мг ежедневно. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 200 мг ежедневно. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 300 мг ежедневно. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 400 мг ежедневно. В некоторых вари-

антах осуществления FTI вводят в дозе 500 мг ежесуточно. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 600 мг ежесуточно. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 700 мг ежесуточно. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 800 мг ежесуточно. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 900 мг ежесуточно. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 1000 мг ежесуточно. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 1100 мг ежесуточно. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 1200 мг ежесуточно. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 1300 мг ежесуточно. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 1400 мг ежесуточно. В некоторых вариантах осуществления FTI представляет собой типифарниб.

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 представляет собой типифарниб.

Как понятно специалисту в данной области, дозу меняют в зависимости от применяемой лекарственной формы, состояния и чувствительности пациента, способа введения и других факторов. Точную дозу определяет специалист-практик, в свете факторов, относящихся к субъекту, требующему лечения. Дозу и введение корректируют для обеспечения достаточных уровней активного ингредиента или для поддержания желательного эффекта. Факторы, которые можно принимать во внимание, включают тяжесть состояния заболевания, общее состояние здоровья субъекта, возраст, массу и пол субъекта, диету, время и частоту введения, комбинацию(комбинации) лекарственных средств, реакции чувствительности, и устойчивость/ответ на лечение. Во время цикла лечения ежесуточную дозу можно менять. В некоторых вариантах осуществления начальную дозу можно титровать вниз в ходе цикла лечения. В некоторых вариантах осуществления начальную дозу можно титровать вверх в ходе цикла лечения. Конечную дозу может зависеть от возникновения зависимой от дозы токсичности и других факторов. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в начальной дозе 300 мг ежесуточно и увеличивают ее до максимальной дозы 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100 или 1200 мг ежесуточно. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в начальной дозе 400 мг ежесуточно и увеличивают ее до максимальной дозы 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100 или 1200 мг ежесуточно. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в начальной дозе 500 мг ежесуточно и увеличивают ее до максимальной дозы 600, 700, 800, 900, 1000, 1100 или 1200 мг ежесуточно. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в начальной дозе 600 мг ежесуточно и увеличивают ее до максимальной дозы 700, 800, 900, 1000, 1100 или 1200 мг ежесуточно. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в начальной дозе 700 мг ежесуточно и увеличивают ее до максимальной дозы 800, 900, 1000, 1100 или 1200 мг ежесуточно. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в начальной дозе 800 мг ежесуточно и увеличивают ее до максимальной дозы 900, 1000, 1100 или 1200 мг ежесуточно. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в начальной дозе 900 мг ежесуточно и увеличивают ее до максимальной дозы 1000, 1100 или 1200 мг ежесуточно. Увеличение дозы можно выполнять сразу или ступенчато. Например, начальную дозу 600 мг ежесуточно можно увеличивать до конечной дозы 1000 мг ежесуточно посредством увеличения на 100 мг в сутки в течение 4 суток, или посредством увеличения на 200 мг в сутки в течение 2 суток, или посредством увеличения на 400 мг сразу. В некоторых вариантах осуществления FTI представляет собой типифарниб.

В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в относительно высокой начальной дозе и титруют ее вниз до более низкой дозы, в зависимости от ответа пациента и других факторов. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в начальной дозе 1200 мг ежесуточно и уменьшают ее до конечной дозы 1100 мг, 1000 мг, 900 мг, 800 мг, 700 мг, 600 мг, 500 мг, 400 мг или 300 мг ежесуточно. В некоторых вариантах осуществления, FTI вводят в начальной дозе 1100 мг ежесуточно и уменьшают ее до конечной дозы 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400 или 300 мг ежесуточно. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в начальной дозе 1000 мг ежесуточно и уменьшают ее до конечной дозы 900, 800, 700, 600, 500, 400 или 300 мг ежесуточно. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в начальной дозе 900 мг ежесуточно и уменьшают ее до конечной дозы 800, 700, 600, 500, 400 или 300 мг ежесуточно. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в начальной дозе 800 мг ежесуточно и уменьшают ее до конечной дозы 700, 600, 500, 400 или 300 мг ежесуточно. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в начальной дозе 600 мг ежесуточно и уменьшают ее до конечной дозы 500, 400 или 300 мг ежесуточно. Уменьшение дозы можно выполнять сразу или ступенчато. В некоторых вариантах осуществления FTI представляет собой типифарниб. Например, начальную дозу 900 мг ежесуточно можно уменьшать до конечной дозы 600 мг ежесуточно посредством уменьшения на 100 мг в сутки в течение 3 суток или посредством уменьшения на 300 мг сразу.

Цикл лечения может иметь различную длину. В некоторых вариантах осуществления цикл лечения может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 недель, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев. В некоторых вариан-

тах осуществления, цикл лечения составляет 4 недели. Цикл лечения может иметь прерывающееся расписание. В некоторых вариантах осуществления 2-недельный цикл лечения может содержать 5-суточное дозирование с последующим 9-суточным отдыхом. В некоторых вариантах осуществления 2-недельный цикл лечения может содержать 6-суточное дозирование с последующим 8-суточным отдыхом. В некоторых вариантах осуществления 2-недельный цикл лечения может содержать 7-суточное дозирование с последующим 7-суточным отдыхом. В некоторых вариантах осуществления 2-недельный цикл лечения может содержать 8-суточное дозирование с последующим 6-суточным отдыхом. В некоторых вариантах осуществления 2-недельный цикл лечения может содержать 9-суточное дозирование с последующим 5-суточным отдыхом.

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 в чередующиеся недели (одна неделя введения, одна неделя отдыха) 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 в чередующиеся недели (одна неделя введения, одна неделя отдыха) в повторяющихся 4-недельных циклах. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 1200 мг b.i.d. перорально в чередующиеся недели (сутки 1-7 и 15-21 из повторяющихся 28-суточных циклов). В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в дозе 1200 мг b.i.d. перорально в течение суток 1-5 и 15-19 из повторяющихся 28-суточных циклов.

В некоторых вариантах осуществления можно принимать использование режима введения 900 мг типифарниба b.i.d. в чередующиеся недели. В этом режиме пациентам вводят начальную дозу 900 мг, po, b.i.d. на сутки 1-7 и 15-21 из 28-суточных циклов лечения. В некоторых вариантах осуществления пациентов 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, чем двенадцати циклам лечения.

В отсутствии неконтролируемой токсичности субъектов можно продолжать подвергать лечению типифарнибом в течение вплоть до 12 месяцев. Дозу также можно увеличивать до 1200 мг b.i.d., если субъект хорошо переносит лечение. Можно включать также ступенчатое уменьшение дозы на 300 мг для контроля связанной с лечением, возникшей во время лечения токсичности.

В некоторых других вариантах осуществления типифарниб вводят перорально в дозе 300 мг b.i.d. ежедневно в течение 21 суток, с последующей 1 неделей отдыха, в 28-суточных циклах лечения (21-суточное расписание; Cheng DT, et al., J Mol Diagn. (2015) 17(3):251-64). В некоторых вариантах осуществления принимают 5-суточное дозирование лежит в диапазоне от 25 до 1300 мг b.i.d. с последующим 9-суточным отдыхом (5-суточное расписание; Zujewski J., J Clin Oncol., (2000) Feb;18(4):927-41). В некоторых вариантах осуществления принимают 7-суточное b.i.d. дозирование с последующим 7-суточным отдыхом (7-суточное расписание; Lara PN Jr., Anticancer Drugs., (2005) 16(3):317-21; Kirschbaum MH, Leukemia., (2011) Oct;25(10):1543-7). В 7-суточном расписании пациентам можно вводить начальную дозу 300 мг b.i.d. с увеличением дозы по 300 мг до максимальной планируемой дозы 1800 мг b.i.d.. В исследовании с 7-суточным расписанием пациентам можно вводить также типифарниб b.i.d. на сутки 1-7 и сутки 15-21 из 28-суточных циклах в дозах вплоть до 1600 мг b.i.d..

FTI может ингибировать рост опухолей млекопитающих при введении в форме расписания с дозированием дважды в сутки. Введение FTI в однократной дозе ежедневно в течение от одних до пяти суток может вызывать заметную супрессию роста опухолей, длящуюся в течение по меньшей мере 21 суток. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в диапазоне дозирования 50-400 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят при 200 мг/кг. Режимы дозирования для конкретных FTI также хорошо известны в данной области (например, патент США № 6838467, полное содержание которого приведено в настоящем документе в качестве ссылки). Например, пригодные дозы для соединений арглабина (WO 98/28303), периллового спирта (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-метионинсульфона (WO 94/10138), BMS 214662 (WO 97/30992), AZD3409; соединений Pfizer A и B (WO 00/12499 и WO 00/12498) приведены в описаниях вышеупомянутых патентов, содержание которых приведено в настоящем документе в качестве ссылки, или известны специалисту в данной области, или могут быть легко определены специалистом в данной области.

В отношении периллового спирта лекарственное средство можно вводить при 1-4 г в сутки для пациента-человека массой 150 фунтов (68 кг). Предпочтительно при 1-2 г в сутки для пациента-человека массой 150 фунтов (68 кг). SCH-66336, как правило, можно вводить в единичной дозе приблизительно от 0,1 до 100 мг, более предпочтительно приблизительно от 1 до 300 мг, в соответствии с конкретным применением. Соединения L778123 и 1-(3-хлорфенил)-4-[1-(4-цианобензил)-5-имидазолилметил]-2-пиперазинон можно вводить пациенту-человеку в количестве между приблизительно 0,1 мг/кг массы тела до приблизительно 20 мг/кг массы тела в сутки, предпочтительно между 0,5 мг/кг массы тела до приблизительно 10 мг/кг массы тела в сутки.

Соединения Pfizer A и B можно вводить в дозах, лежащих в диапазоне от приблизительно 1,0 мг вплоть до приблизительно 500 мг в сутки, предпочтительно от приблизительно 1 до приблизительно 100 мг в сутки в однократной или дробных (т.е. множественных) дозах. Терапевтические соединения обычно вводят в ежесуточных дозах, лежащих 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 дозирования приблизительно от 0,05 до 200 мг/кг/сутки, предпочтительно при менее 100 мг/кг/сутки в однократной дозе или в 2-4 дробных дозах.

2.4. Способы комбинированной терапии.

В некоторых вариантах осуществления лечение FTI проводят в комбинации с радиотерапией или терапией радиоактивным облучением. Радиотерапия включает использование γ -излучения, рентгеновского излучения и/или направленную доставку радиоактивных изотопов к клеткам опухолей. Рассмотрены также другие формы повреждающих ДНК факторов, такие как микроволны, протонное облучение (патенты США № 5760395 и 4870287; полное содержание всех из которых, таким образом, приведено в качестве ссылки), и УФ-облучение. Наиболее вероятно, что все эти факторы вызывают широкий диапазон повреждения ДНК, предшественников ДНК, репликации и репарации ДНК и на сборку и поддержание хромосом.

В некоторых вариантах осуществления вводят терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции, содержащей FTI, которое эффективно сенситизирует опухоль у хозяина к облучению (патент США № 6545020, полное содержание которого, таким образом, приведено в качестве ссылки). Облучение может представлять собой ионизирующее излучение, и в частности гамма-излучение. В некоторых вариантах осуществления гамма-излучение испускают посредством линейных ускорителей или посредством радиоактивных изотопов. Облучение опухоли посредством радиоактивных изотопов может являться внешним или внутренним.

Облучение может представлять собой также рентгеновское облучение. Диапазоны дозирования для рентгеновского излучения лежат в диапазоне от ежесуточных доз 50 до 200 рентген для длительных периодов времени (3-4 недели) до однократных доз 2000-6000 рентген. Диапазоны дозирования для радиоактивных изотопов широко меняются и зависят от времени полужизни изотопа, силы и типа радиоактивного излучения и поглощения неопластическими клетками.

В некоторых вариантах осуществления введение фармацевтической композиции начинают вплоть до одного месяца, в частности вплоть до 10 суток или недели, до облучения опухоли. Кроме того, если облучение опухоли является дробным, введение фармацевтической композиции поддерживают в интервале между первым и последним сеансом облучения.

Количество FTI, доза облучения и промежутки между дозами облучения зависят от серии параметров, таких как тип опухоли, ее локализации, реакция пациентов на химиотерапию или радиотерапию, и в конечном счете терапевт и радиолог определяют их в каждом индивидуальном случае.

В некоторых вариантах осуществления представленные в настоящем документе способы дополнительно включают введение терапевтически эффективного количества второго действующего вещества или поддерживающую терапию. Второе действующее вещество может представлять собой химиотерапевтическое средство. Химиотерапевтическое средство или лекарственное средство можно классифицировать по их механизму активности внутри клетки, например могут ли они влиять на клеточный цикл и на какой стадии. Альтернативно средство можно классифицировать на основании его способности напрямую перекрестно сшивать ДНК, интеркалировать в ДНК или индуцировать хромосомные и митотические аберрации посредством влияния на синтез нуклеиновой кислоты.

Примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодоба, карбоквон, метуредоба и уредоба; этиленимины и метиламеламины, включая алтре-тамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентифосфорамид и триметилломеламин; ацетогинины (особенно буллатин и буллатинон); камптотецин (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и биззелезин); криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги, KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкреастатин; саркодиктиин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидрохлорид мехлорэтаминоксид, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднемустин, трофосфамид и урамустин; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорзотоцин, фотему-

стин, ломустин, нимустин и ранимнустин; антибиотики, такие как эндиновые антибиотики (например, калихеамицин, особенно калихеамицин гамма II и калихеамицин омега II); динемин, включая динемин А; бисфосфонаты, такие как клодронат; эсперамицин; так же как хромофор неокарцинонстатин и родственные хромофоры хромопротеинов - энединные антибиотики, аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, сактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицин, дактиномицин, даунорубин, деторубин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубин (включая морфолино-доксорубин, цианоморфолино-доксорубин, 2-пирролино-доксорубин и дезоксидоксорубин), эпирубин, эзрубин, идарубин, марселломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловую кислоту, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфирамицин, пуромин, квеламицин, родорубин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зинонстатин и зорубин; 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, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин и флоксуридин; андрогены, такие как калостерон, пропионат дромостанолон, эпитиостанол, мепитиостан, и тестостерон; средства, подавляющие функции надпочечников, такие как митотан и трилостан; компенсатор фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; гликозид альдофосфамида; аминоклевулиновую кислоту; энилурацил; амсарин; бестрабутил; бисантрон; эдатрексат; дефофамин; демекольцин; диазиквон; элфорнитин; ацетат эллиптиния; эпотилон; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лониданин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраэрин; пентостатин; фенамет; пирурубин; лозоксантрон; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK; разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; теназоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотечены (особенно токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангвидин); уретан; виндизин; декарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ага-С"); циклофосфамид; таксоиды, например, паклитаксел и доцетаксел, гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; координационные комплексы платины, такие как цисплатин, оксалиплатин, и карбоплатин; винбластин; платину; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; винорелбин; новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; ирино-текан (например, СРТ-11); ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин; карбоплатин, прокарбазин, пликомицин, гемцитабин, навелбин, транс-платину и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеуказанных.

Вторые действующие вещества могут представлять собой крупные молекулы (например, белки) или малые молекулы (например, синтетические неорганические, металлоорганические или органические молекулы). В некоторых вариантах осуществления второе действующее вещество представляет собой гипометилирующее ДНК средство, терапевтическое антитело, специфически связывающее антиген злокачественной опухоли, гематопозитический фактор роста, цитокин, противораковое средство, антибиотик, ингибитор сох-2, иммуномодулирующее средство, антигитомитарный глобулин, иммуносупрессивное средство, кортикостероид или их фармакологически активный мутант или производное.

В некоторых вариантах осуществления второе действующее вещество представляет собой гипометилирующее ДНК средство, такое как аналог цитидина (например, азациитидин) или 5-азадезоксцитидин (например, децитабин). В некоторых вариантах осуществления, второе действующее вещество представляет собой циторедуктивное средство, включая, но без ограничения, индукционную терапию, топотекан, гидреа, РО этопозид, леналидомид, LDAC и тиогуанин. В некоторых вариантах осуществления второе действующее вещество представляет собой митоксантрон, этопозид, цитарабин или вальсподар. В некоторых вариантах осуществления второе действующее вещество представляет собой митоксантрон плюс вальсподар, этопозид плюс вальсподар или цитарабин плюс вальсподар. В некоторых вариантах осуществления второе действующее вещество представляет собой идарубин, флударабин, топотекан, или ага-С. В некоторых других вариантах осуществления второе действующее вещество представляет собой идарубин плюс ага-С, флударабин плюс ага-С, митоксантрон плюс ага-С, или топотекан плюс ага-С. В некоторых вариантах осуществления второе действующее вещество представляет собой хинин. Можно использовать другие комбинации средств, указанных выше, и дозы может определять терапевт.

Для любого конкретного типа злокачественной опухоли, описанного в настоящем документе, способы лечения, как описано в настоящем документе или иным образом доступно в данной области, можно использовать в комбинации с лечением FTI. Например, лекарственные средства, которые можно использовать в комбинации с FTI, включают белинонстат (Белеодак®) и пралатрексат (Фолотин®), выпускаемый на рынок Spectrum Pharmaceuticals, ромидепсин (Истодакс®), выпускаемый на рынок Celgene, и брентуксимаб ведотин (Адцетрис®) (против ALCL), выпускаемый на рынок Seattle Genetics; лекарственные средства, которые можно использовать в комбинации с FTI, включают азациитидин (Видаза®) и леналидомид (Ревлид®), выпускаемый на рынок Celgene, и децитабин (Дакоген®), выпускаемый на рынок Otsuka и Johnson & Johnson; лекарственные средства, которые можно использовать в комбинации с FTI

против рака щитовидной железы, включают вандетаниб (Капрелса®) от AstraZeneca, сорафениб (Нексавар®) от Bayer, кабозантиниб (Кометрик®) от Exelixis и ленватиниб (Ленвима®) от Eisai.

Нецитотоксические лекарственные средства, такие как пралатрексат (Фолотин®), ромидеписин (Ис-тодакс®) и белинонат (Белеодак®), также можно использовать в комбинации с лечением FTI.

В некоторых вариантах осуществления второе действующее вещество представляет собой иммуно-терапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления второе действующее вещество представляет собой антитело против PD1 или антитело против PDL1.

В некоторых вариантах осуществления предусматривают, что второе действующее вещество или второе лекарственное средство, используемое в комбинации с FTI, можно вводить до, во время или после лечения FTI. В некоторых вариантах осуществления второе действующее вещество или второе лекарственное средство, используемое в комбинации с FTI, можно вводить до лечения FTI. В некоторых вариантах осуществления второе действующее вещество или второе лекарственное средство, используемое в комбинации с FTI, можно вводить в то же время, что и лечение FTI. В некоторых вариантах осуществления второе действующее вещество или второе лекарственное средство, используемое в комбинации с FTI, можно вводить после лечения FTI.

Лечение FTI можно также проводить 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. Иммунологические гены в качестве биомаркеров для лечения FTI.

В настоящем документе представлены способы отбора пациентов с злокачественными опухолями для лечения ингибитором фарнезилтрансферазы (FTI). Представленные в настоящем документе способы основаны частично на открытии, что генотипы и уровни экспрессии конкретных генов, которые ассоциированы с активностью клеток естественных киллеров (клетки NK), коррелируют с клиническим преимуществом лечения FTI. Конкретно генотипирование генов KIR и генов HLA и уровни экспрессии биомаркеров, включая KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 и GZMM, можно использовать для прогнозирования способности пациента с злокачественной опухолью отвечать на лечение FTI. Как представлено в настоящем документе, в дополнение к уровням экспрессии индивидуальных биомаркеров, относительное отношение уровней экспрессии между конкретными биомаркерами, например, отношение уровня экспрессии KIR2DS2 к уровню экспрессии KIR2DL2, или отношение уровня экспрессии KIR2DS5 к уровню экспрессии KIR2DL5, также можно использовать для прогнозирования способности пациента с злокачественной опухолью отвечать на лечение FTI. Соответственно в настоящем документе представлены способы прогнозирования способности пациента с злокачественной опухолью отвечать на лечение FTI, способы отбора популяции пациентов с злокачественной опухолью для лечения FTI и способы лечения злокачественной опухоли у субъекта с использованием терапевтически эффективного количества FTI, на основании генотипа или уровней экспрессии этих биомаркеров в образце от пациента. В настоящем документе представлены также композиции и наборы для прогнозирования способности пациента с злокачественной опухолью отвечать на лечение FTI.

Фарнезилтрансфераза (ФТазы) играет критические роли в пост-трансляционных модификациях белков Ras. FTI представляют собой класс биологически активных противораковых лекарственных средств, которые ингибируют фарнезилирование широкого ряда белков-мишеней, включая Ras. Белки Ras играют ключевую роль в передаче сигналов стимуляции роста клеток, и мутация гена *ras* приводит к постоянной активации белка, в конечном счете приводя к неконтролируемой пролиферации клеток. Высокое преобладание мутантных генов *ras*, обнаруженных в 30% всех злокачественных опухолей человека, делает этот путь привлекательной мишенью для разработки противораковых лекарственных средств. Способом помешать функционированию Ras является ингибирование ФТазы, фермента, присоединяющего изопренильную группу из 15-атомов углерода к белкам Ras, посредством FTI. FTI блокируют активацию Ras посредством ингибирования ФТазы, в конечном счете приводя к аресту роста клеток. Таким образом, прогнозировали, что FTI могут являться эффективными лекарственными средствами для лечения злокачественных опухолей.

Однако корреляции между мутациями *ras* и ответом на FTI не показано в прошлых клинических исследованиях (Karp et al., Blood 97:3361-3369 (2001); и публикация патента США 20070048782)). В то время как несколько ранних клинических исследований были сфокусированы на злокачественных опухолях, обладающих высокой частотой мутаций *ras*, частота ответа являлась разочаровывающе низкой в этих исследованиях. (Mesa Lancet Oncol 6:279-286 (2006); Rao et al., J Clin Oncol 22:3950-3957 (2004))

Ранние исследования типифарниба, FTI, проводили для пациентов с AML с плохим риском и без предшествующего лечения (СТЕР-20, фаза II), и пациентов с AML с рецидивирующим/невосприимчивым AML (INT-17 фазы II). В исследовании фазы III типифарниба по сравнению с наилучшим поддерживающим лечением (BSC) не удалось показать улучшение общей выживаемости. Множество генов/белков ассоциировали в литературе 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 анализы получения профилей экспрессии генов в образцах костного мозга из 2 исследований AML

(СТЕР-20, INT-17) идентифицировали отношение экспрессии 2 генов: RASGRP1 (передатчика сигналов Т-клеток) 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 отношения 2 генов в бластных клетках в костном мозге в качестве критерия включения не удалось показать значительного клинического преимущества типифарниба при AML (Lancet et al., Blood (ASH) 120: Abstract 1508(2012)).

В настоящем изобретении идентифицировано множество иммунологических генов в качестве биомаркеров, ассоциированных с лучшим прогнозом для лечения FTI, и новые способы представлены в настоящем документе для отбора пациентов для лечения FTI. В отличие от ранее идентифицированных маркеров, таких как RASGRP1, которые, как обнаружено, ассоциированы с хорошим прогнозом не только для лечения FTI, но также для другой стандартной химиотерапии, связанные с иммунитетом биомаркеры, идентифицированные в настоящем изобретении, специфически ассоциированы с клиническим преимуществом лечения FTI, но не средствами из числа других химиотерапевтических средств.

Биомаркеры, как идентифицировано в настоящем документе, включают KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5, GZMM, так же как специфический лиганд для KIR2DS2, HLA-C2. Показано, что носители KIR2DS2 и HLA-C2 предрасположены к MDS. (Serio et al., Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2006 108: Abstract 2670; Cook et al., Blood 2004; 103: 1521-152) Иммунологические биомаркеры, идентифицированные в настоящем изобретении, все представляют собой гены, связанные с клетками NK. Открытие, что FTI, такой как типифарниб, избирательно нацеливается на злокачественные опухоли со специфическими генотипами или профилями экспрессии KIR, описанными в настоящем документе, может быть, по меньшей мере частично, основан на том механизме, что конкретные клетки NK со специфическими генотипами или профилями экспрессии KIR могут индуцировать аутоиммунитет. Такие клетки NK могут также осуществлять понижающую регуляцию представления антигена, уничтожение или понижающую регуляцию конкретных подтипов Т-клеток. Посредством ингибирования передачи сигналов KIR-RAS, FTI может модулировать или ингибировать активность клеток NK, способствовать цитотоксичности по отношению к клеткам злокачественных опухолей посредством модуляции собственной иммунной системы пациента. А также посредством ингибирования передачи сигналов KIR-RAS, FTI может модулировать или ингибировать активность клеток NK и других иммунцитов против нормальных гематологических клеток и их предшественников, уменьшая или исключая необходимость трансфузии эритроцитов или тромбоцитов или введения гематологического фактора роста.

3.1. Типирование KIR и типирование HLA.

Как представлено в настоящем документе, генотип генов KIR и генов HLA субъекта может являться показателем для вероятности субъекта отвечать на лечение FTI. Пациент с злокачественной опухолью, который является носителем KIR2DS2, KIR2DS5 или HLA-C2, вероятно, способен отвечать на лечение FTI. Соответственно типирование KIR у пациентов с злокачественными опухолями и избирательное лечение тех, которые являются носителями KIR2DS2 или KIR2DS5, может увеличивать общую частоту ответа пациентов с злокачественными опухолями на лечение FTI. Кроме того, типирование HLA у пациентов с злокачественными опухолями и избирательное лечение тех, которые являются носителями HLA-C2, может дополнительно увеличивать общую частоту ответа пациентов с злокачественными опухолями на лечение FTI.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения злокачественной опухоли у субъекта посредством введения терапевтически эффективного количества FTI субъекту, где субъект является носителем KIR2DS2 или KIR2DS5. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ лечения злокачественной опухоли у субъекта посредством типирования KIR у субъекта и введения терапевтически эффективного количества FTI субъекту, где субъект является носителем KIR2DS2 или KIR2DS5. В некоторых вариантах осуществления субъект является носителем KIR2DS2. В некоторых вариантах осуществления субъект является носителем KIR2DS5. В некоторых вариантах осуществления субъект является носителем как KIR2DS2, так и KIR2DS5. В некоторых вариантах осуществления субъект также не является носителем KIR2DL2. В некоторых вариантах осуществления субъект также не является носителем KIR2DL5. В некоторых вариантах осуществления субъект является носителем KIR2DS2, но не носителем KIR2DL2. В некоторых других вариантах осуществления субъект является носителем KIR2DS5, но не носителем KIR2DL5.

В некоторых вариантах осуществления способы лечения злокачественной опухоли у субъекта, как представлено в настоящем документе, дополнительно включают типирование HLA у субъекта и введение терапевтически эффективного количества FTI субъекту, который является носителем HLA-C2. В некоторых вариантах осуществления субъект является носителем как KIR2DS2, так и HLA-C2. В некоторых вариантах осуществления субъект является носителем как KIR2DS5, так и HLA-C2. В некоторых вариантах осуществления субъект является носителем KIR2DS2, KIR2DS5 и HLA-C2. В некоторых вариантах осуществления субъект, который является носителем HLA-C2, является гомозиготным HLA-C2/HLA-C2. В некоторых вариантах осуществления субъект является гетерозиготным HLA-C1/HLA-C2.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ отбора пациента с злокачественной опухолью для лечения FTI посредством типирования KIR, где пациента с злокаче-

ственной опухолью отбирают для лечения FTI, если пациент с злокачественной опухолью является носителем KIR2DS2 или KIR2DS5. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ прогнозирования вероятности для пациента с злокачественной опухолью являться отвечающим на лечение FTI посредством типирования KIR, и определения того, что пациент с злокачественной опухолью, вероятно, способен отвечать на лечение FTI, если пациент с злокачественной опухолью является носителем KIR2DS2 или KIR2DS5. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение терапевтически эффективного количества FTI пациенту с злокачественной опухолью. В некоторых вариантах осуществления субъект является носителем KIR2DS2. В некоторых вариантах осуществления субъект является носителем KIR2DS5. В некоторых вариантах осуществления субъект является носителем как KIR2DS2, так и KIR2DS5. В некоторых вариантах осуществления, субъект также не является носителем KIR2DL2. В некоторых вариантах осуществления субъект также не является носителем KIR2DL5. В некоторых вариантах осуществления субъект является носителем KIR2DS2, но не носителем KIR2DL2. В некоторых других вариантах осуществления субъект является носителем KIR2DS5, но не носителем KIR2DL5.

В некоторых вариантах осуществления способы отбора пациента с злокачественной опухолью для лечения FTI или прогнозирования вероятности для пациента с злокачественной опухолью являться отвечающим на лечение FTI, как представлено в настоящем документе, дополнительно включают типирование HLA у субъекта и введение терапевтически эффективного количества FTI субъекту, который является носителем HLA-C2. В некоторых вариантах осуществления субъект является носителем как KIR2DS2, так и HLA-C2. В некоторых вариантах осуществления субъект является носителем как KIR2DS5, так и HLA-C2. В некоторых вариантах осуществления субъект является носителем KIR2DS2, KIR2DS5 и HLA-C2. В некоторых вариантах осуществления субъект, который является носителем HLA-C2, является гомозиготным HLA-C2/HLA-C2. В некоторых вариантах осуществления, субъект является гетерозиготным HLA-C1/HLA-C2.

Способы типирования KIR хорошо известны в данной области. Иллюстративные способы типирования KIR описаны в WO 2012047985; Lebedeva et al., Hum Immun., 68(9):789-96 (2007); Gonzalez et al., Hum Immun., 70 (10) : 858-63 (2009); Yun et al., Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 106:Abstract 1407 (2005) (см. также Yun et al., Clin Immunol. 123 (3) : 272-280 (2007).); Leung et al., J Immun. 174:6540-6545 (2005); Dinuer et al., US 2008/0280289 (см. также WO 2005/046459, избранные разделы; и KIR Genotyping Product Brochure 2004.); Chen et al., WO 2009/051672. см. также PCT/US2008/011671; Trachtenberg et al., Публикация патентной заявки № US 2008/0213787 (см. также WO 2007/041067.); Houtchens et al., Immunogenetics. 59(7):525-37 (2007).; Gomez-Lozano et al., Tissue Antigens 59(3) :184-193 (2002); и Shilling et al., J Immunol. 168:2307-2315 (2002); Патенты США № 6723564, 6111251, 6104028, 6558902, 6706530, 6423966, 5777324, 6569385, 6500621, 6300076 и 6258538; Uhrberg et al., Immunity 7:753-763 (1997); Gomez-Lozano et al., Tissue Antigens 59:184-193 (2002); Cook et al., Hum. Immunology 64:567-571 (2003); Crum et al., Tissue Antigens 56:313-326 (2000); Middleton et al., Transplant immunology 10:147-164 (2002); Ross et al., Nature Biotech., 16:1347-1351 (1998); Fei et al., Rapid Comm. Mass. Spec. 14:950-959 (2000); Fei et al., NAR 26 (11) :2827-2828 (1998); Amexis et al., PNAS 98(21) 12097-12102 (2001); Li et al., Electrophoresis 20:1258-1265 (1999); Buetow et al., PNAS 98(2) 581-584 (2001); Storm et al., Methods in Mol. Biol., 212:241-262 (2003); Parham, Immunology Lett. 92:11-13 (2004); и MassARRAY™ Homogenous Mass EXTEND™ (hME) Assay, Sequenom®, Application Notes, Bulletin #1021; полное содержание каждого из которых, таким образом, приведено в качестве ссылки.

Кроме того, доступны некоторые наборы для генотипирования KIR, включая Inno-Train, "KIR-Ready Gene" Product Brochure 9/2005; Miltenyi Biotec, "KIR Typing Kit" Product Brochure 2009; Invitrogen, "KIR Genotyping SSP Kit" Product Brochure 11/2006; и Tepnel Lifecodes, "KIR Genotyping" Product Brochure 6/2005, полное содержание каждого из которых, таким образом, приведено в качестве ссылки.

Представленные в настоящем документе способы можно осуществлять любым способом, описанным в настоящем документе или иным образом известным в данной области. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ лечения злокачественной опухоли у субъекта с использованием FTI посредством типирования KIR, или отбора пациента с злокачественной опухолью для лечения FTI посредством типирования KIR, где типирование KIR проводят посредством секвенирования, полимеразной цепной реакции (ПЦР), анализа микромассива ДНК, масс-спектрометрии (MS), анализа однонуклеотидного полиморфизма (SNP), анализа иммуноблоттинга или твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). В некоторых вариантах осуществления типирование KIR проводят посредством анализа микромассива ДНК. В некоторых вариантах осуществления типирование KIR проводят посредством ELISA. В некоторых вариантах осуществления типирование KIR проводят посредством секвенирования. В некоторых вариантах осуществления типирование KIR проводят посредством секвенирования нового поколения (NGS).

В некоторых вариантах осуществления типирование KIR можно осуществлять посредством ПЦР. В некоторых вариантах осуществления типирование KIR можно осуществлять посредством ПЦР с использованием специфического для последовательности праймера (SSP). В некоторых вариантах осуществле-

ния SSP включают SSP, которые являются специфическими для амплификации KIR2DL2, KIR2DL5, KIR2DS2, KIR2DS5, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления типирование KIR можно осуществлять посредством ПЦП с использованием специфического для последовательности олигонуклеотидного зонда (SSOP). В некоторых вариантах осуществления типирование KIR можно осуществлять посредством ПЦП с использованием типирования на основании последовательности (SBT). В некоторых вариантах осуществления типирование KIR можно осуществлять посредством анализа микромассива ДНК. В некоторых вариантах осуществления типирование KIR можно осуществлять посредством MS. В некоторых вариантах осуществления типирование KIR можно осуществлять посредством времяпролетной масс-спектрометрии с лазерной десорбцией/ионизацией с помощью матрицы (MALDI-TOF). Как понятно специалисту в данной области типирование KIR можно осуществлять посредством любого способа, описанного в настоящем документе, или иным образом известного в данной области.

Способы типирования HLA хорошо известны в данной области. Первоначально наиболее широко применяемым способом типирования ДНК для идентификации этих аллелей являлся анализ полиморфизма длины фрагментов рестрикции (RFLP). В дополнение к полиморфизму длины фрагментов рестрикции (ПЦП-RFLP) другим способом являлась гибридизация амплифицированных продуктов ПЦП со специфическими для последовательности олигонуклеотидными зондами (ПЦП-SSO) для разделения аллелей HLA (см., Tiercy et al. (1990) Blood Review 4: 9-15, полное содержание которого, таким образом, приведено в качестве ссылки). Для этого способа необходимо получить продукт ПЦП представляющего интерес локуса HLA и затем нанести точками на нитроцеллюлозные мембраны или полоски. Затем каждую мембрану гибридизуют со специфическим для последовательности зондом, промывают и затем анализируют посредством экспонирования рентгеновской пленки или посредством колориметрического анализа в зависимости от способа детекции. Подобно способу ПЦП-SSP, получают зонды для области аллельного полиморфизма, ответственного за различные аллели HLA. Каждый образец необходимо гибридизовать и анализировать с использованием различных зондов по меньшей мере 100-200 раз для полного типирования класса I и II. Способы гибридизации и детекции для типирования ПЦП-SSO включают использование меченных нерадиоактивной меткой зондов, форматов микропланшетов и т.д. (см., например, Saiki et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 86: 6230-6234; Erlich et al. (1991) Eur. J. Immunogenet. 18(1-2): 33-55; Kawasaki et al. (1993) Methods Enzymol. 218:369-381; полное содержание всех из которых, таким образом, приведено в настоящем документе в качестве ссылки).

Описан способ молекулярного типирования с использованием амплификации со специфическими для последовательности праймерами (ПЦП-SSP) (см., Olerup and Zetterquist (1992) Tissue Antigens 39: 225-235). Этот способ ПЦП-SSP является простым, полезным и быстрым, поскольку стадия детекции является намного более простой. В ПЦП-SSP специфические для аллельной последовательности праймеры амплифицируют только комплементарный аллель матрицы, позволяя детектировать генетическое разнообразие с высокой степенью разрешения. Этот способ позволяет определение типа HLA просто по тому, присутствуют или отсутствуют продукты амплификации (совместно называемые "ампликонами") после ПЦП. В ПЦП-SSP детекцию продуктов амплификации обычно выполняют посредством электрофореза в агарозном геле с последующим окрашиванием геля посредством бромид аэтидия (EtBr).

Другим способом типирования HLA является SSCP одноцепочечный конформационный полиморфизм. Кратко одноцепочечные продукты ПЦП различных локусов HLA разделяют посредством электрофореза в не денатурирующем полиакриламидном геле (PAGE). Одиночные цепи мигрируют до уникальной локализации на основании состава их пар оснований. Посредством сравнения с известными стандартами, можно вывести типирование. Его можно использовать для определения истинной гомозиготности.

Другие способы типирования HLA, включая, но без ограничения, секвенирование, полимеразную цепную реакцию (ПЦР), анализ микромассива ДНК, масс-спектрометрию (MS), анализ однонуклеотидного полиморфизма (SNP), анализ иммуноблоттинга, или твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), также можно использовать в представленных в настоящем документе способах. В некоторых вариантах осуществления секвенирование может представлять собой NGS. Другие способы описаны в патенте США № 6670124, US 5468611, US 8435740, US 8771951 и US 20130267613; полное содержание которых, таким образом, приведено в качестве ссылки. Другие различные способы типирования HLA, известные в данной области, также можно использовать в представленных в настоящем документе способах.

Например, анализ однонуклеотидного полиморфизма (SNP) можно использовать для типирования HLA. В анализе SNP можно типировать различные HLA на основании полиморфизма в положении 77 в HLA-C и в положении 83 в HLA-B и -A. Анализ SNP можно проводить в HT7900 от Applied Biosystems, следуя протоколу аллельного дискриминантного анализа, представленному производителем. Праймеры для анализа разработаны таким образом, что они амплифицируют все аллели конкретного типа HLA (такого как HLA-C), так же как ампликон, содержащий представляющую интерес полиморфную область. Разработаны два зонда с одним несовпадением между ними. Каждый зонд связывался только с одной группой аллелей и являлся меченым флуоресцентным красителем 6FAM или VIC на 5'-конце. Зонды содержали также белок, связывающийся с малой бороздкой (MGB) Taqman® с нефлуоресцентным гасителем (NFQ) (Applied Biosystems). Для HLA-C прямой праймер может представлять собой

5'-TTGGGACCGGGAGACACAG-3' (SEQ ID NO: 46),

и обратный праймер может представлять собой

5'-CGATGTAATCCTTGCCGTC-3' (SEQ ID NO: 47).

Зонды, используемые для HLA-C1 и HLA-C2, могут представлять собой

6FAM-CCGAGTGAG CCTGC-MGBNFQ (SEQ ID NO: 48) и

VIC-CCGAGTGAA CCTGC-MGBNFQ (SEQ ID NO: 49)

соответственно. Каждая реакционная смесь для анализа может содержать зонд в концентрации 250 нМ и 20 нг геномной ДНК в 1× готовой смеси для генотипирования Taqman от Applied Biosystems (USA).

В некоторых вариантах осуществления типирование KIR или типирование HLA проводят в качестве сопутствующей диагностики при лечении FTI. Сопутствующую диагностику можно проводить в клиническом центре, в котором проводят лечение субъекта. Сопутствующую диагностику можно также проводить в центре, отличном от клинического центра, в котором проводят лечение субъекта.

В некоторых вариантах осуществления способы типирования KIR или типирования HLA включают получение образца от субъекта. Субъект может представлять собой пациента с злокачественной опухолью. Образец может представлять собой образец цельной крови, образец костного мозга, частично очищенный образец крови, PBMC или образец биопсии ткани. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец костного мозга от пациента с злокачественной опухолью. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой PBMC от пациента с злокачественной опухолью. В некоторых вариантах осуществления образец является обогащенным клетками NK. Клетки NK можно обогащать из костного мозга, цельной крови или частично очищенной крови от пациента с злокачественной опухолью. В некоторых вариантах осуществления клетки NK дополнительно размножают *in vitro* перед типированием KIR.

3.2. Экспрессия KIR и экспрессия GZMM.

Как представлено в настоящем документе, уровень экспрессии биомаркера выбранного из группы, состоящего из KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 и GZMM, в образце от субъекта может являться показательным для вероятности субъекта являться отвечающим на лечение FTI. Пациент с злокачественной опухолью, уровень экспрессии KIR2DS2 которого выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS2, вероятно, способен отвечать на лечение FTI. Пациент с злокачественной опухолью, уровень экспрессии KIR2DS5 которого выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS5 вероятно, способен отвечать на лечение FTI. Пациент с злокачественной опухолью, уровень экспрессии GZMM которого выше, чем эталонный уровень экспрессии GZMM, вероятно, способен отвечать на лечение FTI. Пациент с злокачественной опухолью, уровень экспрессии KIR2DL2 которого ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL2, вероятно, способен отвечать на лечение FTI. Пациент с злокачественной опухолью, уровень экспрессии KIR2DL5 которого ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL5, вероятно, способен отвечать на лечение FTI. Соответственно детекция уровня экспрессии одного или более из этих биомаркеров у пациентов с злокачественными опухолями и избирательное лечение пациентов с злокачественными опухолями, соответствующих одному или более из вышеописанных условий, может увеличивать общую частоту ответа пациентов с злокачественными опухолями на лечение FTI.

В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии KIR2DL5 представляет собой суммарные уровни экспрессии KIR2DL5A и KIR2DL5B. В некоторых вариантах осуществления, уровень экспрессии KIR2DL5 представляет собой уровень экспрессии KIR2DL5A. В некоторых вариантах осуществления, уровень экспрессии KIR2DL5 представляет собой уровень экспрессии KIR2DL5B.

Кроме того, в настоящем документе представлены способы использования отношения уровней экспрессии конкретных биомаркеров для прогнозирования вероятности субъекта являться отвечающим на лечение FTI. Например, высокое отношение уровня экспрессии KIR2DS2 к уровню экспрессии KIR2DL2 ("отношение 2DS2/2DL2") может показывать, что субъект, вероятно, способен отвечать на лечение FTI. Подобным образом высокое отношение уровня экспрессии KIR2DS5 к уровню экспрессии KIR2DL5 ("отношение 2DS5/2DL5") может показывать, что субъект вероятно, способен отвечать на лечение FTI. Соответственно детекция уровня экспрессии этих биомаркеров у пациентов с злокачественными опухолями и избирательное лечение пациентов с злокачественными опухолями, отношение 2DS2/2DL2 которых выше, чем эталонное отношение, или отношение 2DS5/2DL5 которых выше, чем эталонное отношение, или и тех и других, может увеличивать общую частоту ответа пациентов с злокачественными опухолями на лечение FTI.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ лечения злокачественной опухоли у субъекта посредством введения терапевтически эффективного количества FTI субъекту, где

(i) уровень экспрессии KIR2DS2 в образце от субъекта выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS2;

(ii) уровень экспрессии KIR2DL2 в образце от субъекта ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL2;

(iii) уровень экспрессии KIR2DS5 в образце от субъекта выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS5;

(iv) уровень экспрессии KIR2DL5 в образце от субъекта ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL5; или

(v) уровень экспрессии GZMM в образце от субъекта выше, чем эталонный уровень экспрессии GZMM;

или присутствует любая комбинация этого.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ лечения злокачественной опухоли у субъекта посредством

(a) определения уровня экспрессии биомаркера, выбранного из группы, состоящей из KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 и GZMM, в образце от субъекта, где

(i) уровень экспрессии KIR2DS2 в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS2;

(ii) уровень экспрессии KIR2DL2 в образце ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL2;

(iii) уровень экспрессии KIR2DS5 в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS5;

(iv) уровень экспрессии KIR2DL5 в образце ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL5;

или

(v) уровень экспрессии GZMM в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии GZMM; и

(b) введение терапевтически эффективного количества FTI субъекту.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ отбора пациента с злокачественной опухолью для лечения FTI посредством определения уровня экспрессии биомаркера, выбранного из группы, состоящей из KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 и GZMM, в образце от пациента с злокачественной опухолью, где пациента с злокачественной опухолью отбирают для лечения FTI, если

(i) уровень экспрессии KIR2DS2 в образце от субъекта выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS2;

(ii) уровень экспрессии KIR2DL2 в образце от субъекта ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL2;

(iii) уровень экспрессии KIR2DS5 в образце от субъекта выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS5;

(iv) уровень экспрессии KIR2DL5 в образце от субъекта ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL5; или

(v) уровень экспрессии GZMM в образце от субъекта выше, чем эталонный уровень экспрессии GZMM;

или присутствует любая комбинация этого.

В некоторых вариантах осуществления представленные в настоящем документе способы включают лечение субъекта с использованием терапевтически эффективного количества FTI или отбор пациента с злокачественной опухолью для лечения FTI, где соблюдается одно из пяти условий:

(i) уровень экспрессии KIR2DS2 в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS2 (условие 1);

(ii) уровень экспрессии KIR2DS5 в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS5 (условие 2);

(iii) уровень экспрессии KIR2DL2 в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL2 (условие 3);

(iv) уровень экспрессии KIR2DL5 в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL5 (условие 4); и

(v) уровень экспрессии GZMM в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью выше, чем эталонный уровень экспрессии GZMM (условие 5).

Специалисту в данной области понятно, что удовлетворение любого одного из пяти вышеописанных условий может показывать, что субъект, вероятно, способен отвечать на лечение FTI. Соответственно каждое условие может независимо служить критерием отбора пациента для лечения FTI, чтобы увеличивать общую частоту ответа. Специалисту в данной области понятно также, что комбинации двух или более условий также могут служить в качестве критериев отбора пациента для лечения FTI, которые являются более избирательными, чем одно условие, и могут потенциально обеспечивать более высокую общую частоту ответа. Соответственно в настоящем документе представлен также способ использования любой комбинации или пермутации вышеуказанных условий для отбора пациента для лечения FTI.

В некоторых вариантах осуществления, способ, представленный в настоящем документе, включает лечение субъекта с использованием терапевтически эффективного количества FTI или отбор пациента с злокачественной опухолью для лечения FTI, где субъект или пациент с злокачественной опухолью удовлетворяет двум из пяти вышеописанных условий, таким как условия 1 и 2, 1 и 3, 1 и 4, 1 и 5, 2 и 3, 2 и 4, 2 и 5, 3 и 4, 3 и 5 или 4 и 5. В некоторых вариантах осуществления субъект или пациент с злокачественной опухолью удовлетворяет условиям 1 и 2. В некоторых вариантах осуществления субъект или пациент с злокачественной опухолью удовлетворяет условиям 1 и 3. В некоторых вариантах осуществления субъект или пациент с злокачественной опухолью удовлетворяет условиям 1 и 4. В некоторых вариантах осуществления субъект или пациент с злокачественной опухолью удовлетворяет условиям 1 и 5. В неко-

GZMM.

В дополнение к уровню экспрессии индивидуальных биомаркеров отношение уровней экспрессии между двумя биомаркерами также может служить критерием для отбора пациента для лечения FTI, чтобы увеличивать частоту ответа. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ лечения злокачественной опухоли у субъекта посредством введения терапевтически эффективного количества FTI субъекту, где

(i) отношение уровня экспрессии KIR2DS2 к уровню экспрессии KIR2DL2 (отношение 2DS2/2DL2) в образце от субъекта выше, чем эталонное отношение 2DS2/2DL2; или

(ii) отношение уровня экспрессии KIR2DS5 к уровню экспрессии KIR2DL5 (отношение 2DS5/2DL5) в образце от субъекта выше, чем эталонное отношение 2DS5/2DL5.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ лечения злокачественной опухоли у субъекта посредством определения уровней экспрессии KIR2DS2 и KIR2DL2, или уровней экспрессии KIR2DS5 и KIR2DL5 в образце от субъекта, где

(i) отношение 2DS2/2DL2 в образце выше, чем эталонное отношение 2DS2/2DL2; или

(ii) отношение 2DS5/2DL5 в образце выше, чем эталонное отношение 2DS5/2DL5;

и введения терапевтически эффективного количества FTI субъекту.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ отбора пациента с злокачественной опухолью для лечения FTI посредством определения уровней экспрессии KIR2DS2 и KIR2DL2, или уровней экспрессии KIR2DS5 и KIR2DL5 в образце от пациента с злокачественной опухолью, где пациента с злокачественной опухолью отбирают для лечения FTI, если

(i) отношение 2DS2/2DL2 в образце выше, чем эталонное отношение 2DS2/2DL2; или

(ii) отношение 2DS5/2DL5 в образце выше, чем эталонное отношение 2DS5/2DL5;

и введения терапевтически эффективного количества FTI субъекту.

В некоторых вариантах осуществления способ, представленный в настоящем документе, включает лечение субъекта с использованием терапевтически эффективного количества FTI или отбор пациента с злокачественной опухолью для лечения FTI, где отношение 2DS2/2DL2 в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью выше, чем эталонное отношение 2DS2/2DL2. В некоторых вариантах осуществления способ по настоящему изобретению включает лечение субъекта с использованием терапевтически эффективного количества FTI или отбор пациента с злокачественной опухолью для лечения FTI, где отношение 2DS5/2DL5 в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью выше, чем эталонное отношение 2DS5/2DL5. В некоторых вариантах осуществления способ по настоящему изобретению включает лечение субъекта с использованием терапевтически эффективного количества FTI или отбор пациента с злокачественной опухолью для лечения FTI, где отношение 2DS2/2DL2 в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью выше, чем эталонное отношение 2DS2/2DL2, и отношение 2DS5/2DL5 в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью выше, чем эталонное отношение 2DS5/2DL5.

В некоторых вариантах осуществления представленные в настоящем документе способы отбора пациента с злокачественной опухолью для лечения FTI могут также быть основаны на уровне экспрессии индивидуальных биомаркеров, так же как на отношении уровней экспрессии между биомаркерами. В некоторых вариантах осуществления способ включает лечение субъекта с использованием терапевтически эффективного количества FTI или отбор пациента с злокачественной опухолью для лечения FTI, где отношение 2DS2/2DL2 в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью выше, чем эталонное отношение 2DS2/2DL2, и субъект или пациент с злокачественной опухолью удовлетворяет по меньшей мере одному из пяти вышеописанных условий относительно индивидуального уровня экспрессии биомаркеров. В некоторых вариантах осуществления способ включает лечение субъекта с использованием терапевтически эффективного количества FTI или отбор пациента с злокачественной опухолью для лечения FTI, где отношение 2DS5/2DL5 в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью выше, чем эталонное отношение 2DS5/2DL5, и субъект или пациент с злокачественной опухолью удовлетворяет по меньшей мере одному из пяти вышеописанных условий относительно индивидуального уровня экспрессии биомаркеров. В некоторых вариантах осуществления способ включает лечение субъекта с использованием терапевтически эффективного количества FTI или отбор пациента с злокачественной опухолью для лечения FTI, где отношение 2DS2/2DL2 в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью выше, чем эталонное отношение 2DS2/2DL2, и отношение 2DS5/2DL5 в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью выше, чем эталонное отношение 2DS5/2DL5, и субъект или пациент с злокачественной опухолью удовлетворяет по меньшей мере одному из пяти вышеописанных условий относительно индивидуального уровня экспрессии биомаркеров.

В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии KIR2DL5 представляет собой суммарные уровни экспрессии KIR2DL5A и KIR2DL5B. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии KIR2DL5 представляет собой уровень экспрессии KIR2DL5A. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии KIR2DL5 представляет собой уровень экспрессии KIR2DL5B. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления отношение 2DS5/2DL5 представляет собой отношение уровня экспрессии KIR2DS5 к суммарным уровням экспрессии KIR2DL5A и KIR2DL5B. В некоторых вари-

антах осуществления отношение $2DS5/2DL5$ представляет собой отношение уровня экспрессии KIR2DS5 к уровню экспрессии KIR2DL5A. В некоторых вариантах осуществления отношение $2DS5/2DL5$ представляет собой отношение уровня экспрессии KIR2DS5 к уровню экспрессии KIR2DL5B.

Для повторения, пять условий для отбора субъекта или пациента с злокачественной опухолью для лечения FTI на основании уровня экспрессии одиночного биомаркера включают: условие 1: уровень экспрессии KIR2DS2 в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS2; условие 2: уровень экспрессии KIR2DS5 в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS5; условие 3: уровень экспрессии KIR2DL2 в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL2; условие 4: уровень экспрессии KIR2DL5 в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL5; условие 5: уровень экспрессии GZMM в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью выше, чем эталонный уровень экспрессии GZMM. Любую комбинацию или пермутацию этих условий можно использовать в дальнейшей комбинации с любым одним или обоими из критериев, основанных на отношении экспрессии (отношение $2DS2/2DL2$ и отношение $2DS2/2DL2$), в качестве критериев для отбора пациента для лечения FTI.

Например, в некоторых вариантах осуществления, способ, представленный в настоящем документе, включает лечение субъекта с использованием терапевтически эффективного количества FTI или отбор пациента с злокачественной опухолью для лечения FTI, где отношение $2DS2/2DL2$ в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью выше, чем эталонное отношение $2DS2/2DL2$, и уровень экспрессии GZMM в образце от субъекта выше, чем эталонный уровень экспрессии GZMM. В некоторых вариантах осуществления, способ включает лечение субъекта с использованием терапевтически эффективного количества FTI или отбор пациента с злокачественной опухолью для лечения FTI, где отношение $2DS5/2DL5$ в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью выше, чем эталонное отношение $2DS5/2DL5$, и уровень экспрессии KIR2DS2 в образце от субъекта выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS2. Специалисту в данной области понятно, что объем настоящего изобретения не является ограниченным этими иллюстративными комбинациями и включает любые комбинации или пермутации индивидуальных критериев отбора пациента для лечения FTI, как описано в настоящем документе.

Как описано в настоящем документе, генотип KIR, генотип HLA и профиль экспрессии некоторых связанных с клетками NK генов можно использовать для прогнозирования способности пациента с злокачественной опухолью отвечать на лечение FTI. Соответственно в настоящем документе представлены способы отбора пациентов с злокачественными опухолями для лечения FTI, или способы лечения пациентов с использованием FTI, включающие сначала типирование KIR у пациента или определение профилей экспрессии биомаркеров, идентифицированных в настоящем документе для оценки того, будет ли пациент с вероятностью отвечать на лечение. Способы могут дополнительно включать типирование HLA у пациента. Специалисту в данной области понятно, что эти способы можно использовать независимо в качестве критериев отбора пациентов для лечения FTI. Кроме того, способы можно использовать также в связи с другими способами стратификации пациентов для дополнительного увеличения частоты ответа популяции пациентов на лечение FTI. Например, в некоторых вариантах осуществления представленные в настоящем документе способы дополнительно включают определение статуса мутаций гена *gas* и отбор пациента для лечения FTI, когда пациент имеет конкретную мутацию *gas*, такую как мутация K-*gas*, мутация N-*gas* или мутация H-*gas*, как более подробно описано ниже. В некоторых вариантах осуществления представленные в настоящем документе способы дополнительно включают определение статуса мутаций гена *gas* и отбор пациента для лечения FTI, когда пациент имеет K-*gas* дикого типа и N-*gas* дикого типа. В некоторых вариантах осуществления представленные в настоящем документе способы дополнительно включают определение статуса мутаций гена *gas* и отбор пациента для лечения FTI, когда пациент имеет мутацию H-*gas*. В других вариантах осуществления представленные в настоящем документе способы могут дополнительно включать использование отношения 2 генов между RASGRP1 и APTX в качестве дополнительного критерия отбора пациентов для лечения FTI (Патент США № 7932036, полное содержание которого, таким образом, приведено в качестве ссылки). Способы, описанные в настоящем документе или иным образом известные в данной области, можно использовать для определения статуса мутаций гена *gas* или экспрессии других биомаркеров, таких как RASGRP1 или APTX. В некоторых вариантах осуществления статус мутаций гена *gas*, такого как H-*gas*, можно определять посредством NGS.

В некоторых вариантах осуществления представленные в настоящем документе способы включают определение уровня экспрессии биомаркера. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии биомаркера может представлять собой уровень белка биомаркера. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии биомаркера может представлять собой уровень РНК биомаркера. Любой способ, как описано в настоящем документе или иным образом известно в данной области для определения уровня белка или уровня РНК гена, можно использовать для определения уровня экспрессии биомаркера по настоящему изобретению.

Иллюстративные способы детекции или количественной оценки уровней мРНК включают, но без ограничения, способы на основе ПЦР, Нозерн-блоттинг, анализы защиты от рибонуклеазы и т.п. После-

довательность мРНК (например, мРНК биомаркера, такого как CRBN или CAP, или ее фрагмента) можно использовать для получения зонда, который является, по меньшей мере, частично комплементарным. Затем зонд можно использовать для детекции последовательности мРНК в образце, с использованием любого подходящего анализа, такого как способы на основе ПЦР, Нозерн-блоттинг, анализ погружаемых зондов и т.п.

Общепринятые способы, известные в данной области для количественной оценки 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 применять антитела, которые могут узнавать специфические дуплексы, включая дуплексы ДНК, дуплексы РНК и гибридные дуплексы ДНК-РНК или дуплексы ДНК-белок. Репрезентативные способы анализа экспрессии генов на основе секвенирования включают серийный анализ экспрессии генов (SAGE) и анализ экспрессии генов посредством массового параллельного секвенирования характерных последовательностей (MPSS).

Чувствительным и гибким количественным способом является ПЦР. Примеры способов ПЦР можно обнаружить в литературе. Примеры анализов ПЦР можно обнаружить в патенте США № 6927024, полное содержание которого приведено в настоящем документе в качестве ссылки. Примеры способов RT-ПЦР можно обнаружить в патенте США № 7122799, полное содержание которого приведено в настоящем документе в качестве ссылки. Способ флуоресцентной ПЦР *in situ* описан в патенте США № 7186507, полное содержание которого приведено в настоящем документе в качестве ссылки.

Следует отметить, однако, что другие способы амплификации нуклеиновых кислот (т.е. отличные от ПЦР) также можно использовать в способах анализа нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе. Например, пригодные способы амплификации включают лигазную цепную реакцию (см., например, Wu & Wallace, *Genomics* 4:560-569, 1988); анализ с замещением цепей (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 амплификации на основе транскрипции (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 амплификации зонда до поддающихся детекции 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, в Abramson and Myers in *Current Opinion in Biotechnology* 4:41-47 (1993).

мРНК можно выделять из исходного образца ткани. Общие способы выделения мРНК хорошо известны в данной области и описаны в стандартных руководствах по молекулярной биологии, включая Ausubel et al., *Current Protocols of Molecular Biology*, John Wiley and Sons (1997). В частности, выделение РНК можно проводить с использованием набора для очистки, набора буферов и протеазы от коммерческих производителей, таких как Qiagen, в соответствии с инструкциями производителя. Например, тотальную РНК из клеток в культуре можно выделять с использованием миниколонок Qiagen RNeasy. Другие коммерчески доступные наборы для выделения РНК включают MASTERPURE® Complete DNA and RNA Purification Kit (EPICENTRE®, Madison, Wis.) и Paraffin Block RNA Isolation Kit (Ambion, Inc.). Тотальную РНК из образцов тканей можно выделять с использованием RNA Stat-60 (Tel-Test). РНК, полученную из опухоли, можно выделять, например, посредством центрифугирования в градиенте плотности хлорида цезия.

В некоторых вариантах осуществления, первой стадией получения профиля экспрессии генов посредством ПЦР является обратная транскрипция матрицы РНК в кДНК, с последующей ее экспоненциальной амплификацией в реакции ПЦР. В других вариантах осуществления, можно использовать комбинированную реакцию обратной транскрипции - полимеразной цепной реакции (RT-ПЦР), например, как описано в патентах США № 5310652; 5322770; 5561058; 5641864; 5693517. Двумя общепринятыми обратными транскриптазами являются обратная транскриптаза вируса миелобластома птиц (AMV-RT) и обратная транскриптаза вируса лейкоза мышей Moloney (MMLV-RT). Стадию обратной транскрипции, как правило, начинают с праймеров, с использованием специфических праймеров, случайных гексамеров или олиго-dT праймеров, в зависимости от условий и цели получения профиля экспрессии. Например, выделенную РНК можно подвергать обратной транскрипции с использованием набора для ПЦР РНК GENEAMP™ (Perkin Elmer, Calif, USA), в соответствии с инструкциями производителя. Затем полученную кДНК можно использовать в качестве матрицы в последующей реакции ПЦР.

В некоторых вариантах осуществления обратную транскрипцию - ПЦР с детекцией в реальном времени (qRT-ПЦР) можно использовать как для детекции, так и для количественной оценки РНК-мишеней (Bustin, et al., 2005, *Clin. Sci.*, 109:365-379). Примеры способов на основе qRT-ПЦР можно обнаружить, например, в патенте США № 7101663, полное содержание которого приведено в настоящем документе в качестве ссылки. Устройства для ПЦР с детекцией в реальном времени, такие как Applied

Biosystems 7500, являются коммерчески доступными, так же как реагенты, такие как химические реагенты TaqMan для детекции последовательностей.

Например, можно использовать анализы экспрессии генов TaqMan®, в соответствии с инструкциями производителя. Эти наборы представляют собой предварительно составленные анализы для экспрессии генов для быстрой, надежной детекции и количественной оценки транскриптов мРНК человека, мыши и крысы. Можно использовать TaqMan® или анализ с использованием 5'-нуклеазы, как описано в патентах США № 5210015; 5487972; и 5804375; и в 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 его ампликоном-мишенью, но можно использовать любой фермент с эквивалентной 5'-нуклеазной активностью. Два олигонуклеотидных праймера используют для получения ампликона, типичного для реакции ПЦР. Третий олигонуклеотид, или зонд, разрабатывают для детекции нуклеотидной последовательности, локализованной между двумя праймерами для ПЦР. Зонд не поддается удлинению посредством фермента ДНК-полимеразы Taq и является меченным с использованием репортерного флуоресцентного красителя и гасящего флуоресценцию красителя. Любое индуцированное лазером излучение от репортерного красителя погашено посредством гасящего красителя, когда два красителя локализованы в непосредственной близости, как они локализованы на зонде. В ходе реакции амплификации фермент ДНК-полимераза Taq расщепляет зонд не зависимо от матрицы образом. Полученные фрагменты зонда разъединяются в растворе, и сигнал от высвобожденного репортерного красителя освобождается от гасящего эффекта второго флуорофора. Одна молекула репортерного красителя высвобождается на каждую новую синтезированную молекулу, и детекция непогашенного репортерного красителя предоставляет основание для количественной интерпретации данных.

Любой способ, пригодный для детекции продукта деградации, можно использовать в анализе с использованием 5'-нуклеазы. Часто зонд для детекции является меченным с использованием двух флуоресцентных красителей, один из которых является способным гасить флуоресценцию другого красителя. Красители присоединены к зонду, предпочтительно один присоединен к 5'-концу, а другой присоединен к внутреннему участку так, что гашение происходит, когда зонд находится в негибризованном состоянии, и так, что расщепление зонда посредством 5'-3'-экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы происходит между двумя красителями.

Амплификация приводит к расщеплению зонда между красителями с сопутствующим прекращением гашения и увеличением флуоресценции, наблюдаемой от изначально погашенного красителя. Накопление продукта деградации мониторируют посредством измерения увеличения флуоресценции реакции. В патентах США № 5491063 и 5571673, содержание обоих из которых приведено в настоящем документе в качестве ссылки, описаны альтернативные способы детекции деградации зонда, которая происходит параллельно с амплификацией. Данные анализа 5'-нуклеазы можно исходно выражать как Ct, или пороговый цикл. Как обсуждают выше, значения флуоресценции регистрируют в ходе каждого цикла, и они представляют количество продукта, амплифицированного до этой точки в реакции амплификации. Точка, когда флуоресцентный сигнал впервые регистрируют как статистически значимый, представляет собой пороговый цикл (Ct).

Для минимизации ошибок и эффекта изменчивости между образцами ПЦР обычно проводят с использованием внутреннего стандарта. Идеальный внутренний стандарт экспрессируется на постоянном уровне среди различных тканей, и на него не влияет экспериментальная обработка. РНК, наиболее часто используемые для нормализации паттернов экспрессии генов, представляют собой мРНК для генов домашнего хозяйства глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (GAPDH) и β -актина.

Праймеры и зонды для ПЦР разрабатывают на основании интронных последовательностей, присутствующих в гене, подлежащем амплификации. В этом варианте осуществления, первой стадией дизайна праймера/зонда является уточнение границ интронных последовательностей внутри генов. Это можно осуществлять посредством публично доступного программного обеспечения, такого как программное обеспечение DNA BLAT, разработанное Kent, W., Genome Res. 12(4):656-64 (2002), или посредством программного обеспечения BLAST, включая его варианты. Последующие стадии следуют хорошо разработанным способам дизайна праймеров и зондов для ПЦР.

Для исключения неспецифических сигналов может являться важным замаскировать повторяющиеся последовательности внутри интронов при конструировании праймеров и зондов. Это можно легко осуществлять с использованием программы Repeat Masker, доступной онлайн из Baylor College of Medicine, проводящей скрининг последовательностей ДНК против библиотеки повторяющихся элементов и возвращающей запрашиваемую последовательность, в которой повторяющиеся элементы замаскированы. Затем маскированные интронные последовательности можно использовать для конструирования последовательностей праймеров и зондов с использованием любого из коммерческих или иным образом публично доступных пакетов программного обеспечения для конструирования праймеров/зондов, таких как Primer Express (Applied Biosystems); MGB assay-by-design (Applied Biosystems); Primer3 (Rozen and Skaletsky (2000) Primer3 в WWW для обычных пользователей и для программистов-биологов. В: Krawetz

S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, N.J., pp 365-386).

Факторы, учитываемые при конструировании праймеров для ПЦР включают длину праймера, температуру плавления (T_m) и содержания G/C, специфичность, комплементарные праймеру последовательности и 3'-концевую последовательность. Как правило, оптимальные праймеры для ПЦР обычно имеют длину 17-30 оснований и содержат приблизительно 20-80%, например приблизительно 50-60% оснований G+C. T_m между 50 и 80°C, например, от приблизительно 50 до 70°C, как правило, являются предпочтительными. Дополнительное руководство для конструирования праймеров и зондов для ПЦР см., например, в Dieffenbach et al., "General Concepts for PCR Primer Design" in: *PCR Primer, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1995, pp. 133-155; Innis and Gelfand, "Optimization of PCRs" in: *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, таким образом, явно приведено в качестве ссылки.

Иллюстративная программа ПЦР, например, представляет собой 50°C в течение 2 мин, 95°C в течение 10 мин, 40 циклов из 95°C в течение 15 с, затем 60°C в течение 1 мин. Для определения количества циклов, при котором сигнал флуоресценции, ассоциированный с накоплением конкретного ампликона, пересекает порог (обозначенный как CT), данные можно анализировать, например, с использованием программного обеспечения 7500 Real-Time PCR System Sequence Detection v.1.3 с использованием способа расчета относительной количественной оценки со сравнением CT. С использованием этого способа выход выражают как кратность изменения уровней экспрессии. В некоторых вариантах осуществления пороговый уровень можно выбирать по автоматическому определению посредством программного обеспечения. В некоторых вариантах осуществления пороговый уровень устанавливают выше фона, но достаточно низко, чтобы он находился в пределах области экспоненциального роста кривой амплификации.

РНК-секвенирование, называемое также секвенирование полного транскриптома способом дробовика (WTSS), относится к применению способов высокопроизводительного секвенирования для секвенирования кДНК для получения информации относительно содержания РНК в образце. Публикации, описывающие РНК-секвенирование, 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); полное содержание которых, таким образом, приведено в качестве ссылки.

Дифференциальную экспрессию генов также можно идентифицировать или подтверждать с использованием способа микромассивов. В этом способе представляющие интерес полинуклеотидные последовательности (включая кДНК и олигонуклеотиды) печатают или наносят в форме массива на субстрат микрочипа. Затем последовательности в форме массива гибридизуют со специфическими ДНК-зондами из представляющих интерес клеток или тканей.

В одном варианте осуществления способа микромассивов, амплифицированные посредством ПЦР вставки клонов кДНК наносят на субстрат в плотном массиве. Предпочтительно по меньшей мере 10000 нуклеотидных последовательностей наносят на субстрат. Гены в форме микромассива, иммобилизованные на микрочипе из 10000 элементов каждый, являются пригодными для гибридизации в строгих условиях. Флуоресцентно меченные кДНК-зонды можно получать посредством включения флуоресцентных нуклеотидов посредством обратной транскрипции РНК, выделенной из представляющих интерес тканей. Меченные кДНК-зонды, нанесенные на чип, гибридизуются со специфичностью к каждому пятну ДНК на массиве. После строгой отмывки для удаления неспецифически связанных зондов чип сканируют посредством конфокальной лазерной микроскопии или посредством другого способа детекции, например, в ПЗС-камере. Количественная оценка гибридизации каждого включенного в массив элемента позволяет оценку встречаемости соответствующей мРНК. С использованием двухцветной флуоресценции отдельно меченные кДНК-зонды, полученные из двух источников РНК, попарно гибридизуют с массивом. Относительную встречаемость транскриптов из двух источников, соответствующих каждому указанному гену, таким образом, определяют одновременно. Миниатюризированный масштаб гибридизации позволяет удобную и быструю оценку паттерна экспрессии для большого количества генов. Показано, что такие способы обладают чувствительностью, необходимой для детекции редких транскриптов, экспрессированных в небольшом количестве копий на клетку, и для воспроизводимой детекции, по меньшей мере, приблизительно двукратных различий в уровнях экспрессии (Schena et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(2) : 106-149 (1996)). Анализ микромассивов можно осуществлять посредством коммерчески доступного оборудования, следуя протоколам производителя, например, с использованием технологии Affymetrix GENCHIP™ или технологии микромассивов Incyte.

Серийный анализ экспрессии генов (SAGE) представляет собой способ, позволяющий одновременный и количественный анализ большого количества транскриптов генов, без необходимости получения индивидуального зонда для гибридизации для каждого транскрипта. Сначала получают метку последовательности (приблизительно 10-14 п.о.), которая содержит достаточно информации для уникальной идентификации транскрипта, при условии, что метка получена из уникального положения внутри каждого транскрипта. Затем множество транскриптов соединяют вместе для формирования серийных молекул, которые можно секвенировать, выявляя идентичность множества меток одновременно. Паттерн экспрес-

сии любой популяции транскриптов можно оценивать количественно посредством определения встречаемости индивидуальных 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).

Технология MassARRAY (Sequenom, San Diego, Calif.) представляет собой автоматизированный, высокопроизводительный способ анализа экспрессии генов с использованием масс-спектрометрии (MS) для детекции. В соответствии с этим способом после выделения РНК, обратной транскрипции и амплификации ПЦР, кДНК подвергают удлинению праймеров. Происходящие из кДНК-продукты удлинения праймеров очищают и распределяют на массиве на чипе, который предварительно нагружен компонентами, необходимыми для подготовки образцов для MALDI-TOF MS. Различные кДНК, присутствующие в реакции, количественно оценивают посредством анализа площадей пиков в полученных масс-спектрах.

Уровень мРНК можно также измерять посредством анализа на основе гибридизации. Типичный способ анализа мРНК может содержать стадии 1) получения связанных с поверхностью рассматриваемых зондов; 2) гибридизации популяции мРНК со связанными с поверхностью зондами в условиях, подходящих для специфического связывания (3) отмывок после гибридизации для удаления нуклеиновых кислот, не связавшихся при гибридизации; и (4) детекции гибридизованных мРНК. Реагенты, использованные на каждой из этих стадий, и условия их использования можно менять в зависимости от конкретного применения.

Любую пригодную платформу для анализа можно использовать для определения уровня мРНК в образце. Например, анализ можно проводить в форме погружаемых зондов, мембраны, чипа, диска, тест-полоски, фильтра, микросферы, предметного стекла, многолуночного планшета или оптического волокна. Система для анализа может иметь твердую подложку, к которой присоединена нуклеиновая кислота, соответствующая мРНК. Твердая подложка может содержать, например, пластик, силикон, металл, смолу, стекло, мембрану, частицу, преципитат, гель, полимер, оболочку, сферу, полисахарид, капилляр, пленку, планшет или предметное стекло. Компоненты для анализа можно получать и упаковывать вместе в форме набора для детекции мРНК.

Нуклеиновую кислоту можно метить, если желательно, для получения популяции меченных мРНК. Как правило, образец можно метить с использованием способов, хорошо известных в данной 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 с использованием флуоресцентной метки. Иллюстративные флуоресцентные красители включают, но без ограничения, ксантеновые красители, флуоресцеиновые красители, родаминовые красители, флуоресцеинизотиоцианат (FITC), 6-карбоксифлуоресцеин (FAM), 6-карбокسي-2',4',7',4,7-гексахлорфлуоресцеин (HEX), 6-карбокسي-4',5'-дихлор-2',7'-диметоксифлуоресцеин (JOE или J), N,N,N',N'-тетраметил-6-карбоксиродамин (TAMRA или T), 6-карбокسي-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; ку-марин, диэтиламинокумарин, умбеллиферон; бензимидазные красители, например, Hoechst 33258; фенантридиновые красители, например, Texas Red; этидиевые красители; акридиновые красители; карбазольные 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.

Гибридизацию можно проводить в подходящих условиях гибридизации, строгость которых можно менять, как желательно. Типичные условия являются подходящими для получения комплексов зонд/мишень на твердой поверхности между участниками комплементарного связывания, т.е. между рассматриваемыми связанными с поверхностью зондами и комплементарными мРНК в образце. В конкретных вариантах осуществления можно применять строгие условия гибридизации.

Гибридизацию, как правило, проводят в строгих условиях гибридизации. Стандартные способы гибридизации (например, в условиях, подходящих для обеспечения специфического связывания мРНК-мишеней 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, пригодных для гибридизации *in situ*, см. в Gall et al., *Meth. Enzymol.*, 21:470-480 (1981); и Angerer et al., in *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 полинуклеотидов, время гибридизации, строгость условий отмывки, и т.п., может зависеть от дизайна эксперимента, включая источник образца, природу связывающих средств, ожидаемую степень комплементарности и т.д., и их можно определять в качестве предмета экспериментов, общепринятых для специалистов в данной области. Специалисту в данной области ясно понятно, что альтернативные, но совместимые условия гибридизации и отмывки можно использовать для обеспечения условий сходной строгости.

После процедуры гибридизации мРНК связанные с поверхностью полинуклеотиды, как правило,

подвергают отмывке для удаления несвязанных нуклеиновых кислот. Отмывку можно проводить с использованием любого удобного способа отмывки, где условия отмывки, как правило, являются строгими, как описано выше. Затем гибридизацию мПНК-мишеней с зондами детектируют с использованием стандартных способов.

В некоторых вариантах осуществления представленные в настоящем документе способы включают определение уровня мПНК одного или более биомаркеров, выбранных из группы, состоящей из KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 и GZMM, с использованием одного из способов, описанных в настоящем документе или иным образом известных в данной области. В одном варианте осуществления способы включают определение уровня мПНК KIR2DS2 в образце от субъекта. В одном варианте осуществления способы включают определение уровня мПНК KIR2DL2 в образце от субъекта. В одном варианте осуществления способы включают определение уровня мПНК KIR2DS5 в образце от субъекта. В одном варианте осуществления способы включают определение уровня мПНК KIR2DL5 в образце от субъекта. В одном варианте осуществления способы включают определение уровня мПНК GZMM в образце от субъекта.

В некоторых вариантах осуществления уровень мПНК KIR2DL5 представляет собой общий уровень мПНК KIR2DL5A и KIR2DL5B. В некоторых вариантах осуществления уровень мПНК KIR2DL5 представляет собой уровень мПНК KIR2DL5A. В некоторых вариантах осуществления уровень мПНК KIR2DL5 представляет собой уровень мПНК KIR2DL5B.

В некоторых вариантах осуществления представленные в настоящем документе способы включают определение уровней мПНК двух или более биомаркеров, выбранных из группы, состоящей из KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 и GZMM. В некоторых вариантах осуществления способы включают определение уровней мПНК трех или более из этих биомаркеров. В некоторых вариантах осуществления способы включают определение уровней мПНК четырех или более из этих биомаркеров. В некоторых вариантах осуществления способы включают определение уровней мПНК всех пяти из этих биомаркеров.

В некоторых вариантах осуществления представленные в настоящем документе способы включают определение уровней мПНК KIR2DS2 и KIR2DL2 в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью, и расчет отношения уровня мПНК KIR2DS2 к уровню мПНК KIR2DL2 (отношения мПНК 2DS2/2DL2). В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают определение уровней мПНК KIR2DS5 и KIR2DL5 в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью и расчет отношения уровня мПНК KIR2DS5 к уровню мПНК KIR2DL5 (отношения мПНК 2DS5/2DL5 мПНК). В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают определение уровней мПНК KIR2DS2 и KIR2DL2 в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью, и уровней мПНК KIR2DS5 и KIR2DL5 в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью, и расчет как отношения мПНК 2DS2/2DL2, так и отношения мПНК 2DS5/2DL5.

В некоторых вариантах осуществления уровень мПНК одного или более биомаркеров, выбранных из группы, состоящей из KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 и GZMM, определяют посредством q ПЦР, RT-ПЦР, ПНК-секвенирования, анализа микромассивов, SAGE, способа MassARRAY или FISH. В некоторых вариантах осуществления, уровень мПНК одного или более биомаркеров, выбранных из группы, состоящей из KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 и GZMM, определяют посредством q ПЦР или RT-ПЦР.

В некоторых вариантах осуществления представленные в настоящем документе способы включают определение уровня белка одного или более биомаркеров, выбранных из группы, состоящей из KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 и GZMM. Уровень белка биомаркера можно детектировать посредством множества способов иммуногистохимии (ИНС) или других способов иммуноанализа.

Показано, что ИНС окрашивание срезов тканей является надежным способом оценки или детекции присутствия белков в образце. В способах иммуногистохимии используют антитело в качестве зонда и для визуализации клеточных антигенов *in situ*, как правило, посредством хромогенных или флуоресцентных способов. Таким образом, антитела или антисыворотки, предпочтительно поликлональные антисыворотки и наиболее предпочтительно моноклональные антитела, специфические для каждого маркера, используют для детекции экспрессии. Как более подробно обсуждают ниже, антитела можно детектировать 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 сочетании с меченым вторичным антителом, содержащим антисыворотки, поликлональные антисыворотки или моноклональное антитело, специфические для первичного антитела. Протоколы и наборы для иммуногистохимии хорошо известны в данной области и являются коммерчески доступными. Автоматизированные системы для подготовки предметных стекол и проведения ИНС являются коммерчески доступными. Система Ventana® BenchMark XT является примером такой автоматизированной системы.

Стандартные иммунологические способы и способы иммуноанализа можно обнаружить в Basic and Clinical Immunology (Stites & Terr eds., 7th ed. 1991). Кроме того, иммуноанализы можно проводить в любой из нескольких конфигураций, обширный обзор которых приведен в Enzyme Immunoassay (Maggio, ed., 1980); и Harlow & Lane, выше. Общий обзор иммуноанализов см. также в Methods

in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology, volume 37 (Asai, ed. 1993); Basic and Clinical Immunology (Stites & Ten, eds., 7th ed. 1991).

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

Доступно широкое множество способов иммуноанализа с использованием такого формата анализа, см., например, патенты США № 4016043, 4424279 и 4018653, полное содержание которых, таким образом, приведено в качестве ссылки. Они включают анализы одного участка и анализы двух участков, или "сэндвич"-анализы неконкурентных типов, так же как традиционные конкурентные анализы связывания. Эти анализы включают также непосредственное связывание меченого антитела с биомаркером-мишенью. Сэндвич-анализы являются общепринятыми анализами. Существует ряд вариантов способа сэндвич-анализа. Например, в типичном прямом анализе немеченое антитело иммобилизуют на твердом субстрате, и образец, подлежащий тестированию, приводят в контакт со связанной молекулой. После подходящего периода инкубации в течение периода времени, достаточного, чтобы позволить формирование комплекса антитело-антиген, затем второе антитело, специфическое к антигену, меченное репортерной молекулой, способной подавать поддающийся детекции сигнал, добавляют и инкубируют, обеспечивая время, достаточное для формирования другого комплекса антитело-антиген-меченое антитело. Любой не вступивший в реакцию материал отмывают и присутствие антигена определяют посредством наблюдения сигнала, образованного репортерной молекулой. Результаты либо могут являться качественными, по простому наблюдению видимого сигнала, либо их можно оценивать количественно посредством сравнения с контрольным образцом, содержащим известные количества биомаркера.

Варианты прямого анализа включают одновременный анализ, в котором как образец, так и меченое антитело добавляют одновременно к связанному антителу. Эти способы хорошо известны специалистам в данной области, включая любые незначительные изменения, как ясно очевидно. В типичном прямом сэндвич-анализе первое антитело, обладающее специфичностью для биомаркера, либо ковалентно, либо пассивно связывают с твердой поверхностью. Твердая поверхность может представлять собой стекло или полимер, где наиболее общепринятыми полимерами являются целлюлоза, полиакриламид, нейлон, полистирол, поливинилхлорид или полипропилен. Твердые подложки могут находиться в форме пробирок, бусин, дисков из микропланшетов или любой другой поверхности, пригодной для проведения иммуноанализа. Способы связывания хорошо известны в данной области и, как правило, состоят из перекрестно сшивающего ковалентного связывания или физической адсорбции, комплекс полимер-антитело промывают при подготовке для тестируемого образца. Аликвоту образца, подлежащего тестированию, затем добавляют к твердофазному комплексу и инкубируют в течение достаточного периода времени (например, 2-40 мин или в течение ночи, если это более удобно) и в подходящих условиях (например, от комнатной температуры до 40°C, например, между 25 и 32°C включительно), чтобы позволить связывание любой субъединицы, присутствующей в антителе. После периода инкубации твердую фазу с субъединицей антитела промывают, высушивают и инкубируют с вторым антителом, специфическим для части биомаркера. Второе антитело связано с репортерной молекулой, которую используют, чтобы показать связывание второго антитела с молекулярным маркером.

В некоторых вариантах осуществления проточную цитометрию (FACS) можно использовать для детекции уровня белка биомаркера. Поверхностные белки (такие как KIR) можно детектировать с использованием антител против специфических биомаркеров. Проточный цитометр детектирует и регистрирует интенсивность меченого флуорохромом антитела, которая показывает уровень экспрессии биомаркера. Нефлуоресцентные цитоплазматические белки можно также наблюдать посредством окрашивания пермеабилizованных клеток. Краситель может представлять собой либо флуоресцентное соединение, способное связываться с конкретными молекулами, либо меченное флуорохромом антитело для связывания с выбранной молекулой.

Альтернативный способ включает иммобилизацию биомаркер-мишеней в образце и затем подвешивание иммобилизованной мишени воздействию специфического антитела, которое может являться или не являться меченым репортерной молекулой. В зависимости от количества мишени и силы сигнала репортерной молекулы, связанную мишень можно подвергать детекции посредством прямого мечения с использованием антитела. Альтернативно второе меченое антитело, специфическое к первому антителу, подвергают воздействию комплекса мишень-первое антитело с формированием третичного комплекса мишень-первое антитело-второе антитело. Комплекс детектируют посредством сигнала, излучаемого меченой репортерной молекулой.

В случае ферментного иммуноанализа фермент конъюгируют с вторым антителом, как правило, посредством глутаральдегида или периодата. Как ясно понятно, однако, существует широкое множество различных способов конъюгации, легко доступных для специалиста в данной области. Общепринятые ферменты, включая пероксидазу хрена, оксидазу глюкозы, бета-галактозидазу и щелочную фосфатазу, и другие, обсуждают в настоящем документе. Субстраты, подлежащие использованию со специфическими ферментами, как правило, выбирают для получения, после гидролиза соответствующим ферментом, под-

дающегося детекции изменения окраски. Примеры пригодных ферментов включают щелочную фосфатазу и пероксидазу. Можно применять также флуорогенные субстраты, образующие флуоресцентный продукт, в отличие от хромогенных субстратов, указанных выше. Во всех случаях меченное ферментом антитело добавляют к комплексу антитело-молекулярный маркер, позволяют связываться и затем избыток реагента отмывают. Раствор, содержащий подходящий субстрат, затем добавляют к комплексу антитело-антиген-антитело. Субстрат может вступать в реакцию с ферментом, связанным с вторым антителом, образуя качественный визуальный сигнал, который можно далее подвергать количественной оценке, обычно спектрофотометрически, для получения показателя количества биомаркера, которое присутствовало в образце. Альтернативно флуоресцентные соединения, такие как флуоресцеин и родамин, можно химически присоединять к антителам без изменения их емкости связывания. При активации посредством освещения светом конкретной длины волны меченное флуорохромом антитело поглощает энергию света, индуцируя состояние возбудимости молекулы, с последующим излучением света характерного цвета, поддающегося визуальной детекции с использованием светового микроскопа. Как и для EIA, меченному флуоресцентной меткой антителу позволяют связываться с комплексом первое антитело-молекулярный маркер. После отмывки несвязавшегося реагента оставшийся третичный комплекс затем подвергают воздействию света подходящей длины волны, наблюдаемая флуоресценция показывает присутствие представляющего интерес молекулярного маркера. Способы иммунофлуоресценции и EIA оба очень хорошо разработаны в данной области, и их обсуждают в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления представленные в настоящем документе способы включают определение уровня белка одного или более биомаркеров, выбранных из группы, состоящей из KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 и GZMM, в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью с использованием одного из способов, описанных в настоящем документе или иным образом известных в данной области. В одном варианте осуществления способ включает определение уровня белка KIR2DS2 в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью. В одном варианте осуществления способы по настоящему изобретению включают определение уровня белка KIR2DL2 в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью. В одном варианте осуществления способ включает определение уровня белка KIR2DS5 в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью. В одном варианте осуществления способ включает определение уровня белка KIR2DL5 в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью. В одном варианте осуществления способ включает определение уровня белка GZMM в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью.

В некоторых вариантах осуществления уровень белка KIR2DL5 представляет собой суммарный уровень белков KIR2DL5A и KIR2DL5B. В некоторых вариантах осуществления уровень белка KIR2DL5 представляет собой уровень белка KIR2DL5A. В некоторых вариантах осуществления уровень белка KIR2DL5 представляет собой уровень белка KIR2DL5B.

В некоторых вариантах осуществления представленные в настоящем документе способы включают определение уровня белка для двух или более из этих биомаркеров. В некоторых вариантах осуществления способы включают определение уровней белка для трех или более из этих биомаркеров. В некоторых вариантах осуществления способы включают определение уровней белка для четырех или более из этих биомаркеров. В некоторых вариантах осуществления способы включают определение уровней белка для пяти из этих биомаркеров.

В некоторых вариантах осуществления представленные в настоящем документе способы дополнительно включают определение уровней белков KIR2DS2 и KIR2DL2 в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью и расчет отношения уровня белка KIR2DS2 к уровню белка KIR2DL2 (отношения белков 2DS2/2DL2). В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают определение уровней белков KIR2DS5 и KIR2DL5 в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью и расчет отношения уровня белка KIR2DS5 к уровню белка KIR2DL5 (отношения белков 2DS5/2DL5). В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают определение уровней белков KIR2DS2 и KIR2DL2 в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью, и уровней белков KIR2DS5 и KIR2DL5 в образце от субъекта или пациента с злокачественной опухолью, и расчет как отношения белков 2DS2/2DL2, так и отношения белков 2DS5/2DL5.

В некоторых вариантах осуществления уровень белка одного или более биомаркеров, выбранных из группы, состоящей из KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 и GZMM, определяют посредством иммуноблоттинга (Вестерн-блоттинга), ELISA, иммуногистохимии, проточной цитометрии, цитометрического анализа на бусинах или масс-спектропии. В некоторых вариантах осуществления уровень белка одного или более биомаркеров, выбранных из группы, состоящей из KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 и GZMM, определяют посредством ELISA.

3.3. Образцы.

В некоторых вариантах осуществления способы типирования KIR, типирования HLA или способы определения либо уровня мРНК, либо уровня белка одного или более биомаркеров, дополнительно включают получение образца от субъекта. Субъект может представлять собой млекопитающее, например человека. Субъект может представлять собой мужчину или женщину и может представлять собой взрослого, ребенка или новорожденного. Субъект может представлять собой пациента. Пациент может пред-

ставлять собой пациента с злокачественной опухолью. Образцы можно анализировать в период времени в ходе активной фазы злокачественной опухоли (например, лимфомы, MDS или лейкоза) или когда злокачественная опухоль является неактивной. В конкретных вариантах осуществления можно получать более одного образца от субъекта.

В некоторых вариантах осуществления способы типирования KIR, типирования HLA или способы определения либо уровня мРНК, либо уровня белка одного или более биомаркеров осуществляют в качестве сопутствующей диагностики для лечения FTI. Сопутствующую диагностику можно проводить в клиническом центре, в котором проводят лечение субъекта. Сопутствующую диагностику можно также проводить в центре, отличном от клинического центра, в котором проводят лечение субъекта.

В конкретных вариантах осуществления образец, используемый в представленных в настоящем документе способах, включает жидкости организма субъекта. Неограничивающие примеры жидкостей организма включают кровь (например, цельную периферическую кровь, периферическую кровь), плазму крови, костный мозг, амниотическую жидкость, внутриглазную жидкость, желчь, лимфу, менструальные выделения, сыворотку, мочу, спинномозговую жидкость, окружающую головной мозг и спинной мозг, синовиальную жидкость, окружающую суставы костей.

В одном варианте осуществления образец представляет собой образец костного мозга. Способы получения образцов костного мозга хорошо известны в данной области, включая, но без ограничения, биопсию костного мозга и аспирацию костного мозга. Костный мозг имеет жидкую часть и более твердую часть. При биопсии костного мозга отбирают образец твердой части. При аспирации костного мозга отбирают образец жидкой части. Биопсию костного мозга и аспирацию костного мозга можно выполнять в одно и то же время и обозначать как исследование костного мозга.

В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец крови. Образец крови можно получать с использованием общепринятых способов, как описано, например, в Innis et al., editors, PCR Protocols (Academic Press, 1990). Лейкоциты можно выделять из образцов крови с использованием общепринятых способов или коммерчески доступных наборов, например набора RosetteSep (Stein Cell Technologies, Vancouver, Canada). Субпопуляции лейкоцитов, например мононуклеарные клетки, клетки NK, В-клетки, Т-клетки, моноциты, гранулоциты или лимфоциты, можно далее выделять с использованием общепринятых способов, например активированной магнитным полем сортировки клеток (MACS) (Miltenyi Biotec, Auburn, California) или активированной флуоресценцией сортировки клеток (FACS) (Becton Dickinson, San Jose, California).

В одном варианте осуществления образец крови составляет от приблизительно 0,1 мл до приблизительно 10,0 мл, от приблизительно 0,2 мл до приблизительно 7 мл, от приблизительно 0,3 мл до приблизительно 5 мл, от приблизительно 0,4 мл до приблизительно 3,5 мл или от приблизительно 0,5 мл до приблизительно 3 мл. В другом варианте осуществления образец крови составляет приблизительно 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 или 10,0 мл.

В некоторых вариантах осуществления образец, используемый в настоящих способах, включает биоптат (например, биоптат опухоли). Биоптат может происходить из любого органа или ткани, например кожи, печени, легкого, сердца, ободочной кишки, почки, костного мозга, зубов, лимфатических узлов, волос, селезенки, головного мозга, молочных желез или других органов. Любой способ биопсии, известный специалистам в данной области, можно использовать для выделения образца от субъекта, например открытую биопсию, закрытую биопсию, толстоигольную биопсию, инцизионную биопсию, эксцизионную биопсию или биопсию тонкоигольной аспирацией.

В одном варианте осуществления образец, используемый в представленных в настоящем документе способах, получают от субъекта до подвергания субъекта лечению против заболевания или нарушения. В другом варианте осуществления образец получают от субъекта во время подвергания субъекта лечению против заболевания или нарушения. В другом варианте осуществления образец получают от субъекта после подвергания субъекта лечению против заболевания или нарушения. В различных вариантах осуществления лечение включает введение FTI субъекту.

В конкретных вариантах осуществления образец, используемый в представленных в настоящем документе способах, включает множество клеток. Такие клетки могут включать любой тип клеток, например стволовые клетки, клетки крови (например, PBMC), лимфоциты, клетки NK, В-клетки, Т-клетки, моноциты, гранулоциты, иммуноциты, или клетки опухолей, или клетки злокачественных опухолей. В конкретных вариантах осуществления образец, используемый в представленных в настоящем документе способах, включает множество обогащенных клеток NK из образца крови или образца костного мозга от субъекта или пациента с злокачественной опухолью. Специфические популяции клеток можно получать с использованием комбинации коммерчески доступных антител (например, Quest Diagnostic (San Juan Capistrano, Calif.); Dako (Denmark)).

В конкретных вариантах осуществления образец, используемый в представленных в настоящем документе способах, происходит из пораженной заболеванием ткани, например от индивидуума, имеющего злокачественную опухоль (например, лимфому, MDS или лейкоз). В некоторых вариантах осуществления клетки можно получать из клеток опухолей, или клеток злокачественных опухолей, или тканей опухолей, таких как биоптаты опухолей или эксплантаты опухолей. В конкретных вариантах осуществления

количество клеток, используемое в представленных в настоящем документе способах, может лежать в диапазоне от отдельной клетки до приблизительно 10^9 клеток. В некоторых вариантах осуществления количество клеток, используемое в представленных в настоящем документе способах, 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 .

Количество и тип клеток, собранных от субъекта, можно мониторируют, например, посредством измерения изменений морфологии и поверхностных маркеров клеток с использованием стандартных способов детекции клеток, таких как проточная цитометрия, сортировка клеток, иммуноцитохимия (например, окрашивание с использованием тканеспецифических или специфических для маркера клеток антител), активированная флуоресценцией сортировка клеток (FACS), активированная магнитным полем сортировка клеток (MACS), посредством проверки морфологии клеток с использованием световой или конфокальной микроскопии и/или посредством измерения изменений экспрессии генов с использованием способов, хорошо известных в данной области, таких как ПЦР и получение профилей экспрессии генов. Эти способы можно использовать также для идентификации клеток, положительных по одному или более конкретным маркерам. Активированная флуоресценцией сортировка клеток (FACS) представляет собой хорошо известный способ разделения частиц, включая клетки, на основании флуоресцентных свойств частиц (Kamarch, 1987, Methods Enzymol, 151:150-165). Лазерное возбуждение флуоресцентных групп в индивидуальных частицах приводит к небольшому электрическому заряду, позволяющему электромагнитное разделение положительных и отрицательных частиц из смеси. В одном варианте осуществления специфические для поверхностных маркеров клеток антитела или лиганды метят различными флуоресцентными метками. Клетки пропускают через сортировщик клеток, позволяя разделение клеток на основании их способности связывать используемые антитела. Отсортированные посредством FACS частицы можно помещать на хранение непосредственно в индивидуальные лунки 96-луночных или 384-луночных планшетов для облегчения разделения и клонирования.

В конкретных вариантах осуществления подгруппы клеток используют в представленных в настоящем документе способах. Способы сортировки и выделения специфических популяций клеток хорошо известны в данной области и могут быть основаны на размере, морфологии клеток, или внутриклеточных или внеклеточных маркерах. Такие способы включают, но без ограничения, проточную цитометрию, проточную сортировку, FACS, разделение на основе бусин, такое как магнитная сортировка клеток, разделение на основании размера (например, с использованием сита, ряда препятствий или фильтра), сортировку в микроструйном устройстве, разделение на основе антител, осаждение, аффинную адсорбцию, аффинную экстракцию, центрифугирование в градиенте плотности, лазерную захватывающую микродиссекцию и т.д. В некоторых вариантах осуществления образец включает обогащенные клетки NK, отсортированные посредством одного или более способов, описанных в настоящем документе, или иным образом известных в данной области. В одном варианте осуществления обогащенные клетки NK дополнительно размножают *in vitro* перед подверганием типированию KIR, типированию HLA или анализу уровня экспрессии одного или более биомаркеров, выбранных из группы, состоящей из KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 и GZMM.

Образец может представлять собой образец цельной крови, образец костного мозга, частично очищенный образец крови, PBMC или образец биопсии. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец костного мозга от пациента с злокачественной опухолью. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой PBMC от пациента с злокачественной опухолью. В некоторых вариантах осуществления образец является обогащенным клетками NK из костного мозга, цельной крови или частично очищенной крови. В некоторых вариантах осуществления клетки NK дополнительно размножают *in vitro*. Способы получения образца от субъекта и способы подготовки образца для определения либо уровня мПНК, либо уровня белка одного или более биомаркеров хорошо известны в данной области.

3.4. Эталонные уровни и эталонные отношения.

В настоящем документе представлены способы лечения субъекта с использованием терапевтически эффективного количества FTI или отбора пациента с злокачественной опухолью для лечения FTI, на основании типирования KIR, уровня экспрессии (либо уровня мПНК, либо уровня белка) одного или более из индивидуальных биомаркеров, выбранных из группы, состоящей из KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 и GZMM, или любого или обоих из отношения уровней экспрессии между биомаркерами (отношения 2DS2/2DL2; отношения 2DS5/2DL5). В некоторых вариантах осуществления пациента с злокачественной опухолью отбирают для лечения FTI, если пациент с злокачественной опухолью является носителем KIR2DS2, или KIR2DS5, или обоих. В некоторых вариантах осуществления пациента с злокачественной опухолью отбирают для лечения FTI, если

- (i) уровень экспрессии KIR2DS2 в образце от субъекта выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS2;
- (ii) уровень экспрессии KIR2DL2 в образце от субъекта ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL2;
- (iii) уровень экспрессии KIR2DS5 в образце от субъекта выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS5;

(iv) уровень экспрессии KIR2DL5 в образце от субъекта ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL5;

(v) уровень экспрессии GZMM в образце от субъекта выше, чем эталонный уровень экспрессии GZMM;

(vi) отношение уровня экспрессии KIR2DS2 к уровню экспрессии KIR2DL2 в образце от субъекта выше, чем эталонное отношение уровня экспрессии KIR2DS2 к уровню экспрессии KIR2DL2; или

(vii) отношение уровня экспрессии KIR2DS5 к уровню экспрессии KIR2DL5 в образце от субъекта выше, чем эталонное отношение уровня экспрессии KIR2DS5 к уровню экспрессии KIR2DL5;

или присутствует любая комбинация (i)-(vii).

Представленные в настоящем документе способы могут дополнительно включать определение эталонного уровня экспрессии каждого индивидуального биомаркера, выбранного из группы, состоящей из KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 и GZMM, или эталонного отношения между уровнями экспрессии биомаркеров, включая эталонное отношение 2DS2/2DL2 и эталонное отношение 2DS5/2DL5. В некоторых вариантах осуществления эталонный уровень экспрессии биомаркера представляет собой уровень экспрессии биомаркера в образце от здорового индивидуума, или средний, или медианный уровень экспрессии биомаркера во множестве образцов от одного или множества здоровых индивидуумов. В некоторых вариантах осуществления эталонный уровень экспрессии биомаркера представляет собой средний уровень экспрессии биомаркера в образцах от 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 или более здоровых индивидуумов. В некоторых вариантах осуществления эталонный уровень экспрессии биомаркера представляет собой медианный уровень экспрессии биомаркера в образцах от 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 или более здоровых индивидуумов.

В некоторых вариантах осуществления эталонный уровень экспрессии KIR2DS2 представляет собой уровень экспрессии KIR2DS2 в образце от здорового индивидуума, или средний, или медианный уровень экспрессии KIR2DS2 во множестве образцов от одного или множества здоровых индивидуумов. В некоторых вариантах осуществления эталонный уровень экспрессии KIR2DL2 представляет собой уровень экспрессии KIR2DL2 в образце от здорового индивидуума, или средний, или медианный уровень экспрессии KIR2DL2 во множестве образцов от одного или множества здоровых индивидуумов. В некоторых вариантах осуществления эталонный уровень экспрессии KIR2DS5 представляет собой уровень экспрессии KIR2DS5 в образце от здорового индивидуума, или средний, или медианный уровень экспрессии KIR2DS5 во множестве образцов от одного или множества здоровых индивидуумов. В некоторых вариантах осуществления эталонный уровень экспрессии KIR2DL5 представляет собой уровень экспрессии KIR2DL5 в образце от здорового индивидуума, или средний, или медианный уровень экспрессии KIR2DL5 во множестве образцов от одного или множества здоровых индивидуумов. В некоторых вариантах осуществления эталонный уровень экспрессии GZMM представляет собой уровень экспрессии GZMM в образце от здорового индивидуума, или средний, или медианный уровень экспрессии GZMM во множестве образцов от одного или множества здоровых индивидуумов.

В некоторых вариантах осуществления представленные в настоящем документе способы дополнительно включают определение эталонного отношения между уровнями экспрессии двух биомаркеров, такого как эталонное отношение экспрессии 2DS2/2DL2 или эталонное отношение экспрессии 2DS5/2DL5. В некоторых вариантах осуществления эталонное отношение экспрессии биомаркеров представляет собой отношение экспрессии биомаркеров в образце от здорового индивидуума, или среднее, или медианное отношение экспрессии биомаркеров во множестве образцов от одного или множества здоровых индивидуумов. В некоторых вариантах осуществления эталонное отношение экспрессии двух биомаркеров представляет собой среднее отношение экспрессии биомаркеров в образцах от 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 или более здоровых индивидуумов. В некоторых вариантах осуществления эталонное отношение экспрессии двух биомаркеров представляет собой медианное отношение экспрессии биомаркеров в образцах от 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 или более здоровых индивидуумов.

В некоторых вариантах осуществления эталонное отношение 2DS2/2DL2 представляет собой отношение 2DS2/2DL2 в образце от здорового индивидуума, или среднее, или медианное отношение 2DS2/2DL2 во множестве образцов от одного или множества здоровых индивидуумов. В некоторых вариантах осуществления эталонное отношение 2DS5/2DL5 представляет собой 2DS5/2DL5 в образце от здорового индивидуума, или среднее, или медианное 2DS5/2DL5 во множестве образцов от одного или множества здоровых индивидуумов.

В некоторых вариантах осуществления эталонный уровень экспрессии биомаркера или эталонное отношение между уровнями экспрессии двух биомаркеров можно определять на основании статистических данных из предшествующих клинических исследований, включая исход для группы пациентов, а именно способность пациентов отвечать на лечение FTI, так же как уровни экспрессии биомаркера или отношение уровней экспрессии между биомаркерами для группы пациентов. Ряд статистических способов хорошо известен в данной области для определения эталонного уровня (или обозначенного как "значение отсечения") одного или более биомаркеров при использовании для прогнозирования способности пациента отвечать на конкретное лечение или для стратификации пациентов для конкретного лечения.

Один способ по изобретению включает анализ профилей экспрессии генов для биомаркеров, иден-

тифицированных в настоящем документе, которые отличают отвечающих от не отвечающих, для определения эталонного уровня экспрессии для одного или более биомаркеров. Сравнение между отвечающими и не отвечающими можно проводить с использованием U-критерия Манна-Уитни, критерия хи-квадрат или точного критерия Фишера. Анализы описательной статистики и сравнения можно проводить с использованием программного обеспечения SigmaStat (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA).

В некоторых вариантах осуществления классификацию и анализ дерева регрессии (CART) можно принимать для определения эталонного уровня. Анализ CART основан на алгоритме бинарного рекурсивного расщепления и позволяет выявление комплексных взаимодействий прогностических переменных, которые могут не являются очевидными из более традиционных способов, таких как множественная линейная регрессия. Бинарное рекурсивное расщепление относится к анализу, который является: 1) бинарным, что означает наличие двух возможных переменных исхода, а именно "отвечающих" и "не отвечающих", с эффектом разделения пациентов на 2 группы; 2) рекурсивным, что означает, что анализ можно проводить множество раз; и 3) расщепляющим, что означает, что весь набор данных можно разделять на части. Этот анализ обладает также способностью исключать прогностические переменные с плохой эффективностью. Дерево классификации можно строить с использованием Salford Predictive Modeler v6.6 (Salford Systems, San Diego, CA, USA).

Изделиями по этому изобретению являются представления профилей экспрессии генов, которые можно использовать для прогнозирования способности пациента с злокачественной опухолью отвечать на лечение FTI, переведенные в среду, которую можно автоматически считывать, такую как машиночитаемые носители (магнитные, оптические и т.п.). Изделия могут включать также инструкции для оценки профилей экспрессии генов на таких средах. Например, изделия могут включать CD-ROM, содержащий компьютерные инструкции для сравнения профилей экспрессии генов биомаркеров, описанных выше. Изделия могут содержать также профили экспрессии генов, записанные на них в цифровой форме, так что их можно сравнивать с данными экспрессии генов для образцов от пациентов. Альтернативно профили можно записывать в различных форматах представления. Алгоритмы кластеризации, такие как алгоритмы, встроенные в компьютерные программы "OMNIVIZ" и "TREE VIEW", упомянутые выше, могут помочь визуализации.

Анализ рабочих характеристик приемника (ROC) можно использовать для определения эталонного уровня экспрессии или эталонного отношения экспрессии, или для тестирования общей прогностической ценности индивидуальных генов и/или мультигенных классификаторов. Обзор анализа ROC можно обнаружить в Soreide, J Clin Pathol 10,1136 (2008), полное содержание которого, таким образом, приведено в качестве ссылки.

Эталонный уровень можно определять по кривой ROC для обучающей выборки для обеспечения как высокой чувствительности, так и высокой специфичности. Для определения того, как много биомаркеров необходимо включать в прогноз, можно использовать перекрестную проверку с исключением (LOOCV). Регистрируют показатели ответа для "исключенных" образцов на основании различных количеств генов. Эффективность прогнозов с различным количеством генов можно оценивать на основании частоты ошибок из-за неправильной классификации, чувствительности, специфичности, значений p для измерения разделения кривых Каплана-Мейера для двух прогнозируемых групп.

Можно использовать алгоритм пар с наиболее высоким результатом (TSP), впервые введенный Ge-man et al. (2004). По существу, алгоритм ранжирует все пары генов (гены i и j) на основании абсолютного различия (D_{ij}) частоты события, когда ген i обладает большим уровнем экспрессии, чем ген j , в образцах среди классов C1-C2. В случаях наличия множества пар с наиболее высоким результатом (где все разделяют одно и то же D_{ij}), верхнюю пару выбирают по второму показателю рангов, измеряющего амплитуду, с которой происходит перестановка уровней экспрессии из одного класса в другой внутри пары генов. Верхнюю пару с наиболее высокой частотой абсолютного $D_{ij} > 2$ -кратного во всех образцах можно выбирать в качестве пары-кандидата. Затем пару-кандидата можно оценивать на независимой тестовой выборке данных. Перекрестную проверку с исключением (LOOCV) можно проводить на обучающей выборке данных для оценки эффективности алгоритма. Эффективность прогнозов можно оценивать на основании максимальной частоты ошибок из-за неправильной классификации. Все статистические анализы можно выполнять с использованием R (R Development Core Team, 2006).

Обзор способов и статистических инструментов, которые можно использовать для определения эталонного уровня, можно обнаружить в James Westgard, Ph.D., Basic Methods Validation, 3^d edition (2008), полное содержание которого, таким образом, приведено в качестве ссылки. Конкретные ссылки приведены на раздел 9 ("How is reportable range of a method determined") и раздел 15 ("How is a reference interval verified").

Клинически регистрируемый диапазон (CRR) представляет собой диапазон уровней аналита, который можно измерять посредством способа, позволяющий разведение, концентрирование или другую предварительную обработку образца, используемые для расширения диапазона непосредственного аналитического измерения. Как представлено в Basic Methods Validation от Dr. Westgard, эксперимент, подлежащий проведению, часто называют "экспериментом для определения линейности", хотя технически отсутствует требование, чтобы способ обеспечивал линейный ответ, если не используют калибровку по

двум точкам. Этот диапазон можно также обозначать как "линейный диапазон", "аналитический диапазон" или "рабочий диапазон" для способа.

Регистрируемый диапазон оценивают посредством проверки линейности графика. Эта проверка может включать построение вручную наилучшей прямой линии на протяжении линейной части точек, построение соединяющей точки линии через все точки, затем сравнения с наилучшей прямой линией, или подбор линии регрессии через точки в линейном диапазоне. Существуют более сложные статистические расчеты, рекомендованные в некоторых руководствах, таких как протокол EP-6 Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI), для оценки линейности аналитических способов. Однако является общепринятым, что регистрируемый диапазон можно адекватно определять посредством "визуальной" оценки, т.е. посредством построения вручную наилучшей прямой линии, соответствующей самым низким точкам в сериях. Институт клинических и лабораторных стандартов (CLSI) рекомендует по меньшей мере от минимум 4 до предпочтительно 5 различных уровней концентраций. Более 5 можно использовать, в частности если необходимо максимизировать верхний предел регистрируемого диапазона, но 5 уровней являются удобными и почти всегда достаточными.

Эталонный интервал, как правило, устанавливают, анализируя образцы, полученные от индивидуумов, соответствующим тщательно определенным критериям (эталонная группа образцов). В протоколах, таких как протоколы Экспертной группы по теории эталонных значений Международной федерации клинической химии (IFCC) и CLSI, описаны исчерпывающие систематические процессы, в которых используют тщательно отобранные группы образцов для установления эталонных интервалов. Эти протоколы, как правило, требуют минимум 120 эталонных индивидуумов для каждой группы (или подгруппы), которых необходимо охарактеризовать.

В одобренном CLSI руководстве C28-A2 описаны различные способы для лабораторий для проверки переноса установленных эталонных интервалов в индивидуальную лабораторию, включающие

1) интуитивное решение, где персонал лаборатории просто проводит обзор принятой информации и субъективно подтверждает, что эталонные интервалы являются приемлемыми для принимаемых лабораторией популяции пациентов и способов тестирования;

2) подтверждение для 20 образцов, где экспериментальную проверку проводят посредством сбора и анализа образцов от 20 индивидуумов, представляющих эталонную популяцию образцов;

3) оценку с использованием 60 образцов, где экспериментальную проверку проводят посредством сбора и анализа образцов от 60 индивидуумов, представляющих эталонную популяцию образцов, и фактический эталонный интервал определяют и сравнивают с заявленным или опубликованным интервалом с использованием статистической формулы, сравнивающей средние и стандартные отклонения двух популяций; и

4) расчет сравнительным способом, где можно доводить или корректировать заявленные или опубликованные эталонные интервалы на основании наблюдаемого методологического смещения и математической взаимосвязи между используемыми способами.

Специалисту в данной области понятно, что эталонные уровни экспрессии биомаркераов, описанные в настоящем документе, так же как эталонные отношения между двумя биомаркерами, можно определять посредством одного или более способов, как представлено в настоящем документе, или других способов, известных в данной области.

Соответственно в некоторых вариантах осуществления представленные в настоящем документе способы включают

a) определение эталонного уровня экспрессии биомаркера, выбранного из группы, состоящей из KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5, GZMM; и

b) введение терапевтически эффективного количества FTI пациенту с злокачественной опухолью, если

(i) уровень экспрессии KIR2DS2 в образце от пациента с злокачественной опухолью выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS2;

(ii) уровень экспрессии KIR2DL2 в образце от пациента с злокачественной опухолью ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL2;

(iii) уровень экспрессии KIR2DS5 в образце от пациента с злокачественной опухолью выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS5;

(iv) уровень экспрессии KIR2DL5 в образце от пациента с злокачественной опухолью ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL5; или

(v) уровень экспрессии GZMM в образце от пациента с злокачественной опухолью выше, чем эталонный уровень экспрессии GZMM;

или присутствует любая комбинация (i)-(v).

В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии KIR2DL5 представляет собой суммарные уровни экспрессии KIR2DL5A и KIR2DL5B. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии KIR2DL5 представляет собой уровень экспрессии KIR2DL5A. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии KIR2DL5 представляет собой уровень экспрессии KIR2DL5B.

Соответственно в некоторых вариантах осуществления представленные в настоящем документе

способы включают

а) определение эталонного уровня мРНК биомаркера, выбранного из группы, состоящей из KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5, GZMM; и

б) введение терапевтически эффективного количества FTI пациенту с злокачественной опухолью, если

(i) уровень мРНК KIR2DS2 в образце от пациента с злокачественной опухолью выше, чем эталонный уровень мРНК KIR2DS2;

(ii) уровень мРНК KIR2DL2 в образце от пациента с злокачественной опухолью ниже, чем эталонный уровень мРНК KIR2DL2;

(iii) уровень мРНК KIR2DS5 в образце от пациента с злокачественной опухолью выше, чем эталонный уровень мРНК KIR2DS5;

(iv) уровень мРНК KIR2DL5 в образце от пациента с злокачественной опухолью ниже, чем эталонный уровень мРНК KIR2DL5; или

(v) уровень мРНК GZMM в образце от пациента с злокачественной опухолью выше, чем эталонный уровень мРНК GZMM;

или присутствует любая комбинация (i)-(v).

В некоторых вариантах осуществления уровень мРНК KIR2DL5 представляет собой суммарные уровни мРНК KIR2DL5A и KIR2DL5B. В некоторых вариантах осуществления уровень мРНК KIR2DL5 представляет собой уровень мРНК KIR2DL5A. В некоторых вариантах осуществления уровень мРНК KIR2DL5 представляет собой уровень мРНК KIR2DL5B.

Соответственно в некоторых вариантах осуществления представленные в настоящем документе способы включают

а) определение эталонного уровня белка биомаркера, выбранного из группы, состоящей из KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5, GZMM; и

б) введение терапевтически эффективного количества FTI пациенту с злокачественной опухолью, если

(i) уровень белка KIR2DS2 в образце от пациента с злокачественной опухолью выше, чем эталонный уровень белка KIR2DS2;

(ii) уровень белка KIR2DL2 в образце от пациента с злокачественной опухолью ниже, чем эталонный уровень белка KIR2DL2;

(iii) уровень белка KIR2DS5 в образце от пациента с злокачественной опухолью выше, чем эталонный уровень белка KIR2DS5;

(iv) уровень белка KIR2DL5 в образце от пациента с злокачественной опухолью ниже, чем эталонный уровень белка KIR2DL5; или

(v) уровень белка GZMM в образце от пациента с злокачественной опухолью выше, чем эталонный уровень белка GZMM;

или присутствует любая комбинация (i)-(v).

В некоторых вариантах осуществления уровень белка KIR2DL5 представляет собой суммарные уровни белков KIR2DL5A и KIR2DL5B. В некоторых вариантах осуществления уровень белка KIR2DL5 представляет собой уровень белка KIR2DL5A. В некоторых вариантах осуществления уровень белка KIR2DL5 представляет собой уровень белка KIR2DL5B.

В некоторых вариантах осуществления представленные в настоящем документе способы включают

а) определение эталонного отношения 2DS2/2DL2 или эталонного отношения 2DS5/2DL5; и

б) введение терапевтически эффективного количества FTI пациенту с злокачественной опухолью, если

(i) отношение 2DS2/2DL2 в образце от пациента с злокачественной опухолью выше, чем эталонное отношение 2DS2/2DL2; или

(ii) отношение 2DS5/2DL5 в образце от пациента с злокачественной опухолью выше, чем эталонное отношение 2DS5/2DL5;

или присутствуют оба (i) и (ii).

В некоторых вариантах осуществления отношение 2DS2/2DL2 представляет собой отношение уровня мРНК KIR2DS2 к уровню мРНК KIR2DL2. В некоторых вариантах осуществления отношение 2DS2/2DL2 представляет собой отношение уровня белка KIR2DS2 к уровню белка KIR2DL2. В некоторых вариантах осуществления отношение 2DS5/2DL5 представляет собой отношение уровня мРНК KIR2DS5 к уровню мРНК KIR2DL5. В некоторых вариантах осуществления отношение 2DS5/2DL5 представляет собой отношение уровня белка KIR2DS5 к уровню белка KIR2DL5.

3.5. Злокачественные опухоли.

В настоящем документе представлены способы лечения злокачественной опухоли у субъекта с FTI, и способы отбора пациентов с злокачественными опухолями для лечения FTI. Злокачественная опухоль может представлять собой гематопозитическую злокачественную опухоль или солидную опухоль. В настоящем документе представлены также способы лечения предзлокачественного состояния у субъекта с использованием FTI и способы отбора пациентов с предзлокачественным состоянием для лечения FTI. В

некоторых вариантах осуществления FTI представляет собой типифарниб.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения гематопозитической злокачественной опухоли у субъекта с использованием FTI или отбора пациентов с злокачественными опухолями для лечения FTI. Гематологические злокачественные опухоли представляют собой злокачественные опухоли крови или костного мозга. Примеры гематологических (или гематогенных) злокачественных опухолей включают лейкозы, лимфому и миелодиспластический синдром (MDS).

Лейкоз относится к злокачественным неоплазиям кроветворных тканей. Различные формы лейкозов описаны, например, в патенте США № 7393862 и предварительной патентной заявке США № 60/380842, поданной 17 мая 2002 г., полное содержание которых приведено в настоящем документе в качестве ссылки. Хотя вирусы, как сообщают, вызывают несколько форм лейкоза у животных, причины лейкоза у человека в большой степени остаются неизвестными. The Merck Manual, 944-952 (17th ed. 1999). Трансформация до злокачественности, как правило, происходит в отдельной клетке за две или более стадии с последующей пролиферацией и клональной экспансией. При некоторых лейкозах, идентифицированы специфические хромосомные транслокации с соответствующей морфологией лейкозных клеток и конкретными клиническими признаками (например, транслокации 9 и 22 при хроническом миелоцитарном лейкозе, и 15 и 17 при остром промиелоцитарном лейкозе). Острые лейкозы преимущественно представляют собой недифференцированные популяции клеток, а хронические лейкозы - более зрелые формы клеток.

Острые лейкозы разделяют на лимфобластный (ALL) и нелимфобластный (ANLL) типы. The Merck Manual, 946-949 (17th ed. 1999). Их можно далее подразделять по их морфологическим и цитохимическим проявлениям в соответствии с Франко-Американо-Британской (FAB) классификацией или в соответствии с их типом и степенью дифференцировки. Применение специфических для B- и T-клеток и миелоидного антигена моноклональных антител лучше всего помогает классификации. ALL преимущественно представляет собой заболевание детского возраста, которое устанавливают по результатам лабораторных исследований и обследованию костного мозга. ANLL, известный также как острый миелогенный лейкоз или AML, возникает в любом возрасте и является более распространенным острым лейкозом у взрослых; он представляет собой форму, обычно ассоциированную с облучением в качестве этиологического фактора. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения пациентов с AML с использованием FTI или способы отбора пациентов для лечения FTI.

Стандартные способы лечения пациентов с AML обычно включают 2 фазы химиотерапии (химию): индукцию ремиссии (или индукция) и консолидацию (терапия после ремиссии). Целью первой части лечения (индукции ремиссии) является избавление от настолько большого количества лейкозных клеток, насколько возможно. Интенсивность лечения может зависеть от возраста и состояния здоровья индивидуума. Интенсивную химиотерапию часто проводят для людей в возрасте меньше 60 лет. Несколько более старшие пациенты с хорошим общим состоянием здоровья могут получать преимущество от сходного или немного менее интенсивного лечения. Людям, которые намного старше или имеют плохое общее состояние здоровья, не подходят интенсивные химиотерапевтические средства.

У более молодых пациентов, таких как пациенты младше 60 лет, индукция часто включает лечение с использованием 2 химиотерапевтических средств, цитарабина (ara-C) и антрациклинового лекарственного средства, такого как даунорубин (дауномицин) или идарубин. Иногда вводят также третье лекарственное средство, кладрибин (леустатин, 2-CdA). Химиотерапию обычно проводят в больнице и продолжают приблизительно неделю. В редких случаях, когда лейкоз распространяется на головной мозг или спинной мозг, можно проводить также химиотерапию спинномозговой жидкости (CSF). Радиотерапию также можно использовать.

Индукцию считают успешной, если достигнута ремиссия. Однако AML у некоторых пациентов может являться невосприимчивым к индукции. Пациентов, которые отвечают на индукцию, затем подвергают дальнейшему лечению, чтобы уничтожить оставшиеся лейкозные клетки и способствовать предотвращению рецидива, которое называют консолидацией. Для более молодых пациентов, основными вариантами консолидационной терапии являются: несколько циклов химиотерапии высокой дозой цитарабина (ara-C) (в некоторых случаях известной как HiDAC); трансплантация аллогенных (донорных) стволовых клеток; и трансплантация аутологичных стволовых клеток.

Хронические лейкозы описывают как являющиеся лимфоцитарными (CLL) или миелоцитарными (CML). The Merck Manual, 949-952 (17th ed. 1999). CLL характеризуется появлением зрелых лимфоцитов в крови, костном мозге и лимфоидных органах. Отличительным признаком CLL является стойкий абсолютный лимфоцитоз (>5000/мкл) и увеличение количества лимфоцитов в костном мозге. У большинства пациентов с CLL присутствует также клональная экспансия лимфоцитов с характеристиками B-клеток. CLL представляет собой заболевание среднего или старшего возраста. При CML характерным признаком является преобладание гранулоцитов на всех стадиях дифференцировки в крови, костном мозге, печени, селезенке и других органах. У пациента с проявлением симптомов при диагностике, общее количество лейкоцитов (WBC) обычно составляет приблизительно 200000/мкл, но может достигать 1000000/мкл. CML относительно просто диагностировать из-за присутствия филадельфийской хромосомы. Хорошо

известно, что стромальные клетки костного мозга поддерживают прогрессирование заболевания CLL и устойчивость к химиотерапии. Нарушение взаимодействий между клетками CLL и стромальными клетками является дополнительной мишенью химиотерапии CLL.

Кроме того, другие формы CLL включают пролимфоцитарный лейкоз (PLL), лейкоз больших гранулярных лимфоцитов (LGL), волосатоклеточный лейкоз (HCL). Клетки злокачественных опухолей при PLL являются сходными с нормальными клетками, называемыми пролимфоцитами - незрелыми формами В-лимфоцитов (В-PLL) или Т-лимфоцитов (Т-PLL). Как В-PLL, так и Т-PLL, проявляют тенденцию являться более агрессивными, чем обычный тип CLL. Злокачественные клетки при LGL являются крупными и обладают признаками либо Т-клеток, либо клеток NK. Большинство лейкозов LGL являются медленно растущими, однако небольшое количество являются более агрессивными. HCL представляет собой другую злокачественную опухоль лимфоцитов, проявляющую тенденцию к медленному прогрессированию и насчитывающую приблизительно 2% из всех лейкозов.

Злокачественные клетки относятся к типу В-лимфоцитов, но отличаются от злокачественных клеток, наблюдаемых при CLL.

Хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML) классифицируют как миелодиспластическую/миелопролиферативную неоплазию по классификации опухолей гематопозитической системы Всемирной организации здравоохранения от 2008 г. Пациенты с CMML имеют большое количество моноцитов в крови (по меньшей мере 1000 на мм^3). Два класса - миелодиспластический и миелопролиферативный - различают на основании уровня количества лейкоцитов (порог 13 г/л). Часто, количество моноцитов является намного большим, что приводит к тому, что общее количество лейкоцитов также становится очень высоким. Обычно аномальные клетки присутствуют в костном мозге, но количество бластных клеток составляет менее 20%. У приблизительно 15-30% пациентов с CMML процесс продолжается до развития острого миелоидного лейкоза. Диагностика CMML основана на комбинации морфологических, гистопатологических и хромосомных аномалий в костном мозге. По прогностической модели Мейо классифицировали пациентов с CMML на три группы риска на основании: увеличения абсолютного количества моноцитов, присутствия циркулирующих бластных клеток, гемоглобина $<10 \text{ г/дл}$ и тромбоцитов $<100 \times 10^9/\text{л}$. Медианная выживаемость составляла 32 месяца, 18,5 месяцев и 10 месяцев в группах низкого, промежуточного и высокого риска соответственно. По показателю Groupe Francophone (GFM) разделяли пациентов с CMML на три группы риска на основании: возраста $>65 \text{ лет}$, $\text{WBC} > 15 \times 10^9/\text{л}$, анемии, тромбоцитов $<100 \times 10^9/\text{л}$ и статуса мутаций ASXL1. После отслеживания с медианой 2,5 года, выживаемость лежала в диапазоне от не достигнутой в группе низкого риска до 14,4 месяцев в группе высокого риска.

Лимфома относится к злокачественным опухолям, происходящим из лимфатической системы. Лимфома характеризуется злокачественной неоплазией лимфоцитов - В-лимфоцитов (В-клеточная лимфома), Т лимфоцитов (Т-клеточная лимфома) и клеток естественных киллеров (лимфома клеток NK). Лимфома, как правило, начинается в лимфатических узлах или скоплениях лимфатической ткани в органах, включая, но без ограничения, желудок или кишечник. Лимфома может затрагивать костный мозг и кровь в некоторых случаях. Лимфома может распространяться от одного участка к другим частям организма.

Виды лечения различных форм лимфом описаны, например, в патенте США № 7468363, полное содержание которого приведено в настоящем документе в качестве ссылки. Такие лимфомы включают, но без ограничения, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, В-клеточную лимфому кожи, лимфому активированных В-клеток, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), лимфому из клеток мантийной зоны (MCL), фолликулярную лимфому (FL; включая, но без ограничения, FL степени I, FL степени II), лимфому из клеток центра фолликула, трансформированную лимфому, лимфоцитарную лимфому промежуточной степени дифференцировки, промежуточную лимфоцитарную лимфому (ILL), диффузную низкодифференцированную лимфоцитарную лимфому (PDL), центроцитарную лимфому, диффузную лимфому из мелких клеток с расщепленным ядром (DSCCL), периферические Т-клеточные лимфомы (PTCL), Т-клеточную лимфому кожи (CTCL) и лимфому из клеток мантийной зоны, и фолликулярную лимфому низкой степени злокачественности.

Неходжкинская лимфома (NHL) является пятой из наиболее распространенных злокачественных опухолей как у мужчин, так и у женщин, в Соединенных Штатах, по оценкам, с 63190 новых случаев и 18660 смертей в 2007 г. Jemal A, et al., CA Cancer J Clin 2007; 57(1):43-66. Вероятность развития NHL увеличивается с возрастом, и заболеваемость NHL у пожилых стабильно увеличивалась за последнее десятилетие, вызывая опасения относительно тенденции старения популяции США. Id. Clarke CA, et al., Cancer 2002; 94(7):2015-2023.

DLBCL насчитывает приблизительно одну треть из неходжкинских лимфом. В то время как некоторых пациентов с DLBCL излечивают с использованием традиционной химиотерапии, остальные умирают от этого заболевания. Противораковые лекарственные средства вызывают быстрое и стойкое истощение лимфоцитов, возможно, посредством прямой индукции апоптоза в зрелых Т- и В-клетках. См. K. Stahnke. et al., Blood 2001, 98:3066-3073. Показано, что абсолютное количество лимфоцитов (ALC) является прогностическим фактором при фолликулярной неходжкинской лимфоме, и недавние результаты

позволяют предполагать, что ALC при постановке диагноза является важным прогностическим фактором при DLBCL.

DLBCL можно разделять на отдельные молекулярные подтипы в соответствии с их паттернами профилей генов: DLBCL из подобных В-клеткам клеток герминативного центра (GCB-DLBCL), DLBCL из клеток, подобных активированным В-клеткам (ABC-DLBCL) и первичная медиастинальная В-клеточная лимфома (PMBL) или неклассифицированный тип. Эти подтипы характеризуются четко выраженными различиями в выживаемости, способности отвечать на химиотерапию и зависимости от пути передачи сигнала, в частности пути NF-κB. См. D. Kim et al., *Journal of Clinical Oncology*, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol. 25, No. 18S (June 20 Supplement), 2007: 8082. См. Bea S, et al., *Blood* 2005; 106: 3183-90; Ngo V.N. et al., *Nature* 2011; 470: 115-9. Такие различия побудили к поиску более эффективных и специфических для подтипов способов лечения DLBCL. В дополнение к разделению на категории острых и хронических, неоплазии, на основании клеток, дающих начало такому нарушению, разделяют также на категории клеток-предшественников или периферических клеток. См., например, публикацию патента США № 2008/0051379, полное содержание описания которой приведено в настоящем документе в качестве ссылки. Неоплазии клеток-предшественников включают ALL и лимфобластные лимфомы и возникают в лимфоцитах до их дифференцировки либо в Т-, либо в В-клетки. Неоплазии периферических клеток представляют собой неоплазии, возникающие в лимфоцитах, дифференцировавшихся либо в Т-, либо в В-клетки. Такие неоплазии периферических клеток включают, но без ограничения, В-клеточную CLL, В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, лимфоплазматическую лимфому, лимфому из клеток мантийной зоны, фолликулярную лимфому, экстранодальную В-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны лимфоидной ткани слизистых оболочек, нодальную лимфому маргинальной зоны, лимфому маргинальной зоны селезенки, волосатоклеточный лейкоз, плазмацитому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL) и лимфому Беркитта. В более, чем 95 процентах случаев CLL, клональная экспансия происходит в линии В-клеток. См. *Cancer: Principles & Practice of Oncology* (3rd Edition) (1989) (pp. 1843-1847). В менее чем 5% случаев CLL клетки опухолей обладают Т-клеточным фенотипом. Вне зависимости от этих классификаций, однако, патологическое нарушение нормального гемопоэза является отличительным признаком всех лейкозов.

PTCL состоит из группы редких и, как правило, агрессивных (быстро растущих) NHL, развивающихся из зрелых Т-клеток. PTCL совместно насчитывают приблизительно от 4 до 10% из всех случаев NHL, что соответствует ежегодной заболеваемости 2800-7200 пациентов в год в Соединенных Штатах. По некоторым оценкам заболеваемость PTCL значительно растет, и увеличенная заболеваемость может быть обусловлена стареющей популяцией. PTCL дополнительно классифицируют на различные подтипы, каждый из которых, как правило, рассматривают как отдельное заболевание, на основании их явных клинических различий. Большинство из этих подтипов являются редкими; тремя наиболее распространенными подтипами PTCL являются, без дополнительных уточнений, анапластическая крупноклеточная лимфома, или ALCL, и ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома, которые совместно насчитывают 70% из всех PTCL в Соединенных Штатах. ALCL может представлять собой кожную ALCL или системную ALCL.

Для большинства подтипов PTCL режим терапии первой линии, как правило, представляет собой комбинированную химиотерапию, такую как CHOP (циклофосфамид, доксорубин, винкристин, преднизон), EPOCH (этопозид, винкристин, доксорубин, циклофосфамид, преднизон) или другие режимы введения множества лекарственных средств. Пациентов, испытывающих рецидив или невосприимчивых к терапии первой линии, как правило, лечат с использованием гемцитабина в комбинации с другими химиотерапевтическими средствами, включая винорелбин (Навелбин®) и доксорубин (Доксил®), в режиме, называемом GND, или других режимах химиотерапии, таких как DHAP (дексаметазон, цитарабин, цисплатин) или ESHAP (этопозид, метилпреднизолон, цитарабин и цисплатин).

Поскольку большинство пациентов с PTCL могут испытывать рецидив, некоторые онкологи рекомендовали введение высокой дозы химиотерапевтических средств с последующей трансплантацией аутологичных стволовых клеток некоторым пациентам, имевшим хороший ответ на начальную химиотерапию. Недавно нецитотоксические лекарственные средства, одобренные для рецидивирующей или невосприимчивой PTCL, такие как пралатрексат (Фолотин®), ромидеписин (Истодакс®) и белинонат (Белоедакс®), ассоциировали с относительно низкой частотой объективных ответов (общая частота ответа, или ORR, 25-27%) и относительно короткой длительностью ответа (8,2-9,4 месяцев). Соответственно лечение рецидивирующей/невосприимчивой PTCL остается важной неудовлетворенной необходимостью для медицины.

Множественная миелома (ММ) представляет собой злокачественную опухоль плазматических клеток в костном мозге. В норме плазматические клетки продуцируют антитела и играют ключевую роль в иммунной функции. Однако неконтролируемый рост этих клеток приводит к боли и переломам в костях, анемии, инфекциям и другим осложнениям. Множественная миелома является второй из наиболее распространенных гематологических злокачественных новообразований, хотя точные причины множественной миеломы остаются неизвестными. Множественная миелома вызывает высокие уровни белков в

крови, моче и органах, включая, но без ограничения, М-белок и другие иммуноглобулины (антитела), альбумин, и бета-2-микроглобулин. М-белок, сокращение для моноклонального белка, известного также как парапротеин, является особенно аномальным белком, продуцируемым плазматическими клетками миеломы, и его можно обнаружить в крови или моче почти всех пациентов с множественной миеломой.

Связанные со скелетом симптомы, включая боль в костях, присутствуют среди наиболее клинически важных симптомов множественной миеломы. Злокачественные плазматические клетки высвобождают факторы, стимулирующие остеокласты (включая IL-1, IL-6 и TNF), которые вызывают вымывание кальция из костей, вызывающее литические поражения; гиперкальциемия представляет собой другой симптом. Факторы, стимулирующие остеокласты, также обозначаемые как цитокины, могут предотвращать апоптоз или гибель клеток миеломы. Пятьдесят процентов пациентов имеют поддающиеся радиологической детекции, связанные с миеломой очаги в скелете при постановке диагноза. Другие распространенные клинические симптомы множественной миеломы включают полиневропатию, анемию, повышенную вязкость крови, инфекции и почечную недостаточность.

Хорошо известно, что стромальные клетки костного мозга поддерживают прогрессирование и устойчивость к химиотерапии заболевания множественной миеломы. Нарушение взаимодействий между клетками множественной миеломы и стромальными клетками является дополнительной мишенью для химиотерапии множественной миеломы.

Миелодиспластический синдром (MDS) относится к неоднородной группе нарушений гематopoэтических стволовых клеток. MDS может характеризоваться увеличением в костном мозге количества клеток с нарушенной морфологией и созревaniem (дисмиелопоэзом), неэффективной продукцией клеток крови, или гемопоэзом, приводящим к уменьшенному количеству клеток крови, или цитопениям, и высоким риском прогрессирования до острого миелоидного лейкоза, возникающим в результате неэффективной продукции клеток крови. См. The Merck Manual 953 (17th ed. 1999) и List et al., 1990, J Clin. Oncol. 8:1424.

В качестве группы злокачественных новообразований гематopoэтических стволовых клеток со значительной заболеваемостью и смертностью MDS является высоко гетерогенным заболеванием, и тяжесть симптомов и прогрессирование заболевания может сильно меняться среди пациентов. Современным стандартным клиническим инструментом для оценки стратификации риска и вариантов лечения является модифицированная Международная прогностическая балльная система, или IPSS-R. IPSS-R разделяет пациентов на пять групп риска (очень низкий, низкий, промежуточный, высокий, очень высокий) на основании оценки цитогенетики, процента бластных клеток (недифференцированных клеток крови) в костном мозге, уровней гемоглобина и количества тромбоцитов и нейтрофилов. WHO предлагает также стратификацию пациентов с MDS по аномалии - делеции (5q).

В соответствии с ACS ежегодная заболеваемость MDS составляет приблизительно 13000 пациентов в Соединенных Штатах, большинство из которых имеют возраст 60 лет или старше. Оцененная распространенность составляет более 60000 пациентов в Соединенных Штатах. Приблизительно 75% пациентов попадают в категории очень низкого, низкого и промежуточного риска по IPSS-R или вместе являются известными как пациенты с MDS с более низким риском.

Начальное повреждение гематopoэтических стволовых клеток может возникать по таким причинам как, но без ограничения, цитотоксическая химиотерапия, радиация, вирус, воздействие химических веществ и генетическая предрасположенность. В костном мозге преобладает клональная мутация, супрессирующая здоровые стволовые клетки. На ранних стадиях MDS основной причиной цитопений является увеличение программируемой гибели клеток (апоптоза). По мере прогрессирования заболевания и перехода в лейкоз редко возникает мутация в гене, и пролиферация лейкозных клеток подавляет здоровый костный мозг. Течение заболевания отличается, где в некоторых случаях оно ведет себя как вялотекущее заболевание, и в других случаях оно ведет себя агрессивно с очень коротким клиническим течением заболевания, переходящим в острую форму лейкоза.

Международная группа гематологов, Франко-Американо-Британская (FAB) объединенная группа, классифицировала нарушения MDS на пять подгрупп, отличая их от AML. The Merck Manual 954 (17th ed. 1999); Bennett J. M., et al., Алл. Intern. Med. 1985 October, 103(4): 620-5; и Besa E. C, Med. Clin. North Am. 1992 May, 76(3):599-617. Лежащее в основе трехлинейное диспластическое изменение клеток костного мозга пациентов обнаружено во всех подтипах.

Существует две подгруппы невосприимчивой анемии, характеризующейся 5% или менее миелобластов в костном мозге: (1) невосприимчивая анемия (RA) и; (2) RA с кольцевидными сидеробластами (RARS), определяемая морфологически как имеющая 15% эритроидных клеток с аномальными кольцевидными сидеробластами, что отражает аномальное накопление железа в митохондриях. Обе имеют длительное клиническое течение и низкую встречаемость прогрессирования до острого лейкоза. Besa E. C, Med. Clin. North Am. 1992 May, 76(3): 599-617.

Существует две подгруппы невосприимчивой анемии с более чем пятью процентами миелобластов: (1) RA с избытком бластных клеток (RAEB), с определением 6-20% миелобластов, и (2) RAEB в стадии трансформации (RAEB-T), с 21-30% миелобластов. Чем выше процент миелобластов, тем короче клиническое течение и тем ближе заболевание к острому миелогенному лейкозу. Переход пациентов от ранних

к более поздним стадиям указывает на то, что эти подтипы представляют собой просто стадии заболевания, а не отдельные единицы. Пожилых пациентов с MDS с трехлинейной дисплазией и с более чем 30% миелобластов, с прогрессированием до острого лейкоза, часто считают обладающими плохим прогнозом, поскольку частота их ответа на химиотерапию ниже, чем у пациентов с острым миелоидным лейкозом *de novo*. Пятым типом MDS, наиболее трудным для классификации, является CMML. Этот подтип может обладать любым процентом миелобластов, но проявляется моноцитозом 1000/дл или более. Он может являться ассоциированным с спленомегалией. Этот подтип перекрывается с миелопролиферативным нарушением и может иметь промежуточное клиническое течение. Он отличается от классического CML тем, что отрицательно характеризуется по Ph хромосоме.

MDS является в первую очередь заболеванием пожилых людей, с медианным началом в седьмом десятилетии жизни. Медианный возраст этих пациентов составляет 65 лет, где возраст лежит в диапазоне от начала третьего десятилетия жизни до такого пожилого возраста, как 80 лет или старше. Синдром может возникать в любой возрастной группе, включая пациентов детского возраста. Пациенты, пережившие лечение злокачественных новообразований с использованием алкилирующих средств, в присутствии или в отсутствие радиотерапии, обладают высокой частотой случаев развития MDS или вторичного острого лейкоза. Приблизительно 60-70% пациентов не имеют очевидного воздействия или причины, вызывающих MDS, и их классифицируют как пациентов с первичным MDS.

Лечение MDS основано на стадии и механизме заболевания, где преобладает конкретная фаза процесса развития заболевания. Трансплантацию костного мозга используют для пациентов с плохим прогнозом или MDS на поздних стадиях. Epstein and Sleasne, 1985, Surg. Ann. 17:125. Альтернативным способом терапии MDS является применение гематопозитических факторов роста или цитокинов для стимуляции развития клеток крови у реципиента. Dexter, 1987, J. Cell Sci. 88:1; Moore, 1991, Annu. Rev. Immunol. 9:159; и Besa E. C, Med. Clin. North Am. 1992 May, 76(3):599-617. Лечение MDS с использованием иммуномодулирующих соединений описано в патенте США № 7189740, полное содержание которого, таким образом, приведено в качестве ссылки.

Возможные способы терапии попадают в три категории, включая поддерживающую терапию, терапию низкой интенсивности и высокой интенсивности. Поддерживающая терапия включает применение трансфузий эритроцитов и тромбоцитов, и гематопозитические цитокины, такие как стимулирующие эритропоэз средства или колониестимулирующие факторы, для улучшения количества форменных элементов крови. Виды терапии низкой интенсивности включают гипометилирующие средства, такие как азацитидин (Видаза®) и децитабин (Дакоген®), модификаторы биологического ответа, такие как леналидомид (Ревлид®), и иммуносупрессивные лекарственные средства, такие как циклоспорин А или анти-тимоцитарный глобулин. Виды терапии высокой интенсивности включают химиотерапевтические средства, такие как идарубин, азацитидин, флударабин и топотекан, и трансплантацию гематопозитических стволовых клеток, или HSCT.

В руководствах Национальной комплексной онкологической сети США, или NCCN, рекомендовано подвергать пациентов с более низким риском (группы IPSS-R очень низкого, низкого, промежуточного риска) поддерживающей терапии или терапии низкой интенсивности с главной терапевтической целью улучшения гематологических показателей или Ht. В руководствах NCCN рекомендовано подвергать пациентов с более высоким риском (группы IPSS-R высокого, очень высокого риска) более агрессивному лечению с использованием терапии высокой интенсивности. В некоторых случаях пациенты с высоким риском являются неспособными перенести химиотерапию, и можно выбирать режимы с более низкой интенсивностью. Несмотря на доступные в настоящее время способы лечения, для значительной части пациентов с MDS отсутствуют эффективные способы терапии, и в руководствах NCCN рекомендованы клинические исследования в качестве дополнительных терапевтических возможностей. Лечение MDS остается важной неудовлетворенной необходимостью, требующей разработки новых способов терапии.

Соответственно в некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения гематопозитической злокачественной опухоли у субъекта с использованием FTI, или отбора пациента с гематопозитической злокачественной опухолью для лечения FTI, где пациент с гематопозитической злокачественной опухолью является носителем KIR2DS2, или носителем KIR2DS5, или того и другого; или где

- (i) уровень экспрессии KIR2DS2 в образце от пациента с гематопозитической злокачественной опухолью выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS2;
- (ii) уровень экспрессии KIR2DL2 в образце от пациента с гематопозитической злокачественной опухолью ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL2;
- (iii) уровень экспрессии KIR2DS5 в образце от пациента с гематопозитической злокачественной опухолью выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS5;
- (iv) уровень экспрессии KIR2DL5 в образце от пациента с гематопозитической злокачественной опухолью ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL5;
- (v) уровень экспрессии GZMM в образце от пациента с гематопозитической злокачественной опухолью выше, чем эталонный уровень экспрессии GZMM;

(vi) отношение уровня экспрессии KIR2DS2 к уровню экспрессии KIR2DL2 в образце от пациента с гематопэтической злокачественной опухолью выше, чем эталонное отношение уровня экспрессии KIR2DS2 к уровню экспрессии KIR2DL2; или

(vii) отношение уровня экспрессии KIR2DS5 к уровню экспрессии KIR2DL5 в образце от пациента с гематопэтической злокачественной опухолью выше, чем эталонное отношение уровня экспрессии KIR2DS5 к уровню экспрессии KIR2DL5;

или присутствует любая комбинация (i)-(vii).

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения гематопэтической злокачественной опухоли у субъекта с использованием FTI или отбора пациента с гематопэтической злокачественной опухолью для лечения FTI. Гематологические злокачественные опухоли включают лейкозы, включая острые лейкозы (такие как острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, острый миелогенный лейкоз и миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный и эритролейкоз), хронические лейкозы (такие как хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз и хронический лимфоцитарный лейкоз), хронический миеломоноцитарный лейкоз, ювенильный миеломоноцитарный лейкоз, истинную полицитемию, лейкоз клеток NK, лимфому, лимфому клеток NK, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому (вялотекущую и высоко злокачественную формы), множественную миелому, периферические Т-клеточные лимфомы, Т-клеточную лимфому кожи, макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей, миелодиспластический синдром, агногенную миелоидную метаплазию, семейный эритрофагоцитарный лимфогистиоцитоз, волосатоклеточный лейкоз и миелодисплазию.

В некоторых вариантах осуществления гематопэтическая злокачественная опухоль, подлежащая лечению представленными в настоящем документе способами, может представлять собой AML, MDS, CMML, лимфому клеток NK, лейкоз клеток NK, CTCL, PTCL, CML. В некоторых вариантах осуществления гематопэтическая злокачественная опухоль представляет собой AML. В некоторых вариантах осуществления гематопэтическая злокачественная опухоль представляет собой MDS. В некоторых вариантах осуществления MDS представляет собой MDS с более низким риском. В некоторых вариантах осуществления гематопэтическая злокачественная опухоль представляет собой CMML. CMML может представлять собой CMML с низким риском, CMML с промежуточным риском или CMML с высоким риском. CMML может представлять собой миелодиспластический CMML или миелопролиферативный CMML. В некоторых вариантах осуществления CMML представляет собой CMML с NRAS/KRAS дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, гематопэтическая злокачественная опухоль представляет собой лимфому NK. В некоторых вариантах осуществления гематопэтическая злокачественная опухоль представляет собой лейкоз NK. В некоторых вариантах осуществления гематопэтическая злокачественная опухоль представляет собой CTCL. В некоторых вариантах осуществления гематопэтическая злокачественная опухоль представляет собой PTCL. В некоторых вариантах осуществления PTCL является невосприимчивой или рецидивирующей PTCL.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения MDS у субъекта с использованием FTI, или отбора пациента с MDS для лечения FTI, где пациент с MDS является носителем KIR2DS2, KIR2DS5 или HLA-C2, или любой их комбинации; или где

(i) уровень экспрессии KIR2DS2 в образце от пациента с MDS выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS2;

(ii) уровень экспрессии KIR2DL2 в образце от пациента с MDS ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL2;

(iii) уровень экспрессии KIR2DS5 в образце от пациента с MDS выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS5;

(iv) уровень экспрессии KIR2DL5 в образце от пациента с MDS ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL5;

(v) уровень экспрессии GZMM в образце от пациента с MDS выше, чем эталонный уровень экспрессии GZMM;

(vi) отношение уровня экспрессии KIR2DS2 к уровню экспрессии KIR2DL2 в образце от пациента с MDS выше, чем эталонное отношение уровня экспрессии KIR2DS2 к уровню экспрессии KIR2DL2; или

(vii) отношение уровня экспрессии KIR2DS5 к уровню экспрессии KIR2DL5 в образце от пациента с MDS выше, чем эталонное отношение уровня экспрессии KIR2DS5 к уровню экспрессии KIR2DL5;

или присутствует любая комбинация этого.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения MDS с более низким риском у субъекта с использованием FTI, или отбора пациента с MDS с более низким риском для лечения FTI, где пациент с MDS с более низким риском является носителем KIR2DS2, KIR2DS5 или HLA-C2, или любой их комбинации; или где

(i) уровень экспрессии KIR2DS2 в образце от пациента с MDS выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS2;

(ii) уровень экспрессии KIR2DL2 в образце от пациента с MDS ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL2;

(iii) уровень экспрессии KIR2DS5 в образце от пациента с MDS выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS5;

(iv) уровень экспрессии KIR2DL5 в образце от пациента с MDS ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL5;

(v) уровень экспрессии GZMM в образце от пациента с MDS выше, чем эталонный уровень экспрессии GZMM;

(vi) отношение уровня экспрессии KIR2DS2 к уровню экспрессии KIR2DL2 в образце от пациента с MDS с более низким риском выше, чем эталонное отношение уровня экспрессии KIR2DS2 к уровню экспрессии KIR2DL2; или

(vii) отношение уровня экспрессии KIR2DS5 к уровню экспрессии KIR2DL5 в образце от пациента с MDS с более низким риском выше, чем эталонное отношение уровня экспрессии KIR2DS5 к уровню экспрессии KIR2DL5;

или присутствует любая комбинация этого.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения AML у субъекта с использованием FTI, или отбора пациента с AML для лечения FTI, где пациент с AML является носителем KIR2DS2, KIR2DS5, или HLA-C2, или любой их комбинации; или где

(i) уровень экспрессии KIR2DS2 в образце от пациента с AML выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS2;

(ii) уровень экспрессии KIR2DL2 в образце от пациента с AML ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL2;

(iii) уровень экспрессии KIR2DS5 в образце от пациента с AML выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS5;

(iv) уровень экспрессии KIR2DL5 в образце от пациента с AML ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL5;

(v) уровень экспрессии GZMM в образце от пациента с AML выше, чем эталонный уровень экспрессии GZMM;

(vi) отношение уровня экспрессии KIR2DS2 к уровню экспрессии KIR2DL2 в образце от пациента с AML выше, чем эталонное отношение уровня экспрессии KIR2DS2 к уровню экспрессии KIR2DL2; или

(vii) отношение уровня экспрессии KIR2DS5 к уровню экспрессии KIR2DL5 в образце от пациента с AML выше, чем эталонное отношение уровня экспрессии KIR2DS5 к уровню экспрессии KIR2DL5;

или присутствует любая комбинация этого.

В некоторых вариантах осуществления пациент с AML представляет собой пациента после индукции ремиссии. В некоторых вариантах осуществления пациент с AML представляет собой пациента после трансплантации. В некоторых вариантах осуществления пациент с AML имеет возраст более 60 лет или по иным причинам не подходит для индукции ремиссии. В некоторых вариантах осуществления пациент с AML имеет возраст более 65, 70 или 75. В некоторых вариантах осуществления пациент с AML является невосприимчивым к стандартной химиотерапии. В некоторых вариантах осуществления пациент с AML представляет собой пациента с рецидивом.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения солидной опухоли.

Солидные опухоли представляют собой аномальные массы ткани, которые обычно не содержат цист или жидких областей. Солидные опухоли могут являться доброкачественными или злокачественными. Различные типы солидных опухолей названы по типу клеток, которые их формируют (такие как саркомы, карциномы и лимфомы). Солидные опухоли, подлежащие лечению способами по изобретению, могут представлять собой саркомы и карциномы, включая фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеосаркому и другие саркомы, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, карциному ободочной кишки, злокачественные новообразования лимфоидной ткани, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак легкого, рак яичника, рак предстательной железы, печеночно-клеточную карциному, плоскоклеточную карциному, базально-клеточную карциному, аденокарциному, карциному потовых желез, медуллярную карциному щитовидной железы, папиллярную карциному щитовидной железы, феохромоцитому, карциному слюнной железы, папиллярную карциному, папиллярные аденокарциномы, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, почечно-клеточный рак, гепатому, карциномы желчных протоков, хориокарциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, опухоль яичка, семиному, карциному мочевого пузыря, меланому и опухоли ЦНС (такие как глиома (такая как глиома ствола головного мозга и смешанные глиомы), глиобластома (также известная как мультиформная глиобластома) астроцитомы, лимфома ЦНС, герминома, медуллобластома, Шваннома, краниофарингиома, эпендимома, пинеалома, гемангиобластома, невринома слухового нерва, олигодендроглиома, менингиома, нейробластома, ретинобластома и метастазы в головном мозге).

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения солидной опухоли, где солидная опухоль представляет собой злокачественную меланому, карциному надпочечников, карциному молочной железы, почечно-клеточный рак, карциному поджелудочной железы, немелкоклеточную карциному легкого (NSCLC) или карциному с неизвестной первичной локализацией.

Лекарственные средства, обычно вводимые пациентам с различными типами или стадиями солидных опухолей, включают, но без ограничения, цефалекс, этопозид, циклофосфамид, доцетаксел, апецитабин, IFN, тамоксифен, IL-2, GM-CSF или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль, подлежащая лечению представленными в настоящем документе способами, может представлять собой рак щитовидной железы, рак головы и шеи, уротелиальный рак, злокачественные опухоли слюнных желез, злокачественные опухоли верхних отделов желудочно-кишечного тракта, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак яичника, злокачественную опухоль мозга, рак желудка, рак предстательной железы, рак легкого, рак толстого кишечника, рак кожи, рак печени и рак поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак мочевого пузыря, подлежащий лечению представленными в настоящем документе способами, может представлять собой переходноклеточную карциному.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль, подлежащая лечению представленными в настоящем документе способами, может быть выбрана из группы, состоящей из карциномы, меланомы, саркомы или хронической гранулематозной болезни.

В некоторых вариантах осуществления предзлокачественные состояния, подлежащие лечению представленными в настоящем документе способами, могут представлять собой актинический хейлит, пищевод Барретта, атрофический гастрит, протоковую карциному *in situ*, врожденный дискератоз, сидеропеническую дисфагию, красный плоский лишай, подслизистый фиброз полости рта, солнечный эластоз, цервикальную дисплазию, полипы, лейкоплакию, эритроплакию, плоскоклеточное интраэпителиальное поражение, предзлокачественное нарушение или предзлокачественное иммунопролиферативное нарушение.

3.6. Иллюстративные FTI и дозы.

В некоторых вариантах осуществления способы лечения злокачественной опухоли у субъекта включают типирование KIR у субъекта и введение терапевтически эффективного количества типифарниба субъекту, где субъект является носителем KIR2DS2 или KIR2DS5, или носителем как KIR2DS2, так и KIR2DS5. В некоторых вариантах осуществления субъект является также носителем HLA-C2. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение субъекту другого FTI, описанного в настоящем документе или иным образом известного в данной области. В некоторых вариантах осуществления FTI выбран из группы, состоящей из типифарниба, арглабина, периллового спирта, лонафарниба (SCH-66336), L778123, L739749, FTI-277, L744832, CP-609,754, R208176, AZD3409 и BMS-214662.

В некоторых вариантах осуществления способ лечения злокачественной опухоли у субъекта включает определение уровня экспрессии биомаркера в образце от субъекта, где биомаркер выбран из группы, состоящей из KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 и GZMM, и введение терапевтически эффективного количества типифарниба субъекту, где

- (i) уровень экспрессии KIR2DS2 в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS2;
- (ii) уровень экспрессии KIR2DL2 в образце ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL2;
- (iii) уровень экспрессии KIR2DS5 в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS5;
- (iv) уровень экспрессии KIR2DL5 в образце ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL5;

или

- (v) уровень экспрессии GZMM в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии GZMM;
- или присутствует любая комбинация (i)-(v).

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

Кроме того, способ лечения злокачественной опухоли у субъекта включает определение уровней экспрессии KIR2DS2 и KIR2DL2 или KIR2DS5 и KIR2DL5 в образце от субъекта и введение терапевтически эффективного количества типифарниба субъекту, где

- (i) отношение 2DS2/2DL2 в образце выше, чем эталонное отношение 2DS2/2DL2; или
 - (ii) отношение 2DS5/2DL5 в образце выше, чем эталонное отношение 2DS5/2DL5;
- или присутствуют оба (i) и (ii).

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

В некоторых вариантах осуществления способ лечения гематологической злокачественной опухоли у субъекта включает типирование KIR у субъекта и введение терапевтически эффективного количества типифарниба субъекту, где субъект является носителем KIR2DS2, или KIR2DS5, или носителем как KIR2DS2, так и KIR2DS5. В некоторых вариантах осуществления субъект является также носителем HLA-C2. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение субъекту другого FTI, опи-

санного в настоящем документе или иным образом известного в данной области. В некоторых вариантах осуществления FTI выбран из группы, состоящей из типифарниба, арглабина, периллового спирта, лонафарниба (SCH-66336), L778123, L739749, FTI-277, L744832, CP-609,754, R208176, AZD3409, и BMS-214662.

В некоторых вариантах осуществления способ лечения гематологической злокачественной опухоли у субъекта включает определение уровня экспрессии биомаркера в образце от субъекта, где биомаркер выбран из группы, состоящей из KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 и GZMM, и введение терапевтически эффективного количества типифарниба субъекту, где

- (i) уровень экспрессии KIR2DS2 в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS2;
- (ii) уровень экспрессии KIR2DL2 в образце ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL2;
- (iii) уровень экспрессии KIR2DS5 в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS5;
- (iv) уровень экспрессии KIR2DL5 в образце ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL5;

или

- (v) уровень экспрессии GZMM в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии GZMM;
- или присутствует любая комбинация (i)-(v).

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

В некоторых вариантах осуществления способ лечения гематологической злокачественной опухоли у субъекта включает определение уровней экспрессии KIR2DS2 и KIR2DL2 или KIR2DS5 и KIR2DL5 в образце от субъекта, и введение терапевтически эффективного количества типифарниба субъекту, где

- (i) отношение 2DS2/2DL2 в образце выше, чем эталонное отношение 2DS2/2DL2; или
- (ii) отношение 2DS5/2DL5 в образце выше, чем эталонное отношение 2DS5/2DL5;

или присутствуют оба (i) и (ii).

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

В некоторых вариантах осуществления способ лечения MDS с более низким риском у субъекта включает типирование KIR у субъекта и введение терапевтически эффективного количества типифарниба субъекту, где субъект является носителем KIR2DS2, или KIR2DS5, или носителем как KIR2DS2, так и KIR2DS5. В некоторых вариантах осуществления субъект является также носителем HLA-C2. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение субъекту другого FTI, описанного в настоящем документе или иным образом известного в данной области. В некоторых вариантах осуществления FTI выбран из группы, состоящей из типифарниба, арглабина, периллового спирта, лонафарниба (SCH-66336), L778123, L739749, FTI-277, L744832, CP-609,754, R208176, AZD3409, и BMS-214662.

В некоторых вариантах осуществления способ лечения MDS с более низким риском у субъекта включает определение уровня экспрессии биомаркера в образце от субъекта, где биомаркер выбран из группы, состоящей из KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 и GZMM, и введение терапевтически эффективного количества типифарниба субъекту, где

- (i) уровень экспрессии KIR2DS2 в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS2;
- (ii) уровень экспрессии KIR2DL2 в образце ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL2;
- (iii) уровень экспрессии KIR2DS5 в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS5;
- (iv) уровень экспрессии KIR2DL5 в образце ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL5;

или

- (v) уровень экспрессии GZMM в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии GZMM;
- или присутствует любая комбинация (i)-(v).

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

Кроме того, способ лечения MDS с более низким риском у субъекта включает определение уровней экспрессии KIR2DS2 и KIR2DL2 или KIR2DS5 и KIR2DL5 в образце от субъекта и введение терапевтически эффективного количества типифарниба субъекту, где

- (i) отношение 2DS2/2DL2 в образце выше, чем эталонное отношение 2DS2/2DL2; или
 - (ii) отношение 2DS5/2DL5 в образце выше, чем эталонное отношение 2DS5/2DL5; или
- присутствуют оба (i) и (ii).

В некоторых вариантах осуществления способы включают введение субъекту другого FTI, описан-

ного в настоящем документе или иным образом известного в данной области. В некоторых вариантах осуществления FTI выбран из группы, состоящей из типифарниба, арглабина, периллового спирта, лонафарниба (SCH-66336), L778123, L739749, FTI-277, L744832, CP-609,754, R208176, AZD3409, и BMS-214662.

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.

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.

В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в циклах лечения. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в чередующиеся недели. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят на сутки 1-7 и 15-21 из 28-суточных циклов лечения. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят перорально в дозе 900 мг дважды в сутки на сутки 1-7 и 15-21 из 28-суточных циклов лечения.

В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят в циклах лечения. В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят в чередующиеся недели. В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят на сутки 1-7 и 15-21 из 28-суточных циклов лечения. В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят перорально в дозе 900 мг дважды в сутки на сутки 1-7 и 15-21 из 28-суточных циклов лечения.

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 вплоть до 12 циклов. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят перорально в дозе 900 мг дважды в сутки на сутки 1-7 и 15-21 из 28-суточных циклов 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 вплоть до 12 циклов. В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят перорально в дозе 900 мг дважды в сутки на сутки 1-7 и 15-21 из 28-суточных циклов лечения в течение по меньшей мере трех циклов.

В некоторых вариантах осуществления способ лечения MDS с более низким риском у субъекта включает типирование KIR у субъекта и введение типифарниба субъекту, где субъект является носителем KIR2DS2 или KIR2DS5, или носителем как KIR2DS2, так и KIR2DS5, и где типифарниб вводят перорально в дозе 900 мг дважды в сутки на сутки 1-7 и 15-21 из 28-суточных циклов лечения. В некоторых вариантах осуществления субъект является также носителем HLA-C2.

В некоторых вариантах осуществления способ лечения MDS с более низким риском у субъекта включает определение уровня экспрессии биомаркера в образце от субъекта, где биомаркер выбран из группы, состоящей из KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 и GZMM, и введение типифарниба субъекту, где

- (i) уровень экспрессии KIR2DS2 в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS2;
- (ii) уровень экспрессии KIR2DL2 в образце ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL2;
- (iii) уровень экспрессии KIR2DS5 в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS5;
- (iv) уровень экспрессии KIR2DL5 в образце ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL5;

или

- (v) уровень экспрессии GZMM в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии GZMM;
- или присутствует любая комбинация (i)-(v); и

где типифарниб вводят перорально в дозе 900 мг дважды в сутки на сутки 1-7 и 15-21 из 28-суточных циклов лечения.

Кроме того, способ лечения MDS с более низким риском у субъекта включает определение уровней экспрессии KIR2DS2 и KIR2DL2 или KIR2DS5 и KIR2DL5 в образце от субъекта, и введение типифарниба субъекту, где (i) отношение 2DS2/2DL2 в образце выше, чем эталонное отношение 2DS2/2DL2; или (ii) отношение 2DS5/2DL5 в образце выше, чем эталонное отношение 2DS5/2DL5;

или присутствуют оба (i) и (ii); и

где типифарниб вводят перорально в дозе 900 мг дважды в сутки на сутки 1-7 и 15-21 из 28-суточных циклов лечения.

3.7. Наборы.

В конкретных вариантах осуществления в настоящем документе представлен набор для типирования KIR у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, набор содержит один или более зондов, которые специфически связываются с геномной ДНК, кДНК или мРНК одного или более генов KIR. Гены KIR могут включать KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIRDL5 или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления наборы могут дополнительно содержать средство для типирования HLA. Средство для типирования HLA может представлять собой один или более зондов, которые специфически связываются с геномной ДНК, кДНК или мРНК одного или более генов HLA. Гены HLA могут включать HLA-C1, HLA-C2 или оба.

В конкретных вариантах осуществления набор дополнительно содержит раствор для отмывки. В конкретных вариантах осуществления набор дополнительно содержит реагенты для выделения геномной ДНК или средства для очистки, средства для детекции, так же как положительный и отрицательный контроль. В конкретных вариантах осуществления набор дополнительно содержит инструкцию для использования набора. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит FTI или фармакологическую композицию, содержащую FTI. Набор можно приспособлять для домашнего применения, клинического применения или исследовательского применения.

В конкретных вариантах осуществления в настоящем документе представлен набор для детекции уровня мРНК одного или более биомаркеров. Один или более биомаркеров выбраны из группы, которая может включать KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIRDL5 и GZMM. В конкретных вариантах осуществления набор содержит один или более зондов, которые специфически связываются с мРНК одного или более биомаркеров. В конкретных вариантах осуществления набор дополнительно содержит раствор для отмывки. В конкретных вариантах осуществления набор дополнительно содержит реагенты для проведения анализа гибридизации, выделения мРНК, или средства для очистки, средства для детекции, так же как положительный и отрицательный контроль. В конкретных вариантах осуществления набор дополнительно содержит инструкцию для использования набора. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит FTI или фармакологическую композицию, содержащую FTI. Набор можно приспособлять для домашнего применения, клинического применения или исследовательского применения.

В конкретных вариантах осуществления в настоящем документе представлен набор для детекции уровня белка одного или более биомаркеров. Один или более биомаркеров выбраны из группы, которая может включать KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIRDL5, и GZMM. В конкретных вариантах осуществления набор содержит погружаемый зонд, покрытый антителом, которое узнает белковый биомаркер, растворы для отмывки, реагенты для проведения анализа, выделения белка, или средства для очистки, средства для детекции, так же как положительный и отрицательный контроль. В конкретных вариантах осуществления набор дополнительно содержит инструкцию для использования набора. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит FTI или фармакологическую композицию, содержащую FTI. Набор можно приспособлять для домашнего применения, клинического применения или исследовательского применения.

В наборах, представленных в настоящем документе, можно применять, например, погружаемый зонд, мембрану, чип, диск, тест-полоску, фильтр, микросферу, предметное стекло, многоруночный планшет или оптическое волокно. Твердая подложка из набора может представлять собой, например, пластик, силикон, металл, смолу, стекло, мембрану, частицу, преципитат, гель, полимер, оболочку, сферу, полисахарид, капилляр, пленку, планшет или предметное стекло. Образец может представлять собой, например, образец крови, образец костного мозга, культуру клеток, линию клеток, ткань, ткань ротовой полости, ткань желудочно-кишечного тракта, орган, органеллу, биологическую жидкость, образец мочи или образец кожи. Биологический образец может представлять собой, например, биоптат лимфатического узла, биоптат костного мозга или образец клеток опухолей периферической крови.

В некоторых вариантах осуществления наборы, представленные в настоящем документе, содержат один или более контейнеров и компонентов для проведения RT-ПЦР, q ПЦР, глубокого секвенирования, NGS или анализа микромассивов. В конкретных вариантах осуществления в представленных в настоящем документе наборах применяют средства для детекции экспрессии биомаркера посредством проточной цитометрии или иммунофлуоресценции. В других вариантах осуществления экспрессию биомаркера измеряют посредством способов на основе ELISA или других сходных способов, известных в данной области.

В конкретных вариантах осуществления наборы, представленные в настоящем документе, содержат компоненты для выделения белка. В другом конкретном варианте осуществления фармацевтический или аналитический набор содержит, в контейнере, FTI или фармацевтическую композицию, содержащую FTI, и дополнительно содержит, в одном или более контейнерах, компоненты для проведения проточной цитометрии или ELISA.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены наборы для измерения биомаркеров, предоставляющие материалы, необходимые для измерения присутствия конкретных генов, или встречаемости одного или более из продуктов генов для генов или подгруппы генов (например, одного, двух, трех, четырех, пяти или более генов) биомаркеров, представленных в настоящем до-

кументе. Такие наборы могут содержать материалы и реагенты, необходимые для измерения ДНК, РНК или белка. В некоторых вариантах осуществления, такие наборы содержат микромассивы, где микромассив состоит из олигонуклеотидов и/или фрагментов ДНК и/или РНК, которые гибридизуются с одним или более из ДНК или транскриптов мРНК одного или более из генов или подгруппы генов биомаркеров, представленных в настоящем документе, или с любой их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления такие наборы могут содержать праймеры для ПЦР любого из продукта ДНК, РНК или копии кДНК продукта РНК для генов или подгруппы генов. В некоторых вариантах осуществления такие наборы могут содержать праймеры для ПЦР, так же как зонды для количественной ПЦР. В некоторых вариантах осуществления такие наборы могут содержать множество праймеров и множество зондов, где некоторые из зондов обладают различными флуорофорами, так чтобы обеспечивать мультиплексирование множества продуктов для продукта гена или продуктов множества генов. В некоторых вариантах осуществления такие наборы могут дополнительно содержать материалы и реагенты для синтеза кДНК для РНК, выделенной из образца. В некоторых вариантах осуществления такие наборы могут содержать антитела, специфические для белковых продуктов гена или подгруппы генов биомаркеров, представленных в настоящем документе. Такие наборы могут дополнительно содержать материалы и реагенты для выделения РНК и/или белков из биологического образца. В некоторых вариантах осуществления такие наборы могут содержать компьютерный программный продукт, встроенный в машиночитаемые носители, для прогнозирования того, является ли пациент клинически чувствительным к FTI. В некоторых вариантах осуществления наборы могут содержать компьютерный программный продукт, встроенный в машиночитаемые носители вместе с инструкциями.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены наборы для измерения экспрессии одной или более последовательностей нуклеиновой кислоты для гена или подгруппы генов биомаркеров. В конкретном варианте осуществления такие наборы измеряют экспрессию одной или более последовательностей нуклеиновой кислоты, ассоциированных с геном или подгруппой генов биомаркеров, представленных в настоящем документе. В соответствии с этим вариантом осуществления наборы могут содержать материалы и реагенты, необходимые для измерения экспрессии конкретной последовательности нуклеиновой кислоты продуктов генов или подгруппы генов биомаркеров, представленных в настоящем документе. Например, микромассив или набор для RT-ПЦР может быть получен для специфического состояния и содержать только реагенты и материалы, необходимые для измерения уровней специфических продуктов транскриптов РНК для генов или подгруппы генов биомаркеров, представленных в настоящем документе, для прогнозирования того, является ли гематологическая злокачественная опухоль у пациента клинически чувствительной к соединению. Альтернативно в некоторых вариантах осуществления наборы могут содержать материалы и реагенты, не ограниченные материалами и реагентами, необходимыми для измерения экспрессии конкретных последовательностей нуклеиновой кислоты для любых конкретных генов биомаркеров, представленных в настоящем документе. Например, в конкретных вариантах осуществления наборы содержат материалы и реагенты, необходимые для измерения уровней экспрессии 1, 2, 3, 4 или 5 биомаркеров, представленных в настоящем документе, в дополнение к реагентам и материалам, необходимым для измерения уровней экспрессии по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45, по меньшей мере 50 или более генов, отличных от генов биомаркеров, представленных в настоящем документе. В других вариантах осуществления наборы содержат реагенты и материалы, необходимые для измерения уровней экспрессии по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или более генов биомаркеров, представленных в настоящем документе, и 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 300, 350, 400, 450 или более генов, не являющихся генами биомаркеров, представленных в настоящем документе, или 1-10, 1-100, 1-150, 1-200, 1-300, 1-400, 1-500, 1-1000, 25-100, 25-200, 25-300, 25-400, 25-500, 25-1000, 100-150, 100-200, 100-300, 100-400, 100-500, 100-1000 или 500-1000 генов, не являющихся генами биомаркеров, представленных в настоящем документе.

В случае наборов микромассивов нуклеиновых кислот, наборы, как правило, содержат зонды, присоединенные к поверхности твердой подложки. В одном таком варианте осуществления зонды могут представлять собой либо олигонуклеотиды, либо зонды большей длины, включая зонды в диапазоне от длины 150 нуклеотидов до длины 800 нуклеотидов. Зонды можно присоединять к подающей детекции метке. В конкретном варианте осуществления зонды являются специфическими для одного или более продуктов генов биомаркеров, представленных в настоящем документе. Наборы микромассивов могут содержать инструкции для проведения анализа и способов интерпретации и анализа данных, полученных в результате проведения анализа. В конкретном варианте осуществления, наборы содержат инструкции для прогнозирования того, является ли гематологическая злокачественная опухоль у пациента клинически чувствительной к FTI. Наборы могут содержать также реагенты для гибридизации и/или реагенты, необходимые для детекции сигнала, образуемого, когда зонд гибридизуется с последовательностью нуклеиновой кислоты - мишенью. Как правило, материалы и реагенты для наборов микромассивов

находятся в одном или более контейнерах. Каждый компонент набора, как правило, находится в своем собственном подходящем контейнере.

В конкретных вариантах осуществления набор микромассивов нуклеиновых кислот содержит материалы и реагенты, необходимые для измерения уровней экспрессии 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более генов идентифицированных биомаркеров, представленных в настоящем документе или их комбинаций, в дополнение к реагентам и материалам, необходимым для измерения уровней экспрессии по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45, по меньшей мере 50 или более генов, отличных от генов биомаркеров, представленных в настоящем документе. В других вариантах осуществления набор микромассивов нуклеиновых кислот содержит реагенты и материалы, необходимые для измерения уровней экспрессии по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45, по меньшей мере 50 или более генов биомаркеров, представленных в настоящем документе, или любой их комбинации, и 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 300, 350, 400, 450 или более генов, не являющихся генами биомаркеров, представленных в настоящем документе, или 1-10, 1-100, 1-150, 1-200, 1-300, 1-400, 1-500, 1-1000, 25-100, 25-200, 25-300, 25-400, 25-500, 25-1000, 100-150, 100-200, 100-300, 100-400, 100-500, 100-1000 или 500-1000 генов, не являющихся генами биомаркеров, представленных в настоящем документе.

Для количественной ПЦР наборы могут содержать предварительно выбранные праймеры, специфические для конкретных последовательностей нуклеиновой кислоты. Наборы для количественной ПЦР могут содержать также ферменты, пригодные для амплификации нуклеиновых кислот (например, полимеразы, такие как Taq) и дезоксинуклеотиды и буферы, необходимые для реакционной смеси для амплификации. Наборы для количественной ПЦР могут содержать также зонды, специфические для последовательностей нуклеиновых кислот, ассоциированных с состоянием или показательных для состояния. Зонды можно метить флуорофором. Зонды можно также метить молекулой гасителя. В некоторых вариантах осуществления наборы для количественной ПЦР могут содержать также компоненты, пригодные для обратной транскрипции РНК, включая ферменты (например, обратные транскриптазы, такие как AMV, MMLV и т.п.) и праймеры для обратной транскрипции вместе с дезоксинуклеотидами и буферами, необходимыми для реакции обратной транскрипции. Каждый компонент набора для количественной ПЦР, как правило, находится в своем собственном подходящем контейнере. Таким образом, эти наборы, как правило, содержат отдельные контейнеры, подходящие для каждого индивидуального реагента, фермента, праймера и зонда. Кроме того, наборы для количественной ПЦР могут содержать инструкции для проведения анализа и способов интерпретации и анализа данных, полученных в результате проведения анализа. В конкретном варианте осуществления наборы содержат инструкции для прогнозирования того, является ли гематологическая злокачественная опухоль у пациента клинически чувствительной к соединению.

В случае наборов на основе антител набор может содержать, например,

(1) первое антитело, которое связывается с представляющим интерес полипептидом или белком; и необязательно

(2) второе, отличное антитело, которое связывается либо с полипептидом или белком, либо с первым антителом и является конъюгированным с поддающейся детекции меткой (например, флуоресцентной меткой, радиоактивным изотопом или ферментом).

Первое антитело может являться присоединенным к твердой подложке. В конкретном варианте осуществления представляющий интерес полипептид или белок представляет собой биомаркер, представленный в настоящем документе. Наборы на основе антител могут содержать также бусины для проведения иммунопреципитации. Каждый компонент наборов на основе антител, как правило, находится в своем собственном подходящем контейнере. Таким образом, эти наборы, как правило, содержат отдельные контейнеры, подходящие для каждого антитела. Кроме того, наборы на основе антител могут содержать инструкции для проведения анализа и способов интерпретации и анализа данных, полученных в результате проведения анализа. В конкретном варианте осуществления наборы содержат инструкции для прогнозирования того, является ли гематологическая злокачественная опухоль у пациента клинически чувствительной к FTI.

В некоторых вариантах осуществления набор, представленный в настоящем документе, содержит FTI, представленный в настоящем документе, или фармацевтическую композицию, содержащую FTI. Наборы могут, кроме того, содержать дополнительные действующие вещества, включая, но без ограничения, действующие вещества, описанные в настоящем документе, такие как гипометилирующие ДНК средство, терапевтическое антитело, специфическое связывающее антиген злокачественной опухоли, гематопозитический фактор роста, цитокин, противораковое средство, антибиотик, ингибитор соx-2, имму-

номодулирующее средство, антитимоцитарный глобулин, иммуносупрессивное средство или кортикостероид.

Наборы, представленные в настоящем документе, могут дополнительно содержать устройства, которые используют для введения ФТИ или других активных ингредиентов. Примеры таких устройств включают, но без ограничения, шприцы, капельницы, пластыри и ингаляторы.

Наборы могут дополнительно содержать клетки или кровь для трансплантации, так же как фармацевтически приемлемые основы, которые можно использовать для введения одного или более активных ингредиентов. Например, если активный ингредиент представлен в твердой форме, которую необходимо разводить для парентерального введения, набор может содержать герметично закрытый контейнер с подходящей основой, в которой активный ингредиент можно растворять для получения не содержащего частиц стерильного раствора, пригодного для парентерального введения. Примеры фармацевтически приемлемых основ включают, но без ограничения, воду для инъекций USP; водные основы, такие как, но без ограничения, хлорид натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, раствор декстрозы для инъекций, раствор декстрозы и хлорида натрия для инъекций, раствор Рингера с декстрозой и лактолом для инъекций; смешивающиеся с водой основы, такие как, но без ограничения, этиловый спирт, полиэтиленгликоль и полипропиленгликоль; и неводные основы, такие как, но без ограничения, кукурузное масло, хлопковое масло, арахисовое масло, кунжутное масло, этилолеат, изопропилмиристат и бензилбензоат.

В конкретных вариантах осуществления способов и наборов, представленных в настоящем документе, твердофазные подложки используют для очистки белков, мечения образцов или проведения твердофазных анализов. Примеры твердых фаз, пригодных для осуществления способов, описанных в настоящем документе, включают бусины, частицы, коллоиды, отдельные поверхности, пробирки, многолучные планшеты, микропланшеты для титрования, предметные стекла, мембраны, гели и электроды. Когда твердая фаза представляет собой материал в форме частиц (например, бусины), его, в одном варианте осуществления, распределяют в лунки многолучных планшетов, чтобы обеспечивать параллельную обработку твердофазных подложек.

Набор по этому описанию может содержать вспомогательный реагент. В некоторых вариантах осуществления вспомогательный реагент может представлять собой вторичное антитело, реагент для детекции, буфер для детекции, буфер для иммобилизации, буфер для разведения, буфер для промывки или любую их комбинацию.

Вторичные антитела могут представлять собой моноклональные или поликлональные антитела. Вторичные антитела могут происходить из любого организма млекопитающих, включая бычьих, мышей, крыс, хомяков, коз, верблюдов, кур, кроликов и других. Вторичные антитела могут включать, например, антитело против IgA человека, антитело против IgD человека, антитело против IgE человека, антитело против IgG человека или антитело против IgM человека. Вторичные антитела могут являться конъюгированными с ферментами (например, пероксидазой хрена (HRP), щелочной фосфатазой (AP), люциферазой и т.п.) или красителями (например, колориметрическими красителями, флуоресцентными красителями, красителями с резонансным переносом энергии флуоресценции (FRET), красителями FRET с временным разрешением (TR)-FRET и т.п.). В некоторых вариантах осуществления вторичное антитело представляет собой поликлональное антитело кролика против IgG человека, которое является конъюгированным с HRP.

Любой реагент для детекции, известный в данной области, можно включать в набор по этому описанию. В некоторых вариантах осуществления реагент для детекции представляет собой колориметрический реагент для детекции, флуоресцентный реагент для детекции или хемилюминесцентный реагент для детекции. В некоторых вариантах осуществления колориметрический реагент для детекции включает PNPP (п-нитрофенилфосфат), ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновую кислоту)) или OPD (о-фенилендиамин). В некоторых вариантах осуществления, флуоресцентный реагент для детекции включает QuantaBlu™ или QuantaRed™ (Thermo Scientific, Waltham, MA). В некоторых вариантах осуществления люминесцентный реагент для детекции включает люминол или люциферин. В некоторых вариантах осуществления реагент для детекции включает запускающий агент (например, H₂O₂) и индикатор (например, конъюгат изолюминола).

Любой буфер для детекции, известный в данной области, можно включать в набор по этому описанию. В некоторых вариантах осуществления буфер для детекции представляет собой цитратно-фосфатный буфер (например, pH приблизительно 4,2).

Любой останавливающий раствор, известный в данной области, можно включать в набор по этому описанию. Останавливающие растворы по этому описанию останавливают или замедляют дальнейшее проявление реагента для детекции и соответствующих сигналов анализа. Останавливающие растворы могут включать, например, буферы с низким pH (например, глициновый буфер, pH 2,0), хаотропные средства (например, хлорид гуанидиния, натрий-додецилсульфат (SDS)) или восстанавливающие средства (например, дитиотреитол, меркаптоэтанол) или т.п.

В некоторых вариантах осуществления вспомогательный реагент представляет собой реагент для иммобилизации, который может представлять собой любой реагент для иммобилизации, известный в

данной области, включая реагенты для ковалентной и нековалентной иммобилизации. Реагенты для ковалентной иммобилизации могут включать любой химический или биологический реагент, который можно использовать для ковалентной иммобилизации пептида или нуклеиновой кислоты на поверхности. Реагенты для ковалентной иммобилизации могут включать, например, реакционноспособную группу для присоединения карбоксила к амину (например, карбодимиды, такие как EDC или DCC), реакционноспособные по отношению к амину группы (например, сложные эфиры N-гидроксисукцинимиды (NHS), имидоэфиры), реакционноспособное по отношению к сульфгидрилу сшивающее средство (например, малеинимиды, галоацетилы, пиридилдисульфиды), реакционноспособные по отношению к карбонилу сшивающие группы (например, гидразиды, алкоксиамины), фотореактивное сшивающее средство (например, арилизиды, диазирины) или группу для хемоселективного лигирования (например, реакционную пару Штаудингера). Реагенты для нековалентной иммобилизации включают любой химический или биологический реагент, который можно использовать для иммобилизации на поверхности нековалентно пептида или нуклеиновой кислоты, таких как аффинные метки (например, биотин) или связывающие реагенты (например, стрептавидин или антитела против метки, такие как антитела против His 6 или антитела против Мус) ("His6" описан как SEQ ID NO: 50) или антитела против Мус.

Наборы по этому описанию могут включать комбинации реагентов для иммобилизации. Такие комбинации включают, например, EDC и NHS, которые можно использовать, например, для иммобилизации белка по этому описанию на поверхности, такой как матрица карбоксилированного декстрана (например, на чипе BIAcore™ CM5 или бусине на основе декстрана). Комбинации реагентов для иммобилизации можно сохранять в форме предварительно смешанных комбинаций реагентов или один или более реагентов для иммобилизации из комбинации сохранять отдельно от других реагентов для иммобилизации.

Большой выбор буферов для промывки известен в данной области, таких как буферы на основе трис(гидроксиметил)аминометана (Tris) (например, забуференный Tris солевой раствор, TBS) или фосфатные буферы (например, фосфатно-солевой буфер, PBS). Буферы для промывки могут включать детергенты, такие как ионные или неионные детергенты. В некоторых вариантах осуществления буфер для промывки представляет собой буфер PBS (например, pH приблизительно 7,4), включая Tween®20 (например, приблизительно 0,05% Tween®20).

Любые буферы для разведения, известные в данной области, можно включать в набор по этому описанию. Буферы для разведения могут содержать белок-носитель (например, бычий сывороточный альбумин, BSA) и детергент (например, Tween®20). В некоторых вариантах осуществления буфер для разведения представляет собой PBS (например, pH приблизительно 7,4), содержащий BSA (например, приблизительно 1% BSA) и Tween®20 (например, приблизительно 0,05% Tween®20).

В некоторых вариантах осуществления, набор по этому описанию содержит очищающий реагент для автоматизированной системы анализа. Автоматизированная система анализа может включать системы от любого производителя. В некоторых вариантах осуществления автоматизированные системы анализа включают, например, BIO-FLASHTM, BEST 2000TM, DS2TM, EL×50 WASHER, EL×800 WASHER и EL×800 READER. Очищающий реагент может включать любой очищающий реагент, известный в данной области.

Следует отметить, что любую комбинацию перечисленных выше вариантов осуществления, например по отношению к одному или более реагентам, таким как, без ограничения, праймеры нуклеиновой кислоты, твердая подложка и т.п., также предусматривают в связи с любым из различных способов и/или наборов, представленных в настоящем документе.

4. K-Ras и N-Ras дикого типа в качестве биомаркеров для лечения FTI.

В настоящем документе представлены способы отбора пациентов с злокачественными опухолями для лечения с использованием FTI, основанные частично на открытии, что статус мутаций Ras ассоциирован с клиническими преимуществами FTI и может быть использован для прогнозирования способности пациента с злокачественной опухолью отвечать на лечение FTI. Соответственно в настоящем документе представлены способы прогнозирования способности пациента с злокачественной опухолью отвечать на лечение FTI, способы отбора популяции пациентов с злокачественной опухолью для лечения FTI и способы лечения злокачественной опухоли у субъекта с использованием терапевтически эффективного количества FTI, на основании статуса мутаций Ras в образце от пациента.

4.1. Статус мутаций Ras.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ лечения злокачественной опухоли у субъекта на основании статуса мутаций K-Ras, N-Ras или обоих. Способ, представленный в настоящем документе, включает (a) определение присутствия или отсутствия мутации Ras в образце от субъекта, где мутация Ras включает мутацию K-Ras или мутацию N-Ras, и затем (b) введение терапевтически эффективного количества FTI указанному субъекту, если определено, что в указанном образце отсутствует мутация K-Ras или мутация N-Ras.

В некоторых вариантах осуществления способ, представленный в настоящем документе, включает (a) определение присутствия или отсутствия мутации K-Ras в образце от субъекта и затем (b) введение терапевтически эффективного количества FTI указанному субъекту, если определено, что в указанном

образце отсутствует мутация K-Ras. В некоторых вариантах осуществления определено, что образец имеет K-Ras дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления способ, представленный в настоящем документе, включает (а) определение присутствия или отсутствия мутации N-Ras в образце от субъекта и затем (б) введение терапевтически эффективного количества FTI указанному субъекту, если определено, что в указанном образце отсутствует мутация N-Ras. В некоторых вариантах осуществления определено, что образец имеет N-Ras дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления мутация K-Ras представляет собой мутацию K_A-Ras. В некоторых вариантах осуществления мутация K-Ras представляет собой мутацию K_B-Ras. В некоторых вариантах осуществления мутация K-Ras представляет собой комбинацию 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 обоих. В некоторых вариантах осуществления мутация K_A-Ras может включать мутацию, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных замен 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 аминокислотных замен 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 Ras представляет собой мутацию N-Ras. 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 аминокислотных замен G12C, G12D, G12F, G12S, G12A, G12V, G12R, G13C, G13R, G13A, G13D, G13V, G15W, G60E, Q61P, Q61L, Q61R, Q61K, Q61H и Q61E.

В некоторых вариантах осуществления определено, что образец не имеет аминокислотной замены в G12, G13 и Q61 K-Ras, а также не имеет аминокислотной замены в G12, G13, и Q61 N-Ras. В некоторых вариантах осуществления определено, что образец не имеет никакой мутации K-Ras или никакой мутации N-Ras. В некоторых вариантах осуществления определено, что образец имеет K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления способ, представленный в настоящем документе, дополнительно включает определение присутствия или отсутствия мутации H-Ras в образце от субъекта и введение терапевтически эффективного количества FTI указанному субъекту если определено, что указанный образец имеет мутацию H-Ras.

В некоторых вариантах осуществления мутация H-Ras представляет собой мутацию в кодоне, выбранном из группы, состоящей из G12, G13 и Q61. В некоторых вариантах осуществления мутация H-Ras может представлять собой мутацию, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных замен G12R, G12V, G13C, G13R, Q61L и Q61R.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ лечения злокачественной опухоли у субъекта на основании статуса мутаций K-Ras и N-Ras, включающий (а) определение присутствия или отсутствия мутации K-Ras и мутации N-Ras в образце от субъекта и затем (б) введение терапевтически эффективного количества FTI субъекту, если образец не имеет никакой мутации K-Ras или никакой мутации N-Ras. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение терапевтически эффективного количества FTI субъекту, если образец имеет K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение статуса мутаций H-Ras и затем введение терапевтически эффективного количества FTI субъекту, если образец от субъекта не имеет никакой мутации K-Ras или никакой мутации N-Ras, но имеет мутацию H-Ras.

В настоящем документе представлены способы прогнозирования способности пациента с злокачественной опухолью отвечать на лечение FTI, способы отбора популяции пациентов с злокачественной опухолью для лечения FTI и способы лечения злокачественной опухоли у субъекта с использованием терапевтически эффективного количества FTI, на основании статуса мутаций Ras в образце от пациента. В некоторых вариантах осуществления способ включает определение присутствия или отсутствия мутации Ras в образце от субъекта до начала лечения. Опухоли или злокачественные опухоли, которые не имеют мутации K-Ras или мутации N-Ras, показывают, что пациенты, вероятно, могут являться отвечающими на лечение FTI. В некоторых вариантах осуществления пациентов отбирают для лечения FTI на основании отсутствия мутации K-Ras или мутации N-Ras. В некоторых вариантах осуществления пациентов отбирают для лечения FTI на основании отсутствия мутации K-Ras и мутации N-Ras. В некоторых вариантах осуществления пациентов дополнительно отбирают на основании присутствия мутации H-Ras. Статус мутаций Ras можно детектировать на уровне нуклеиновой кислоты или белка. В некоторых вариантах осуществления статус мутаций Ras определяют посредством анализа нуклеиновых кислот, полученных из образца. В некоторых вариантах осуществления статус мутаций Ras определяют посредством анализа белка, полученного из образца.

Технологии, которые можно использовать в представленных в настоящем документе способах, включают гибридизацию *in situ* (Stoler, Clin. Lab. Med. 12:215- 36 (1990)), с использованием меченных радиоактивным изотопом или флуорофором зондов, полимеразной цепной реакции (ПЦР); количественного Саузерн-блоттинга, дот-блоттинга и других технологий для количественной оценки индивидуальных генов. В некоторых вариантах осуществления зонды или праймеры, выбранные для оценки амплификации гена, являются высоко специфическими для исключения детекции близко родственных гомологичных генов. Альтернативно можно применять антитела, которые могут узнавать специфические дуплексы, включая дуплексы ДНК, дуплексы РНК и гибридные дуплексы ДНК-РНК или дуплексы ДНК-белок. Антитела, в свою очередь, можно метить, и можно проводить анализ, где дуплекс является связанным с поверхностью, так что после формирования дуплекса на поверхности можно детектировать присутствие антитела, связанного с дуплексом.

В некоторых вариантах осуществления статус мутаций Ras определяют посредством анализа нуклеиновых кислот, полученных из образца. Нуклеиновые кислоты могут представлять собой молекулы мРНК или геномной ДНК от тестируемого субъекта.

Способы определения статуса мутаций Ras посредством анализа нуклеиновых кислот хорошо известны в данной области. В некоторых вариантах осуществления способы включают секвенирование, полимеразную цепную реакцию (ПЦР), анализ микромассива ДНК, масс-спектрометрию (MS), анализ однонуклеотидного полиморфизма (SNP), денатурирующую высокоэффективную жидкостную хроматографию (DHPLC) или анализ полиморфизма длины фрагментов рестрикции (RFLP). В некоторых вариантах осуществления статус мутаций Ras определяют с использованием стандартных способов секвенирования, включая, например секвенирование по Сэнгеру, секвенирование нового поколения (NGS). В некоторых вариантах осуществления статус мутаций Ras определяют с использованием MS.

В некоторых вариантах осуществления способ включает определение присутствия или отсутствия мутации Ras посредством амплификации нуклеиновой кислоты Ras из образца посредством ПЦР. Например, способ ПЦР и пары праймеров, которые можно использовать, известны специалисту в данной области (например, Chang et al., Clinical Biochemistry, 43 (2010), 296-301; WO2015144184). Например, мультиплексную ПЦР можно использовать для амплификации кодонов 12 и 13 из экзона 2 и кодона 61 из экзона 3 генов N-, H- или K-Ras с использованием двух пар универсальных праймеров для экзонов 2 и 3. Например, можно использовать следующие праймеры:

SEQ ID NO	Экзон	Последовательность праймера
21	2	5' -CYKRBKDRMRATGACKGARTAYAARCTKGTGGT-3'
22	2	5' -ACCTCTATDGTGKGGRTCRTATTTC-3'
23	3	5' -CAGGATTCTYACMGRAARCARGT-3'
24	4	5' -TTKATGGCAAAYACACAVAGRAAGC-3'

Как применяют в настоящем документе, буквы используют в соответствии с обозначением IUPAC, например "Y" обозначает пиримидин, "K" обозначает кето-, например G или C, "R" обозначает пурин, "B" C, G или T, "D" обозначает A, G или T, "M" обозначает A, C, "V" обозначает A, C или G.

После мультиплексной амплификации ПЦР продукты можно очищать для удаления праймеров и не включенных дезоксинуклеотидтрифосфатов с использованием системы PCR-M™ Clean Up (Viogenebio-tek Co., Sunnyvale, CA, USA). Затем выделенную ДНК можно оценивать полуколичественно в 1% агарозном геле в 0,5×TBE и визуализировать посредством окрашивания бромидом этидия. Затем продукты можно подвергать анализу удлинения праймеров с использованием праймеров, как описано в Chang et al., Clinical Biochemistry 43 (2010), 296-301, например, таких как следующие:

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

Можно применять различные концентрации зонда для любого из кодонов 12, 13 или 61 (например, 0,03-0,6 мкМ) в реакционных смесях, содержащих 1,5 мкл очищенных продуктов ПЦР, так же как 4 мкл мультиплексного набора ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), содержащего ДНК-полимеразу AmpliTaq® и флуоресцентно меченные дидезоксинуклеотидтрифосфаты (ddNTP) (меченный RGG дидезоксиаденозинтрифосфат, меченный TAMRA дидезоксицитидинтрифосфат, меченный ROX дидезокситимидинтрифосфат и меченный R110 дидезоксигуанозинтрифосфат). Затем каждую 10 мкл реакционную смесь можно подвергать 25 циклам удлинения на одно основание, состоящим из стадии денатурации при 96°C в течение 10 с и гибридизации и удлинения праймеров при 55°C в течение 35 с. После цикла удлинения не включенные флуоресцентные ddNTP можно затем инкубировать с 1 мкл щелочной фосфатазы креветки (United States Biochemical Co., Cleveland, USA) при 37°C в течение 1 ч, с последующей инактивацией фермента при 75°C в течение 15 мин. Продукты реакции удлинения праймеров можно затем разделять посредством автоматизированного капиллярного электрофореза на платформе для капиллярного электрофореза, например 14 мкл формамида Hi-Di™ (Applied

Biosystems) и 0,28 мкл стандарта размеров GeneScan™-120LIZ® (Applied Biosystems) добавляли к 6 мкл продуктов удлинения праймеров. Затем все образцы можно, например, анализировать в анализаторе ABI Prism 310 DNA Genetic Analyzer (Applied Biosystems) согласно инструкциям производителя с использованием GeneScan™ 3.1 (Applied Biosystems).

В настоящем документе представлены способы отбора пациентов с злокачественными опухолями, которые, вероятно, могут получать преимущество от лечения FTI, включающие определение присутствия или отсутствия мутации Ras посредством амплификации нуклеиновой кислоты Ras из образцов опухолей пациентов и секвенирования амплифицированной нуклеиновой кислоты.

Соответственно нуклеиновую кислоту Ras можно амплифицировать с использованием праймеров, как описано выше, и секвенировать. Например, нуклеиновую кислоту K-Ras, N-Ras и H-Ras можно амплифицировать посредством ПЦР, как описано выше, и затем субклонировать с использованием например, набора TOPO TA Cloning Kit для секвенирования (Invitrogen).

В вышеуказанном изобретательском способе нуклеиновую кислоту RAS можно получать из образцов опухолей пациентов любым способом, известным специалисту в данной области. Например, для выделения геномной ДНК или мРНК из образца опухоли можно использовать любой коммерческий набор, например, такой как Qlamp DNA mini kit или RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). Например, если мРНК выделена из образца опухоли пациента, синтез кДНК можно осуществлять перед осуществлением способов, как описано в настоящем документе, в соответствии с любой известной технологией в данной области.

Например, нуклеиновая кислота, подлежащая выделению из опухоли, может, например, представлять собой одну из геномной ДНК, тотальной РНК, мРНК или поли(А)+ мРНК. Например, если мРНК выделена из образца опухоли пациента, мРНК (тотальную мРНК или поли(А)+ мРНК) можно использовать для синтеза кДНК в соответствии с хорошо разработанными способами в предшествующей области техники, такими как представленные в коммерческих наборах для синтеза кДНК, например, в наборе для синтеза первой цепи Superscript® III. Затем кДНК можно далее амплифицировать, например посредством ПЦР, и затем подвергать секвенированию, например посредством секвенирования по Сэнгеру или пиро-секвенирования для определения нуклеотидной последовательности, например кодонов 12 и 13 гена RAS, например H-RAS, N-RAS или KRAS. Альтернативно продукт ПЦР можно, например, также субклонировать в клонирующий вектор TA TOPO для секвенирования. Технологии, отличные от секвенирования, для определения отсутствия или присутствия мутаций Ras можно использовать в представленных в настоящем документе способах, например, такие как удлинение праймера на один нуклеотид (SNPE) (PLoS One. 2013 Aug 21; 8 (8):e72239); анализ микромассива ДНК, масс-спектрометрия (MS) (например, времяпролетная масс-спектрометрия с лазерной десорбцией/ионизацией с помощью матрицы (MALDI-TOF) масс-спектрометрия), анализ однонуклеотидного полиморфизма (SNP), денатурирующая высокоэффективная жидкостная хроматография (DHPLC) или анализ полиморфизма длины фрагментов рестрикции (RFLP).

Например, анализ однонуклеотидного полиморфизма (SNP) можно использовать для определения статуса мутаций Ras в образце. Анализ SNP можно проводить в HT7900 от Applied Biosystems, с последующим аллельным дискриминантным анализом по протоколу, представленному производителем. Статус мутаций Ras можно также определять посредством DHPLC или RFLP или любых других способов, известных в данной области. Bowen et al., Blood, 106:2113-2119 (2005); Bowen et al., Blood, 101:2770-2774 (2003); Nishikawa et al., Clin Chim Acta., 318:107-112 (2002); Lin SY et al., Am J Clin Pathol. 100:686-689 (1993); O'Leary JJ et al., J Clin Pathol. 51:576-582 (1998).

В некоторых вариантах осуществления статус мутаций Ras определяют посредством анализа белка, полученного из образца. Мутантный белок Ras можно детектировать посредством множества способов иммуногистохимии (ИНС) или других способов иммуноанализа, известных в данной области. Показано, что ИНС окрашивание срезов тканей является надежным способом оценки или детекции присутствия белков в образце. В способах иммуногистохимии используют антитело в качестве зонда и для визуализации клеточных антигенов in situ, как правило, хромогенными или флуоресцентными способами. Таким образом, антитела или антисыворотки, предпочтительно поликлональные антисыворотки и наиболее предпочтительно моноклональные антитела, которые специфически нацелены на мутантный K-Ras или N-Ras, можно использовать для детекции экспрессии. Как более подробно обсуждают ниже, антитела можно детектировать посредством прямого мечения самих антител, например с использованием радиоактивных меток, флуоресцентных меток, гаптенных меток, таких как биотин, или фермента, такого как пероксидаза хрена или щелочная фосфатаза. Альтернативно немеченое первичное антитело используют в сочетании с меченым вторичным антителом, включающим антисыворотки, поликлональные антисыворотки или моноклональные антитела, специфические для первичного антитела. Протоколы и наборы для иммуногистохимии хорошо известны в данной области и являются коммерчески доступными. Автоматизированные системы для подготовки предметных стекол и проведения ИНС являются коммерчески доступными. Система Ventana® BenchMark XT является примером такой автоматизированной системы.

Стандартные иммунологические способы и способы иммуноанализа можно обнаружить в Basic and

Clinical Immunology (Stites & Terr eds., 7th ed. 1991). Кроме того, иммуноанализы можно проводить в любой из нескольких конфигураций, обширный обзор которых приведен в Enzyme Immunoassay (Maggio, ed., 1980); и Harlow & Lane, выше. Общий обзор иммуноанализов см. также в Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology, volume 37 (Asai, ed. 1993); Basic и Clinical Immunology (Stites & Ten, eds., 7th ed. 1991).

Анализы для детекции мутаций K-Ras или мутаций N-Ras включают неконкурентные анализы, например сэндвич-анализы и конкурентные анализы. Как правило, можно использовать анализ, такой как анализ ELISA. Анализы ELISA известны в данной области, например, для анализа широкого множества тканей и образцов, включая кровь, плазму, сыворотку или костный мозг.

Доступно широкое множество способов иммуноанализа с использованием такого формата анализа, см., например, патенты США № 4016043, 4424279 и 4018653, полное содержание которых, таким образом, приведено в качестве ссылки. Они включают анализы одного участка и анализы двух участков, или "сэндвич"-анализы неконкурентных типов, так же как традиционные конкурентные анализы связывания. Эти анализы включают также непосредственное связывание меченого антитела с мутантным белком Ras-мишенью. Сэндвич-анализы являются общепринятыми анализами. Существует ряд вариантов способа сэндвич-анализа. Например, в типичном прямом анализе немеченое антитело иммобилизуют на твердом субстрате и образец, подлежащий тестированию, приводят в контакт со связанной молекулой. После подходящего периода инкубации в течение периода времени, достаточного, чтобы позволить формирование комплекса антитело-антиген, затем второе антитело, специфическое к антигену, меченное репортерной молекулой, способной подавать поддающийся детекции сигнал, добавляют и инкубируют, обеспечивая время, достаточное для формирования другого комплекса антитело-антиген-меченое антитело. Любой не вступивший в реакцию материал отмывают, и присутствие антигена определяют посредством наблюдения сигнала, образованного репортерной молекулой. Результаты либо могут являться качественными, по простому наблюдению видимого сигнала, либо их можно оценивать количественно посредством сравнения с контрольным образцом.

Варианты прямого анализа включают одновременный анализ, в котором как образец, так и меченое антитело добавляют одновременно к связанному антителу. Эти способы хорошо известны специалистам в данной области, включая любые незначительные изменения, как ясно очевидно. В типичном прямом сэндвич-анализе первое антитело, обладающее специфичностью для биомаркера, либо ковалентно, либо пассивно связывают с твердой поверхностью. Твердая поверхность может представлять собой стекло или полимер, где наиболее общепринятыми полимерами являются целлюлоза, полиакриламид, нейлон, полистирол, поливинилхлорид или полипропилен. Твердые подложки могут находиться в форме пробирок, бусин, дисков из микропланшетов или любой другой поверхности, пригодной для проведения иммуноанализа. Способы связывания хорошо известны в данной области и, как правило, состоят из перекрестно сшивающего ковалентного связывания или физической адсорбции, комплекс полимер-антитело промывают при подготовке для тестируемого образца. Аликвоту образца, подлежащего тестированию, затем добавляют к твердофазному комплексу и инкубируют в течение достаточного периода времени (например, 2-40 мин или в течение ночи, если это более удобно) и в подходящих условиях (например, от комнатной температуры до 40°C, например между 25 и 32°C включительно), чтобы позволить связывание любой субъединицы, присутствующей в антителе. После периода инкубации твердую фазу с субъединицей антитела промывают, высушивают и инкубируют с вторым антителом, специфическим для части мутантного белка Ras. Второе антитело связано с репортерной молекулой, которую используют, чтобы показать связывание второго антитела с мутантным белком Ras.

В некоторых вариантах осуществления проточную цитометрию (FACS) можно использовать для детекции мутантного K-Ras или N-Ras с использованием антитела, специфически нацеленного на мутантный K-Ras или N-Ras. Проточный цитометр детектирует и регистрирует интенсивность меченого флуорохромом антитела, которая показывает присутствие мутантного K-Ras или N-Ras. Нефлуоресцентные цитоплазматические белки можно также наблюдать посредством окрашивания пермеабелизованных клеток. Краситель может представлять собой либо флуоресцентное соединение, способное связываться с конкретными молекулами, либо меченное флуорохромом антитело для связывания с выбранной молекулой.

Альтернативный способ включает иммобилизацию белка Ras - мишени - в образце и затем подвержение иммобилизованной мишени воздействию специфического для мутанта антитела, которое может являться или не являться меченым репортерной молекулой. В зависимости от количества мишени и силы сигнала репортерной молекулы, связанную мишень можно подвергать детекции посредством прямого мечения с использованием антитела. Альтернативно второе меченое антитело, специфическое к первому антителу, подвергают воздействию комплекса мишень - первое антитело, с формированием третьего комплекса мишень - первое антитело - второе антитело. Комплекс детектируют посредством сигнала, излучаемого меченой репортерной молекулой.

В случае ферментного иммуноанализа, фермент конъюгируют с вторым антителом, как правило, посредством глутаральдегида или периодата. Как ясно понятно, однако, существует широкое множество различных способов конъюгации, легко доступных для специалиста в данной области. Общепринятые ферменты, включая пероксидазу хрена, оксидазу глюкозы, бета-галактозидазу и щелочную фосфатазу, и

другие, обсуждают в настоящем документе. Субстраты, подлежащие использованию со специфическими ферментами, как правило, выбирают для получения, после гидролиза соответствующим ферментом, поддающегося детекции изменения окраски. Примеры пригодных ферментов включают щелочную фосфатазу и пероксидазу. Можно применять также флуорогенные субстраты, образующие флуоресцентный продукт, в отличие от хромогенных субстратов, указанных выше. Во всех случаях меченное ферментом анти тело добавляют к комплексу антитело - молекулярный маркер, позволяют связываться и затем избыток реагента отмывают. Раствор, содержащий подходящий субстрат, затем добавляют к комплексу антитело - антиген - антитело. Субстрат может вступать в реакцию с ферментом, связанным с вторым антителом, образуя качественный визуальный сигнал, который можно далее подвергать количественной оценке, обычно спектрофотометрически, для получения показателя количества мутантного белка Ras, которое присутствовало в образце. Альтернативно флуоресцентные соединения, такие как флуоресцеин и родамин, можно химически присоединять к антителам без изменения их емкости связывания. При активации посредством освещения светом конкретной длины волны меченное флуорохромом антитело поглощает энергию света, индуцируя состояние возбудимости молекулы, с последующим излучением света характерного цвета, поддающегося визуальной детекции с использованием светового микроскопа. Как и для EIA, меченному флуоресцентной меткой антителу позволяют связываться с комплексом первое антитело - молекулярный маркер. После отмывки несвязавшегося реагента оставшийся третичный комплекс затем подвергают воздействию света подходящей длины волны, наблюдаемая флуоресценция показывает присутствие представляющего интерес молекулярного маркера. Способы иммунофлуоресценции и EIA оба очень хорошо разработаны в данной области, и их обсуждают в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления определение статуса мутаций Ras проводят в качестве сопутствующей диагностики для лечения FTI. Сопутствующую диагностику можно проводить в клиническом центре, в котором проводят лечение субъекта. Сопутствующую диагностику можно также проводить в центре, отличном от клинического центра, в котором проводят лечение субъекта.

Как понятно специалисту в данной области, в настоящем документе представлены способы, предназначенные для прогнозирования способности пациента с злокачественной опухолью отвечать на лечение FTI, способы отбора популяции пациентов с злокачественной опухолью для лечения FTI и способы лечения злокачественной опухоли у субъекта с использованием терапевтически эффективного количества FTI, на основании статуса мутаций Ras в образце от пациента. Любые способы, описанные в настоящем документе, или иным образом известные в данной области для определения статуса мутаций Ras, можно применять в этих способах.

4.2. Образцы.

В некоторых вариантах осуществления представленные в настоящем документе способы включают получение образца от субъекта. Образец, используемый в представленных в настоящем документе способах, включает жидкости организма субъекта. Неограничивающие примеры жидкостей организма включают кровь (например, цельную периферическую кровь, периферическую кровь), плазму крови, костный мозг, амниотическую жидкость, внутриглазную жидкость, желчь, лимфу, менструальные выделения, сыворотку, мочу, спинномозговую жидкость, окружающую головной мозг и спинной мозг, синовиальную жидкость, окружающую суставы костей.

В одном варианте осуществления образец представляет собой образец костного мозга. Способы получения образцов костного мозга хорошо известны в данной области, включая, но без ограничения, биопсию костного мозга и аспирацию костного мозга. Костный мозг имеет жидкую часть и более твердую часть. При биопсии костного мозга отбирают образец твердой части. При аспирации костного мозга отбирают образец жидкой части. Биопсию костного мозга и аспирацию костного мозга можно выполнять в одно и то же время и обозначать как исследование костного мозга.

В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец крови. Образец крови можно получать с использованием общепринятых способов, как описано, например, в Innis et al., editors, PCR Protocols (Academic Press, 1990). Лейкоциты можно выделять из образцов крови с использованием общепринятых способов или коммерчески доступных наборов, например набора RosetteSep (Stein Cell Technologies, Vancouver, Canada). Субпопуляции лейкоцитов, например мононуклеарные клетки, клетки NK, В-клетки, Т-клетки, моноциты, гранулоциты или лимфоциты, можно далее выделять с использованием общепринятых способов, например активированной магнитным полем сортировки клеток (MACS) (Miltenyi Biotec, Auburn, California) или активированной флуоресценцией сортировки клеток (FACS) (Becton Dickinson, San Jose, California).

В одном варианте осуществления образец крови составляет от приблизительно 0,1 мл до приблизительно 10,0 мл, от приблизительно 0,2 мл до приблизительно 7 мл, от приблизительно 0,3 мл до приблизительно 5 мл, от приблизительно 0,4 мл до приблизительно 3,5 мл или от приблизительно 0,5 мл до приблизительно 3 мл. В другом варианте осуществления, образец крови составляет приблизительно 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 или 10,0 мл.

В некоторых вариантах осуществления образец, используемый в настоящих способах, включает биоптат (например, биоптат опухоли). Биоптат может происходить из любого органа или ткани, например кожи, печени, легкого, сердца, ободочной кишки, почки, костного мозга, зубов, лимфатических узлов,

волос, селезенки, головного мозга, молочных желез или других органов. Любой способ биопсии, известный специалистам в данной области, можно использовать для выделения образца от субъекта, например открытую биопсию, закрытую биопсию, толстоигольную биопсию, инцизионную биопсию, эксцизионную биопсию или биопсию тонкоигольной аспирацией.

В конкретных вариантах осуществления образец, используемый в представленных в настоящем документе способах, включает множество клеток. Такие клетки могут включать любой тип клеток, например стволовые клетки, клетки крови (например, PBMC), лимфоциты, клетки NK, В-клетки, Т-клетки, моноциты, гранулоциты, иммуноциты, или клетки опухолей, или клетки злокачественных опухолей. Специфические популяции клеток можно получать с использованием комбинации коммерчески доступных антител (например, Quest Diagnostic (San Juan Capistrano, Calif.); Dako (Denmark)).

В конкретных вариантах осуществления образец, используемый в представленных в настоящем документе способах, происходит из пораженной заболеванием ткани, например от индивидуума, имеющего злокачественную опухоль (например, лимфому, MDS или лейкоз). В некоторых вариантах осуществления клетки можно получать из клеток опухолей, или клеток злокачественных опухолей, или тканей опухолей, таких как биоптаты опухолей или эксплантаты опухолей. В конкретных вариантах осуществления количество клеток, используемое в представленных в настоящем документе способах, может лежать в диапазоне от отдельной клетки до приблизительно 10^9 клеток. В некоторых вариантах осуществления количество клеток, используемое в представленных в настоящем документе способах, 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 .

Количество и тип клеток, собранных от субъекта, можно мониторировать, например, посредством измерения изменений морфологии и поверхностных маркеров клеток с использованием стандартных способов детекции клеток, таких как проточная цитометрия, сортировка клеток, иммуноцитохимия (например, окрашивание с использованием тканеспецифических или специфических для маркера клеток антител), активированная флуоресценцией сортировка клеток (FACS), активированная магнитным полем сортировка клеток (MACS), посредством проверки морфологии клеток с использованием световой или конфокальной микроскопии и/или посредством измерения изменений экспрессии генов с использованием способов, хорошо известных в данной области, таких как ПЦР и получение профилей экспрессии генов. Эти способы можно использовать также для идентификации клеток, положительных по одному или более конкретным маркерам. Активированная флуоресценцией сортировка клеток (FACS) представляет собой хорошо известный способ разделения частиц, включая клетки, на основании флуоресцентных свойств частиц (Kamarch, 1987, *Methods Enzymol*, 151:150-165). Лазерное возбуждение флуоресцентных групп в индивидуальных частицах приводит к небольшому электрическому заряду, позволяющему электромагнитное разделение положительных и отрицательных частиц из смеси. В одном варианте осуществления специфические для поверхностных маркеров клеток антитела или лиганды метят различными флуоресцентными метками. Клетки пропускают через сортировщик клеток, позволяя разделение клеток на основании их способности связывать используемые антитела. Отсортированные посредством FACS частицы можно помещать на хранение непосредственно в индивидуальные лунки 96-луночных или 384-луночных планшетоов для облегчения разделения и клонирования.

В конкретных вариантах осуществления подгруппы клеток используют в представленных в настоящем документе способах. Способы сортировки и выделения специфических популяций клеток хорошо известны в данной области и могут быть основаны на размере, морфологии клеток или внутриклеточных или внеклеточных маркерах. Такие способы включают, но без ограничения, проточную цитометрию, проточную сортировку, FACS, разделение на основе бусин, такое как магнитная сортировка клеток, разделение на основании размера (например, с использованием сита, ряда препятствий или фильтра), сортировку в микроструйном устройстве, разделение на основе антител, осаждение, аффинную адсорбцию, аффинную экстракцию, центрифугирование в градиенте плотности, лазерную захватывающую микродиссекцию и т.д.

Образец может представлять собой образец цельной крови, образец костного мозга, частично очищенный образец крови или PBMC. Образец может представлять собой биоптат ткани или биоптат опухоли. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец костного мозга от пациента с злокачественной опухолью. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой PBMC от пациента с злокачественной опухолью.

4.3 Злокачественные опухоли.

В настоящем документе представлены способы лечения злокачественной опухоли у субъекта с использованием FTI и способы отбора пациентов с злокачественными опухолями для лечения FTI на основании отсутствия мутации K-Ras и мутации N-Ras. Злокачественная опухоль может представлять собой гематопозитическую злокачественную опухоль или солидную опухоль. В настоящем документе представлены также способы лечения предзлокачественного состояния у субъекта с использованием FTI и способы отбора пациентов с предзлокачественным состоянием для лечения FTI на основании отсутствия мутации K-Ras и мутации N-Ras.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения солидных опухолей с использованием FTI на основании отсутствия мутации K-Ras и мутации N-Ras. Со-

лидные опухоли представляют собой аномальные массы ткани, которые обычно не содержат цист или жидких областей. Солидные опухоли могут являться доброкачественными или злокачественными. Различные типы солидных опухолей названы по типу клеток, которые их формируют (такие как саркомы, карциномы и лимфомы). Солидные опухоли, подлежащие лечению способами по изобретению, могут представлять собой саркомы и карциномы, включая фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеосаркому и другие саркомы, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, карциному ободочной кишки, злокачественные новообразования лимфоидной ткани, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак легкого, рак яичника, рак предстательной железы, печеночно-клеточную карциному, плоскоклеточную карциному, базально-клеточную карциному, аденокарциному, карциному потовых желез, медуллярную карциному щитовидной железы, папиллярную карциному щитовидной железы, феохромоцитому, карциному сальной железы, папиллярную карциному, папиллярные аденокарциномы, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, почечно-клеточный рак, гепатому, карциномы желчных протоков, хориокарциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, опухоль яичка, семиному, карциному мочевого пузыря, меланому и опухоли ЦНС (такие как глиома (такая как глиома ствола головного мозга и смешанные глиомы), глиобластома (также известная как мультиформная глиобластома) астроцитомы, лимфома ЦНС, герминома, медуллобластома, Шваннома, краниофарингиома, эпендимома, пинеалома, гемангиобластома, невринома слухового нерва, олигодендроглиома, менингиома, нейробластома, ретинобластома и метастазы в головном мозге). В некоторых вариантах осуществления FTI представляет собой типифарниб.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения солидной опухоли с использованием FTI на основании отсутствия мутации K-Ras и мутации N-Ras, где солидная опухоль представляет собой злокачественную меланому, карциному надпочечников, карциному молочной железы, почечно-клеточный рак, карциному поджелудочной железы, немелкоклеточную карциному легкого (NSCLC) или карциному с неизвестной первичной локализацией. В некоторых вариантах осуществления, FTI представляет собой типифарниб. Лекарственные средства, обычно вводимые пациентам с различными типами или стадиями солидных опухолей, включают, но без ограничения, целебрекс, этопозид, циклофосфамид, доцетаксел, апецитабин, IFN, тамоксифен, IL-2, GM-CSF или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль, подлежащая лечению представленными в настоящем документе способами, может представлять собой рак щитовидной железы, рак головы и шеи, уротелиальный рак, злокачественные опухоли слюнных желез, злокачественные опухоли верхних отделов желудочно-кишечного тракта, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак яичника, злокачественную опухоль мозга, рак желудка, рак предстательной железы, рак легкого, рак толстого кишечника, рак кожи, рак печени и рак поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления, рак мочевого пузыря, подлежащий лечению представленными в настоящем документе способами, может представлять собой переходноклеточную карциному. В некоторых вариантах осуществления, FTI представляет собой типифарниб.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль, подлежащая лечению представленными в настоящем документе способами, может быть выбрана из группы, состоящей из карциномы, меланомы, саркомы или хронической гранулематозной болезни.

В некоторых вариантах осуществления предзлокачественные состояния, подлежащие лечению представленными в настоящем документе способами, могут представлять собой актинический хейлит, пищевод Барретта, атрофический гастрит, протоковую карциному *in situ*, врожденный дискератоз, сидеропеническую дисфагию, красный плоский лишай, подслизистый фиброз полости рта, солнечный эластоз, цервикальную дисплазию, полипы, лейкоплакию, эритроплакию, плоскоклеточное интраэпителиальное поражение, предзлокачественное нарушение или предзлокачественное иммунопролиферативное нарушение.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения гематопозитической злокачественной опухоли у субъекта с использованием FTI или отбора пациентов с злокачественными опухолями для лечения FTI на основании отсутствия мутации K-Ras и мутации N-Ras.

Гематологические злокачественные опухоли представляют собой злокачественные опухоли крови или костного мозга. Примеры гематологических (или гематогенных) злокачественных опухолей включают миелопролиферативную неоплазию (MPN), миелодиспластический синдром (MDS), лейкоз и лимфому. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой острый миелоидный лейкоз (AML), лимфому клеток естественных киллеров (лимфому NK), лейкоз клеток естественных киллеров (лейкоз NK), Т-клеточную лимфому кожи (CTCL), ювенильный миеломоноцитарный лейкоз (JMML), периферическую Т-клеточную лимфому (PTCL), хронический миелоидный лейкоз (CML) или хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML). В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой CMML. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой JMML.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения CMML у субъекта с использованием FTI или отбора пациентов с CMML для лечения FTI на основании

отсутствия мутации K-Ras и мутации N-Ras. CMML классифицируют как миелодиспластическую/миелопролиферативную неоплазию по классификации опухолей гематопозитической системы Всемирной организации здравоохранения от 2008 г. CMML может представлять собой миелодиспластический CMML или миелопролиферативный CMML. Пациенты с CMML имеют большое количество моноцитов в крови (по меньшей мере 1000 на мм³). Два класса - миелодиспластический и миелопролиферативный - различают на основании уровня количества лейкоцитов (порог 13 г/л). Часто количество моноцитов является намного большим, что приводит к тому, что общее количество лейкоцитов также становится очень высоким. Обычно аномальные клетки присутствуют в костном мозге, но количество бластных клеток составляет менее 20%. У приблизительно 15-30% пациентов с CMML процесс продолжается до развития острого миелоидного лейкоза. Диагностика CMML основана на комбинации морфологических, гистопатологических и хромосомных аномалий в костном мозге. По прогностической модели Мейо классифицировали пациентов с CMML на три группы риска на основании: увеличения абсолютного количества моноцитов, присутствия циркулирующих бластных клеток, гемоглобина <10 г/дл и тромбоцитов <100×10⁹/л. Медианная выживаемость составляла 32 месяца, 18,5 месяцев и 10 месяцев в группах низкого, промежуточного и высокого риска соответственно. По показателю Groupe Francophone (GFM) разделяли пациентов с CMML на три группы риска на основании: возраста >65 лет, WBC >15×10⁹/л, анемии, тромбоцитов <100×10⁹/л и статуса мутаций ASXL1. После отслеживания с медианой 2,5 года выживаемость лежала в диапазоне от не достигнутой в группе низкого риска до 14,4 месяцев в группе высокого риска.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения CMML у субъекта посредством определения присутствия или отсутствия мутации K-Ras и мутации N-Ras в образце от субъекта и затем введения терапевтически эффективного количества FTI субъекту, если определено, что в образце отсутствует мутация K-Ras и отсутствует мутация N-Ras. В некоторых вариантах осуществления FTI представляет собой типифарниб. В некоторых вариантах осуществления определено, что образец имеет K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения CMML у субъекта посредством определения присутствия или отсутствия мутации K-Ras в образце от субъекта и затем введения терапевтически эффективного количества FTI субъекту, если определено, что в образце отсутствует мутация K-Ras. В некоторых вариантах осуществления FTI представляет собой типифарниб. В некоторых вариантах осуществления определено, что образец имеет K-Ras дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения CMML у субъекта посредством определения присутствия или отсутствия мутации N-Ras в образце от субъекта и затем введения терапевтически эффективного количества FTI субъекту, если определено, что в образце отсутствует мутация N-Ras. В некоторых вариантах осуществления FTI представляет собой типифарниб. В некоторых вариантах осуществления определено, что образец имеет N-Ras дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения CMML у субъекта посредством определения присутствия или отсутствия мутации K-Ras и мутации N-Ras в образце от субъекта и затем введения типифарниба субъекту, если определено, что образец обладает K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения MDS у субъекта с использованием FTI или отбора пациентов с MDS для лечения FTI. MDS относится к неоднородной группе нарушений гематопозитических стволовых клеток. MDS может характеризоваться увеличением в костном мозге количества клеток с нарушенной морфологией и созреванием (дисмиелопоэзом), неэффективной продукцией клеток крови, или гемопоэзом, приводящим к уменьшенному количеству клеток крови, или цитопениям (включая анемию, лейкопению и тромбоцитопению), и высоким риском прогрессирования до острого миелоидного лейкоза, возникающим в результате неэффективной продукции клеток крови. См. The Merck Manual 953 (17th ed. 1999) и List et al., 1990, J Clin. Oncol. 8:1424.

MDS можно разделять на ряд подтипов, в зависимости, по меньшей мере, от того, 1) присутствует ли увеличенное количество бластных клеток в костном мозге или крови и какой процент костного мозга или крови состоит из этих бластных клеток; 2) показан ли аномальный рост костного мозга (дисплазия) только для одного типа клеток крови (однолинейная дисплазия) или для более, чем одного типа клеток крови (мультилинейная дисплазия); и 3) присутствуют ли хромосомные аномалии в клетках костного мозга, и если присутствуют, какой тип или типы аномалий. MDS можно классифицировать также на основании поверхностных маркеров клеток злокачественных опухолей. В соответствии со Всемирной организацией здравоохранения, подтипы MDS включают невосприимчивую цитопению с однолинейной дисплазией (RCUD), известную также как невосприимчивая анемия, невосприимчивая нейтропения или невосприимчивая тромбоцитопения; невосприимчивую анемию с кольцевидными сидеробластами (RARS); невосприимчивую цитопению с мультилинейной дисплазией (RCMD), которая включает RCMD-RS, если присутствуют как мультилинейная дисплазия, так и кольцевидные сидеробласты; невосприимчивую анемию-1 с избытком бластных клеток (RAEB-1) и невосприимчивую анемию-2 с избытком бластных клеток (RAEB-2) (эти подтипы означают, что пациенты имеют по меньшей мере 5%

(RAEB-1) или по меньшей мере 10% (RAEB-2), но менее, чем 20% бластных клеток в костном мозге); MDS, ассоциированный с изолированной аномалией хромосомы 5 [del(5q)]; и не поддающийся классификации MDS (MDS-U).

В качестве группы злокачественных новообразований гематопозитических стволовых клеток со значительной заболеваемостью и смертностью MDS является высоко гетерогенным заболеванием, и тяжесть симптомов и прогрессирование заболевания может сильно меняться среди пациентов. Современным стандартным клиническим инструментом для оценки стратификации риска и вариантов лечения является модифицированная Международная прогностическая балльная система, или IPSS-R. IPSS-R разделяет пациентов на пять групп риска (очень низкий, низкий, промежуточный, высокий, очень высокий) на основании оценки цитогенетики, процента бластных клеток (недифференцированных клеток крови) в костном мозге, уровней гемоглобина и количества тромбоцитов и нейтрофилов. WHO предлагает также стратификацию пациентов с MDS по аномалии - делеции (5q).

В соответствии с ACS ежегодная заболеваемость MDS составляет приблизительно 13000 пациентов в Соединенных Штатах, большинство из которых имеют возраст 60 лет или старше. Оцененная распространенность составляет более 60000 пациентов в Соединенных Штатах. Приблизительно 75% пациентов попадают в категории очень низкого, низкого и промежуточного риска по IPSS-R или вместе являются известными как пациенты с MDS с более низким риском.

Начальное повреждение гематопозитических стволовых клеток может возникать по таким причинам как, но без ограничения, цитотоксическая химиотерапия, радиация, вирус, воздействие химических веществ и генетическая предрасположенность. В костном мозге преобладает клональная мутация, супрессирующая здоровые стволовые клетки. На ранних стадиях MDS основной причиной цитопений является увеличение программируемой гибели клеток (апоптоза). По мере прогрессирования заболевания и перехода в лейкоз редко возникает мутация в гене, и пролиферация лейкозных клеток подавляет здоровый костный мозг. Течение заболевания отличается, где в некоторых случаях оно ведет себя как вялотекущее заболевание, и в других случаях оно ведет себя агрессивно с очень коротким клиническим течением заболевания, переходящим в острую форму лейкоза.

Международная группа гематологов, Франко-Американо-Британская (FAB) объединенная группа, классифицировала нарушения MDS на пять подгрупп, отличая их от AML. The Merck Manual 954 (17th ed. 1999); Bennett J. M., et al., *All. Intern. Med.* 1985 October, 103(4): 620-5; и Besa E. C, *Med. Clin. North Am.* 1992 May, 76(3):599-617. Лежащее в основе трехлинейное диспластическое изменение клеток костного мозга пациентов обнаружено во всех подтипах.

Существует две подгруппы невосприимчивой анемии, характеризующейся пятью процентами или менее миелобластов в костном мозге: (1) невосприимчивая анемия (RA) и; (2) RA с кольцевидными сидеробластами (RARS), определяемая морфологически как имеющая 15% эритроидных клеток с аномальными кольцевидными сидеробластами, что отражает аномальное накопление железа в митохондриях. Обе имеют длительное клиническое течение и низкую встречаемость прогрессирования до острого лейкоза. Besa E. C, *Med. Clin. North Am.* 1992 May, 76(3): 599-617.

Существует две подгруппы невосприимчивой анемии с более чем пятью процентами миелобластов: (1) RA с избытком бластных клеток (RAEB), с определением 6-20% миелобластов, и (2) RAEB в стадии трансформации (RAEB-T), с 21-30% миелобластов. Чем выше процент миелобластов, тем короче клиническое течение и тем ближе заболевание к острому миелогенному лейкозу. Переход пациентов от ранних к более поздним стадиям указывает на то, что эти подтипы представляют собой просто стадии заболевания, а не отдельные единицы. Пожилых пациентов с MDS с трехлинейной дисплазией и с более чем 30% миелобластов, с прогрессированием до острого лейкоза, часто считают обладающими плохим прогнозом, поскольку частота их ответа на химиотерапию ниже, чем у пациентов с острым миелоидным лейкозом *de novo*. Пятым типом MDS, наиболее трудным для классификации, является CMML. Этот подтип может обладать любым процентом миелобластов, но проявляется моноцитозом 1000/дл или более. Он может являться ассоциированным с спленомегалией. Этот подтип перекрывается с миелопролиферативным нарушением и может иметь промежуточное клиническое течение. Он отличается от классического CML тем, что отрицательно характеризуется по Ph хромосоме.

MDS является в первую очередь заболеванием пожилых людей, с медианным началом в седьмом десятилетии жизни. Медианный возраст этих пациентов составляет 65 лет, где возраст лежит в диапазоне от начала третьего десятилетия жизни до такого пожилого возраста, как 80 лет или старше. Синдром может возникать в любой возрастной группе, включая пациентов детского возраста. Пациенты, пережившие лечение злокачественных новообразований с использованием алкилирующих средств, в присутствии или в отсутствие радиотерапии, обладают высокой частотой случаев развития MDS или вторичного острого лейкоза. Приблизительно 60-70% пациентов не имеют очевидного воздействия или причины, вызывающих MDS, и их классифицируют как пациентов с первичным MDS.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения MPN у субъекта с использованием FTI или отбора пациентов с MPN для лечения FTI. MPN представляет собой группу заболеваний, затрагивающих формирование клеток крови. При всех формах MPN в стволовых клетках в костном мозге развиваются генетические дефекты (называемые приобретенными дефекта-

ми), вызывающие аномалии их роста и выживаемости. Это приводит к необычно высокому количеству клеток крови в костном мозге (костному мозгу с избыточным клеточным содержанием) и в кровотоке. Иногда при MPN, аномальные стволовые клетки вызывают cause рубцевание в костном мозге, называемое миелофиброзом. Миелофиброз может приводить к низким уровням клеток крови, особенно к низким уровням эритроцитов (анемии). При MPN аномальные стволовые клетки могут расти также в селезенке, вызывая увеличение селезенки (спленомегалию), и в других участках вне костного мозга, вызывая увеличение других органов.

Существует несколько типов хронического MPN, на основании пораженных клеток. Три классических типа MPN включают истинную полицитемию (PV), при которой присутствует слишком много RBC; эссенциальную тромбоцитемию (ET), при которой присутствует слишком много тромбоцитов; первичный миелофиброз (PMF), при котором волокна и бластные клетки (аномальные стволовые клетки) накапливаются в костном мозге. Другие типы MPN включают: хронический миелоидный лейкоз, при котором присутствует слишком много лейкоцитов; хронический нейтрофильный лейкоз, при котором присутствует слишком много нейтрофилов; хронический эозинофильный лейкоз, без дополнительных уточнений, при котором присутствует слишком много эозинофилов (гиперэозинофилию); мастоцитоз, называемый также заболеванием тучных клеток, при котором присутствует слишком много тучных клеток, представляющих собой тип клеток иммунной системы, обнаруживаемый в тканях, таких как кожа и ткани пищеварительных органов, а не в кровотоке; миелоидные и лимфоидные неоплазии с эозинофилией и аномалиями генов PDGFRA, PDGFRB и FGFR1; и другие не поддающиеся классификации миелопролиферативные неоплазии.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения лейкоза у субъекта с использованием FTI или отбора пациентов с лейкозом для лечения FTI. Лейкоз относится к злокачественным неоплазиям кроветворных тканей. Различные формы лейкозов описаны, например, в патенте США № 7393862 и предварительной патентной заявке США № 60/380842, поданной 17 мая 2002 г., полное содержание которых приведено в настоящем документе в качестве ссылки. Хотя вирусы, как сообщают, вызывают несколько форм лейкоза у животных, причины лейкоза у человека в большой степени остаются неизвестными. The Merck Manual, 944-952 (17th ed. 1999). Трансформация до злокачественности, как правило, происходит в отдельной клетке за две или более стадии с последующей пролиферацией и клональной экспансией. При некоторых лейкозах идентифицированы специфические хромосомные транслокации с соответствующей морфологией лейкозных клеток и конкретными клиническими признаками (например, транслокации 9 и 22 при хроническом миелоцитарном лейкозе, и 15 и 17 при остром промиелоцитарном лейкозе). Острые лейкозы преимущественно представляют собой недифференцированные популяции клеток, а хронические лейкозы - более зрелые формы клеток.

Острые лейкозы разделяют на лимфобластный (ALL) и нелимфобластный (ANLL) типы. The Merck Manual, 946-949 (17th ed. 1999). Их можно далее подразделять по их морфологическим и цитохимическим проявлениям в соответствии с Франко-Американо-Британской (FAB) классификацией или в соответствии с их типом и степенью дифференцировки. Применение специфических для B- и T-клеток и миелоидного антигена моноклональных антител лучше всего помогает классификации. ALL преимущественно представляет собой заболевание детского возраста, которое устанавливают по результатам лабораторных исследований и обследованию костного мозга. ANLL, известный также как острый миелогенный лейкоз или AML, возникает в любом возрасте и является более распространенным острым лейкозом у взрослых; он представляет собой форму, обычно ассоциированную с облучением в качестве этиологического фактора. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе представлены способы лечения пациентов с AML с использованием FTI, или способы отбора пациентов для лечения FTI.

Стандартные способы лечения пациентов с AML обычно включают 2 фазы химиотерапии (химию): индукцию ремиссии (или индукцию) и консолидацию (терапию после ремиссии). Целью первой части лечения (индукции ремиссии) является избавление от настолько большого количества лейкозных клеток, насколько возможно. Интенсивность лечения может зависеть от возраста и состояния здоровья индивидуума. Интенсивную химиотерапию часто проводят для людей в возрасте меньше 60 лет. Несколько более старшие пациенты с хорошим общим состоянием здоровья могут получать преимущество от сходного или немного менее интенсивного лечения. Людям, которые намного старше или имеют плохое общее состояние здоровья, не подходят интенсивные химиотерапевтические средства.

У более молодых пациентов, таких как пациенты младше 60 лет, индукция часто включает лечение с использованием 2 химиотерапевтических средств, цитарабина (ara-C) и антрациклинового лекарственного средства, такого как даунорубин (дауномицин) или идарубин. Иногда вводят также третье лекарственное средство, кладрибин (леустатин, 2-CdA). Химиотерапию обычно проводят в больнице и продолжают приблизительно неделю. В редких случаях, когда лейкоз распространяется на головной мозг или спинной мозг, можно проводить также химиотерапию спинномозговой жидкости (CSF). Радиотерапию также можно использовать.

Индукцию считают успешной, если достигнута ремиссия. Однако AML у некоторых пациентов может являться невосприимчивой к индукции. Пациентов, которые отвечают на индукцию, затем подвергают дальнейшему лечению, чтобы уничтожить оставшиеся лейкозные клетки и способствовать предот-

вращению рецидива, которое называют консолидацией. Для более молодых пациентов основными вариантами консолидационной терапии являются несколько циклов химиотерапии высокой дозой цитарабина (ага-С) (в некоторых случаях известной как HiDAC); трансплантация аллогенных (донорных) стволовых клеток; и трансплантация аутологичных стволовых клеток.

Хронические лейкозы описывают как являющиеся лимфоцитарными (CLL) или миелоцитарными (CML). The Merck Manual, 949-952 (17th ed. 1999). CLL характеризуется появлением зрелых лимфоцитов в крови, костном мозге и лимфоидных органах. Отличительным признаком CLL является стойкий абсолютный лимфоцитоз ($>5000/\text{мкл}$) и увеличение количества лимфоцитов в костном мозге. У большинства пациентов с CLL присутствует также клональная экспансия лимфоцитов с характеристиками В-клеток. CLL представляет собой заболевание среднего или старшего возраста. При CML характерным признаком является преобладание гранулоцитов на всех стадиях дифференцировки в крови, костном мозге, печени, селезенке и других органах. У пациента с проявлением симптомов при диагностике, общее количество лейкоцитов (WBC) обычно составляет приблизительно 200000/мкл, но может достигать 1000000/мкл. CML относительно просто диагностировать из-за присутствия филадельфийской хромосомы. Хорошо известно, что стромальные клетки костного мозга поддерживают прогрессирование заболевания CLL и устойчивость к химиотерапии. Нарушение взаимодействий между клетками CLL и стромальными клетками является дополнительной мишенью химиотерапии CLL.

Кроме того, другие формы CLL включают пролимфоцитарный лейкоз (PLL), лейкоз больших гранулярных лимфоцитов (LGL), волосатоклеточный лейкоз (HCL). Клетки злокачественных опухолей при PLL являются сходными с нормальными клетками, называемыми пролимфоцитами - незрелыми формами В-лимфоцитов (В-PLL) или Т-лимфоцитов (Т-PLL). Как В-PLL, так и Т-PLL, проявляют тенденцию являться более агрессивными, чем обычный тип CLL. Злокачественные клетки при LGL являются крупными и обладают признаками либо Т-клеток, либо клеток NK. Большинство лейкозов LGL являются медленно растущими, однако, небольшое количество являются более агрессивными. HCL представляет собой другую злокачественную опухоль лимфоцитов, проявляющую тенденцию к медленному прогрессированию, и насчитывающей приблизительно 2% из всех лейкозов.

Злокачественные клетки относятся к типу В-лимфоцитов, но отличаются от злокачественных клеток, наблюдаемых при CLL.

Ювенильный миеломоноцитарный лейкоз (JMML) представляет собой тяжелый хронический лейкоз, поражающий детей в основном в возрасте 4 года и младше. Средний возраст пациентов при постановке диагноза составляет 2 года. Всемирная организация здравоохранения классифицирует JMML как смешанное миелодиспластическое и миелопролиферативное нарушение. JMML охватывает диагнозы, ранее обозначаемые как ювенильный хронический миелоидный лейкоз (JCML), хронический миеломоноцитарный лейкоз у детей и синдром моносомии 7 новорожденных.

Лимфома относится к злокачественным опухолям, происходящим из лимфатической системы. Лимфома характеризуется злокачественной неоплазией лимфоцитов - В-лимфоцитов (В-клеточная лимфома), Т лимфоцитов (Т-клеточная лимфома) и клеток естественных киллеров (лимфома клеток NK). Лимфома, как правило, начинается в лимфатических узлах или скоплениях лимфатической ткани в органах, включая, но без ограничения, желудок или кишечник. Лимфома может затрагивать костный мозг и кровь, в некоторых случаях. Лимфома может распространяться от одного участка к другим частям организма.

Виды лечения различных форм лимфом описаны, например, в патенте США № 7468363, полное содержание которого приведено в настоящем документе в качестве ссылки. Такие лимфомы включают, но без ограничения, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, В-клеточную лимфому кожи, лимфому активированных В-клеток, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), лимфому из клеток мантийной зоны (MCL), фолликулярную лимфому (FL; включая, но без ограничения, FL степени I, FL степени II), лимфому из клеток центра фолликула, трансформированную лимфому, лимфоцитарную лимфому промежуточной степени дифференцировки, промежуточную лимфоцитарную лимфому (ILL), диффузную низкодифференцированную лимфоцитарную лимфому (PDL), центроцитарную лимфому, диффузную лимфому из мелких клеток с расщепленным ядром (DSCCL), периферические Т-клеточные лимфомы (PTCL), Т-клеточную лимфому кожи (CTCL) и лимфому из клеток мантийной зоны, и фолликулярную лимфому низкой степени злокачественности.

Неходжкинская лимфома (NHL) является пятой из наиболее распространенных злокачественных опухолей как у мужчин, так и у женщин, в Соединенных Штатах, по оценкам, с 63190 новых случаев и 18660 смертей в 2007 г. Jemal A, et al., CA Cancer J Clin 2007; 57(1):43-66. Вероятность развития NHL увеличивается с возрастом, и заболеваемость NHL у пожилых стабильно увеличивалась за последнее десятилетие, вызывая опасения относительно тенденции старения популяции США. Id. Clarke CA, et al., Cancer 2002; 94(7):2015-2023.

DLBCL насчитывает приблизительно одну треть из неходжкинских лимфом. В то время как некоторых пациентов с DLBCL излечивают с использованием традиционной химиотерапии, остальные умирают от этого заболевания. Противораковые лекарственные средства вызывают быстрое и стойкое истощение лимфоцитов, возможно, посредством прямой индукции апоптоза в зрелых Т- и В-клетках. См. К.

Stahnke. et al., Blood 2001, 98:3066-3073. Показано, что абсолютное количество лимфоцитов (ALC) является прогностическим фактором при фолликулярной неходжжкинской лимфоме, и недавние результаты позволяют предполагать, что ALC при постановке диагноза является важным прогностическим фактором при DLBCL.

DLBCL можно разделять на отдельные молекулярные подтипы в соответствии с их паттернами получения профилей генов: DLBCL из подобных В-клеткам клеток герминативного центра (GCB-DLBCL), DLBCL из клеток, подобных активированным В-клеткам (ABC-DLBCL) и первичная медиастинальная В-клеточная лимфома (PMBL) или неклассифицированный тип. Эти подтипы характеризуются четко выраженными различиями в выживаемости, способности отвечать на химиотерапию и зависимости от пути передачи сигнала, в частности пути NF-κB. См. D. Kim et al., Journal of Clinical Oncology, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol. 25, No. 18S (June 20 Supplement), 2007: 8082. См. Bea S, et al., Blood 2005; 106: 3183-90; Ngo V.N. et al., Nature 2011; 470: 115-9. Такие различия побудили к поиску более эффективных и специфических для подтипов способов лечения DLBCL. В дополнение к разделению на категории острых и хронических, неоплазии, на основании клеток, дающих начало такому нарушению, разделяют также на категории клеток-предшественников или периферических клеток. См., например, публикацию патента США № 2008/0051379, полное содержание описания которой приведено в настоящем документе в качестве ссылки. Неоплазии клеток-предшественников включают ALL и лимфобластные лимфомы и возникают в лимфоцитах до их дифференцировки либо в Т-, либо в В-клетки. Неоплазии периферических клеток представляют собой неоплазии, возникающие в лимфоцитах, дифференцировавшихся либо в Т-, либо в В-клетки. Такие неоплазии периферических клеток включают, но без ограничения, В-клеточную CLL, В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, лимфоплазматическую лимфому, лимфому из клеток мантийной зоны, фолликулярную лимфому, экстранодальную В-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны лимфоидной ткани слизистых оболочек, нодальную лимфому маргинальной зоны, лимфому маргинальной зоны селезенки, волосатоклеточный лейкоз, плазмацитому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL) и лимфому Беркитта. В более, чем 95 процентах случаев CLL, клональная экспансия происходит в линии В-клеток. См. Cancer: Principles & Practice of Oncology (3rd Edition) (1989) (pp. 1843-1847). В менее чем 5% случаев CLL клетки опухолей обладают Т-клеточным фенотипом. Вне зависимости от этих классификаций, однако, патологическое нарушение нормального гемопоэза является отличительным признаком всех лейкозов.

PTCL состоит из группы редких и, как правило, агрессивных (быстро растущих) NHL, развивающихся из зрелых Т-клеток. PTCL совместно насчитывают приблизительно от 4 до 10% из всех случаев NHL, что соответствует ежегодной заболеваемости 2800-7200 пациенты в год в Соединенных Штатах. По некоторым оценкам заболеваемость PTCL значительно растет, и увеличенная заболеваемость может быть обусловлена стареющей популяцией. PTCL дополнительно классифицируют на различные подтипы, каждый из которых, как правило, рассматривают как отдельное заболевание, на основании их явных клинических различий. Большинство из этих подтипов являются редкими; тремя наиболее распространенными подтипами PTCL являются, без дополнительных уточнений, анапластическая крупноклеточная лимфома, или ALCL, и ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома, которые совместно насчитывают 70% из всех PTCL в Соединенных Штатах. ALCL может представлять собой кожную ALCL или системную ALCL.

Для большинства подтипов PTCL режим терапии первой линии, как правило, представляет собой комбинированную химиотерапию, такую как СНОР (циклофосфамид, доксорубин, винкристин, преднизон), ЕРОСН (этопозид, винкристин, доксорубин, циклофосфамид, преднизон) или другие режимы введения множества лекарственных средств. Пациентов, испытывающих рецидив или невосприимчивых к терапии первой линии, как правило, лечат с использованием гемцитабина в комбинации с другими химиотерапевтическими средствами, включая винорелбин (Навелбин®) и доксорубин (Доксил®), в режиме, называемом GND, или других режимах химиотерапии, таких как DHAP (дексаметазон, цитарабин, цисплатин) или ESHAP (этопозид, метилпреднизолон, цитарабин и цисплатин).

Поскольку большинство пациентов с PTCL могут испытывать рецидив, некоторые онкологи рекомендовали введение высокой дозы химиотерапевтических средств с последующей трансплантацией аутологичных стволовых клеток некоторым пациентам, имевшим хороший ответ на начальную химиотерапию. Недавно нецитотоксические лекарственные средства, одобренные для рецидивирующей или невосприимчивой PTCL, такие как пралатрексат (Фолотин®), ромидеписин (Истодакс®) и белинонат (Белеодакс®), ассоциировали с относительно низкой частотой объективных ответов (общая частота ответа, или ORR, 25-27%) и относительно короткой длительностью ответа (8,2-9,4 месяцев). Соответственно лечение рецидивирующей/невосприимчивой PTCL остается важной неудовлетворенной необходимостью для медицины.

Множественная миелома (ММ) представляет собой злокачественную опухоль плазматических клеток в костном мозге. В норме плазматические клетки продуцируют антитела и играют ключевую роль в иммунной функции. Однако неконтролируемый рост этих клеток приводит к боли и переломам в костях, анемии, инфекциям и другим осложнениям. Множественная миелома является второй из наиболее рас-

пространенных гематологических злокачественных новообразований, хотя точные причины множественной миеломы остаются неизвестными. Множественная миелома вызывает высокие уровни белков в крови, моче и органах, включая, но без ограничения, М-белок и другие иммуноглобулины (антитела), альбумин, и бета-2-микроглобулин. М-белок, сокращение для моноклонального белка, известный также как парапротеин, является особенно аномальным белком, продуцируемым плазматическими клетками миеломы, и его можно обнаружить в крови или моче почти всех пациентов с множественной миеломой.

Связанные со скелетом симптомы, включая боль в костях, присутствуют среди наиболее клинически важных симптомов множественной миеломы. Злокачественные плазматические клетки высвобождают факторы, стимулирующие остеокласты (включая IL-1, IL-6 и TNF), которые вызывают вымывание кальция из костей, вызывающее литические поражения; гиперкальциемия представляет собой другой симптом. Факторы, стимулирующие остеокласты, также обозначаемые как цитокины, могут предотвращать апоптоз или гибель клеток миеломы. Пятьдесят процентов пациентов имеют поддающиеся радиологической детекции связанные с миеломой очаги в скелете при постановке диагноза. Другие распространенные клинические симптомы множественной миеломы включают полиневропатию, анемию, повышенную вязкость крови, инфекции и почечную недостаточность.

Хорошо известно, что стромальные клетки костного мозга поддерживают прогрессирование и устойчивость к химиотерапии заболевания множественной миеломы. Нарушение взаимодействий между клетками множественной миеломы и стромальными клетками является дополнительной мишенью для химиотерапии множественной миеломы.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы прогнозирования способности пациента с MDS отвечать на лечение FTI, способы отбора популяции пациентов с MDS для лечения FTI и способы лечения MDS у субъекта с использованием терапевтически эффективного количества FTI, на основании статуса мутаций Ras в образце от пациента. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы прогнозирования способности пациента с MPN отвечать на лечение FTI, способы отбора популяции пациентов с MDS для лечения FTI и способы лечения MPN у субъекта с использованием терапевтически эффективного количества FTI, на основании статуса мутаций Ras в образце от пациента. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы прогнозирования способности пациента с AML отвечать на лечение FTI, способы отбора популяции пациентов с AML для лечения FTI и способы лечения AML у субъекта с использованием терапевтически эффективного количества FTI, на основании статуса мутаций Ras в образце от пациента. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы прогнозирования способности пациента с JMML отвечать на лечение FTI, способы отбора популяции пациентов с JMML для лечения FTI и способы лечения JMML у субъекта с использованием терапевтически эффективного количества FTI, на основании статуса мутаций Ras в образце от пациента.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы прогнозирования способности пациента с CMML отвечать на лечение FTI, способы отбора популяции пациентов с CMML для лечения FTI и способы лечения CMML у субъекта с использованием терапевтически эффективного количества FTI, на основании статуса мутаций Ras в образце от пациента. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ лечения CMML у субъекта на основании статуса мутаций K-Ras, N-Ras или обоих. Способ, представленный в настоящем документе, включает (а) определение присутствия или отсутствия мутации Ras в образце от субъекта, где мутация Ras включает мутацию K-Ras или мутацию N-Ras, и затем (b) введение терапевтически эффективного количества FTI указанному субъекту, если определено, что в указанном образце отсутствует мутация K-Ras или мутация N-Ras. В некоторых вариантах осуществления определено, что образец не имеет никакой мутации K-Ras или никакой мутации N-Ras. В некоторых вариантах осуществления определено, что образец имеет K-Ras дикого типа. В некоторых вариантах осуществления определено, что образец имеет N-Ras дикого типа. В некоторых вариантах осуществления определено, что образец имеет K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа. В некоторых вариантах осуществления FTI представляет собой типифарниб.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы прогнозирования способности пациента с CMML отвечать на типифарниб, способы отбора популяции пациентов с CMML для лечения типифарнибом и способы лечения CMML у субъекта с использованием терапевтически эффективного количества типифарниба, на основании статуса мутаций K-Ras и N-Ras в образце от пациента. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ лечения CMML у субъекта на основании статуса мутаций K-Ras, N-Ras или обоих. Способ, представленный в настоящем документе, включает (а) определение присутствия или отсутствия мутации Ras в образце от субъекта, имеющего CMML, где мутация Ras включает мутацию K-Ras или мутацию N-Ras, и затем (b) введение терапевтически эффективного количества типифарниба субъекту, если определено, что в образце отсутствует мутация K-Ras или мутация N-Ras. В некоторых вариантах осуществления определено, что образец не имеет никакой мутации K-Ras или никакой мутации N-Ras. В некоторых вариантах осуществления определено, что образец имеет K-Ras дикого типа. В некоторых вариантах осуществления определено, что образец имеет N-Ras дикого типа. В некоторых вариантах осуществления определено, что образец имеет K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа.

4.4. Иллюстративные FTI и дозы.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ лечения злокачественной опухоли у субъекта на основании статуса мутаций K-Ras, N-Ras или обоих. Способ, представленный в настоящем документе, включает (а) определение присутствия или отсутствия мутации Ras в образце от субъекта, где мутация Ras включает мутацию K-Ras или мутацию N-Ras, и затем (б) введение терапевтически эффективного количества типифарниба указанному субъекту, если определено, что в указанном образце отсутствует мутация K-Ras или мутация N-Ras. В некоторых вариантах осуществления определено, что образец имеет K-Ras дикого типа. В некоторых вариантах осуществления определено, что образец имеет N-Ras дикого типа. В некоторых вариантах осуществления определено, что образец имеет K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение субъекту другого FTI, описанного в настоящем документе или иным образом известного в данной области. В некоторых вариантах осуществления FTI выбран из группы, состоящей из типифарниба, арглабина, периллового спирта, лонафарниба (SCH-66336), L778123, L739749, FTI-277, L744832, CP-609,754, R208176, AZD3409 и BMS-214662.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ лечения гематологической злокачественной опухоли у субъекта на основании статуса мутаций K-Ras, N-Ras или обоих. Способ, представленный в настоящем документе, включает (а) определение присутствия или отсутствия мутации Ras в образце от субъекта, где мутация Ras включает мутацию K-Ras или мутацию N-Ras, и затем (б) введение терапевтически эффективного количества типифарниба указанному субъекту, если определено, что в указанном образце отсутствует мутация K-Ras или мутация N-Ras. В некоторых вариантах осуществления определено, что образец имеет K-Ras дикого типа. В некоторых вариантах осуществления определено, что образец имеет N-Ras дикого типа. В некоторых вариантах осуществления определено, что образец имеет K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение субъекту другого FTI, описанного в настоящем документе или иным образом известного в данной области. В некоторых вариантах осуществления FTI выбран из группы, состоящей из типифарниба, арглабина, периллового спирта, лонафарниба (SCH-66336), L778123, L739749, FTI-277, L744832, CP-609,754, R208176, AZD3409 и BMS-214662.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ лечения CMMML у субъекта на основании статуса мутаций K-Ras, N-Ras или обоих. Способ, представленный в настоящем документе, включает (а) определение присутствия или отсутствия мутации Ras в образце от субъекта, где мутация Ras включает мутацию K-Ras или мутацию N-Ras, и затем (б) введение терапевтически эффективного количества типифарниба указанному субъекту, если определено, что в указанном образце отсутствует мутация K-Ras или мутация N-Ras. В некоторых вариантах осуществления определено, что образец имеет K-Ras дикого типа. В некоторых вариантах осуществления определено, что образец имеет N-Ras дикого типа. В некоторых вариантах осуществления определено, что образец имеет K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение субъекту другого FTI, описанного в настоящем документе или иным образом известного в данной области. В некоторых вариантах осуществления FTI выбран из группы, состоящей из типифарниба, арглабина, периллового спирта, лонафарниба (SCH-66336), L778123, L739749, FTI-277, L744832, CP-609,754, R208176, AZD3409 и BMS-214662.

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.

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.

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 циклах лечения. В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят в чередующиеся недели. В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят на сутки 1-7 и 15-21 из 28-суточных циклов лечения. В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят перорально в дозе 900 мг дважды в сутки на сутки 1-7 и 15-21 из 28-суточных циклов лечения.

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 вплоть до 12 циклов. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят перорально в дозе 900 мг дважды в сутки на сутки 1-7 и 15-21 из 28-суточных циклов 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 вплоть до 12 циклов. В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят перорально в дозе 900 мг дважды в сутки на сутки 1-7 и 15-21 из 28-суточных циклов лечения в течение по меньшей мере трех циклов.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения CMML у субъекта с использованием терапевтически эффективного количества типифарниба, на основании статуса мутаций K-Ras в образце от пациента. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ лечения CMML у субъекта, включающий (а) определение наличия в образце от субъекта K-Ras дикого типа и затем (b) введение типифарниба субъекту в дозе 900 мг дважды в сутки на сутки 1-7 и 15-21 из 28-суточных циклов лечения.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения CMML у субъекта с использованием терапевтически эффективного количества типифарниба, на основании статуса мутаций N-Ras в образце от пациента. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ лечения CMML у субъекта, включающий (а) определение наличия в образце от субъекта N-Ras дикого типа и затем (b) введение типифарниба субъекту в дозе 900 мг дважды в сутки на сутки 1-7 и 15-21 из 28-суточных циклов лечения.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения CMML у субъекта с использованием терапевтически эффективного количества типифарниба, на основании статуса мутаций K-Ras и N-Ras в образце от пациента. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ лечения CMML у субъекта, включающий (а) определение наличия в образце от субъекта K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа и затем (b) введение типифарниба субъекту в дозе 900 мг дважды в сутки на сутки 1-7 и 15-21 из 28-суточных циклов лечения.

5. Мутантный H-Ras в качестве биомаркеров для лечения FTI.

5.1. Статус мутации H-ras.

Белок H-ras вовлечен в регуляцию деления клеток в ответ на стимуляцию факторами роста. Факторы роста действуют посредством связывания рецепторов поверхности клеток, пронизывающих плазматическую мембрану клеток. После активации рецепторы стимулируют событие передачи сигнала в цитоплазме, процесс, посредством которого белки и вторичные мессенджеры передают сигналы от внешнего окружения клетки к ядру клетки и инструктируют клетку для роста или деления. H-ras локализован в плазматической мембране и является ранним участником во многих путях передачи сигналов. H-ras действует как молекулярный переключатель включения/выключения - когда он включен, он привлекает и активирует белки, необходимые для прохождения сигнала от рецептора. В конкретных опухолях мутации в H-ras или его вышестоящих эффекторах заставляют его находиться постоянно включенным, что приводит в результате к постоянной активации нижестоящих сигналов роста и пролиферации, которые управляют ростом клеток опухоли. FTI действуют для предотвращения аномального роста и пролиферации клеток, зависящих от этих путей передачи сигналов посредством ингибирования фарнезилирования белка и последующей локализации в мембране H-ras, таким образом, выключая H-ras.

FTI, такие как типифарниб, предотвращают фарнезилирование белка, тип модификации белка, известный как пренилирование, который вместе с другими модификациями белка, обеспечивает локализацию H-ras в мембране, где он может получать и передавать внеклеточные сигналы, вовлеченные в возникновение и развитие злокачественных опухолей. FTI, такие как типифарниб, могут блокировать фарнезилирование и последующую локализацию в мембране H-ras и ингибировать онкогенную, управляемую H-ras, трансформацию *in vitro* и *in vivo*. В то время как K-ras и N-ras сходным образом используют фарнезилирование белка, они могут также использовать родственный путь пренилирования, который также приводит к локализации в мембране. В то же время, локализация в мембране H-ras зависит единственно от фарнезилирования белка.

В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль, подлежащая лечению представленными в настоящем документе способами, может иметь мутации H-ras. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль, подлежащая лечению представленными в настоящем документе способами, может представлять собой солидную опухоль с мутацией H-ras. Сольдная опухоль с мутацией H-ras может представлять собой любую из солидных опухолей, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль может представлять собой рак щитовидной железы, рак головы и шеи, уротелиальные карциномы, рак мочевого пузыря или злокачественные опухоли слюнных желез с мутацией H-ras. Представленные в настоящем документе или иным образом известные в данной области способы можно использовать для определения статуса мутаций гена *ras*. В некоторых вариантах осуществления статус мутаций гена *ras* можно определять в анализе на основе NGS. В некоторых вариантах осуществления статус мутаций гена *ras* можно определять посредством качественного анализа на основе

ПЦР. Качественный анализ на основе ПЦР может являться технически сходным с анализами на основе ПЦР, уже разработанными и одобренными FDA для K-ras. В некоторых вариантах осуществления статус мутаций гена ras можно определять в форме сопутствующей диагностики для лечения FTI, такого как лечение типифарнибом. Сопутствующую диагностику можно проводить в клиническом центре, в котором проводят лечение пациента типифарнибом, или в отдельном центре.

В настоящем документе представлены способы отбора пациентов с злокачественными опухолями для лечения с использованием FTI на основании присутствия мутации H-Ras. Эти способы основаны частично на открытии, что мутация H-Ras ассоциирована с клиническим преимуществом лечения FTI и, таким образом, может быть использована для прогнозирования способности пациента с злокачественной опухолью отвечать на лечение FTI. Соответственно в настоящем документе представлены способы прогнозирования способности пациента с злокачественной опухолью отвечать на лечение FTI, способы отбора популяции пациентов с злокачественной опухолью для лечения FTI и способы лечения злокачественной опухоли у субъекта с использованием терапевтически эффективного количества FTI, на основании присутствия мутации H-Ras в образце от пациента. Злокачественная опухоль может представлять собой гематопозитическую злокачественную опухоль или солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой солидную опухоль.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ лечения злокачественной опухоли у субъекта на основании присутствия мутации H-Ras. Способ, представленный в настоящем документе, включает (a) определение присутствия или отсутствия мутации H-Ras в образце от субъекта и затем (b) введение терапевтически эффективного количества FTI субъекту, если в образце определено наличие мутации H-Ras.

Образец может представлять собой образец опухоли. В некоторых вариантах осуществления способы включают (a) определение наличия у пациента с злокачественной опухолью мутации H-Ras и затем (b) введение терапевтически эффективного количества FTI субъекту.

В некоторых вариантах осуществления мутация H-Ras представляет собой мутацию в кодоне, выбранном из группы, состоящей из G12, G13 и Q61. В некоторых вариантах осуществления мутация H-Ras может представлять собой мутацию, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных замен G12R, G12V, G13C, G13R, Q61L и Q61R. В некоторых вариантах осуществления мутация может представлять собой мутацию в другом кодоне, которая приводит к активации белка H-Ras.

В некоторых вариантах осуществления представленные в настоящем документе способы дополнительно включают (a) определение присутствия или отсутствия мутации K-Ras и мутации N-Ras в образце от субъекта, и затем (b) введение терапевтически эффективного количества FTI субъекту, если образец не имеет мутации K-Ras или мутации N-Ras. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение терапевтически эффективного количества FTI субъекту, если образец имеет K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления мутация K-Ras представляет собой мутацию K_A-Ras. В некоторых вариантах осуществления, мутация K-Ras представляет собой мутацию K_B-Ras. В некоторых вариантах осуществления, мутация K-Ras представляет собой комбинацию 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 обоих. В некоторых вариантах осуществления, мутация K_A-Ras может включать мутацию, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных замен 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 аминокислотных замен 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 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 аминокислотных замен G12C, G12D, G12F, G12S, G12A, G12V, G12R, G13C, G13R, G13A, G13D, G13V, G15W, G60E, Q61P, Q61L, Q61R, Q61K, Q61H и Q61E.

В некоторых вариантах осуществления определено, что образец не имеет аминокислотной замены в G12, G13 и Q61 K-Ras, а также не имеет аминокислотной замены в G12, G13 и Q61 N-Ras. В некоторых вариантах осуществления определено, что образец не имеет никакой мутации K-Ras или никакой мутации N-Ras. В некоторых вариантах осуществления определено, что образец имеет K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления способ, представленный в настоящем документе, включает (a) определение присутствия или отсутствия мутации H-Ras, мутации K-Ras и мутации N-Ras в образце от субъекта и затем (b) введение терапевтически эффективного количества FTI субъекту, если в образце определено наличие мутации H-Ras, но не мутации K-Ras или мутации N-Ras. Образец может представлять собой образец опухоли. В некоторых вариантах осуществления способы включают (a) определение

наличия у пациента с злокачественной опухолью мутации H-Ras и K-Ras дикого типа, и N-Ras дикого типа и затем (b) введение терапевтически эффективного количества FТИ субъекту. В некоторых вариантах осуществления FТИ представляет собой типифарниб.

В настоящем документе представлены способы лечения злокачественной опухоли у субъекта с FТИ и способы отбора пациентов с злокачественными опухолями для лечения FТИ на основании присутствия мутации H-Ras. Злокачественная опухоль может представлять собой гематопозитическую злокачественную опухоль или солидную опухоль. В настоящем документе представлены также способы лечения предзлокачественного состояния у субъекта с использованием FТИ и способы отбора пациентов с предзлокачественным состоянием для лечения FТИ на основании статуса мутации H-Ras.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения злокачественной опухоли у субъекта с использованием FТИ или отбора пациентов с злокачественными опухолями для лечения FТИ на основании присутствия мутации H-Ras. Злокачественная опухоль может представлять собой гематопозитическую злокачественную опухоль или солидную опухоль. Злокачественная опухоль может являться связанной с папилломавирусом человека (HPV+ или положительной по HPV) или не связанной с HPV (HPV- или отрицательной по HPV).

В настоящем документе представлены способы прогнозирования способности пациента с злокачественной опухолью отвечать на лечение FТИ, способы отбора популяции пациентов с злокачественной опухолью для лечения FТИ и способы лечения злокачественной опухоли у субъекта с использованием терапевтически эффективного количества FТИ, на основании присутствия мутации H-Ras в образце от пациента. Статус мутаций H-Ras можно детектировать на уровне нуклеиновой кислоты или белка. В некоторых вариантах осуществления, статус мутаций H-Ras определяют посредством анализа нуклеиновых кислот, полученных из образца. В некоторых вариантах осуществления статус мутаций H-Ras определяют посредством анализа белка, полученного из образца.

В некоторых вариантах осуществления статус мутаций H-Ras определяют посредством анализа нуклеиновых кислот, полученных из образца. Нуклеиновые кислоты могут представлять собой молекулы мРНК или геномной ДНК от тестируемого субъекта. Способы определения статуса мутаций Ras посредством анализа нуклеиновых кислот хорошо известны в данной области. В некоторых вариантах осуществления способы включают секвенирование, полимеразную цепную реакцию (ПЦР), анализ микромассива ДНК, масс-спектрометрию (MS), анализ однонуклеотидного полиморфизма (SNP), денатурирующую высокоэффективную жидкостную хроматографию (DHPLC) или анализ полиморфизма длины фрагментов рестрикции (RFLP). В некоторых вариантах осуществления, статус мутаций Ras определяют с использованием стандартных способов секвенирования, включая, например, секвенирование по Сэнгеру, секвенирование нового поколения (NGS). В некоторых вариантах осуществления статус мутаций Ras определяют с использованием MS.

В некоторых вариантах осуществления статус мутаций H-Ras определяют посредством анализа белка, полученного из образца. Мутантный белок H-Ras можно детектировать посредством множества способов иммуногистохимии (IHC), анализа иммуноблоттинга, твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) или других способов иммуноанализа, известных в данной области.

Как понятно специалисту в данной области, любые способы, описанные в настоящем документе или иным образом известные в данной области для анализа мутации Ras, можно использовать для определения присутствия или отсутствия мутации H-Ras.

5.2. Образцы.

В некоторых вариантах осуществления представленные в настоящем документе способы включают получение образца от субъекта. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец опухоли. В некоторых вариантах осуществления образец, используемый в настоящих способах, включает биоптат (например, биоптат опухоли). Биоптат может происходить из любого органа или ткани, например, кожи, печени, легкого, сердца, ободочной кишки, почки, костного мозга, зубов, лимфатических узлов, волос, селезенки, головного мозга, молочных желез или других органов. Любой способ биопсии, известный специалистам в данной области, можно использовать для выделения образца от субъекта, например, открытую биопсию, закрытую биопсию, толстоигольную биопсию, инцизионную биопсию, эксцизионную биопсию или биопсию тонкоигольной аспирацией.

Образец, используемый в представленных в настоящем документе способах, включает жидкости организма субъекта.

Неограничивающие примеры жидкостей организма включают кровь (например, цельную периферическую кровь, периферическую кровь), плазму крови, костный мозг, амниотическую жидкость, внутриглазную жидкость, желчь, лимфу, менструальные выделения, сыворотку, мочу, спинномозговую жидкость, окружающую головной мозг и спинной мозг, синовиальную жидкость, окружающую суставы костей.

В одном варианте осуществления образец представляет собой образец костного мозга. Способы получения образцов костного мозга хорошо известны в данной области, включая, но без ограничения, биопсию костного мозга и аспирацию костного мозга. Костный мозг имеет жидкую часть и более твердую часть. При биопсии костного мозга, отбирают образец твердой части. При аспирации костного мозга отбирают образец жидкой части. Биопсию костного мозга и аспирацию костного мозга можно выполнять в

одно и то же время и обозначать как исследование костного мозга.

В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец крови. Образец крови можно получать с использованием общепринятых способов, как описано, например, в Innis et al., editors, PCR Protocols (Academic Press, 1990). Лейкоциты можно выделять из образцов крови с использованием общепринятых способов или коммерчески доступных наборов, например набора RosetteSep (Stein Cell Technologies, Vancouver, Canada). Субпопуляции лейкоцитов, например моноклеарные клетки, клетки NK, В-клетки, Т-клетки, моноциты, гранулоциты или лимфоциты, можно далее выделять с использованием общепринятых способов, например активированной магнитным полем сортировки клеток (MACS) (Miltenyi Biotec, Auburn, California) или активированной флуоресценцией сортировки клеток (FACS) (Becton Dickinson, San Jose, California).

В конкретных вариантах осуществления образец, используемый в представленных в настоящем документе способах, включает множество клеток. Такие клетки могут включать любой тип клеток, например стволовые клетки, клетки крови (например, РВМС), лимфоциты, клетки NK, В-клетки, Т-клетки, моноциты, гранулоциты, иммуноциты, или клетки опухолей, или клетки злокачественных опухолей. Специфические популяции клеток можно получать с использованием комбинации коммерчески доступных антител (например, Quest Diagnostic (San Juan Capistrano, Calif.); Dako (Denmark)).

В конкретных вариантах осуществления образец, используемый в представленных в настоящем документе способах, происходит из пораженной заболеванием ткани, например от индивидуума, имеющего злокачественную опухоль (например, рак головы и шеи, опухоль слюнных желез или опухоль щитовидной железы). В некоторых вариантах осуществления клетки можно получать из клеток опухолей или клеток злокачественных опухолей, или тканей опухолей, таких как биоптаты опухолей или эксплантаты опухолей. В конкретных вариантах осуществления, количество клеток, используемое в представленных в настоящем документе способах, может лежать в диапазоне от отдельной клетки до приблизительно 10^9 клеток. В некоторых вариантах осуществления количество клеток, используемое в представленных в настоящем документе способах, 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 .

Количество и тип клеток, собранных от субъекта, можно мониторировать, например, посредством измерения изменений морфологии и поверхностных маркеров клеток с использованием стандартных способов детекции клеток, таких как проточная цитометрия, сортировка клеток, иммуноцитохимия (например, окрашивание с использованием тканеспецифических или специфических для маркера клеток антител) активированная флуоресценцией сортировка клеток (FACS), активированная магнитным полем сортировка клеток (MACS), посредством проверки морфологии клеток с использованием световой или конфокальной микроскопии, и/или посредством измерения изменений экспрессии генов с использованием способов, хорошо известных в данной области, таких как ПЦР и получение профилей экспрессии генов. Эти способы можно использовать также для идентификации клеток, положительных по одному или более конкретным маркерам.

Активированная флуоресценцией сортировка клеток (FACS) представляет собой хорошо известный способ разделения частиц, включая клетки, на основании флуоресцентных свойств частиц (Kamarch, 1987, Methods Enzymol, 151:150-165). Лазерное возбуждение флуоресцентных групп в индивидуальных частицах приводит к небольшому электрическому заряду, позволяющему электромагнитное разделение положительных и отрицательных частиц из смеси. В одном варианте осуществления специфические для поверхностных маркеров клеток антитела или лиганды метят различными флуоресцентными метками. Клетки пропускают через сортировщик клеток, позволяя разделение клеток на основании их способности связывать используемые антитела. Отсортированные посредством FACS частицы можно помещать на хранение непосредственно в индивидуальные лунки 96-луночных или 384-луночных планшетов для облегчения разделения и клонирования.

В конкретных вариантах осуществления подгруппы клеток используют в представленных в настоящем документе способах. Способы сортировки и выделения специфических популяций клеток хорошо известны в данной области и могут быть основаны на размере, морфологии клеток, или внутриклеточных или внеклеточных маркерах. Такие способы включают, но без ограничения, проточную цитометрию, проточную сортировку, FACS, разделение на основе бусин, такое как магнитная сортировка клеток, разделение на основании размера (например, с использованием сита, ряда препятствий или фильтра), сортировку в микроструйном устройстве, разделение на основе антител, осаждение, аффинную адсорбцию, аффинную экстракцию, центрифугирование в градиенте плотности, лазерную захватывающую микродиссекцию и т.д.

5.3. Злокачественные опухоли.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения гематопэтической злокачественной опухоли у субъекта с использованием FTI или отбора пациентов с злокачественными опухолями для лечения FTI на основании присутствия мутации H-Ras. В некоторых вариантах осуществления гематопэтическая злокачественная опухоль является отрицательной по HPV. В некоторых вариантах осуществления способы включают (а) определение у пациента с отрицательной

по HPV гематопозитической злокачественной опухолью наличия мутации H-Ras, и затем (b) введение терапевтически эффективного количества типифарниба пациенту.

Гематологические злокачественные опухоли представляют собой злокачественные опухоли крови или костного мозга. Примеры гематологических (или гематогенных) злокачественных опухолей включают миелопролиферативную неоплазию (MPN), миелодиспластический синдром (MDS), лейкоз и лимфому. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой острый миелоидный лейкоз (AML), лимфому клеток естественных киллеров (NK лимфома), лейкоз клеток естественных киллеров (NK лейкоз), Т-клеточную лимфому кожи (CTCL), ювенильный миеломоноцитарный лейкоз (JMML), периферическую Т-клеточную лимфому (PTCL), хронический миелоидный лейкоз (CML) или хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML). В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой CMML. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой JMML.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения солидной опухоли с использованием FTI на основании присутствия мутации H-Ras. В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль является отрицательной по HPV. В некоторых вариантах осуществления FTI представляет собой типифарниб. В некоторых вариантах осуществления способы включают (a) определение у пациента с отрицательной по HPV солидной опухолью наличия мутации H-Ras и затем (b) введение терапевтически эффективного количества типифарниба пациенту.

Солидные опухоли представляют собой аномальные массы ткани которые обычно не содержат цист или жидких областей. Солидные опухоли могут являться доброкачественными или злокачественными. Различные типы солидных опухолей названы по типу клеток, которые их формируют (такие как саркомы, карциномы и лимфомы). Солидные опухоли, подлежащие лечению способами по изобретению, могут представлять собой саркомы и карциномы, включая фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеосаркому и другие саркомы, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, карциному ободочной кишки, злокачественные новообразования лимфоидной ткани, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак легкого, рак яичника, рак предстательной железы, печеночно-клеточную карциному, плоскоклеточную карциному, базально-клеточную карциному, аденокарциному, карциному потовых желез, карциному щитовидной железы, медуллярную карциному щитовидной железы, папиллярную карциному щитовидной железы, феохромоцитому, карциному слюнной железы, папиллярную карциному, папиллярные аденокарциномы, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, почечноклеточный рак, гепатому, карциномы желчных протоков, хориокарциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, опухоль яичка, семиному, карциному мочевого пузыря, меланому и опухоли ЦНС (такие как глиома (такая как глиома ствола головного мозга и смешанные глиомы), глиобластома (также известная как мультиформная глиобластома) астроцитомы, лимфома ЦНС, герминома, медуллобластома, Шваннома краниофарингиома, эпендимомы, пинеалома, гемангиобластома, невринома слухового нерва, олигодендроглиома, менингиома, нейробластома, ретинобластома и метастазы в головном мозге).

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения солидной опухоли с использованием FTI на основании присутствия мутации H-Ras, где солидная опухоль представляет собой рак щитовидной железы, рак головы и шеи, злокачественные опухоли слюнных желез, злокачественную меланому, карциному надпочечников, карциному молочной железы, почечноклеточный рак, карциному поджелудочной железы, немелкоклеточную карциному легкого (NSCLC) или карциному с неизвестной первичной локализацией. В некоторых вариантах осуществления FTI представляет собой типифарниб. Лекарственные средства, обычно вводимые пациентам с различными типами или стадиями солидных опухолей, включают, но без ограничения, целебрекс, этопозид, циклофосфамид, доцетаксел, апекитабин, IFN, тамоксифен, IL-2, GM-CSF или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль, подлежащая лечению представленными в настоящем документе способами, может представлять собой рак щитовидной железы, рак головы и шеи, уротелиальный рак, злокачественные опухоли слюнных желез, злокачественные опухоли верхних отделов желудочно-кишечного тракта, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак яичника, злокачественная опухоль мозга, рак желудка, рак предстательной железы, рак легкого, рак толстого кишечника, рак кожи, рак печени и рак поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак мочевого пузыря, подлежащий лечению представленными в настоящем документе способами, может представлять собой переходноклеточную карциному. В некоторых вариантах осуществления FTI представляет собой типифарниб.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль, подлежащая лечению представленными в настоящем документе способами, может быть выбрана из группы, состоящей из карциномы, меланомы, саркомы или хронической гранулематозной болезни.

В некоторых вариантах осуществления предзлокачественные состояния, подлежащие лечению представленными в настоящем документе способами, могут представлять собой актинический хейлит, пищевод Барретта, атрофический гастрит, протоковую карциному *in situ*, врожденный дискератоз, сидеропеническую дисфагию, красный плоский лишай, подслизистый фиброз полости рта, солнечный эла-

стоз, цервикальную дисплазию, полипы, лейкоплакию, эритроплакию, плоскоклеточное интраэпителиальное поражение, предзлокачественное нарушение или предзлокачественное иммунопролиферативное нарушение.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения солидной опухоли у субъекта с использованием FTI и способы отбора пациентов с солидной опухолью для лечения FTI на основании присутствия мутации H-Ras у субъекта, где солидная опухоль представляет собой рак щитовидной железы, рак головы и шеи или злокачественную опухоль слюнных желез. В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой рак щитовидной железы. В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой плоскоклеточную карциному головы и шеи (HNSCC). В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой злокачественную опухоль слюнных желез.

Плоскоклеточная карцинома головы и шеи (HNSCC) является шестой из наиболее распространенных злокачественных опухолей во всем мире, с приблизительно 650000 случаев и 200000 смертей в год во всем мире и приблизительно 54000 новых случаев в год в США. Она является также наиболее распространенной злокачественной опухолью в Центральной Азии.

HNSCC имеет 2 различные этиологии и соответствующие типы опухолей. Первый подтип является ассоциированным с табакокурением и употреблением алкоголя и не связанным с папилломавирусом человека (HPV- или отрицательный по HPV). Второй подтип является ассоциированным с инфекцией HPV высокого риска (HPV+ или положительный по HPV). Второй подтип является в большей степени ограниченным злокачественными опухолями ротоглотки. HPV+ опухоли являются отдельной единицей с лучшим прогнозом и могут требовать отличного лечения.

Значительная доля HNSCC, в частности злокачественные опухоли ротоглотки, вызвана инфекцией HPV. HPV высокого риска подтипа 16 насчитывают 85% всех HPV+ опухолей при HNSCC. P16 можно использовать в качестве суррогатного маркера инфекции HPV при HNSCC, в частности в ротоглотке. Более точное тестирование HPV является доступным и основано на детекции E6/E7 (Liang C, et al., Cancer Res. 2012;72:5004-5013).

Для HPV+ HNSCC показаны значительно более низкие уровни экспрессии EGFR, чем для HPV- HNSCC. Амплификация EGFR возникает только в HPV- HNSCC. Высокие количество копий гена EGFR и экспрессия белка являются ассоциированными с плохим клиническим исходом при HNSCC на поздней стадии.

В настоящее время терапия первой линии для рецидивирующей/метастазирующей HNSCC включает двухкомпонентную химиотерапию на основе препаратов 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 (химерное IgG1) или панитумумаб, можно использовать в качестве монотерапии, с химиотерапией (например, платина/5-FU, цисплатин) или с радиотерапией. Несмотря на высокие уровни экспрессии EGFR при HNSCC, частота ответа на цетуксимаб в качестве монотерапии составляет только 13% с частотой SD 33%, и в настоящее время не существует доступного прогностического биомаркера.

Лекарственные средства, находящиеся в разработке для HNSCC, включают лекарственные средства, нацеленные на путь PI3K: BKM120 (бупарлисиб)+цетуксимаб, BYL719+цетуксимаб, темсиролиму+цетуксимаб, ригосертиб+цетуксимаб; лекарственные средства, нацеленные на путь MET: тивантиниб+цетуксимаб, фиклатузумаб+цетуксимаб; лекарственные средства, нацеленные на путь EGFR/HER3: афатиниб+цетуксимаб+паклитаксел, патритумаб; лекарственные средства, нацеленные на путь FGFR: BGJ398; лекарственные средства, нацеленные на путь CDK4/6-клеточного цикла: палбоциклиб, LEE011; ингибитор RTK: анлотиниб и химиотерапия: пероральный азацитидин. Более недавние возможные способы терапии для HNSCC включают иммунотерапию, такую как антитела против PD1 или против PDL1.

В то время как высокой частоты излечения достигали для локализованного и локально-регионального заболевания с использованием хирургии, радиации, химиолучевой терапии и индукционной химиотерапии, доля выживших для рецидивирующих/метастазирующих заболеваний остается очень низкой, и лучшие возможные способы терапии являются необходимыми.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ лечения HNSCC у субъекта на основании присутствия мутации H-Ras. В некоторых вариантах осуществления HNSCC может представлять собой отрицательную по HPV HNSCC. В некоторых вариантах осуществления HNSCC может представлять собой рецидивирующую/повторную HNSCC. В некоторых вариантах осуществления HNSCC может представлять собой метастазирующую HNSCC. Способ, представленный в настоящем документе, включает (а) определение присутствия или отсутствия мутации H-Ras в образце от субъекта, и затем (б) введение терапевтически эффективного количества FTI субъекту, если в образце определено наличие мутации H-Ras. Образец может представлять собой образец опухоли. В некоторых вариантах осуществления способы включают (а) определение у пациента с HNSCC наличия мутации H-Ras и затем (б) введение терапевтически эффективного количества FTI субъекту. В некоторых вариантах осуществления FTI представляет собой типифарниб.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ лечения злокачественной опухоли слюнных желез у субъекта на основании присутствия мутации H-Ras. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль слюнных желез может представлять собой злокачественную опухоль слюнных желез на поздних стадиях. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль слюнных желез может представлять собой метастазирующую злокачественную опухоль слюнных желез. Способ, представленный в настоящем документе, включает (а) определение присутствия или отсутствия мутации H-Ras в образце от субъекта и затем (б) введение терапевтически эффективного количества FTI субъекту, если в образце определено наличие мутации H-Ras. Образец может представлять собой образец опухоли. В некоторых вариантах осуществления способы включают (а) определение у пациента с злокачественной опухолью наличия мутации H-Ras и затем (б) введение терапевтически эффективного количества FTI субъекту. В некоторых вариантах осуществления FTI представляет собой типифарниб.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ лечения рака щитовидной железы у субъекта на основании присутствия мутации H-Ras. В некоторых вариантах осуществления, рак щитовидной железы может представлять собой рецидивирующий/повторный рак щитовидной железы. В некоторых вариантах осуществления рак щитовидной железы может представлять собой метастазирующий рак щитовидной железы. В некоторых вариантах осуществления рак щитовидной железы может представлять собой рак щитовидной железы на поздних стадиях. Способ, представленный в настоящем документе, включает (а) определение присутствия или отсутствия мутации H-Ras в образце от субъекта и затем (б) введение терапевтически эффективного количества FTI субъекту, если в образце определено наличие мутации H-Ras. Образец может представлять собой образец опухоли. В некоторых вариантах осуществления способы включают (а) определение у пациента с HNSCC наличия мутации H-Ras и затем (б) введение терапевтически эффективного количества FTI субъекту. В некоторых вариантах осуществления FTI представляет собой типифарниб.

5.4. Иллюстративные FTI и дозы.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения злокачественной опухоли у субъекта с использованием типифарниба или отбора пациентов с злокачественными опухолями для лечения типифарнибом на основании присутствия мутации H-Ras. В некоторых вариантах осуществления способы включают лечение субъекта с использованием другого FTI, описанного в настоящем документе или иным образом известного в данной области. В некоторых вариантах осуществления FTI выбран из группы, состоящей из типифарниба, арглабина, периллового спирта, лонафарниба (SCH-66336), L778123, L739749, FTI-277, L744832, CP-609,754, R208176, AZD3409 и BMS-214662.

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.

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.

В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в циклах лечения. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят в чередующиеся недели. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят на сутки 1-7 и 15-21 из 28-суточных циклов лечения. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят перорально в дозе 900 мг дважды в сутки на сутки 1-7 и 15-21 из 28-суточных циклов лечения. В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят в циклах лечения. В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят в чередующиеся недели. В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят на сутки 1-7 и 15-21 из 28-суточных циклов лечения. В некоторых вариантах осуществления типифарниб вводят перорально в дозе 900 мг дважды в сутки на сутки 1-7 и 15-21 из 28-суточных циклов лечения.

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 вплоть до 12 циклов. В некоторых вариантах осуществления FTI вводят перорально в дозе 900 мг дважды в сутки на сутки 1-7 и 15-21 из 28-суточных циклов 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 вплоть до 12 циклов. В некоторых вариантах осуществления, типифарниб вводят перорально в дозе 900 мг дважды в сутки на сутки 1-7 и 15-21 из 28-суточных циклов лечения в течение по меньшей мере трех циклов.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ лечения HNSCC у субъекта с использованием типифарниба на основании присутствия мутации H-Ras. В некоторых вариантах осуществления HNSCC может представлять собой отрицательную по HPV HNSCC. В некоторых вариантах осуществления HNSCC может представлять собой рецидивирующую/повторную HNSCC. В некоторых вариантах осуществления HNSCC может представлять собой метастазирующую HNSCC. Способ, представленный в настоящем документе, включает (а) определение присутствия или отсутствия мутации H-Ras в образце от субъекта и затем (б) введение терапевтически эффективного количества типифарниба субъекту, если в образце определено наличие мутации H-Ras. Образец может представлять собой образец опухоли. В некоторых вариантах осуществления способы включают (а) определение у пациента с HNSCC наличия мутации H-Ras и затем (б) введение терапевтически эффективного количества типифарниба субъекту.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ лечения злокачественной опухоли слюнных желез у субъекта с использованием типифарниба на основании присутствия мутации H-Ras. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль слюнных желез может представлять собой злокачественную опухоль слюнных желез на поздних стадиях. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль слюнных желез может представлять собой метастазирующую злокачественную опухоль слюнных желез. Способ, представленный в настоящем документе, включает (а) определение присутствия или отсутствия мутации H-Ras в образце от субъекта и затем (б) введение терапевтически эффективного количества типифарниба субъекту, если в образце определено наличие мутации H-Ras. Образец может представлять собой образец опухоли. В некоторых вариантах осуществления способы включают (а) определение у пациента с злокачественной опухолью слюнных желез наличия мутации H-Ras и затем (б) введение терапевтически эффективного количества типифарниба субъекту. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение субъекту другого FTI, описанного в настоящем документе или иным образом известного в данной области. В некоторых вариантах осуществления FTI выбран из группы, состоящей из типифарниба, арглабина, периллового спирта, лонафарниба (SCH-66336), L778123, L739749, FTI-277, L744832, CP-609,754, R208176, AZD3409, и BMS-214662.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ лечения рака щитовидной железы у субъекта с использованием типифарниба на основании присутствия мутации H-Ras. В некоторых вариантах осуществления рак щитовидной железы может представлять собой рецидивирующий/повторный рак щитовидной железы. В некоторых вариантах осуществления рак щитовидной железы может представлять собой метастазирующий рак щитовидной железы. В некоторых вариантах осуществления рак щитовидной железы может представлять собой рак щитовидной железы на поздних стадиях. Способ, представленный в настоящем документе, включает (а) определение присутствия или отсутствия мутации H-Ras в образце от субъекта, и затем (б) введение терапевтически эффективного количества типифарниба субъекту, если в образце определено наличие мутации H-Ras. Образец может представлять собой образец опухоли. В некоторых вариантах осуществления способы включают (а) определение у пациента с HNSCC наличия мутации H-Ras и затем (б) введение терапевтически эффективного количества типифарниба субъекту. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение субъекту другого FTI, описанного в настоящем документе или иным образом известного в данной области. В некоторых вариантах осуществления FTI выбран из группы, состоящей из типифарниба, арглабина, периллового спирта, лонафарниба (SCH-66336), L778123, L739749, FTI-277, L744832, CP-609,754, R208176, AZD3409 и BMS-214662.

В некоторых вариантах осуществления способы включают (а) определение у пациента с HNSCC наличия мутации H-Ras и затем (б) введение типифарниба субъекту, где типифарниб вводят перорально в дозе 900 мг дважды в сутки на сутки 1-7 и 15-21 из 28-суточных циклов лечения. В некоторых вариантах осуществления пациент с HNSCC имеет рецидивирующую/невосприимчивую HNSCC. В некоторых вариантах осуществления пациент с HNSCC имеет отрицательную по HPV HNSCC.

В некоторых вариантах осуществления способы включают (а) определение у пациента с злокачественной опухолью слюнных желез наличия мутации H-Ras и затем (б) введение типифарниба субъекту, где типифарниб вводят перорально в дозе 900 мг дважды в сутки на сутки 1-7 и 15-21 из 28-суточных циклов лечения.

В некоторых вариантах осуществления способы включают (а) определение у пациента с раком щитовидной железы наличия мутации H-Ras и затем (б) введение типифарниба субъекту, где типифарниб вводят перорально в дозе 900 мг дважды в сутки на сутки 1-7 и 15-21 из 28-суточных циклов лечения.

В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают введение второго лекарственного средства пациенту, имеющему солидную опухоль с мутацией H-Ras. В некоторых вариантах осуществления второе лекарственное средство представляет собой химиотерапевтическое средство, такое как цисплатин, 5-FU, карбоплатин, паклитаксел или двухкомпонентная химиотерапия на основе препаратов платины (например, цисплатин/5-FU или карбоплатин/паклитаксел). В некоторых вариантах осуществления второе лекарственное средство представляет собой терапию антителом против EGFR (например, цетуксимаб, панитумумаб, афатиниб). В некоторых вариантах осуществления второе лекар-

ственное средство представляет собой таксаны, метотрексат и/или цетуксимаб. В некоторых вариантах осуществления второе лекарственное средство представляет собой радиотерапию. В некоторых вариантах осуществления второе лекарственное средство включает лекарственные средства, нацеленные на путь PI3K: BKM120 (бупарлисиб)+цетуксимаб, BYL719+цетуксимаб, темсиролимус+цетуксимаб, ригосертиб+цетуксимаб; лекарственные средства, нацеленные на путь MET: тивантиниб+цетуксимаб, фиклагузумаб+цетуксимаб; лекарственные средства, нацеленные на путь EGFR/HER3 афатиниб+цетуксимаб+паклитаксел, патритумаб; лекарственные средства, нацеленные на путь FGFR: BGJ398; лекарственные средства, нацеленные на путь CDK4/6-клеточного цикла: палбоциклиб, LEE011; ингибитор RTK: анлотиниб и химиотерапия: пероральный азацитидин. В некоторых вариантах осуществления второе лекарственное средство представляет собой иммунотерапию, такую как антитела против PD1 или против PDL1.

Некоторые варианты осуществления заявленного изобретения состоят в следующем.

1. Способ лечения солидной опухоли у субъекта, включающий
 - (a) определение присутствия или отсутствия мутации N-Ras в образце от указанного субъекта и затем
 - (b) введение терапевтически эффективного количества ингибитора фарнезилтрансферазы (FTI) указанному субъекту, если определено, что указанный образец имеет мутацию N-Ras.
2. Способ по п.1, где указанная мутация N-Ras содержит аминокислотную замену в кодоне, выбранном из группы, состоящей из G12, G13, Q61 и любой их комбинации.
3. Способ по п.1 или 2, дополнительно включающий определение присутствия или отсутствия мутации K-Ras или мутации N-Ras, где указанный образец не имеет мутации K-Ras или мутации N-Ras.
4. Способ по п.3, где указанный образец имеет K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа.
5. Способ по любому из пп.1-4, где указанный образец представляет собой биоптат ткани.
6. Способ по любому из пп.1-4, где указанный образец представляет собой биоптат опухоли.
7. Способ по любому из пп.1-6, где определение присутствия или отсутствия мутации Ras включает анализ нуклеиновых кислот, полученных из указанного образца.
8. Способ по п.7, где указанную мутацию Ras определяют посредством секвенирования, полимеразной цепной реакции (ПЦР), анализа микромассива ДНК, масс-спектрометрии (MS), анализа однонуклеотидного полиморфизма (SNP), денатурирующей высокоэффективной жидкостной хроматографии (DHPLC) или анализа полиморфизма длины фрагментов рестрикции (RFLP).
9. Способ по п.8, где мутацию Ras определяют посредством ПЦР.
10. Способ по п.8, где мутацию Ras определяют посредством секвенирования.
11. Способ по любому из пп.1-6, где определение присутствия или отсутствия мутации Ras включает анализ белков, полученных из указанного образца.
12. Способ по любому из пп.1-11, где указанная злокачественная опухоль представляет собой гематологическую злокачественную опухоль или солидную опухоль.
13. Способ по п.12, где указанная злокачественная опухоль является отрицательной по HPV.
14. Способ по п.12, где указанная злокачественная опухоль находится на поздних стадиях или является метастазирующей.
15. Способ по п.12, где указанная злокачественная опухоль представляет собой солидную опухоль, выбранную из группы, состоящей из гепатоклеточной карциномы, рака головы и шеи, опухоли слюнных желез, опухоли щитовидной железы, уротелиального рака, рака молочной железы, меланомы, рака желудка, рака поджелудочной железы и рака легкого.
16. Способ по п.13, где указанная злокачественная опухоль представляет собой рак головы и шеи.
17. Способ по п.16, где указанный рак головы и шеи представляет собой плоскоклеточную карциному головы и шеи (HNSCC).
18. Способ по п.17, где HNSCC представляет собой отрицательную по HPV HNSCC.
19. Способ по п.17 или 18, где указанная HNSCC представляет собой рецидивирующую/невосприимчивую HNSCC.
20. Способ по п.13, где указанная злокачественная опухоль представляет собой опухоль слюнных желез.
21. Способ по п.20, где указанная опухоль слюнных желез представляет собой опухоль слюнных желез на поздних стадиях.
22. Способ по п.13, где указанная злокачественная опухоль представляет собой опухоль щитовидной железы.
23. Способ по п.21, где указанная опухоль щитовидной железы представляет собой злокачественную опухоль щитовидной железы или опухоль щитовидной железы на поздних стадиях.
24. Способ по п.12, где злокачественная опухоль представляет собой гематологическую злокачественную опухоль, выбранную из группы, состоящей из миелопролиферативной неоплазии (MPN), миелодиспластического синдрома (MDS), хронического миеломоноцитарного лейкоза (CMML), острого миелоидного лейкоза (AML), лимфомы клеток естественных киллеров (лимфомы NK), лейкоза клеток естественных киллеров (лейкоза NK), Т-клеточной лимфомы кожи (CTCL), периферической Т-клеточной лимфомы (PTCL) и хронического миелоидного лейкоза (CML).

25. Способ лечения злокачественной опухоли щитовидной железы у субъекта, включающий
 - (a) определение присутствия или отсутствия мутации H-Ras в образце опухоли щитовидной железы у указанного субъекта и затем
 - (b) введение терапевтически эффективного количества типифарниба указанному субъекту, если определено, что указанный образец имеет мутацию H-Ras.
26. Способ лечения HNSCC у субъекта, включающий
 - (a) определение присутствия или отсутствия мутации H-Ras в образце HNSCC у указанного субъекта, и затем (b) введение терапевтически эффективного количества типифарниба указанному субъекту если определено, что указанный образец имеет мутацию H-Ras.
27. Способ лечения опухоли слюнных желез у субъекта, включающий
 - (a) определение присутствия или отсутствия мутации H-Ras в образце указанной опухоли слюнных желез у указанного субъекта и затем
 - (b) введение терапевтически эффективного количества типифарниба указанному субъекту, если определено, что указанный образец имеет мутацию H-Ras.
28. Способ лечения злокачественной опухоли у субъекта, включающий
 - (a) определение присутствия или отсутствия мутации Ras в образце от указанного субъекта, где указанная мутация Ras содержит мутацию K-Ras или мутацию N-Ras, и затем
 - (b) введение терапевтически эффективного количества ингибитора фARNЕзилтрансферазы (FTI) указанному субъекту, если определяют, что в указанном образце отсутствует указанная мутация K-Ras или указанная мутация N-Ras.
29. Способ по п.28, где указанная мутация Ras содержит мутацию K-Ras.
30. Способ по п.28, где указанная мутация Ras содержит мутацию N-Ras.
31. Способ по п.28, где указанная мутация Ras содержит мутацию K-Ras и мутацию N-Ras.
32. Способ по любому из пп.28-31, где указанная мутация K-Ras содержит аминокислотную замену в кодоне, выбранном из группы, состоящей из G12, G13, Q61 и любой их комбинации.
33. Способ по любому из пп.28-31, где указанная мутация N-Ras содержит аминокислотную замену в кодоне, выбранном из группы, состоящей из G12, G13, Q61 и любой их комбинации.
34. Способ по любому из пп.28-33, где указанная мутация Ras содержит аминокислотную замену в G12, G13 и Q61 в мутации K-Ras; и аминокислотную замену в G12, G13 и Q61 в мутации N-Ras.
35. Способ по любому из пп.28-33, где указанный образец не имеет мутации K-Ras или мутации N-Ras.
36. Способ по п.35, где указанный образец имеет K-Ras дикого типа.
37. Способ по п.35, где указанный образец имеет N-Ras дикого типа.
38. Способ по п.35, где указанный образец имеет K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа.
39. Способ по любому из пп.28-38, где указанная мутация Ras дополнительно содержит мутацию H-Ras, и определено, что указанный образец имеет указанную мутацию H-Ras.
40. Способ по п.39, где указанная мутация H-Ras содержит аминокислотную замену в кодоне, выбранном из группы, состоящей из G12, G13, Q61 и любой их комбинации.
41. Способ по любому из пп.28-40, где указанный образец представляет собой биоптат ткани.
42. Способ по любому из пп.28-40, где указанный образец представляет собой биоптат опухоли.
43. Способ по любому из пп.28-40, где указанный образец представляет собой образец крови, образец сыворотки или образец костного мозга.
44. Способ по любому из пп.28-43, где определение присутствия или отсутствия мутации Ras включает анализ нуклеиновых кислот, полученных из указанного образца.
45. Способ по п.44, где указанную мутацию Ras определяют посредством секвенирования, полимеразной цепной реакции (ПЦР), анализа микромассива ДНК, масс-спектрометрии (MS), анализа однонуклеотидного полиморфизма (SNP), денатурирующей высокоэффективной жидкостной хроматографии (DHPLC) или анализа полиморфизма длины фрагментов рестрикции (RFLP).
46. Способ по п.45, где мутацию Ras определяют посредством ПЦР.
47. Способ по п.45, где мутацию Ras определяют посредством секвенирования.
48. Способ по любому из пп.28-43, где определение присутствия или отсутствия мутации Ras включает анализ белков, полученных из указанного образца.
49. Способ по любому из пп.28-48, где указанная злокачественная опухоль представляет собой миелопролиферативную неоплазию (MPN), миелодиспластический синдром (MDS), хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML), острый миелоидный лейкоз (AML), лимфому клеток естественных киллеров (лимфому NK), лейкоз клеток естественных киллеров (лейкоз NK), Т-клеточную лимфому кожи (CTCL), периферическую Т-клеточную лимфому (PTCL), хронический миелоидный лейкоз (CML) или солидную опухоль.
50. Способ по п.49, где указанная злокачественная опухоль представляет собой MDS.
51. Способ по п.50, где указанный MDS представляет собой MDS с более низким риском.
52. Способ по п.49, где указанная злокачественная опухоль представляет собой CMML.
53. Способ по п.52, где указанный CMML представляет собой CMML с низким риском или CMML

с промежуточным риском.

54. Способ по п.52, где указанный CMML представляет собой миелодиспластический CMML или миелопролиферативный CMML.

55. Способ по п.49, где указанная злокачественная опухоль представляет собой AML.

56. Способ по п.55, где указанный субъект представляет собой субъекта после индукции ремиссии или после трансплантации.

57. Способ по п.55, где указанный субъект имеет возраст более 60 лет или по иным причинам не подходит для индукции ремиссии.

58. Способ по п.49, где указанная злокачественная опухоль представляет собой солидную опухоль, выбранную из группы, состоящей из гепатоклеточной карциномы, рака головы и шеи, опухоли слюнных желез, опухоли щитовидной железы, рака молочной железы, меланомы, рака желудка, рака поджелудочной железы и рака легкого.

59. Способ лечения CMML у субъекта, включающий

(a) определение того, что указанный субъект имеет K-Ras дикого типа, и затем

(b) введение терапевтически эффективного количества типифарниба указанному субъекту.

60. Способ лечения CMML у субъекта, включающий

(a) определение того, что указанный субъект имеет N-Ras дикого типа, и затем

(b) введение терапевтически эффективного количества типифарниба указанному субъекту.

61. Способ лечения CMML у субъекта, включающий

(a) определение того, что указанный субъект имеет K-Ras дикого типа и N-Ras дикого типа, и затем

(b) введение терапевтически эффективного количества типифарниба указанному субъекту.

62. Способ лечения злокачественной опухоли у субъекта, включающий

(a) типирование KIR у указанного субъекта, где указанный субъект является носителем KIR2DS2 или KIR2DS5, и

(b) введение терапевтически эффективного количества FTI указанному субъекту.

63. Способ по п.62, где указанный субъект является носителем KIR2DS2.

64. Способ по п.62, где указанный субъект является носителем KIR2DS5.

65. Способ по любому из пп.62-64, дополнительно включающий типирование HLA у указанного субъекта, где указанный субъект является носителем HLA-C2.

66. Способ по п.65, где указанный субъект является носителем KIR2DS2 и HLA-C2.

67. Способ по п.65 или 66, где указанный носитель HLA-C2 является гомозиготным по HLA-C2.

68. Способ по любому из пп.62-67, где типирование KIR включает определение присутствия гена KIR в образце от указанного субъекта, где указанный ген KIR выбран из группы, состоящей из KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5 и KIR2DL5.

69. Способ по любому из пп.62-67, где типирование KIR и типирование HLA проводят посредством секвенирования, полимеразной цепной реакции (ПЦР), анализа микромассива ДНК, масс-спектрометрии (MS), анализа однонуклеотидного полиморфизма (SNP), анализа иммуноблоттинга или твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

70. Способ по п.69, где типирование KIR проводят посредством анализа SNP с использованием MS.

71. Способ по любому из пп.68-70, где указанный образец представляет собой образец крови или образец костного мозга.

72. Способ по любому из пп.68-70, где указанный образец представляет собой мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC).

73. Способ по любому из пп.68-70, где указанный образец является обогащенным клетками NK.

74. Способ лечения злокачественной опухоли у субъекта, включающий

(a) определение уровня экспрессии биомаркера, выбранного из группы, состоящей из KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 и GZMM в образце от указанного субъекта, где

(i) уровень экспрессии KIR2DS2 в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS2;

(ii) уровень экспрессии KIR2DL2 в образце ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL2;

(iii) уровень экспрессии KIR2DS5 в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS5;

(iv) уровень экспрессии KIR2DL5 в образце ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL5;

или

(v) уровень экспрессии GZMM в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии GZMM; и

(b) введение терапевтически эффективного количества FTI указанному субъекту.

75. Способ лечения злокачественной опухоли у субъекта, включающий

(a) определение уровней экспрессии KIR2DS2 и KIR2DL2, или KIR2DS5 и KIR2DL5 в образце от указанного субъекта, где

(i) отношение уровня экспрессии KIR2DS2 к уровню экспрессии KIR2DL2 в образце выше, чем эталонное отношение; или

(ii) отношение уровня экспрессии KIR2DS5 к уровню экспрессии KIR2DL5 в образце выше, чем эталонное отношение; и

(b) введение терапевтически эффективного количества FTI указанному субъекту.

76. Способ по п.74, включающий определение уровня экспрессии KIR2DS2, где уровень экспрессии KIR2DS2 в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS2.

77. Способ по п.74, включающий определение уровня экспрессии KIR2DL2, где уровень экспрессии KIR2DL2 в образце ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL2.

78. Способ по п.74, включающий определение уровня экспрессии KIR2DS5, где уровень экспрессии KIR2DS5 в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS5.

79. Способ по п.74, включающий определение уровня экспрессии KIR2DL5, где уровень экспрессии KIR2DL5 в образце ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL5.

80. Способ по п.74, включающий определение уровня экспрессии GZMM, где уровень экспрессии GZMM в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии GZMM.

81. Способ по п.75, включающий определение уровней экспрессии KIR2DS2 и KIR2DL2, где отношение уровня экспрессии KIR2DS2 к уровню экспрессии KIR2DL2 в образце выше, чем эталонное отношение.

82. Способ по п.75, включающий определение уровней экспрессии KIR2DS5 и KIR2DL5, где отношение уровня экспрессии KIR2DS5 к уровню экспрессии KIR2DL5 в образце выше, чем эталонное отношение.

83. Способ по любому из пп.74-82, где указанный образец представляет собой образец крови или образец костного мозга.

84. Способ по любому из пп.74-82, где указанный образец представляет собой PBMC.

85. Способ по любому из пп.74-82, где указанный образец является обогащенным клетками NK.

86. Способ по любому из пп.74-85, где указанный уровень экспрессии биомаркера измеряют посредством определения уровня белка указанного биомаркера.

87. Способ по п.86, где уровень белка указанного биомаркера определяют с использованием способа иммуногистохимии (ИHC), анализа иммуноблоттинга, проточной цитометрии (FACS) или ELISA.

88. Способ по п.86, включающий приведение образца в контакт с антителом, которое иммуноспецифически связывается с указанным белком биомаркера.

89. Способ по любому из пп.74-85, где указанный уровень экспрессии биомаркера измеряют посредством определения уровня РНК указанного биомаркера.

90. Способ по п.89, где уровень мРНК указанного биомаркера измеряют с использованием q ПЦР, RT-ПЦР, РНК-секвенирования, анализа микромассивов, SAGE, способа MassARRAY или FISH.

91. Способ по любому из пп.62-90, где указанная злокачественная опухоль представляет собой острый миелоидный лейкоз (AML), миелодиспластический синдром (MDS), хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML), лимфому клеток естественных киллеров (лимфому NK), лейкоз клеток естественных киллеров (NK лейкоз), Т-клеточную лимфому кожи (CTCL), периферическую Т-клеточную лимфому (PTCL), хронический миелоидный лейкоз (CML) или солидную опухоль.

92. Способ по п.91, где указанная злокачественная опухоль представляет собой AML.

93. Способ по п.92, где указанный субъект представляет собой субъекта после индукции ремиссии или после трансплантации.

94. Способ по п.92, где указанный субъект имеет возраст более 60 лет или по иным причинам не подходит для индукция ремиссии.

95. Способ по п.91, где указанная злокачественная опухоль представляет собой MDS.

96. Способ по п.95, где указанный MDS представляет собой MDS с низким риском, MDS с промежуточным риском или MDS с высоким риском.

97. Способ по п.95, где указанный MDS представляет собой MDS с более низким риском.

98. Способ по п.91, где указанная злокачественная опухоль представляет собой CMML.

99. Способ по п.98, где указанный CMML представляет собой CMML с низким риском или CMML с промежуточным риском.

100. Способ по п.98, где указанный CMML представляет собой миелодиспластический CMML или миелопролиферативный CMML.

101. Способ по п.98, где указанный CMML представляет собой CMML с NRAS/KRAS дикого типа.

102. Способ по п.91, где указанная злокачественная опухоль представляет собой лимфому NK или лейкоз NK.

103. Способ по п.91, где указанная злокачественная опухоль представляет собой CTCL или PTCL.

104. Способ по п.91, где указанная злокачественная опухоль представляет собой солидную опухоль, выбранную из группы, состоящей из гепатоклеточной карциномы, рака головы и шеи, опухоли слюнных желез, опухоли щитовидной железы, рака молочной железы, меланомы, рака желудка, рака поджелудочной железы и рака легкого.

105. Способ лечения MDS у субъекта, включающий (а) типирование KIR у указанного субъекта, где указанный субъект является носителем KIR2DS2 или KIR2DS5, и (b) введение терапевтически эффективного количества типифарниба указанному субъекту.

106. Способ по п.105, дополнительно включающий типирование HLA у указанного субъекта, где указанный субъект является носителем HLA-C2.

107. Способ по п.106, где указанный субъект является носителем KIR2DS2 и HLA-C2.
108. Способ по п.106 или 107, где указанный носитель HLA-C2 является гомозиготным по HLA-C2.
109. Способ лечения MDS у субъекта, включающий
- (a) определение уровня экспрессии биомаркера, выбранного из группы, состоящей из KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 и GZMM, в образце от указанного субъекта, где
 - (i) уровень экспрессии KIR2DS2 в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS2;
 - (ii) уровень экспрессии KIR2DL2 в образце ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL2;
 - (iii) уровень экспрессии KIR2DS5 в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS5;
 - (iv) уровень экспрессии KIR2DL5 в образце ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL5;
 - или
 - (v) уровень экспрессии GZMM в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии GZMM; и
 - (b) введение терапевтически эффективного количества типифарниба указанному субъекту.
110. Способ лечения MDS у субъекта, включающий
- (a) определение уровней экспрессии KIR2DS2 и KIR2DL2, или KIR2DS5 и KIR2DL5 в образце от указанного субъекта, где
 - (i) отношение уровня экспрессии KIR2DS2 к уровню экспрессии KIR2DL2 в образце выше, чем эталонное отношение; или
 - (ii) отношение уровня экспрессии KIR2DS5 к уровню экспрессии KIR2DL5 в образце выше, чем эталонное отношение; и
 - (b) введение терапевтически эффективного количества типифарниба указанному субъекту.
111. Способ отбора пациента с злокачественной опухолью для лечения FTI, включающий
- (a) типирование KIR у указанного пациента с злокачественной опухолью, где указанный пациент с злокачественной опухолью является носителем KIR2DS2 или KIR2DS5, и
 - (b) введение терапевтически эффективного количества FTI указанному пациенту с злокачественной опухолью.
112. Способ по п.111, дополнительно включающий типирование HLA у указанного субъекта, где указанный субъект является носителем HLA-C2.
113. Способ по п.112, где указанный субъект является носителем KIR2DS2 и HLA-C2.
114. Способ по п.112 или 113, где указанный носитель HLA-C2 является гомозиготным по HLA-C2.
115. Способ отбора пациента с злокачественной опухолью для лечения FTI, включающий
- (a) определение уровня экспрессии биомаркера, выбранного из группы, состоящей из KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 и GZMM, в образце от указанного субъекта, где
 - (i) уровень экспрессии KIR2DS2 в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS2;
 - (ii) уровень экспрессии KIR2DL2 в образце ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL2;
 - (iii) уровень экспрессии KIR2DS5 в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS5;
 - (iv) уровень экспрессии KIR2DL5 в образце ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL5;
 - или
 - (v) уровень экспрессии GZMM в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии GZMM; и
 - (b) введение терапевтически эффективного количества FTI указанному субъекту.
116. Способ отбора пациента с злокачественной опухолью для лечения FTI, включающий
- (a) определение уровней экспрессии KIR2DS2 и KIR2DL2, или KIR2DS5 и KIR2DL5 в образце от указанного субъекта, где
 - (i) отношение уровня экспрессии KIR2DS2 к уровню экспрессии KIR2DL2 в образце выше, чем эталонное отношение; или
 - (ii) отношение уровня экспрессии KIR2DS5 к уровню экспрессии KIR2DL5 в образце выше, чем эталонное отношение; и
 - (b) введение терапевтически эффективного количества FTI указанному субъекту.
117. Способ ингибирования активности клеток NK у субъекта, включающий
- (a) типирование KIR у указанного субъекта, где указанный субъект является носителем KIR2DS2 или KIR2DS5, и
 - (b) введение терапевтически эффективного количества FTI указанному субъекту.
118. Способ по п.117, дополнительно включающий типирование HLA у указанного субъекта, где указанный субъект является носителем HLA-C2.
119. Способ ингибирования активности клеток NK у субъекта, включающий
- (a) определение уровня экспрессии биомаркера, выбранного из группы, состоящей из KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 и GZMM, в образце от указанного субъекта, где
 - (i) уровень экспрессии KIR2DS2 в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS2;
 - (ii) уровень экспрессии KIR2DL2 в образце ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL2;
 - (iii) уровень экспрессии KIR2DS5 в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS5;
 - (iv) уровень экспрессии KIR2DL5 в образце ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL5;
 - или
 - (v) уровень экспрессии GZMM в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии GZMM; и

- (b) введение терапевтически эффективного количества FTI указанному субъекту.
120. Способ ингибирования активности клеток NK у субъекта, включающий
- (a) определение уровней экспрессии KIR2DS2 и KIR2DL2 или KIR2DS5 и KIR2DL5 в образце от указанного субъекта, где
- (i) отношение уровня экспрессии KIR2DS2 к уровню экспрессии KIR2DL2 в образце от указанного субъекта выше, чем эталонное отношение; или
- (ii) отношение уровня экспрессии KIR2DS5 к уровню экспрессии KIR2DL5 в образце от указанного субъекта выше, чем эталонное отношение; и
- (b) введение терапевтически эффективного количества FTI указанному субъекту.
121. Способ по любому из пп.1-120, где FTI выбран из группы, состоящей из типифарниба, арглабина, периллового спирта, лонафарниба (SCH-66336), L778123, L739749, FTI-277, L744832, CP-609,754, R208176, AZD3409 и BMS-214662.
122. Способ по п.121 где FTI представляет собой типифарниб.
123. Способ по любому из пп.1-122, где FTI вводят перорально, парентерально, ректально или местно.
124. Способ по любому из пп.1-123, где FTI вводят в дозе 1-1000 мг/кг массы тела.
125. Способ по любому из пп.1-124, где FTI вводят дважды в сутки.
126. Способ по п.125, где FTI вводят в дозе 200-1200 мг дважды в сутки.
127. Способ по п.125, где FTI вводят в дозе 600 мг дважды в сутки.
128. Способ по п.125, где FTI вводят в дозе 900 мг дважды в сутки.
129. Способ по любому из пп.1-128, где FTI вводят в течение периода от одного до семи суток.
130. Способ по любому из пп.1-129, где FTI вводят в чередующиеся недели.
131. Способ по любому из пп.1-130, где FTI вводят на сутки 1-7 и 15-21 из 28-суточных циклов лечения.
132. Способ по п.131, где FTI вводят в течение по меньшей мере 3 циклов.
133. Способ по п.131, где FTI вводят в течение по меньшей мере 6 циклов.
134. Способ по п.131, где указанный цикл лечения продолжают вплоть до 12 месяцев.
135. Способ по п.132, где типифарниб вводят перорально в дозе 900 мг дважды в сутки на сутки 1-7 и 15-21 из 28-суточных циклов лечения.
136. Способ по любому из пп.1-135, где FTI вводят до, во время или после облучения.
137. Способ по любому из пп.1-135, дополнительно включающий введение терапевтически эффективного количества второго действующего вещества или поддерживающую терапию.
138. Способ по п.137, где указанное второе действующее вещество представляет собой гипометилирующее ДНК средство, терапевтическое антитело, специфически связывающее антиген злокачественной опухоли, гематопоезический фактор роста, цитокин, противораковое средство, антибиотик, ингибитор сох-2, иммуномодулирующее средство, антитимочитарный глобулин, иммуносупрессивное средство, кортикостероид или их фармакологическое производное.
139. Способ по п.137, где указанное второе действующее вещество представляет собой антитело против PD1 или антитело против PDL1.
140. Набор для прогнозирования способности пациента с злокачественной опухолью отвечать на лечение FTI, содержащий по меньшей мере одно средство для типирования KIR у указанного пациента с злокачественной опухолью, и вспомогательное средство, где прогнозируют, что указанный пациент с злокачественной опухолью является способным отвечать на лечение FTI, если указанный пациент с злокачественной опухолью является носителем KIR2DS2 или KIR2DS5.
141. Набор по п.140, дополнительно содержащий средство для типирования HLA у указанного пациента с злокачественной опухолью, где указанный пациент с злокачественной опухолью является носителем HLA-C2.
142. Набор для прогнозирования способности пациента с злокачественной опухолью отвечать на лечение FTI, содержащий по меньшей мере одно средство для определения экспрессии по меньшей мере одного биомаркера в образце от пациента с злокачественной опухолью и вспомогательное средство, где указанный биомаркер выбран из группы, состоящей из KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 и GZMM; где прогнозируют, что указанный пациент с злокачественной опухолью является способным отвечать на лечение FTI, если
- (i) уровень экспрессии KIR2DS2 в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS2;
- (ii) уровень экспрессии KIR2DL2 в образце ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL2;
- (iii) уровень экспрессии KIR2DS5 в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS5;
- (iv) уровень экспрессии KIR2DL5 в образце ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL5;
- (v) уровень экспрессии GZMM в образце выше, чем эталонный уровень экспрессии GZMM;
- (vi) отношение уровня экспрессии KIR2DS2 к уровню экспрессии KIR2DL2 в образце выше, чем эталонное отношение; или
- (vii) отношение уровня экспрессии KIR2DS5 к уровню экспрессии KIR2DL5 в образце выше, чем эталонное отношение.

143. Набор для прогнозирования способности пациента с злокачественной опухолью отвечать на лечение FTI, содержащий одно или более средств для определения уровня экспрессии KIR2DS2 и KIR2DL2 в образце от пациента с злокачественной опухолью, и вспомогательное средство; где прогнозируют, что указанный пациент является отвечающим на лечение FTI, если

i) уровень экспрессии KIR2DS2 в образце указанного пациента выше, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DS2;

(ii) уровень экспрессии KIR2DL2 в образце от указанного пациента ниже, чем эталонный уровень экспрессии KIR2DL2; или

(iii) отношение уровня экспрессии KIR2DS2 к уровню экспрессии KIR2DL2 в образце от указанного пациента выше, чем эталонное отношение.

144. Набор по любому из пп.140-143, дополнительно содержащий этикетку, указывающую, что набор используют для прогнозирования способности пациента с злокачественной опухолью отвечать на лечение FTI.

145. Набор по любому из пп.140-143, где указанный пациент представляет собой пациента с MDS, и указанный FTI представляет собой типифарниб.

6. Примеры.

Понятно, что модификации, которые по существу не влияют на функционирование различных вариантов осуществления этого изобретения, также представлены в пределах определения изобретения, представленного в настоящем документе.

Соответственно следующие примеры предназначены для иллюстрации, но не ограничения настоящего изобретения. Полное содержание всех процитированных в настоящем документе ссылок приведено в качестве ссылки.

Пример I.

Идентификация иммунологических биомаркеров, ассоциированных с клиническим преимуществом типифарниба

Анализы получения профилей экспрессии генов в образцах костного мозга из двух исследований AML, так же как данные IC₅₀ для типифарниба во множестве линий клеток, выявили, что множество связанных с иммунитетом генов, особенно связанных с клетками NK генов, являлись ассоциированными с лучшим прогнозом для типифарниба. В то время как некоторые из этих генов, по-видимому, являлись неспецифическими для лечения типифарнибом, другие, включая KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5, KIR2DL5 и GZMM, являлись специфически ассоциированными с клиническими преимуществами типифарниба, но не других не относящихся к FTI химиотерапевтических средств, таких как цитарабин и митоксантрон.

В настоящем исследовании использовали данные для микромассивов, полученные в анализе глобальной экспрессии генов для образцов костного мозга, собранных в двух клинических исследованиях, исследующих эффективность и безопасность FTI типифарниба. Одно клиническое исследование проводили для взрослых пациентов в возрасте 65 лет или старше с ранее не подвергавшимся лечению AML, и другое проводили для рецидивирующего и невосприимчивого AML. Клинические результаты этих исследований опубликованы ранее (Lancet et al., Blood 109:1387-1394 (2007); Harousseau et al., Blood 9:9 (2007); Raponi et al., Clin. Cancer Res. 13:2254-2260 (2007)), и данные определения профилей генов являлись публично доступными в Gene Expression Omnibus от NCBI (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) и являются доступными под серийными номерами доступа в GEO Series GSE8970 и GSE5122.

Как описано в Raponi et al., Blood 111:2589-96 (2008), образцы BM собирали от предоставивших согласие пациентов перед лечением типифарнибом, и моноклеарные клетки обрабатывали в том же центре. Тотальную РНК выделяли из образцов клеток, подвергали контролю качества, и далее перерабатывали для анализа микромассивов. ДНК выделяли из того же самого образца. Образцы подвергали анализу глобальной экспрессии генов, и/или количественной полимеразной цепной реакции (QPCR) специфических генов).

Ответ на типифарниб регистрировали в отчете о клиническом исследовании и определяли как пациентов, обладающих полной ремиссией (CR), частичной ремиссией (PR) или улучшением гематологических показателей (HI). Пациентов с PR и HI включали в качестве отвечающих, поскольку ранее показано, что они обладают сходным преимуществом по выживаемости с теми, кто достиг CR. Кратко, CR определяли как BM, для которого показано менее 5% миелобластов с нормальным созреванием всех линий клеток, абсолютное количество нейтрофилов (ANC) по меньшей мере 10⁹/л (1000/мкл), и количество тромбоцитов 100×10⁹/л (100000/мкл). PR определяли как наличие восстановления ANC и тромбоцитов до указанных выше уровней, но с 5-19% бластных клеток в BM, и более, чем 50% уменьшение процента бластных клеток в BM от исходного. HI определяли как то же, что и PR, за исключением восстановления ANC до 0,5-1×10⁹/л (500-1000/мкл) и количества тромбоцитов до 20-100×10⁹/л (20000-100000/мкл). Прогрессирующее заболевание (PD) определяли как любое из следующего: более, чем 50% увеличение процента бластных клеток в BM от исходного (более чем на 5% бластных клеток, если исходный процент составляет менее 5%, более чем на 10% бластных клеток, если исходный процент составляет 5-10%, и более

чем на 20% бластных клеток, если исходный процент составляет 10-20%); более чем 50% увеличение процента циркулирующих бластных клеток; появление новых циркулирующих бластных клеток по меньшей мере в 2 последовательных случаях; или развитие экстрамедуллярного лейкоза. Стабильное заболевание (SD) определяли как любой ответ, не удовлетворяющий критериям CR, PR, HI или PD.

Кривые Каплана-Мейера использовали для исследования связи между значениями биомаркеров и клиническим преимуществом. Идентификация множества связанных с клетками NK генов, большая длительность ответа, наблюдаемая у некоторых пациентов при лечении типифарнибом, и роль опосредованной RAS передачи сигналов в клетках NK поддерживают то, что способность пациентов с AML отвечать на лечение типифарнибом может возникать в результате инфильтрации иммунцитов в костный мозг.

1. Корреляция уровня экспрессии KIR2DS5 с клиническим преимуществом типифарниба.

Как показано на фиг. 1A, уровень экспрессии KIR2DS5 ассоциирован с исходом для пациентов с AML, подвергнутых лечению типифарнибом. При разделении пациентов на категории на основании различных клинических ответов, обнаружено, что пациенты с PD кластеризовались на нижнем конце диапазона экспрессии KIR2DS5; пациенты с CR кластеризовались на верхнем конце диапазона экспрессии KIR2DS5; и пациенты с HI и SD кластеризовались между группами CR и PD.

Кроме того, идентифицирована сильная корреляция между уровнем экспрессии KIR2DS5 и PFS пациентов с AML, подвергнутых лечению типифарнибом (фиг. 1B). Пациенты, уровни экспрессии KIR2DS5 которых находились в наивысшем (четвертом) квартиле, обладали статистически значимой более длительной PFS по сравнению с остальными пациентами. Корреляция поддерживает то, что пациентов с AML можно отбирать на основании уровня экспрессии KIR2DS5 для лечения типифарнибом, чтобы увеличивать вероятность способности отвечать на лечение.

2. Специфическая корреляция между отношением экспрессии KIR2DS2 к KIR2DL2 и клиническим преимуществом типифарниба.

Как показано на фиг. 2A и B, отношение уровня экспрессии KIR2DS2 к уровню экспрессии KIR2DL2 (отношение 2DS2/2DL2) сильно коррелировало как с PFS (фиг. 2A), так и с OS (фиг. 2B) пациентов с AML, подвергнутых лечению типифарнибом. Как показано, пациенты с отношением 2DS2/2DL2 в наивысшем (четвертом) квартиле обладали статистически значимой более длительными PFS (медиана=431 сутки) и OS (медиана=750 суток) по сравнению с остальной популяцией пациентов.

Кроме того, корреляция между отношением 2DS2/2DL2 и клиническим преимуществом являлась специфической для типифарниба, и ее не наблюдали для других не относящихся к FTI химиотерапевтических средств, таких как цитарабин и митоксантрон (данные химиотерапии от Metzeler KH et al., Blood, 112:4193-201 (2008)). Как показано на фиг. 3A и B, так же как в таблице ниже, вероятность выживаемости пациентов с AML, подвергнутых лечению высокой дозой цитарабина и митоксантрона, не отличалась между пациентами с отношением 2DS2/2DL2 в наивысшем (четвертом) квинтиле и остальными пациентами.

Исследование	5-й Q/1-4-й Q/все, медиана (сутки)	Условия	Лечение	HR	N/5-й Q
GSE12417-GPL96	233/321/294	Первая линия	Высокая доза цитарабина плюс митоксантрона	1,39	163/33
GSE12417-GPL570	308/624/538	Первая линия	Высокая доза цитарабина плюс митоксантрона/интенсивная химиотерапия у 17 пациентов	1,38	79/16
GSE8970 (СТЕР-20)	754/179/233	Первая линия,	Типифарниб	0,21	34/7
		пожилые			

Специфическая корреляция между отношением 2DS2/2DL2 и клиническим преимуществом типифарниба поддерживает то, что пациентов с AML можно отбирать на основании отношения 2DS2/2DL2 для лечения типифарнибом, чтобы увеличивать общий ответ на лечение.

3. Специфическая корреляция между отношением экспрессии KIR2DS5 к KIR2DL5 и клиническим преимуществом типифарниба.

Как показано на фиг. 4A, отношение уровня экспрессии KIR2DS5 к уровню экспрессии KIR2DL5A (отношение 2DS5/2DL5) сильно коррелировало как с PFS, так и с OS пациентов с AML, подвергнутых лечению типифарнибом. Как показано, пациенты с отношением 2DS5/2DL5A в наивысшем (четвертом) квартиле обладали статистически значимой более длительными PFS и OS по сравнению с остальной популяцией пациентов.

Кроме того, корреляция между отношением 2DS5/2DL5 и клиническим преимуществом являлась специфической для типифарниба, и ее не наблюдали для других не относящихся к FTI химиотерапевти-

ческих средств, таких как цитарабин и митоксантрон (данные химиотерапии от Metzeler KH et al., Blood, 112:4193-201 (2008)) (фиг. 4B). Как показано на фиг. 4B, вероятность выживаемости пациентов с AML, подвергнутых лечению высокой дозой цитарабина и митоксантрона, не отличалась между пациентами с различным отношением 2DS5/2DL5.

Специфическая корреляция между отношением 2DS5/2DL5 и клиническим преимуществом типифарниба поддерживает то, что пациентов с AML можно отбирать на основании отношения 2DS5/2DL5 для лечения типифарнибом, чтобы увеличивать общий ответ на лечение.

4. Специфическая корреляция уровня экспрессии GZMM с клиническим преимуществом типифарниба.

Как показано на фиг. 5, уровень экспрессии GZMM ассоциирован с исходом для пациентов с AML, подвергнутых лечению типифарнибом. При разделении пациентов на категории на основании различных клинических ответов, обнаружено, что пациенты с PD кластеризовались на нижнем конце диапазона экспрессии GZMM и обладали самым низким медианным уровнем экспрессии GZMM среди четырех групп (CR, HI, SD и PD). Пациенты с CR кластеризовались на верхнем конце диапазона экспрессии GZMM и обладали наивысшим медианным уровнем экспрессии GZMM среди четырех групп.

Кроме того, идентифицирована также сильная корреляция между уровнем экспрессии GZMM и OS и PFS пациентов с AML, подвергнутых лечению типифарнибом (фиг. 6A). Пациенты, уровни экспрессии GZMM которых находились в наивысшем (четвертом) квартиле, обладали статистически значимыми более длительными OS и PFS по сравнению с остальными пациентами. Корреляция между уровнем экспрессии GZMM и клиническим преимуществом являлась специфической для типифарниба, и ее не наблюдали для других не относящихся к FTI химиотерапевтических средств, таких как цитарабин и митоксантрон (фиг. 6B). Специфическая корреляция поддерживает то, что пациентов с AML можно отбирать на основании уровня экспрессии GZMM для лечения типифарнибом, чтобы увеличивать общий ответ на лечение.

5. Специфическая корреляция уровня экспрессии KIR2DS2 с клиническим преимуществом типифарниба.

Как показано на фиг. 7A, уровень экспрессии KIR2DS2 ассоциирован с исходом для пациентов с AML, подвергнутых лечению типифарнибом. Сильная корреляция идентифицирована между уровнем экспрессии KIR2DS2 и OS пациентов с AML, подвергнутых лечению типифарнибом (фиг. 7A). Пациенты, уровни экспрессии KIR2DS2 которых находились в наивысшем (4^м) квартиле, обладали статистически значимой более длительной OS по сравнению с остальными пациентами (фиг. 7A и фиг. 7B, верхняя левая панель).

Как показано на фиг. 7B и в таблице ниже, экспрессия KIR2DS2 сильно коррелировала с клиническим преимуществом, включая частоту полного ответа и конечные точки выживаемости. Пациенты в верхнем (четвертом) квартиле экспрессии KIR2DS2 обладали медианной выживаемостью 564 суток, в то время как пациенты в 1-3 квартилях экспрессии KIR2DS2 обладали медианной выживаемостью 153 суток. В отличие от этого, не идентифицировано корреляции экспрессии маркеров клеток NK, включая KIR2DS2, и клиническим преимуществом, полученным от химиотерапевтического лечения в подгруппе из 51 ранее не подвергавшихся лечению и пожилых (>65 лет) пациентов с AML, зарегистрированных в исследовании German AML Cooperative Group 1999 study (AML CG 1999) (фиг. 7B, правая панель). Из 34 ранее не подвергавшихся лечению, обладающих плохими показателями риска и пожилых пациентов с AML, которых подвергали лечению типифарнибом в предшествующих клинических исследованиях фазы 2, 25 имели предшествующий MDS. Эта специфическая корреляция поддерживает то, что пациентов с злокачественными опухолями можно отбирать на основании уровня экспрессии KIR2DS2 для лечения типифарнибом, чтобы увеличивать вероятность способности отвечать на лечение AML и MDS.

Лечение (n)	Медианная общая выживаемость (сутки)	KIR2DS2, нижние 1 ^{-й} -3 ^{-й} квартили, медианная выживаемость (сутки)	KIR2DS2, верхний 4 ^{-й} квартиль, (верхняя) медианная выживаемость (сутки)	Отношение рисков
Типифарниб (34)	233	153	564	0,303
Химиотерапия (51)	240	176	284	0,83

Пример II.

А. Стратификация пациентов с AML для клинических исследований типифарниба.

Можно проводить клинические исследования, включающие типирование KIR в качестве части критерия включения пациентов. Например, можно проводить исследование для лечения типифарнибом пациентов с AML, которые старше 60 лет или по иным причинам не подходят для стандартной химиотерапии или обладают невосприимчивым или рецидивирующим AML.

Перед тем как пациента с AML допускают до клинических исследований, образец костного мозга или образец крови получают от пациента. Затем образец подвергают анализу микромассивов. ДНК выде-

ляют из образца костного мозга, обработанного Trizol, по инструкциям производителя (Qiagen). Образцы подвергают анализу глобальной экспрессии генов и количественной полимеразной цепной реакции (QPCR) специфических генов, включая KIR2DS2, KIR2DL2, KIR2DS5 и KIR2DL5. Среди прочего анализ микромассивов предоставляет генотип генов KIR пациента. Если идентифицируют, что пациент является носителем гена KIR2DS2 или носителем гена KIR2DS5, пациента затем допускают к исследованию типифарниба. Иллюстративные критерии включения могут являться следующими.

Патологическое подтверждение диагноза AML ($\geq 20\%$ бластных клеток в костном мозге).

Общее состояние по ECOG 0 или 1.

Пациенты должны являться способными дать информированное согласие SGOT и SGPT $\leq 2,5$ х пределов нормы (степень 1).

Уровень креатинина в сыворотке $\leq 1,5$ х пределов нормы (степень 1).

AML (любой из следующего).

Впервые диагностированный AML у взрослых ≥ 70 лет.

Впервые диагностированный AML, возникающий в результате MDS, у взрослых ≥ 60 лет.

Доказанный по биопсии рецидивирующий или невосприимчивый AML.

Гиперлейкоцитоз с ≥ 30000 лейкемических бластных клеток/мкл.

Носитель KIR2DS2, или KIR2DS5, с подтверждением по биопсии костного мозга.

Иллюстративный режим дозирования может представлять собой следующий.

Пациентам вводят 600 мг типифарниба перорально (PO) дважды в сутки (B.I.D.) на сутки 1-21. Курсы повторяют каждые 28 суток в отсутствие прогрессирования заболевания или неприемлемой токсичности.

Частота полной ремиссии (CR) и частота частичной ремиссии (PR) могут представлять собой показатели первичного исхода исследования.

В. Пациенты с MDS для клинических исследований типифарниба с маркерами иммуноцитов в качестве вторичных конечных точек.

Можно проводить клинические исследования, включающие типирование KIR в качестве части критерия включения пациентов. Например, можно проводить исследование для лечения типифарнибом пациентов с AML, имеющих MDS, или конкретно, MDS с более низким риском. Первичной конечной точкой исследования является независимость от трансфузии в соответствии с критериями Международной рабочей группы для миелодиспластических/миелопролиферативных неоплазий у взрослых или родственной системы оценки ответа. Вторичные конечные точки могут включать анализ маркеров иммуноцитов, особенно маркеров клеток NK, таких как KIR2DS2, KIR2DS5, KIR2DL2, KIR2DL5 и GZMM.

Когда пациента MDS с более низким риском допускают до клинических исследований, образец костного мозга или образец крови получают от пациента. Затем образец подвергают анализу микромассивов. ДНК выделяют из образца костного мозга, обработанного Trizol, по инструкциям производителя (Qiagen). Образцы подвергают анализу глобальной экспрессии генов и количественной полимеразной цепной реакции (QPCR) специфических генов, таких как KIR2DS2, KIR2DS5, KIR2DL2, KIR2DL5 и GZMM. Среди прочего, анализ микромассивов предоставляет генотип генов KIR пациента.

Иллюстративный режим дозирования может представлять собой: Пациентам вводят 600 мг типифарниба перорально (PO) дважды в сутки (B.I.D.) на сутки 1-21. Курсы повторяют каждые 28 суток в отсутствие прогрессирования заболевания или неприемлемой токсичности.

Сопутствующий диагностический тест также можно использовать, чтобы способствовать отбору пациентов в клинических исследованиях типифарниба в популяции пациентов с MDS с более низким риском. Можно использовать генетические анализы, детектирующие присутствие или отсутствие генов KIR в клетках NK, как описано в настоящем документе или иным образом известно в данной области. Можно использовать также анализы, описанные в настоящем документе (например, анализ на основе ПЦР), или иным образом известные в данной области для определения уровней экспрессии биомаркеров, и можно определять оптимальный критерий отсека биомаркера для отбора пациентов для последующих клинических исследований.

Пример III.

Индивидуализированные терапевтические решения для пациентов с CMML.

Следующие способы можно принимать для определения того, является ли пациент с CMML подходящим для лечения FTI, такого как лечение типифарнибом.

Образец BM отбирают у пациента до лечения, и моноклеарные клетки обрабатывают в том же центре. Тотальную РНК выделяют из образцов клеток с использованием набора Trizol (Qiagen, Santa Clarita, CA). Качество РНК определяют посредством оценки присутствия полос рибосомальной РНК в Agilent Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA). Образцы хорошего качества перерабатывают далее для анализа микромассивов.

Для каждого образца 1 г тотальной РНК (как оценено по OD260) подвергают обратной транскрипции с использованием высокопроизводительного набора High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), в соответствии с инструкциями производителя. Образцы можно затем инкубировать при 25°C в течение 10 мин и затем при 37°C в течение 30 мин для оптимального

превращения РНК. QPCR проводят с использованием системы детекции последовательностей ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems), где все образцы обрабатывают в трех повторях. Каждая реакционная смесь содержит 5 мкл универсальной готовой реакционной смеси для ПЦР Taqman, содержащей урацил-N-гликозилазу (Applied Biosystems), 4,5 мкл матрицы кДНК и 0,5 мкл 20х реакционной смеси, необходимой для анализа экспрессии генов (Applied Biosystems) или 9 пмоль как прямого, так и обратного праймера, и 2,5 пмоль зонда в общем объеме реакционной смеси 10 мкл. Все наборы праймеров и флуорогенных зондов с амидитом флуоресцеина (FAM) выбирают для получения ампликонов менее 100 нуклеотиды, позволяющих амплификацию транскриптов из образцов деградированной РНК. Праймеры и зонды разрабатывают для специфической амплификации KIR2DS2 и KIR2DL2. Все наборы праймеров пересекают границы экзонов и таким образом, специфически амплифицируют транскрипты мРНК, а не геномную ДНК.

Затем отношение экспрессии KIR2DS2/KIR2DL2 рассчитывают с использованием способов, известных в данной области (например, Ma et al., Cancer Cell, 5:607-616 (2004), полное содержание которого, таким образом, приведено в качестве ссылки). Необработанные значения Ct подвергают нормализации посредством вычитания среднего Ct для набора образцов, деления на стандартное отклонение и затем расчета различий нормализованных значений Ct для каждого гена.

Как описано в настоящем документе, эталонное отношение экспрессии KIR2DS2/KIR2DL2 можно определять посредством статистического анализа. Как показано на фиг. 2А и 2В (Пример I. II выше), например, эталонное отношение экспрессии может представлять собой отношение экспрессии, отличающее пациентов с отношением 2DS2/2DL2 в наивысшем (4^{-м}) квартиле от остальных пациентов. Соответственно, если определяют, что отношение 2DS2/2DL2 пациента с CMML выше, чем эталонное отношение (а именно, отношение 2DS2/2DL2 пациента с CMML находится в наивысшем (четвертом) квартиле), и пациент не имеет других препятствий для подвергания лечению типифарнибом, тогда предписывают лечение типифарнибом. С другой стороны, если определяют, что отношение 2DS2/2DL2 пациента с CMML ниже, чем эталонное отношение, лечение типифарнибом не рекомендуют.

Если лечение типифарнибом предписывают пациенту с CMML, пациента с CMML можно одновременно подвергать другому лечению, такому как воздействие ионизирующего излучения или второго действующего вещества, или поддерживающая терапия, которое онколог считает подходящим. Второе действующее вещество может представлять собой гипометилирующее ДНК средство, такое как азацитидин или децитабин.

Пример IV.

Более низкая IC₅₀ для типифарниба в линиях миелоидных и лимфоидных клеток со статусом K-RAS/N-RAS дикого типа.

Как показано в таблице ниже, анализы данных IC₅₀ для типифарниба во множестве линий миелоидных и лимфоидных клеток выявили, что линии клеток, несущие мутации в кодоне 12, 13 и/или 61 N-RAS или K-RAS, являются устойчивыми к типифарнибу, в то время как линии клеток, не несущие этих мутаций, включая клетки, имеющие N-RAS и K-RAS дикого типа, являются более чувствительными к лечению типифарнибом.

IC₅₀ типифарниба для линий миелоидных и лимфоидных клеток.

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

Данные из Genomics of Drug Sensitivity in Cancer ("GDSC").

Пример V.

Длительные ответы у пациентов с MDS/CMML с опухолями со статусом N-RAS/K-RAS дикого типа после лечения типифарнибом.

Двадцать одного пациента с MDS подвергали лечению типифарнибом в исследовании с увеличением дозы фазы 1. Типифарниб вводили дважды в сутки (по расписанию 3-недели введения/1 неделя без введения, в течение 8 недель) (исходная доза 300 мг перорально дважды в сутки; всего 600 мг).

Объективные ответы 3 HI, 2PR и 1 CR наблюдали у 6 из 20 (30%) подлежащих оценке пациентов. Как показано в табл. 2 ниже, пациенты с MDS с N-RAS и K-RAS дикого типа с большей вероятностью имеют длительные ответы (Kurzrock et al., Blood, 102 (13):4527-34 (2003)).

Диагноз	Ответ	Длительность (месяцы)	Общая ежедневная доза, мг	Мутация Ras
RAEB	HI	16	300*	Нет
CMML	HI	2	600	Да (K-RAS)
CMML	PR	6	600	Да (N-RAS)
CMML	PR	16+	800	Нет
RAEB	HI	3	900	Нет
RAEB-T	CR	9+	800	Нет

*Пациенту начали вводить общую ежедневную дозу 600 мг/сутки, но дозу уменьшили через 2 недели

RAEB: невосприимчивая анемия с избытком бластных клеток

Пример VI.

Продленная PFS и более высокая частота ответа у пациентов с AML со статусом N-RAS дикого типа после лечения типифарнибом CTEP-20 представляло собой клиническое исследование типифарниба фазы 2 у ранее не подвергавшихся лечению пожилых или неподходящих для лечения пациентов с AML. (Raponi et al., Blood 111:2589-96 (2008)).

Статус гена N-RAS определяли для 32 пациентов. Как показано на фиг. 8, тенденцию лучшей PFS наблюдали у пациентов с AML с N-RAS дикого типа (PFS=157 суток) по сравнению с пациентами с мутантным N-RAS (PFS=65 суток). Как показано на фиг. 9, пациенты с N-RAS дикого типа (43% ORR) обладают более высокой частотой ответа по сравнению с пациентами с мутантным N-RAS (27% ORR). Соответственно пациентов с AML можно отбирать на основании статуса мутаций гена RAS для лечения

типифарнибом, чтобы увеличивать способность отвечать на лечение.

Пример VII.

Клинические исследования типифарниба для пациентов с CMML, стратифицированных на основании статуса мутаций RAS.

В этом примере описано клиническое исследование типифарниба фазы 2 с первичной целью оценки противоопухолевой активности типифарниба, в отношении частоты объективных ответов (ORR) с использованием критериев Международной рабочей группы для миелодиспластических/миелопролиферативных неоплазий (MDS/MPN IWG), для типифарниба у субъектов с хроническим миеломоноцитарным лейкозом (CMML) и у субъектов с CMML, заболевание у которых характеризуется KRAS/NRAS дикого типа. Вторичные цели включают оценку эффекта типифарниба на частоту CR, полную цитогенетическую ремиссию, частичную ремиссию, ответ костного мозга и клиническое преимущество; длительность ответа; частоту PFS в течение 1 года; частоту выживаемости в течение 1 года; профиль неблагоприятных событий (AE) в соответствии с общими терминологическими критериями нежелательных явлений Национального института онкологии США версии 4.03 (NCI CTCAE v 4.03).

В этом исследовании фазы 2 исследуют противоопухолевую активность типифарниба в отношении ORR у субъектов с CMML. Вплоть до 20 подходящих субъектов регистрировали и ретроспективно стратифицировали на одну из двух страт (приблизительно 10 субъектов на страту) на основании статуса мутаций KRAS и/или NRAS у субъекта. В первую страту можно регистрировать субъектов с опухолями со статусом KRAS и NRAS дикого типа. Во вторую страту можно регистрировать субъектов со статусом мутантного KRAS, мутантного NRAS или двойного мутанта в опухоли.

Субъектов можно лечить типифарнибом, вводимым в исходной дозе 900 мг, перорально с пищей, дважды в сутки (b.i.d.) в течение 7 суток в чередующиеся недели (сутки 1-7 и 15-21) в 28-суточных циклах. По усмотрению исследователя, дозу типифарниба можно увеличивать до 1200 мг b.i.d., если субъект не испытывает ограничивающей дозу токсичности при уровне дозы 900 мг. Субъектов, у которых развивались серьезные неблагоприятные события (SAE) или возникшие во время лечения неблагоприятные события $\geq$ степени 2 (TEAE), по-видимому, связанные с типифарнибом и продолжающиеся ≥ 14 суток, не подвергают увеличению дозы. Допускают также ступенчатые уменьшения дозы на 300 мг для контроля связанной с лечением, возникшей во время лечения токсичности.

В отсутствие неконтролируемой токсичности, субъектов можно продолжать подвергать лечению типифарнибом до прогрессирования заболевания. Если наблюдают полный ответ, терапию типифарнибом можно сохранять в течение по меньшей мере 6 месяцев после начала ответа.

Оценку заболевания (оценки костного мозга, гематологии и качества жизни) можно проводить при скрининге и при осмотре на сутки 22 (± 5 суток), проводимом в ходе циклов 2, 4, 6 и приблизительно каждые 12 недель после этого (циклы 9, 12, 15 и т.д.). Гематологические оценки, включая оценки периферической крови и обзор необходимых трансфузий, можно проводить при скрининге и по меньшей мере ежемесячно до прогрессирования заболевания. Скрининг по аспирации/биопсии костного мозга не является необходимым для начала лечения у субъектов, которые имеют аспирацию/биопсию костного мозга, подтверждающего их диагноз, в пределах 4 недель до суток 1 цикла 1 и могут предоставить образцы для завершения целей исследования. Если аспирация костного мозга является неадекватной для оценки заболевания по расписанию, можно проводить биопсию костного мозга. Дополнительные оценки заболевания или гематологические оценки можно проводить, если так считает необходимым исследователь. Период времени оценок заболевания и гематологических оценок сохраняют настолько долгим, насколько это возможно, независимо от потенциальной продолжительности цикла лечения.

Пример VIII.

Индивидуализированные терапевтические решения для пациентов с CMML.

Следующие способы можно принимать для определения того, является ли пациент с CMML подходящим для лечения FTI, такого как лечение типифарнибом.

ДНК можно предварительно выделять из клеток костного мозга (моноклеарных клеток или лейкоцитарной пленки) или периферической крови пациента с проявлением CMML. Статус мутаций N-Ras и K-Ras определяют посредством секвенирования ДНК, с использованием адаптированного для флуоресцентных праймеров способа терминации цепи в секвенаторе ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Если для прямого секвенирования получают отрицательные результаты, продукты ПЦР клонируют (оригинальный набор TA Cloning Kit; Invitrogen, Groningen, the Netherlands) и секвенируют.

Если определяют, что пациент с CMML не имеет никаких мутаций в кодонах 12, 13 и 61 K-Ras или N-Ras, или если определяют, что пациент с CMML имеет K-Ras и N-Ras дикого типа, и если пациент не имеет других препятствий для подвергания лечению типифарнибом, предписывают лечение типифарнибом. С другой стороны, если определяют, что пациент с CMML имеет мутацию либо N-Ras, либо K-Ras, приводящую к активации либо N-Ras, либо K-Ras, лечение типифарнибом не рекомендуют.

Если лечение типифарнибом предписывают пациенту с CMML, пациента с CMML можно одновременно подвергать другому лечению, такому как воздействие ионизирующего излучения или второго действующего вещества, или поддерживающая терапия, которое онколог считает подходящим. Второе дей-

ствующее вещество может представлять собой гипометилирующее ДНК средство, такое как азациитидин или децитабин.

Пример IX.

Клинические исследования типифарниба для пациентов с солидными опухолями, стратифицированных на основании статуса мутаций HRAS.

Клиническое исследование фазы 2 начали для применения типифарниба в лечении опухолей на поздних стадиях с известной мутацией HRAS. Дизайн клинических исследований включает регистрацию 2 когорты из 18 пациентов каждая. В когорту 1 регистрировали субъектов с злокачественными опухолями щитовидной железы с мутациями HRAS, вне зависимости от гистологии щитовидной железы. В когорту 2 регистрировали любых субъектов с негематологическими опухолями с мутантным HRAS, отличными от рака щитовидной железы, соответствующих критериям включения.

Это клиническое исследование разработано для включения двух стадий, где первая стадия включала 11 подлежащих оценке пациентов, и вторая стадия включала 7 дополнительных подлежащих оценке пациентов, и когорту не переводят на вторую стадию, если наблюдают один объективный ответ или не наблюдают объективных ответов в когорте на первой стадии. Клиническое исследование считают положительным, если по меньшей мере 4 отвечающих наблюдают в когорте из 18 субъектов. Первичной конечной точкой является частота объективных ответов, и оценку ответа опухолей проводят в соответствии с Критериями оценки ответа солидных опухолей версии 1.1 (необходимо подтверждение ответа).

В соответствии с протоколом типифарниб вводят зарегистрированным пациентам в исходной дозе 900 мг, перорально с пищей, дважды в сутки (b.i.d.) в течение 7 суток в чередующиеся недели (сутки 1-7 и 15-21) в 28-суточных циклах. По усмотрению исследователя дозу типифарниба можно увеличивать до 1200 мг b.i.d. если субъект не испытывает ограничивающей дозу токсичности при уровне дозы 900 мг. Субъектов, у которых развивались серьезные неблагоприятные события (SAE) или возникшие во время лечения неблагоприятные события $\geq$ степени 2 (TEAE), по-видимому, связанные с типифарнибом и продолжающиеся ≥ 14 суток, не подвергают увеличению дозы. Допускают также ступенчатые уменьшения дозы на 300 мг для контроля связанной с лечением, возникшей во время лечения токсичности.

Четверых (4) подлежащих оценке пациентов регистрировали в первую когорту (пациентов с злокачественными опухолями щитовидной железы с мутациями HRAS) и одиннадцать (11) подлежащих оценке пациентов регистрировали во вторую когорту (пациенты с негематологическими опухолями, отличными от рака щитовидной железы, с мутациями HRAS). Во второй когорте трое (3) из этих пациентов имели рецидивирующую/невосприимчивую карциному головы и шеи, и двое (2) из этих трех (3) испытывали подтвержденные объективные частичные ответы (PR), и третий пациент испытывал стабилизацию заболевания более шести месяцев (> 8 месяцев). Все трое пациентов с карциномой головы и шеи являются отрицательными по HPV. Все пациенты с опухолью головы и шеи остались в исследовании. Ответы наблюдали для двух пациентов с PR после 3 циклов лечения, шести циклов для одного, и трех для другого. Кроме того, пять (5) зарегистрированных пациентов имели злокачественные опухоли слюнных желез с мутациями HRAS, и трое (3) из них испытывали стабилизацию заболевания более шести месяцев (> 7 , 9 и > 11 месяцев). Когорту 2 перевели на вторую стадию исследования для регистрации семи дополнительных пациентов для протокола исследования.

Пример X.

Индивидуализированные терапевтические решения для пациентов с солидными опухолями.

Следующие способы можно принимать для определения того, является ли пациент, имеющий солидную опухоль, подходящим для лечения FTI, такого как лечение типифарнибом. Пациент может иметь опухоль щитовидной железы. Пациент может иметь опухоль слюнных желез. Пациент может также иметь опухоль головы и шеи. Опухоль головы и шеи может представлять собой плоскоклеточную карциному головы и шеи.

ДНК можно выделять из образца опухоли от пациента. Статус мутаций H-Ras определяют посредством секвенирования ДНК, с использованием адаптированного для флуоресцентных праймеров способа терминации цепи в секвенаторе ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Если для прямого секвенирования получают отрицательные результаты, продукты ПЦР клонируют (оригинальный набор TA Cloning Kit; Invitrogen, Groningen, the Netherlands) и секвенируют.

Если определяют, что пациент, имеющий солидную опухоль, имеет мутацию в кодонах 12, 13 и 61 H-Ras, или другую мутацию, приводящую к активации H-Ras, и если пациент не имеет других препятствий для подвергания лечению типифарнибом, предписывают лечение типифарнибом. С другой стороны, если определяют, что пациент не имеет никаких мутаций, приводящих к активации H-Ras, или имеет H-Ras дикого типа, лечение типифарнибом не рекомендуют.

Если лечение типифарнибом предписывают пациенту, пациента можно одновременно подвергать другому лечению, такому как воздействие ионизирующего излучения или второго действующего вещества, или поддерживающая терапия, которое онколог считает подходящим. Для пациента с плоскоклеточной карциномой головы и шеи, дополнительное лечение может представлять собой лечение антителом против EGFR, лечение антителом против PD1/PDL1.

Настоящее описание содержит список последовательностей, который подан в электронной форме в формате ASCII и полное содержание которого, таким образом, приведено в качестве ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 29 сентября 2016 г., названа 14168-011-999 SL.txt и имеет размер 42868 байт.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения плоскоклеточной карциномы головы и шеи (HNSCC) с мутацией H-Ras у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества типифарниба указанному субъекту, где указанная HNSCC находится на поздней стадии, является метастазирующей, рецидивирующей или невосприимчивой.

2. Способ по п.1, где указанная HNSCC является отрицательной по папилломавирусу человека (HPV).

3. Способ по п.1, где указанная мутация H-Ras содержит аминокислотную замену в кодоне, выбранном из группы, состоящей из G12, G13, Q61 и любой их комбинации.

4. Способ по п.3, где указанная мутация H-Ras указанного субъекта содержит аминокислотную замену в кодоне G12.

5. Способ по п.3, где указанная мутация H-Ras указанного субъекта содержит аминокислотную замену в кодоне G13.

6. Способ по п.3, где указанная мутация H-Ras указанного субъекта содержит аминокислотную замену в кодоне Q61.

7. Способ по любому из пп.1-6, включающий определение присутствия мутации H-Ras в образце от указанного субъекта.

8. Способ по п.7, где указанный образец представляет собой биоптат ткани или биоптат опухоли.

9. Способ по п.7 или 8, где указанную мутацию H-Ras определяют способом, выбранным из группы, состоящей из секвенирования, полимеразной цепной реакции (ПЦР), анализа микромассива ДНК, масс-спектрометрии (MS), анализа однонуклеотидного полиморфизма (SNP), денатурирующей высокоэффективной жидкостной хроматографии (DHPLC) или анализа полиморфизма длины фрагментов рестрикции (RFLP).

10. Способ по любому из пп.1-9, где типифарниб вводят в дозе 1-1000 мг/кг массы тела.

11. Способ по любому из пп.1-10, где типифарниб вводят дважды в сутки.

12. Способ по п.11, где типифарниб вводят в дозе 300 мг дважды в сутки.

13. Способ по п.11, где типифарниб вводят в дозе 600 мг дважды в сутки.

14. Способ по п.11, где типифарниб вводят в дозе 900 мг дважды в сутки.

15. Способ по любому из пп.1-14, где типифарниб вводят в течение периода от одного до семи суток.

16. Способ по любому из пп.1-15, где типифарниб вводят на сутки 1-7 и 15-21 из 28-суточного цикла лечения.

17. Способ по п.16, где типифарниб вводят в течение по меньшей мере 3 циклов.

18. Способ по п.16, где типифарниб вводят в течение по меньшей мере 6 циклов.

19. Способ по п.16, где типифарниб вводят в течение вплоть до 12 месяцев.

20. Способ по п.12, где типифарниб вводят в дозе 300 мг дважды в сутки в течение 3 из 4 недель в повторяющихся 4-недельных циклах.

21. Способ по п.13, где типифарниб вводят в дозе 600 мг дважды в сутки на сутки 1-7 и 15-21 из 28-суточного цикла лечения.

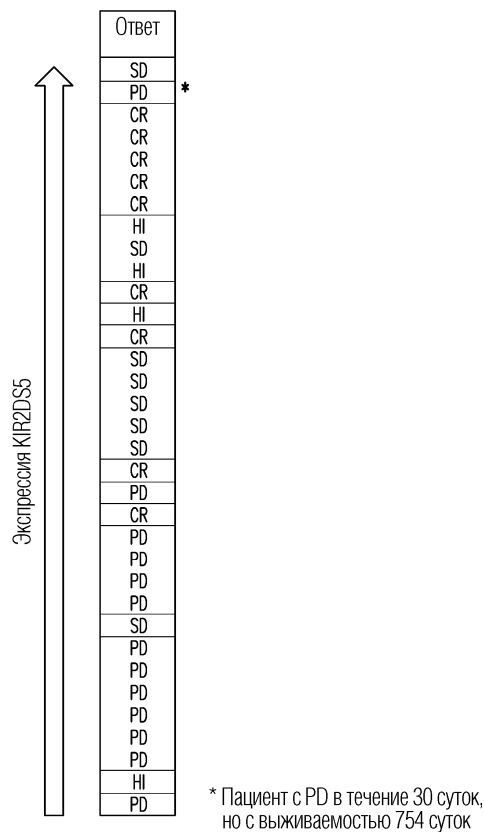
22. Способ по п.14, где типифарниб вводят в дозе 900 мг дважды в сутки на сутки 1-7 и 15-21 из 28-суточного цикла лечения.

23. Способ по любому из пп.1-22, где типифарниб вводят до, во время или после облучения.

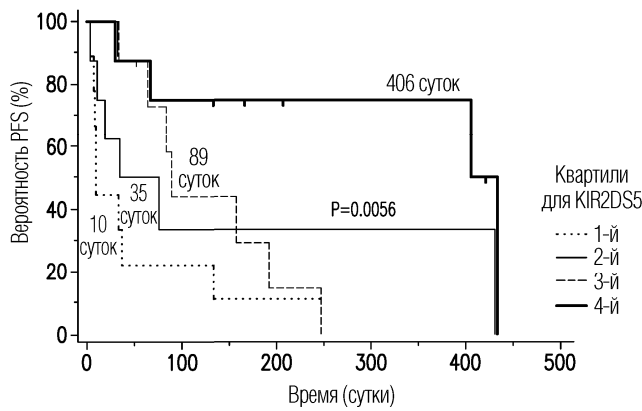
24. Способ по любому из пп.1-23, где типифарниб вводят с терапевтически эффективным количеством второго действующего вещества или поддерживающей терапии.

25. Способ по п.24, где указанное второе действующее вещество выбрано из группы, состоящей из антитела против EGFR, цисплатина, карбоплатина, таксана, гемцитабина, метотрексата, антитела против PD1 и антитела против PDL1.

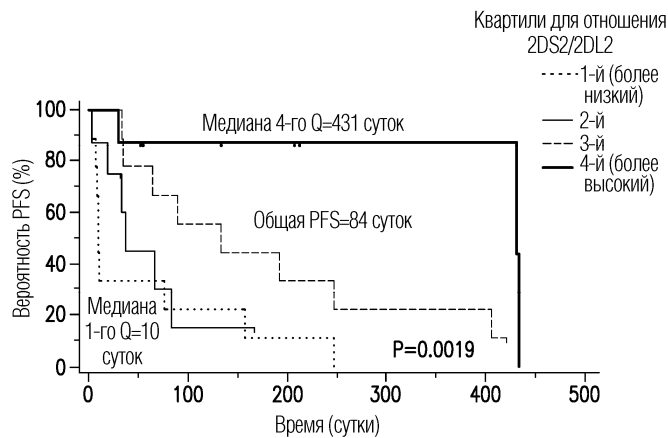
26. Способ по п.24, где указанное второе действующее вещество представляет собой антитело против PD1 и антитело против PDL1.



Фиг. 1А

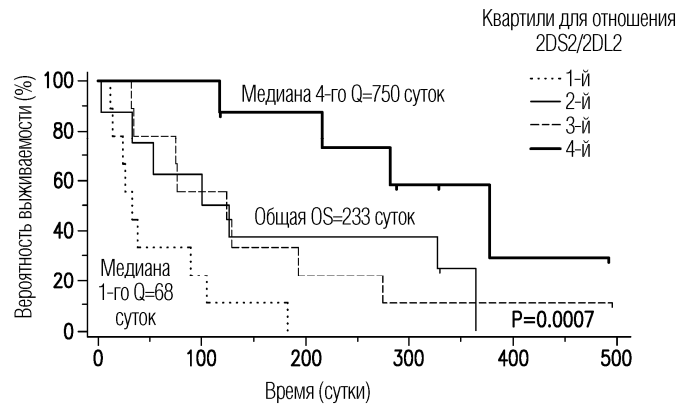


Фиг. 1В

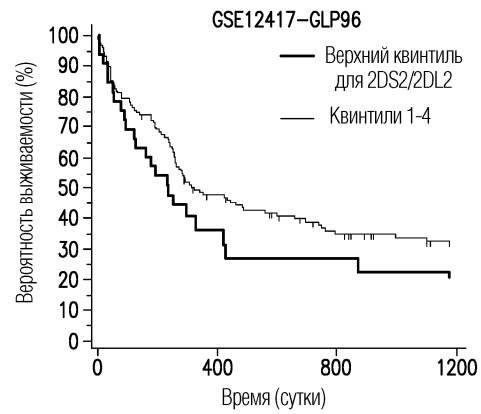


Фиг. 2А

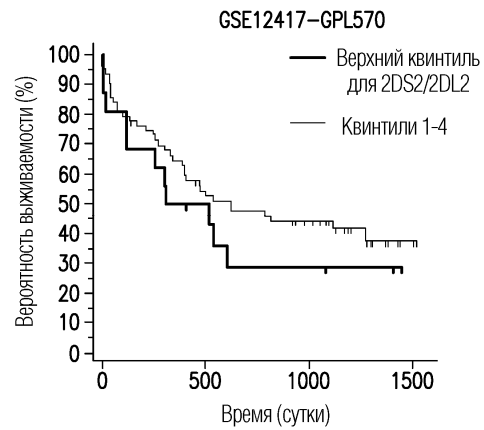
040014



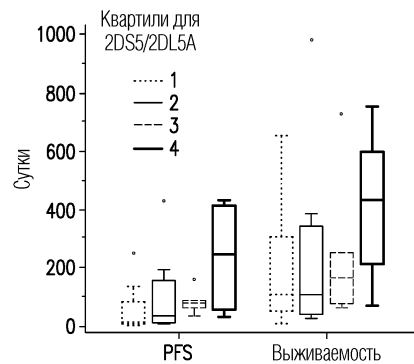
Фиг. 2В



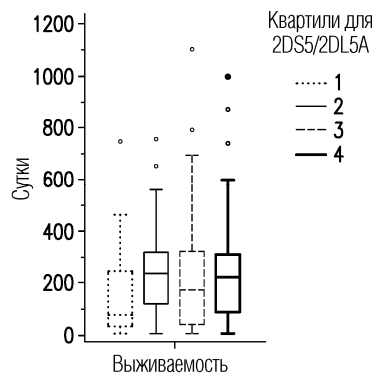
Фиг. 3А



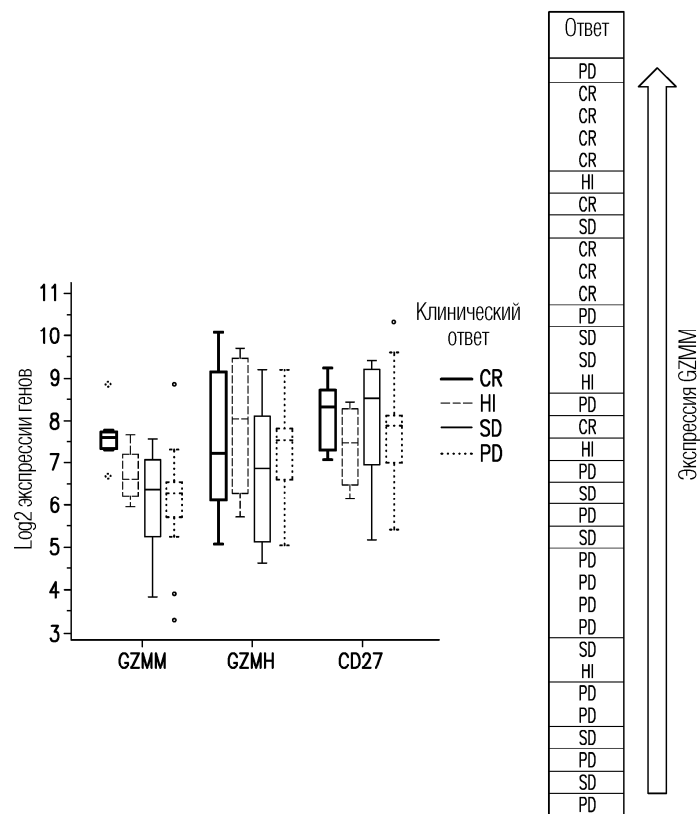
Фиг. 3В



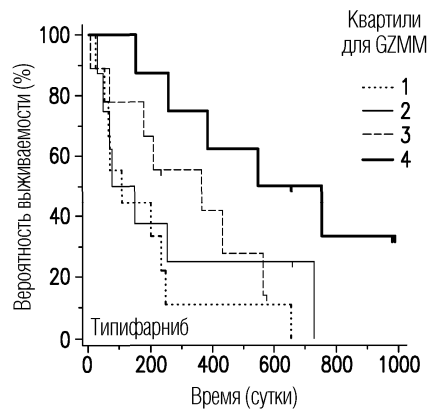
Фиг. 4А



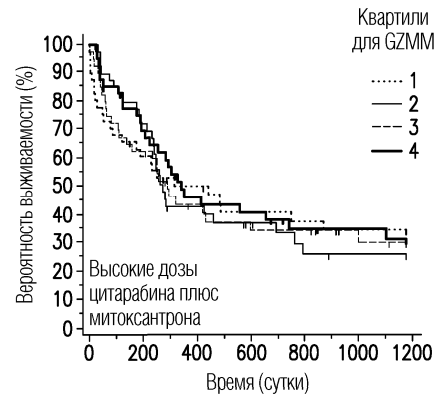
Фиг. 4В



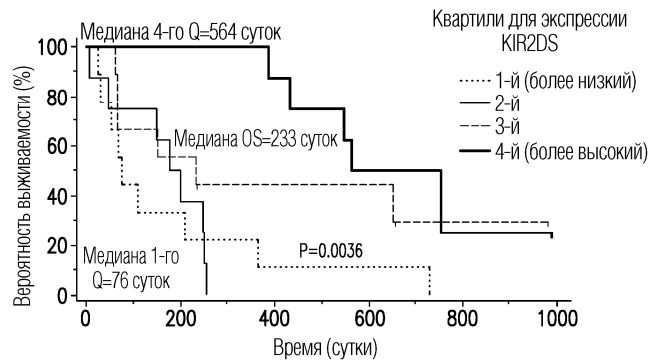
Фиг. 5



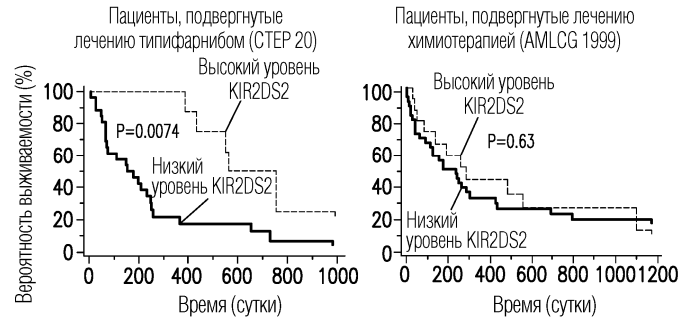
Фиг. 6А



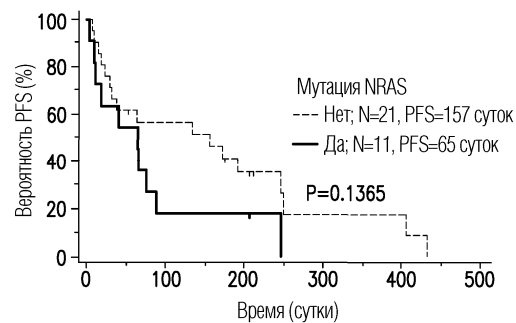
Фиг. 6В



Фиг. 7А



Фиг. 7В



Фиг. 8

Ответы у пациентов с мутантным NRAS

Отвѣты у пациентов
с WT NRAS

CR
CR
HI
SD
SD
SD
SD
PD
PD
PD
PD

CR
CR
CR
CR
CR
CR
HI
HI
HI
SD
SD
SD
SD
SD
PD
PD
PD
PD
PD

WT NRAS: N=21, 6CR и 3 HI, 43% ORR

Мутантный NRAS: N=11, 2CR и 3 HI, 27% ORR

ФИГ. 9