

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **028984**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2018.01.31

(21) Номер заявки
201491787

(22) Дата подачи заявки
2013.03.27

(51) Int. Cl. *A61K 31/4439* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
G11B 20/00 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ (S)-ПИРРОЛИДИН-1,2-ДИКАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ 2-АМИД 1-({4-МЕТИЛ-5-[2-(2,2,2-ТРИФТОР-1,1-ДИМЕТИЛЭТИЛ)ПИРИДИН-4-ИЛ]ТИАЗОЛ-2-ИЛ}АМИДА) ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

(31) **61/617,284; 61/767,848**

(32) **2012.03.29; 2013.02.22**

(33) **US**

(43) **2015.01.30**

(86) **PCT/EP2013/056600**

(87) **WO 2013/144249 2013.10.03**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НОВАРТИС АГ (CH)

(72) Изобретатель:
**Фюре Паскаль, Фритч Кристин, Мера
Савер-Мишель (CH)**

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

(56) **WO-A1-2012016970**

SABBAH DIMA A. ET AL.: "Biological evaluation and docking studies of recently identified inhibitors of phosphoinositide-3-kinases", *BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS*, vol. 22, no. 2, January 2012 (2012-01), pages 876-880, XP002697245, table 3

FRAZZETTO MARK ET AL.: "Dissecting isoform selectivity of PI3K inhibitors: the role of non-conserved residues in the catalytic pocket", *BIOCHEMICAL JOURNAL*, vol. 414, no. Part 3, September 2008 (2008-09), pages 383-390, XP002697246, table 2 page 387 under the headmark: "The influence of p110alpha mutations on inhibitor potency"

EP-A1-2377933

(57) Изобретение относится к применению (S)-пирролидин-1,2-дикарбоновой кислоты 2-амид 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилэтил)пиридин-4-ил]тиазол-2-ил}амида) или его фармацевтически приемлемой соли для лечения рака у пациента, имеющего глутамин в положении 859 каталитической субъединицы p110 α PI3K или имеющего последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует глутамин в положении 859 каталитической субъединицы p110 α PI3K. Рак может быть выбран из группы, состоящей из глиобластомы, меланомы, рака яичников, рака молочной железы, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), эндометриального рака, рака простаты, рака толстой кишки и миеломы.

B1**028984****028984****B1**

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США No. 61/617284, поданной 29 марта 2012 года, и предварительной заявки на патент США No. 61/767848, поданной 22 февраля 2013 года, полное содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Область техники, к которой относится изобретение

Данное изобретение относится к новым индивидуальным видам терапии, способам применения в лечении пациентов, имеющих рак.

Уровень техники, предшествующий изобретению

Фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) содержат семейство липидкиназ, которые катализируют перенос фосфата в D-3' положение инозитсодержащих липидов с получением фосфоинозитол-3-фосфата (PIP), фосфоинозитол-3,4-дифосфата (PIP₂) и фосфоинозитол-3,4,5-трифосфата (PIP₃), которые, в свою очередь, действуют в качестве вторичных мессенджеров в сигнальных каскадах посредством стыкующих белков, содержащих плекстрин-гомологичный, FYVE, Phox и другие фосфолипид-связывающие домены, во множестве сигнальных комплексов, часто в плазматической мембране (Vanhaesebroeck et al., *Annu. Rev. Biochem.* 70:535 (2001); Katso et al., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17:615 (2001)). Из двух PI3K класса I PI3K класса 1A являются гетеродимерами, составленными из каталитической субъединицы p110 (α, β, δ изоформы), конститутивно ассоциированной с регуляторной субъединицей, которая может являться p85 α , p55 α , p50 α , p85 β или p55 γ . Подкласс 1B класса имеет один член семейства, гетеродимер, составленный из каталитической субъединицы p110 γ , ассоциированной или с p101 или с p84 двух регуляторных субъединиц (Fruman et al., *Annu. Rev. Biochem.* 67:481 (1998); Suire et al., *Curr. Biol.* 15:566 (2005)). Модулярные домены p85/55/50 субъединиц содержат домены Src гомологии (SH2), которые связывают фосфотирозиновые остатки в контексте специфической последовательности на активированном рецепторе и цитоплазматические тирозинкиназы, в результате приводя к активации и локализации PI3K класса 1A. Класс 1B как и p110 β при некоторых обстоятельствах активируется напрямую белок-сопряженными рецепторами, которые связывают разнообразный репертуар пептидных и непептидных лигандов (Stephens et al., *Cell* 89:105 (1997)); Katso et al., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17:615-675 (2001)). Следовательно, получающиеся в результате фосфолипидные продукты PI3K класса I связывают расположенные ранее рецепторы с расположенными далее клеточными активностями, включающими пролиферацию, выживаемость, хемотаксис, клеточный транспорт, подвижность, метаболизм, воспалительный и аллергический ответы, транскрипцию и трансляцию (Cantley et al., *Cell* 64:281 (1991); Escobedo and Williams, *Nature* 335:85 (1988); Fantl et al., *Cell* 69:413 (1992)).

PIP₃ направляет Akt, продукт человеческого гомолога вирусного онкогена γ -Akt, к плазматической мембране, где он действует в качестве узловой точки для многих внутриклеточных сигнальных путей, важных для роста и выживаемости (Fantl et al., *Cell* 69:413-423 (1992); Bader et al., *Nature Rev. Cancer* 5:921 (2005); Vivanco and Sawyer, *Nature Rev. Cancer* 2:489 (2002)). Аберрантное регулирование PI3K, которое обычно повышает выживаемость через Akt активацию, является одним из наиболее превалирующих событий в раке человека и, как было продемонстрировано, происходит на множестве уровней. Ген-супрессор опухоли PTEN, который дефосфорилирует фосфоинозитиды в 3'-положении инозитного кольца и, таким образом, противодействует PI3K активности, функционально делетирован во множестве опухолей. В других опухолях гены изоформы p110 α , PIK3CA, и Akt являются амплифицированными, и была продемонстрирована повышенная экспрессия белка из их генных продуктов в нескольких видах рака человека. Кроме того, мутации и транслокации p85 α , которые служат для повышающей регуляции комплекса p85-p110, были описаны для видов рака человека. В заключение, соматические бессмысленные мутации в PIK3CA, которая активирует расположенные далее сигнальные пути, были описаны со значительными частотами для широкого разнообразия видов рака человека (Kang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:802 (2005); Samuels et al., *Science* 304:554 (2004); Samuels et al., *Cancer Cell* 7:561-573 (2005)). Эти наблюдения демонстрируют, что нарушение регулирования фосфоинозитол-3 киназы и расположенных ранее и далее компонентов этого сигнального пути является одним из наиболее частых нарушений регулирования, ассоциированных с видами рака человека и пролиферативными заболеваниями (Parsons et al., *Nature* 436:792 (2005); Hennessey et al., *Nature Rev. Drug Disc.* 4:988-1004 (2005)).

Существует увеличивающаяся совокупность данных, которая предполагает, что генетический профиль пациента может являться определяющим для восприимчивости пациента к терапевтическому воздействию. Учитывая многочисленные виды терапии, доступные для индивидуума, имеющего рак, определение генетических факторов, которые влияют, например, на ответную реакцию на конкретное лекарственное средство, может быть применено для предоставления пациенту индивидуального режима лечения. Такой индивидуальный режим лечения предполагает возможность максимизации терапевтической пользы для пациента с минимизацией при этом связанных с этим побочных эффектов, которые ассоциированы с альтернативным и менее эффективными режимами лечения. Таким образом, существует потребность в идентификации факторов, которые могут быть применены для предсказания того, вероятен ли ответ пациента на конкретное терапевтическое лечение.

Сущность изобретения

Данное изобретение основано на обнаружении того, что идентичность нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислоту в положении 859 в каталитической субъединице p110 α PI3K, может быть применена для отбора индивидуумов, имеющих рак, которые вероятно будут поддаваться лечению с терапевтически эффективным количеством специфичного к альфа-изоформе PI3K ингибиторного соединения, такого как (S)-пирролидин-1,2-дикарбоновой кислоты 2-амид 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилэтил)пиридин-4-ил]тиазол-2-ил}амид) или его фармацевтически приемлемая соль. В частности, было обнаружено, что модификация глутаминового остатка (также обозначаемого в данном документе как Q или Gln) в положении 859 в каталитической p110 α субъединицы PI3K в образце, взятом у индивидуума, имеющего рак, может быть применена для определения того, будет ли индивидуум поддаваться лечению со специфичным к альфа-изоформе PI3K ингибиторным соединением (S)-пирролидин-1,2-дикарбоновой кислоты 2-амид 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилэтил)пиридин-4-ил]тиазол-2-ил}амидом) или его фармацевтически приемлемой солью. Определяющий этап может быть выполнен прямым анализом биологического образца, взятого у индивидуума, на целевой материал (например, мРНК, кДНК, белок и т.д.), представляющий интерес.

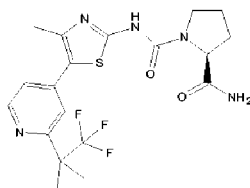
В первом варианте изобретение относится к лечению пациента, имеющего рак, включающему введение терапевтически эффективного количества (S)-пирролидин-1,2-дикарбоновой кислоты 2-амид 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилэтил)пиридин-4-ил]тиазол-2-ил}амида) или его фармацевтически приемлемой соли пациенту на основании того, что пациент имеет глутамин в положении 859 каталитической субъединицы p110 α PI3K.

В другом варианте изобретение относится к лечению пациента, имеющего рак, включающий введение терапевтически эффективного количества (S)-пирролидин-1,2-дикарбоновой кислоты 2-амид 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилэтил)пиридин-4-ил]тиазол-2-ил}амида) или его фармацевтически приемлемой соли пациенту на основании того, что пациент имеет последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует глутамин в положении 859 каталитической субъединицы p110 α PI3K. Рак может быть любым раком, включая глиобластому; меланому; рак яичников; рак молочной железы; немелкоклеточный рак легкого (NSCLC); эндометриальный рак, рак простаты; рак толстой кишки и миелому.

Как правило, образец представляет собой образец опухоли и может являться свежемороженым образцом или пропитанным парафином образцом ткани.

В способах по изобретению, как описано в данном документе, способы детектирования глутамина или другого варианта аминокислоты могут быть осуществлены предварительно любым способом, известным в данной области, таким как иммунологические анализы, иммуногистохимия, ELISA, проточная цитометрия, Вестерн-блоттинг, ВЭЖХ и масс-спектропия. В дополнение в способах по изобретению, как описано в данном документе, способы для детектирования мутации в молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей каталитическую субъединицу p110 α PI3K, содержат полимеразную цепную реакцию (ПЦР), полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), анализы на основе Taq-Map, прямое секвенирование, динамическую аллель-специфичную гибридизацию, анализы высокоплотных олигонуклеотидных SNP, анализы полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ), анализы удлинения праймера, олигонуклеотид-лигазные анализы, анализ одноцепочечного конформационного полиморфизма, электрофорез в геле с использованием градиента температуры (TGGE), денатурирующую высокоэффективную жидкостную хроматографию, высокоразрешающий анализ плавления, анализы с неправильно связывающим ДНК белком, SNPLex® или капиллярный электрофорез.

В способах по изобретению, как описано в данном документе, ингибитор PI3K является (S)-пирролидин-1,2-дикарбоновой кислоты 2-амид 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилэтил)пиридин-4-ил]тиазол-2-ил}амидом) или его фармацевтически приемлемой солью; также продемонстрированным ниже в виде формулы (A)



(A).

или его фармацевтически приемлемой солью.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 изображает график, демонстрирующий кривые кинетики АТФ активации для PI3K дикого типа (дт) (константа Михаэлиса (K_m)=60 \pm 6 мкМ) и для Q859A мутанта PI3K α (K_m =72 \pm 8 мкМ).

Фиг. 2 показывает график, демонстрирующий кривые ингибирования для PI3K дикого типа (дт) и для Q859A мутанта PI3K α .

Подробное описание изобретения

Данное изобретение основано на обнаружении того, что наличие или отсутствие мутации в после-

довательности нуклеиновой кислоты, кодирующей глутамин в положении 859 каталитической субъединицы p110 α PI3K, может быть применено для определения вероятности ответной реакции пациента на терапию со специфичным к альфа-изоформе PI3K ингибиторным соединением, таким как (S)-пирролидин-1,2-дикарбоновой кислоты 2-амид 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилэтил)пиридин-4-ил]тиазол-2-ил}амид) или его фармацевтически приемлемая соль. Конкретно, было обнаружено, что последовательность нуклеиновой кислоты из образца от пациента, которая кодирует каталитическую субъединицу дикого типа p110 α PI3K, т.е., имеет глутамин в положении 859, является более вероятно подверженной лечению с ингибирующим альфа субъединицу PI3K соединением (S)-пирролидин-1,2-дикарбоновой кислоты 2-амид 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилэтил)пиридин-4-ил]тиазол-2-ил}амидом). Напротив, последовательность нуклеиновой кислоты из образца от пациента, имеющая мутацию, которая кодирует вариант в положении 859 каталитической субъединицы p110 α PI3K, т.е., кодирует аминокислоту, отличную от глутамина в положении 859, такую как аланин, является менее вероятно подверженной лечению с ингибирующим альфа субъединицу PI3K соединением (S)-пирролидин-1,2-дикарбоновой кислоты 2-амид 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилэтил)пиридин-4-ил]тиазол-2-ил}амидом). Такой пациент должен подвергаться лечению с альтернативным видом терапии рака, таким как другой ингибитор PI3K (как это применяется в данном документе, другой тип ингибитора PI3K α , должен ингибитором, который не является (S)-пирролидин-1,2-дикарбоновой кислоты 2-амид 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилэтил)пиридин-4-ил]тиазол-2-ил}амидом)), и он может являться, но не ограничен ими, лечением с химиотерапевтическим средством или альтернативной ингибирующей PI3K терапией, такой как ингибитор, который может селективно ингибировать изоформу, отличную от альфа формы субъединицы PI3K, или ингибитором, который может ингибировать более чем одну изоформу субъединицы PI3K.

В некоторых вариантах осуществления способов по изобретению наличие или отсутствие мутации в последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует глутамин в положении 859 в каталитической субъединице p110 α PI3K, может быть детектировано анализированием биологического образца на геномную последовательность, нуклеиновую кислоту-продукт, полипептидный продукт или эквивалентный генетический маркер.

В одном примере изобретение содержит генотипирование образца от индивидуума. Для генотипирования нуклеотидные символы, которые кодируют глутамин в положении 859, определяют или в одном аллеле или обоих аллелях гена каталитической субъединицы p110 α PI3K. Применительно к каталитической субъединице p110 α гена PI3K, мутация происходит в нуклеотиде 2575-2577 гена каталитической субъединицы p110 α PI3K в одном или более аллелей. Генотип может быть гомозиготным или гетерозиготным. В способах по изобретению, определение идентичности последовательности нуклеиновой кислоты или белка, в положении 859 может быть сравнено с последовательностью белка дикого типа (GeneID: 5290; кодирующий, например, белок с номером доступа в NCBI NP_006209.2; SEQ ID NO:1), или последовательностью ДНК (SEQ ID NO:2), или последовательностью нуклеиновой кислоты дикого типа (мРНК; номер референсной последовательности в NCBI NM_006218.2), или геномной ДНК (NCBI номер референсной последовательности в NCBI NG_012113.1), соответствующим образом. Вариант в положении 859 (т.е., аминокислота, отличная от глутамина) каталитической субъединицы p110 α PI3K, применяется в отношении изменения в референсной последовательности (дикого типа) белка в положении 859, получающегося в результате генетической мутации в последовательности гена каталитической субъединицы p110 α PI3K, которая кодирует белок. В одном варианте осуществления вариант может являться аланином в положении 859.

Данное открытие, таким образом, предоставляет способы прогнозирования вероятности того, что пациент, имеющий PI3K-экспрессирующий рак будет проявлять благотворную ответную реакцию на терапию с ингибирующим альфа субъединицу PI3K соединением (S)-пирролидин-1,2-дикарбоновой кислоты 2-амид 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилэтил)пиридин-4-ил]тиазол-2-ил}амидом) или его фармацевтически приемлемой солью. Пациенты для такой оценки включают: 1) пациентов, которые имеют PI3K-экспрессирующий рак и которые еще не подвергались какому-либо лечению от рака; 2) пациентов, которые имеют PI3K-экспрессирующий рак и которые подверглись полной или частичной резекции рака, например, которые подверглись хирургическому удалению раковых тканей в клинически возможной степени; и 3) пациентов, которые имеют PI3K-экспрессирующий рак и которые подвергались режиму лечения, отличному от режима лечения с ингибитором PI3K.

В целях изобретения, образец анализируется на наличие или отсутствие мутации, кодирующей глутамин в положении 859 каталитической субъединицы p110 α PI3K гена PIK3CA. В одном примере мутация приводит к замене/варианту глутамина с аланином в положении 859 в человеческой каталитической субъединице p110 α PI3K гена PIK3CA (Q859A) [GeneID: 5290; кодирующий, например, белок с номером доступа в NCBI NP_006209.2 (SEQ ID NO: 1)].

Изобретение содержит ингибирующее альфа субъединицу PI3K соединение (S) -пирролидин-1,2-дикарбоновой кислоты 2-амид 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилэтил)пиридин-4-ил]тиазол-2-ил}амид) или его фармацевтически приемлемую соль для применения в лечении рака, что характеризу-

ется тем, что терапевтически эффективное количество указанного соединения или его фармацевтически приемлемой соли вводят пациенту на основании того, что указанный пациент имеет глутамин в положении 859 каталитической субъединицы p110 α PI3K.

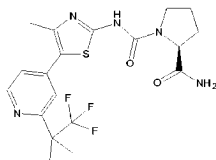
В еще одном варианте изобретение содержит ингибирующее альфа субъединицу PI3K соединение (S)-пирролидин-1,2-дикарбоновой кислоты 2-амид 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилэтил)пиридин-4-ил]тиазол-2-ил}-амид) или его фармацевтически приемлемую соль для применения в лечении рака, что характеризуется тем, что терапевтически эффективное количество указанного соединения или его фармацевтически приемлемой соли вводят пациенту на основании того, что указанный пациент имеет нуклеиновую кислоту, кодирующую глутамин в положении 859 каталитической субъединицы p110 α PI3K.

Ингибиторы PI3K

В соответствии с данным изобретением пациенты, имеющие опухоли, которые экспрессируют форму дикого типа каталитической субъединицы p110 α PI3K, более вероятно будут подвержены лечению с ингибирующим альфа субъединицу PI3K соединением (S)-пирролидин-1,2-дикарбоновой кислоты 2-амид 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилэтил)пиридин-4-ил]тиазол-2-ил}-амидом) или его фармацевтически приемлемой солью.

В используемом в данном документе значении термин "ингибитор альфа субъединицы PI3K" представляет собой молекулу, которая может ингибировать каталитическую субъединицу p110 α PI3K. Предполагается, что ингибитор альфа субъединицы PI3K может селективно ингибировать альфа подтип PI3K, по сравнению с его способностью ингибировать другие подтипы, включая бета, и/или дельта, и/или гамма подтипы.

WO 2010/029082 описывает специфические производные 2-карбоксамидциклоаминомочевины, которые, как было обнаружено, обладают преимущественными фармакологическими свойствами и демонстрируют улучшенную селективность для PI3-киназы альфа подтипа, по сравнению с другими типами. Специфические производные 2-карбоксамидциклоаминомочевины, которые являются подходящими для данного изобретения их приготовление и подходящие составы, их содержащие, описаны в WO 2010/029082. В способах по изобретению, описанных в данном документе, ингибитор альфа субъединицы PI3K может являться соединением (S)-пирролидин-1,2-дикарбоновой кислоты 2-амид 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилэтил)пиридин-4-ил]тиазол-2-ил}-амидом) или его фармацевтически приемлемой солью. Ингибитор альфа субъединицы PI3K, применяемый в данном изобретении, является соединением с формулой (A)



(A).

или его фармацевтически приемлемой солью. Это соединение подробно описано в WO2010/029082. Синтез этого соединения описан в WO 2010/029082 в качестве примера 15.

Ингибирующее альфа субъединицу PI3K соединение, описанное в данном документе, может являться самым агентом, его фармацевтически приемлемой солью, его фармацевтически приемлемым сложным эфиром, также как и стереоизомером, энантиомером, рацемической смесью и тому подобным.

Приготовление образцов

Если нуклеиновая кислота кодирует аминокислоту глутамин дикого типа, это указывает на то, что пациент должен быть выбран и подвергаться лечению с ингибирующим альфа субъединицу PI3K соединением (как указано выше). Однако если нуклеиновая кислота имеет мутацию и кодирует вариант аминокислоты, т.е., кодирует аминокислоту, отличную от глутамина, то пациент не должен подвергаться лечению с ингибирующим альфа субъединицу PI3K соединением (как указано выше).

Изобретение может содержать детектирование мутации в жидкости организма, такой как кровь (например, сыворотка или плазма), костный мозг, спинномозговая жидкость, перитонеальная/плевральная жидкость, лимфатическая жидкость, асцит, серозная жидкость, слюна, слезная жидкость, кал и моча или в ткани, такой как опухолевая ткань. Опухолевая ткань может являться свежей тканью или пропитанной парафином тканью.

В используемом в данном документе значении "пациент" относится к человеку или животному, включая всех млекопитающих, таких как приматы (в особенности высшие приматы), овца, собака, грызуны (например, мышь или крыса), морская свинка, коза, свинья, кошка, кролик и корова. В предпочтительном варианте осуществления пациент является человеком. В другом варианте осуществления пациент является экспериментальным животным или животным, подходящим для модели заболевания.

Образцы жидкости организма могут быть получены от пациента с применением любого из способов, известных в данной области. Способы выделения клеточной ДНК из образцов жидкости организма хорошо известны в данной области. Как правило, клетки лизируют с детергентами. После клеточного

лизиса белки удаляют из ДНК с применением различных протеаз. ДНК затем выделяют с фенолом, осаждают в спирте и растворяют в водном растворе. Способы выделения бесклеточной ДНК из образцов жидкости организма также известны в данной области. Обычно бесклеточную ДНК в образце жидкости организма отделяют от клеток, осаждают в спирте и растворяют в водном растворе.

Как правило, твердый образец опухоли может являться тестовым образцом клеток или ткани, которые получены от пациента с раком биопсией или хирургической резекцией. Образец клеток или ткани может быть удален биопсией аспирацией иглой.

Для этого тонкую иглу, присоединенную к шприцу, вводят через кожу в целевую ткань. Иглу, как правило, направляют в целевую область с применением ультразвука или визуализации компьютерной томографией (КТ). Когда иглу вводят в ткань, создают вакуум шприцом, вследствие чего клетки или жидкость могут быть вытянуты через иглу и собраны в шприце. Образец клеток или ткани может также быть удален эксцизионной или толстоигольной биопсией. Для этого, конусообразный, цилиндрический или очень маленький кусочек ткани удаляют из целевой области. КТ-визуализацию, ультразвук или эндоскоп, как правило, применяют для направления этого типа биопсии. Более конкретно, весь раковый очаг может быть удален эксцизионной биопсией или хирургической резекцией. В данном изобретении тестовый образец, как правило, является образцом клеток, удаленных в виде части хирургической резекции.

Тестовый образец, например, ткань может также храниться, например, в RNeasy (Qiagen; Austin Тех.), или быть мгновенно замороженным и храниться при -80°C для дальнейшего использования. Биопсированный образец ткани может также быть зафиксирован в фиксаторе, таком как формальдегид, параформальдегид или уксусная кислота/этанол. Зафиксированный образец ткани может быть залит воском (парафином) или пластичной смолой. Залитый образец ткани (или замороженный образец ткани) может быть разрезан на тонкие срезы. РНК или белок могут также быть выделены из зафиксированного или залитого воском образца ткани.

PI3K-экспрессирующие виды рака, пригодные для лечения в соответствии с данным изобретением, содержат виды рака или клеточных пролиферативных заболеваний, такие как опухоль и/или раковый клеточный рост, опосредованные PI3K. Заболевания могут содержать демонстрирующие сверхэкспрессию или амплификацию PI3K альфа, соматическую мутацию PIK3CA или мутации зародышевых линий или соматическую мутацию PTEN или мутации и транслокацию p85 α , который служит для повышающей регуляции комплекса p85-p110. В частности, рак содержит, например, саркому; рак легкого; бронха; простаты; молочной железы (включая спорадические виды рака груди и пострадавших от болезни Каудена); поджелудочной железы; гастроинтестинальный рак; толстой кишки; прямой кишки; карциному толстой кишки; колоректальную аденому; щитовидной железы; печени; внутрипеченочных желчных протоков; гепатоклеточный; надпочечника; желудка; гастриальный; глиому; глиобластому; эндометриальный; меланому; почки; почечной лоханки; мочевого пузыря; тела матки; шейки матки; влагалища; яичника; множественную миелому; пищевода; лейкемию; острую миелогенную лейкемию; хроническую миелогенную лейкемию; лимфоцитарную лейкемию; миелоидную лейкемию; мозга; карциному мозга; ротовой полости и глотки; гортани; тонкого кишечника; неходжкинскую лимфому; меланому; ворсинчатую аденому толстой кишки; неоплазию; неоплазию эпителиального характера; лимфомы; карциному молочной железы; базально-клеточную карциному; плоскоклеточную карциному; актинический кератоз; опухолевые заболевания, включая твердые опухоли; опухоль шеи или головы; истинную полицитемию; эссенциальную тромбоцитемию; миелофиброз с миелоидной метаплазией и болезнь Вальденстрема.

Детектирование

Изобретение содержит детектирование нуклеиновой кислоты, кодирующей мутированную аминокислоту в положении 859 для предсказания ответной реакции пациента на лечение PI3K лекарственным средством. Так как мутации в каталитической p110 α субъединице PI3K, как правило, происходят на уровне ДНК, способы по изобретению могут быть основаны на детектировании мутаций в геномной ДНК, также как и в транскриптах (мРНК, кДНК) и самих белках.

Мутации в каталитической субъединице PI3K p110 α , описанные в данном документе, могут быть детектированы любым известным в данной области способом. В описании мутации в каталитической субъединице PI3K p110 α по изобретению мутация содержит любую аминокислотную замену глутаминовой аминокислоты (Q), которая присутствует в последовательности дикого типа в положении 859, например, может присутствовать замена глутамин (Q) на аланин (A). В дополнение мутация в каталитической субъединице p110 α PI3K в данном документе относится к кодирующей цепи гена для удобства. Как признает специалист в данной области, тем не менее, молекулы нуклеиновых кислот, содержащие ген могут, являясь комплементарными двухцепочечными молекулами и таким образом ссылка к конкретному сайту на кодирующей цепи также относится к соответствующему сайту на комплементарной антисмысловой цепи. То есть, может быть осуществлена ссылка к мутантному сайту на любой из цепей и олигонуклеотид может быть сконструирован для гибридизации специфично с любой цепью в целевой области, содержащей полиморфный и/или мутантный сайт. Таким образом, изобретение также содержит одноцепочечные полинуклеотиды и мутации, которые являются комплементарными к кодирующей цепи геном-

ных вариантов, описанных в данном документе.

Более разнообразные технологии могут быть применены для идентификации того, если последовательность нуклеиновой кислоты кодирует мутацию в положении 859 в каталитической субъединице p110 α PI3K, включая анализ одноцепочечного конформационного полиморфизма (SSCP), гетеродуплексный анализ денатурирующей высокоэффективной жидкостной хроматографией (ДВЭЖХ), прямое секвенирование ДНК и вычислительные способы (Shi et al, Clin Chem 47:164-172 (2001)). Наиболее распространенные способы в настоящее время содержат гибридизацию, достройку праймера и способы расщепления. Каждый из этих способов должен быть соединен с соответствующей детекторной системой. Технологии детектирования содержат флуоресцентную поляризацию (Chan et al, Genome Res. 9:492-499 (1999)), люминометрическое детектирование высвобождения пирофосфата (пиросеквенирование) (Ahmadiian et al, Anal. Biochem. 280:103-110 (2000)), анализы расщепления на основе резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET), ДВЭЖХ и масс-спектроскопию (Shi, Clin Chem 47:164-172 (2001); Патент США No. 6300076 B1).

Автоматический анализатор (например, устройство для ПЦР или устройство для автоматического секвенирования) применяется для определения наличия или отсутствия мутации в положении 2575-2577 (кодон, который кодирует Gln в положении 859) в каталитической p110 альфа субъединице PI3K. Все такие способы хорошо известны специалистам в данной области.

Мутации могут быть детектированы с применением технологии INVADER™ (доступной у Third Wave Technologies Inc. Madison, Wisconsin USA). В этом анализе специфичный расположенный ранее олигонуклеотид "захватчик" и частично перекрывающийся расположенный далее зонд вместе образуют специфичную структуру, когда они связаны с комплементарной ДНК матрицей. Эта структура распознается и разрезается в специфичном сайте ферментом Клеваза, в результате, приводя к высвобождению 5' флэпов зонда олигонуклеотида. Этот фрагмент затем служит в качестве олигонуклеотида "захватчика" применительно к синтетическим вторичным мишеням и вторичным флуоресцентно меченым сигнальным зондам, содержащимся в реакционной смеси. Это приводит к специфичному расщеплению вторичных сигнальных зондов ферментом Клеваза. Флуоресцентный сигнал генерируется, когда этот вторичный зонд (меченый с молекулами красителя, способными к резонансному переносу энергии флуоресценции) расщепляется. Клевазы имеют строгие требования относительно их структуры, образованной перекрытием ДНК последовательностей или флэпов, и могут, следовательно, применяться для специфичного детектирования несоответствия одиночной пары оснований непосредственно перед сайтом расщепления расположенной далее цепи ДНК. Ryan D et al, Molecular Diagnosis 4(2): 135-144 (1999) and Lyamichev V et al, Nature Biotechnology 17: 292-296 (1999), см. также Патенты США No. 5846717 и 6001567.

Область, содержащая целевую мутацию может быть амплифицирована с применением любого способа, направленного на олигонуклеотидную амплификацию, включая, но не ограничиваясь им, полимеразную цепную реакцию (ПЦР) (патент США No. 4965188), лигазную цепную реакцию (ЛЦР) (Barany et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193 (1991); публикация патента согласно PCT WO 90/01069) и лигирование олигонуклеотидных зондов (ЛОЗ) (Landegren et al, Science 241: 1077-1080 (1988)).

Олигонуклеотиды, пригодные в качестве праймеров или зондов, в таких способах должны специфично гибридизоваться с областью нуклеиновой кислоты, которая содержит или расположена близко к полиморфному/мутантному сайту. Как правило, олигонуклеотиды составляют между 10 и 35 нуклеотидов в длину и предпочтительно, между 15 и 30 нуклеотидов в длину. Наиболее предпочтительно олигонуклеотиды составляют от 20 до 25 нуклеотидов в длину. Точная длина олигонуклеотида будет зависеть от многих факторов, которые обычно рассматриваются и применяются на практике специалистами в данной области.

Другие известные процедуры амплификации нуклеиновой кислоты могут быть применены для амплификации области, содержащей мутацию каталитической субъединицы p110 α в положении 859, содержат системы амплификации на основе транскрипции (патент США No. 5130238; EP 329822; патент США No. 5169766, публикация патента согласно PCT WO 89/06700) и изотермические способы (Walker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 392-396 (1992)).

Мутация в положении 859 каталитической субъединицы p110 α может быть проанализирована до или после амплификации с использованием нескольких основанных на гибридизации способов, известных в данной области. Как правило, в выполнении таких методов используются аллель-специфичные олигонуклеотиды. Аллель-специфичные олигонуклеотиды могут быть применены в виде различно меченых пар зондов, с одним членом пары, демонстрирующим совершенное соответствие с одним вариантом целевой последовательности и другим членом, демонстрирующим совершенное соответствие с другим вариантом. Предпочтительно, члены набора имеют температуры плавления в пределах 5°C по Цельсию и более предпочтительно в пределах 2°C, друг от друга, при гибридизации с которыми детектируют полиморфный или мутантный сайты. Гибридизация аллель-специфичного олигонуклеотида с целевым полинуклеотидом может быть выполнена с обоими объектами в растворе или такая гибридизация может быть выполнена, когда любой из олигонуклеотида или целевого полинуклеотида ковалентно или нековалентно закреплен на твердой подложке. Прикрепление может быть опосредовано, например, взаимодействием

ем антитело-антиген, поли-L-Lys, стрептавидин или авидин-биотин, солевыми мостиками, гидрофобными взаимодействиями, химическими связями, УФ перекрестным сшиванием, отжигом и т.д. Аллель-специфичный олигонуклеотид может быть синтезирован непосредственно на твердой подложке или прикреплен к твердой подложке после синтеза. Твердые подложки, подходящие для применения в способах детектирования по изобретению, содержат основы, изготовленные из кремния, стекла, пластика, бумаги и тому подобного, которые могут быть сформированы, например, в виде лунок (как в 96-луночные планшеты), слайдов, листов, мембран, волокон, крошки, тарелок и гранул. Твердая подложка может быть обработана, покрыта или дериватизирована для облегчения иммобилизации аллель-специфичного олигонуклеотида или целевой нуклеиновой кислоты.

Полипептиды, имеющие глутамин в положении 859 или имеющие замену в положении 859 каталитической субъединицы p110, могут также быть проанализированы с применением способов, известных в данной области, таких как радиоиммунологические анализы или фермент-связанные иммунологические анализы, иммунологические анализы с конкурентным связыванием, масс-спектроскопия, технологии/платформы для анализа на месте, дот-блот, Вестерн-блоттинг, хроматография, предпочтительно высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) или тому подобное. Могут быть применены меченые антитела, связывающие их связывающие участки или другие партнеры по связыванию. Антитела могут быть моноклонального или поликлонального происхождения и могут быть продуцированными биосинтетически. Партнеры по связыванию могут являться встречающимися в природе молекулами или продуцированными синтетически. Количество связанных в комплекс белков определяют с применением стандартных методологий детектирования белка, описанных в данной области. Детальный обзор конструкций иммунологических анализов, теорий и протоколов можно найти в многочисленных текстах в данной области, включая *Practical Immunology*, Butt, W. R., ed., Marcel Dekker, New York, 1984.

Множество различных меток может быть применено в анализах по изобретению, включая прямые метки, такие как флуоресцентные или люминесцентные метки, металлы, красители, радионуклиды и тому подобное, присоединенные к антителу. Непрямые метки содержат различные ферменты хорошо известные в данной области, такие как щелочная фосфатаза, гидроген пероксидаза и тому подобное. В одноэтапном анализе целевой белок (т.е., каталитическую субъединицу p110, имеющую глутамин в положении 859) иммобилизуют и инкубируют с меченым антителом. Меченое антитело связывается с иммобилизированной целевой молекулой. После промывания для удаления несвязанных молекул образец анализируют на наличие метки. Многочисленные иммуногистохимические способы включены в форматы диагностики на месте и переносные наборы, все из которых могут быть применены для определения наличия белка.

Применение иммобилизованных антител, специфичных к белкам или полипептидам, также предусмотрено данным открытием. Антитела могут быть иммобилизованы на множестве твердых подложек, таких как магнитные или хроматографические частицы, поверхность места анализа (такая как лунки для микротитрования), куски твердого материала субстрата (такого как пластик, нейлон, бумага) и тому подобное. Полоска для анализа может быть приготовлена нанесением антитела или ряда антител упорядочено на твердую подложку. Затем полоска может быть погружена в тестовый образец и подвержена этапам промывки и детектирования для генерирования измеряемого сигнала, например, окрашенной точки.

В двухэтапном анализе иммобилизованный целевой белок (например, каталитическая субъединица p110, имеющая глутамин в положении 859) может быть инкубирована с немеченым антителом. Комплекс с немеченым антителом при его наличии затем связывается с вторичным, меченым антителом, которое специфично к немеченому антителу. Образец промывают и анализируют на наличие метки. Выбор маркера, применяемого для мечения антитела, будет варьироваться в зависимости от применения. Однако, выбор маркера является легко определяемым для специалиста в данной области.

Дот-блоттинг регулярно применяется на практике специалистом в данной области для детектирования требуемого белка с применением антитела в качестве зонда (*Promega Protocols and Applications Guide*, Second Edition, 1991, Page 263, Promega Corporation). Образцы наносят на мембрану с применением устройства для дот-блоттинга. Меченый зонд инкубируют мембраной и детектируют наличие белка.

Вестерн-блоттинг анализ хорошо известен специалисту в данной области (*Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 1989, Vol. 3, Chapter 18, Cold Spring Harbor Laboratory). В Вестерн-блоттинге образец разделяют с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза. Гель переносят на мембрану. Мембрану инкубируют с меченым антителом для детектирования требуемого белка.

Введение

Ингибирующее альфа субъединицу PI3K соединение (S)-пирролидин-1,2-дикарбоновой кислоты 2-амид 1-(4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилэтил)пиридин-4-ил]тиазол-2-ил)амид) или его фармацевтически приемлемая соль могут быть введены в терапевтически эффективных количествах посредством любого из обычных и приемлемых способов, известных в данной области, или отдельно или в комбинации с одним или более терапевтических агентов. Терапевтически эффективное количество может широко варьироваться в зависимости от тяжести заболевания, возраста и состояния здоровья пациента, эффективности применяемого соединения и других факторов. Для вышеприведенных применений тре-

буемая дозировка без сомнения будет варьироваться в зависимости от способа введения, конкретного состояния, которое будет подвергаться лечению, и желаемого эффекта.

В целом, для удовлетворительных результатов предусмотрено получение систематических суточных дозировок от приблизительно 0,03 до приблизительно 100,0 мг/кг в расчете на массу тела, например, от приблизительно 0,03 до приблизительно 10,0 мг/кг в расчете на массу тела соединения (S)-пирролидин-1,2-дикарбоновой кислоты 2-амид 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилэтил)пиридин-4-ил]-тиазол-2-ил}амида) или его фармацевтически приемлемой соли. Указанная суточная дозировка в более крупных млекопитающих, например, людях, находится в пределах от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 3 г, например, от приблизительно 5 мг до приблизительно 1,5 г соединения (S)-пирролидин-1,2-дикарбоновой кислоты 2-амид 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилэтил)пиридин-4-ил]-тиазол-2-ил}амида) или его фармацевтически приемлемой соли, удобно введенной, например, в разделенных дозах вплоть до четырех раз в сутки или замедленной форме. Подходящие единичные формы дозирования для орального введения содержат от приблизительно 0,1 до приблизительно 500 мг, например, от приблизительно 1,0 до приблизительно 500 мг соединения (S)-пирролидин-1,2-дикарбоновой кислоты 2-амид 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилэтил)пиридин-4-ил]-тиазол-2-ил}амида) или его фармацевтически приемлемой соли. Ингибирующее альфа субъединицу PI3K соединение (S)-пирролидин-1,2-дикарбоновой кислоты 2-амид 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилэтил)пиридин-4-ил]-тиазол-2-ил}амида) или его фармацевтически приемлемая соль, как описано в данном документе, могут быть введены в виде фармацевтической композиции любым стандартным путем, в частности энтерально, например, орально, например, в форме таблеток или капсул или парентерально, например, в форме инъеклируемых растворов или суспензий, местно, например, в форме лосьонов, гелей, мазей или кремов или в назальной или суппозиторной форме.

Примеры

Пример 1. Материалы и способы клонирования и экспрессии каталитической p110 α дикого типа и мутанта Q859A с изоформой 1 p85.

Манипулирование ДНК и плазмиды: стандартные технологии молекулярной биологии применяли для конструирования описанных плазмид. Все ферменты получали у Roche Diagnostics и New England BioLabs. ДНК фрагменты являлись или очищенными с применением набора GenElute PCR Clean-up (Sigma), или являлись выделенными из препаративных агарозных гелей с Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel). Лигирования ДНК выполняли от 1 до 4 ч при комнатной температуре набором Rapid DNA Ligation (Roche Diagnostics) и трансформировали в E.coli DH5 альфа (Invitrogen). Плазмидную ДНК очищали с набором QIAprep 8 Miniprep (QIAGEN) или набором GenElute HP Plasmid Midiprep (Sigma). Все процедуры выполняли, как описано в соответствующих руководствах.

Приготавливали плазмиду His-Nativ hPI3k-alpha/p85 pDUAL Consensus. Для этого конструктор, бычий ДНК фрагмент из 3243 п.о., содержащий всю открытую рамку считывания бычьей p110 α изоформы PI3-K (RefSeq NM 174574.1), амплифицировали ПЦР из плазмиды, предоставленной Matthias Wymann (Institute of Biochemistry, University of Freiburg), с применением совместимых праймеров GATEWAY, показанных в табл. 1. Кратко, прямой праймер PI3Ka FOR GATE содержал сайт рестрикции BamH I (одинарное подчеркивание), сайт распознавания Козака (двойное подчеркивание) и последовательность attB1, требуемую для GATEWAY клонирования (курсив), тогда как обратный праймер PI3 Ka REV GATE содержал сайт рестрикции Hind III (одинарное подчеркивание) и последовательность attB2 GATEWAY (курсив). ПЦР амплификации выполняли с применением ДНК полимеразы High Fidelity Platinum Pfx (Invitrogen) согласно протоколам изготовителя.

Таблица 1

Праймеры, применяемые для амплификации ПЦР бычьего PI3-K α

Название праймера	Последовательность праймера
PI3_Ka_FOR_GATE	GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TGG GGATCC ACC ATG CCT CCA AGA CCA TCA TCA GGT GAA CTG (SEQ ID NO:3)
PI3_Ka_REV_GATE	GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG AAGCTT TCA GTT CAA AGC ATG CTG CTT AAT (SEQ ID NO:4)

После ПЦР, фрагменты очищали с применением 30% PEG 8000; 30 mM MgCl₂ для удаления димеров праймера attB и транспонировали в исходный вектор GATEWAY pDONOR 201. Кратко, 4 мкл ПЦР продукта (10 нг/мкл) смешивали с 2 мкл реакционной смеси, 1 мкл pDONOR 201 (150 нг/л), 2 мкл BP Clonase и 1 мкл TE и инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин перед добавлением 2 мкл протеиназы K (2 мкг/мкл). Затем образцы инкубировали дополнительно в течение 60 мин при 37°C и затем применяли для трансформации компетентных клеток DH5 α .

Позитивные рекомбинантные плазмиды PI3-K α pDONOR впоследствии идентифицировали анализом с рестрикционными ферментами и подтверждали последовательность (SOLVIAS). 2 мкл свежеприготовленной PI3-K α pDONOR затем смешивали с 2 мкл pDEST 20 (150 нг/мкл), 2 мкл реакционной смеси, 2 мкл LR Clonase и 2 мкл TE. Образцы инкубировали при комнатной температуре, как описано выше

перед трансформацией компетентных клеток DH5 α для создания GST-PI3-K α pDEST 20.

ПЦР продукт из 3933 п.о., содержащий всю открытую рамку считывания GST-PI3-K α , затем амплифицировали с применением ген-специфичных олигонуклеотидов, содержащих фланкирующие сайты Spe I и Hind III (подчеркнуты) (Табл. 2) из GST-PI3-K α pDEST 20 и лигировали в p50 pFastBac DUAL, как описано выше.

Таблица 2

Праймеры, применяемые для амплификации GST-PI3-K α ПЦР

Название праймера	Последовательность праймера
GST-FOR	AGCA <u>ACTAGT</u> ACC ATG GCC CTT ATA CTA GTT (SEQ ID NO:5)
PI3_Ka_REV_GATE	GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG <u>AAGCTT</u> TCA GTT CAA AGC ATG CTG CTT AAT (SEQ ID NO:6)

Позитивные рекомбинантные плазмиды, содержащие как GST-PI3-K α , так и усеченные p85 адапторные белки (bovGST-PI3-K α /p85 pFastbac DUAL), затем подтверждали анализом рестрикционного расщепления и проверяли последовательность (SOLVIAS).

Номерами доступа в RefSeq для бычьего PIK3CA (p110 α) и человеческого PIK3R1 (p85 α изоформа 1) являются NM_174574.1 и NM_181523, соответственно.

Первичную последовательность всех конструкторов, полученных из ПЦР, подтверждали секвенированием у Solvias AG, Basel.

ПЦР амплификации: ПЦР-амплификации выполняли на термоциклере MJ-Research DNA Engine PTC-200 в общем объеме 100 мкл с Pwo Master (Roche).

Адапторный белок p85 α (PIK3R1, 1-724 aa) полной длины амплифицировали из 1 нг плазмиды pCMV6 XL5::p85 α Изоформа 1 (Номер по каталогу TC11320, Origene) с конечной концентрацией 500 нМ любого праймера, 1 \times Master Mix, 5% ДМСО и следующими праймерами: p85upnew: 5'-CCGCGGATC CACCATGAGTGCTGAGGGGTACCAG-3' (SEQ ID NO:7) и p85do: 5'-GCCGGAATTCTCATCGCCTC TGCTGTGCATATAC-3' (SEQ ID NO:8). Параметры циклирования являлись следующими: 94°C, 2 мин; (94°C, 15 с; 53°C, 30 с; 72°C, 60 с)₁₀; (72°C, 60 с + 5 с/цикл)₁₉; 72°C, 7 мин.

Праймеры p85upnew и p85do вводят сайты рестрикционного фермента для BamHI и EcoRI на N-конце и C-конце, соответственно.

Клонирование.

Клонирование изоформы 1 p85 альфа (PI3KR1) в pFastBac1.

Бакуловирусный вектор pFastBac1 (Invitrogen) и амплифицированную ДНК изоформы 1 p85 α разрезали с BamHI и EcoRI и подвергали очистке через гель. Лигирование выполняли в течение 1 ч при комнатной температуре, и компетентные клетки E. coli DH5 α трансформировали для получения плазмиды pFastBac::p85 α изоформа 1.

Клонирование каталитической p110 альфа (PIK3CA) в pFastBac1.

Плазмиду His-Nativ hPI3k-альфа p85 pDUAL расщепляли с BamHI и HindIII. Полученный фрагмент очищали от агарозных гелей и лигировали в течение от 2 до 4 ч при комнатной температуре в pFastBac1, разрезанную такими же рестрикционными ферментами. Трансформация в компетентные клетки E. coli DH5 α привела к плазмиде pFastBac: :p110 α .

Мутагенез.

Мутагенез для генерирования мутанта Q859A PI3K α (p110 α) выполняли с набором для сайт-направленного мутагенеза QuikChange II (Stratagene (номер по каталогу 200523) и олигонуклеотидами p110Q859Aup (5'-GAAATTCTCACACTATAATGGCTATTTCAGTGTAAAGGAGGCCTG-3') (SEQ ID NO:9) и p110Q859Ado (5'-CAGGCCCTCTTTACACTGAATAGCCATTATAGTGTGAGAATTTTC-3') (SEQ ID NO:10) в соответствии с протоколом производителя.

Экспрессия белка: (а) генерация вируса и экспрессия белка.

Рекомбинантную бакуловирусную ДНК генерировали транспозированием в E. coli DH10 Bac (Invitrogen). ДНК бакмиды выделяли из единичных колоний и затем трансфицировали в клетки Sf9. Трансфекции, амплификации и анализ бляшкообразования выполняли в соответствии с руководством к бакуловирусной системе экспрессии Bac-to-Bac (Invitrogen) в среде TC-100 (Cambrex), дополненной 10% FCS. Титры вируса определяли стандартными анализами бляшкообразования. Экспрессию выполняли во встряхиваемых колбах, начиная с 1 \times 10⁶ клеток/мл в среде ExCell-420 (JRH Biosciences Ltd), дополненной раствором 0,5 \times Пенициллин/Стрептомицин (Sigma).

Для того чтобы воспроизвести активный холофермент каталитической субъединицы p110 и адапторный белок p85 во время экспрессии клетки Sf9 коинфицировали обоими вирусами одновременно. Белки экспрессировали в 100 мл культуральной среды в течение 72 ч при 27°C в соответствии с протоколом TIPS, как описано в другом месте (например, Erdmann et al (2010), J.Biomol.Tech.; 21 (1):9-17). Относительное соотношение коинфекции p110 к p85 варьировали, и оптимальное соотношение коинфекции составило 1:1. Белковую экспрессию визуализировали исследованием цельноклеточных лизатов Вес-

терн-блоттингом. Растворимость белка PI3K α является высокой (85-90% растворимо).

Очистка белка.

Рекомбинантные белки очищали от клеток насекомых, инфицированных бакуловирусом Sf9. Приблизительно $1,5 \times 10^3$ клеток из одной ферментации 100 мл ресуспендировали в 12 мл буфере для лизиса (50 mM Трис pH 7,2, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 1% Triton X-100, 10% глицерин, 6 мкл Бензоназы (25 U/мкл), 1 \times полный ингибитор протеаз (Roche), 1 mM активированного ортованадата натрия) и разрушали ультразвуком (ультразвуковой дезинтегратор Branson Digital W-450D в общем 3 мин в бане лед/этанол (импульсы 30 с, охлаждение 1 мин между импульсами). Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 14000 g (центрифуга Sorvall RC5-B, ротор SS-34, 11000 об/мин, 45 мин при 4°C) и супернатант переносили в новую пробирку.

Для очистки с гистидиновой меткой p110 α /p85 α применяли 1 мл His-Trap HP Ni-сефарозные колонки (номер по каталогу 17-5247-01, GE Healthcare), присоединенные к системе Äkta explorer FPLC. Колонки уравнивали 25 mM Трис-HCl pH 7,5, 0,5M NaCl и осветленные лизаты загружали в суперпетлю при скорости потока 0,5 мл/мин. После промывания 10 объемами колонки раствором 25 mM Трис-HCl pH 7,5, 0,5M NaCl, 25 mM имидазола, связанный белок элюировали ступенчатым градиентом имидазола 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 250 и 500 mM имидазола. Элюированный белок концентрировали приблизительно 10-кратно посредством центрифугирования со спин-колонками Amicon Ultra-15 и после добавления глицерина до конечной 30% (об./об.) разделяли на аликвоты и мгновенно замораживали в жидком азоте.

Концентрацию белка определяли в двух повторениях с набором для анализа белка BCA (номер по каталогу 23227, Pierce) в микротитровальных планшетах согласно протоколу, предоставленному с набором.

Материалы и способы для ферментативного анализа HTRF®

Набор анализа фосфоинозитид-3-киназа (PI3-Киназа или PI3K), гомогенный с временным разрешением (HTRF®), приобрели у Upstate (в настоящее время Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). PIP2 и PiP3 приобрели у Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA), микропланшеты у Greiner (Frickenhäusen, Germany; Catalog No. 781207). Все другие реагенты приобрели у Sigma (St Louis, MO, USA).

Анализ ферментативной гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF®) (от Upstate (сейчас Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) выполняли по существу как описано Sugita et al. (2008), Biochem. Biophys. Res. Commun. 377(3):941-5. PI3K α (0,25-1,5 нг) инкубировали в течение 60 минут при комнатной температуре в 20 мкл буфера, содержащего 10 mM MgCl₂, 30 мкМ ATP, 20 мкМ 1,2-диооктаноил-sn-глицеро-3-фосфо-(1'-мио-инозит-4',5'-бисфосфата) (аммониевая соль) (PIP2), 150 mM NaCl, 5 mM (dl-дтитотрентол) ДТТ и 25 mM Трис/HCl (pH 7,5) в 384-луночных белых планшетах. Киназную реакцию инициировали добавлением АТФ (30 мкМ) для исследований ингибирования и добавлением PI3K α для АТФ кинетики (0-2 0 0 мкМ ATP).

PI3K ингибитор (S)-пирролидин-1,2-дикарбоновой кислоты 2-амид 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилэтил)пиридин-4-ил]тиазол-2-ил}амид) (далее обозначаемый "Соединение I") разбавляли последовательно в диметилсульфоксиде (ДМСО) и в буфере (конечная концентрация: 2,5% ДМСО). Киназную реакцию останавливали добавлением реагентов HTRF в соответствии с инструкциями производителя. Планшет герметизировано закрывали для предотвращения испарения и выдерживали в темноте при комнатной температуре в течение 16 ч. Планшет считывали с применением многометочного считывателя Tecan's GeniosPro® (от Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland) в режиме флуоресценции с временным разрешением (фильтр возбуждения: 340 нм; фильтр испускания 1: 620 нм; фильтр испускания 2: 665 нм; зеркало: dichroic2; время задержки: 150 мкс; время интегрирования: 500 мкс; 10 вспышек).

Сигнал HTRF определяли в соответствии с формулой: HTRF сигнал = $10000 \times (\text{испускание при } 665 \text{ нм} / \text{испускание при } 620 \text{ нм})$.

Сигнал HTRF постепенно снижался зависимым от PIP3 образом и нормализовался как % максимального снижения, полученного с 30 мкМ 1,2-диооктаноил-3-глицеро-3-фосфо-(1'-мио-инозит-3',4',5'-трисфосфатом) (аммониевая соль) (PIP3). Стандартную кривую подготавливали с PIP3 ($EC_{50} = 200 \text{ нМ}$) и применяли для расчета количества PIP3, продуцированного киназной реакцией в соответствии с формулой:

$$[PIP3] = EC_{50} \times (100 - y) / y,$$

где y обозначает нормализованный сигнал HTRF и EC_{50} концентрацию PIP3 при 50% сигнала на стандартной кривой. Расход АТФ и PIP2 никогда не превышал 5%.

АТФ кинетика соответствовала нелинейной регрессии с уравнением Михаэлиса-Ментен и кривые ингибирования Соединением I соответствовали 4-параметрическому логическому уравнению. Универсальную функцию подобию Xlfit® (ID Business Solutions, Guildford, UK) применяли для универсального соответствия всех повторных экспериментов.

Результат.

Применяя вышеприведенные материалы и способы, в экспериментах продемонстрировали кинетику АТФ активации PI3K α , как показано на фиг. 1, и ингибирование PI3K α дикого типа (дт) и мутации

Q859A Соединением I, как показано на фиг. 2.

Фиг. 1 предоставляет средние значения \pm стандартная ошибка (CO.) 14 экспериментов для PI3K дикого типа (дт) (константа Михаэлиса (K_m)= 60 ± 6 мкМ) и 5 экспериментов для Q859A мутанта PI3K α (K_m = 72 ± 8 мкМ). Как суммировано на фиг. 1 к этому документу, PI3K дикого типа (дт) и Q859A мутант PI3K α демонстрируют схожую кинетику АТФ активации PI3K α .

Фиг. 2 предоставляет средние значения \pm стандартная ошибка (CO.) 10 экспериментов PI3K дикого типа (дт) и 7 экспериментов для Q859A мутанта PI3K α . Как суммировано на фиг. 2 к этому документу, мутация Q859A в PI3K α значительно увеличивает IC_{50} до 122 ± 28 нМ по сравнению с диким типом (IC_{50} = $8, 4 \pm 1,0$ нМ). Это 14,5-кратное увеличение IC_{50} до 122 ± 28 нМ очевидно демонстрирует, что мутация Q859 в PI3K α является ключевым остатком для оценки эффективности соединения I при введении.

SEQL.txt

Список последовательностей

```
<110> Furet, Pascal
      Fritsch, Christine
      Maira, Saiveur-Michel

<120> СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА
<130> 55064-US-PSP

<150> 61/617284
<151> 2012-03-29

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 1068
<212> Белок
<213> homo sapiens

<400> 1
Met Pro Pro Arg Pro Ser Ser Gly Glu Leu Trp Gly Ile His Leu Met
1          5          10          15

Pro Pro Arg ile Leu val Glu cys Leu Leu Pro Asn Gly Met ile val
          20          25          30

Thr Leu Glu Cys Leu Arg Glu Ala Thr Leu ile Thr ile Lys His Glu
          35          40          45

Leu phe Lys Glu Ala Arg Lys Tyr Pro Leu His gln Leu Leu gln Asp
          50          55          60

Glu Ser Ser Tyr ile phe val Ser val Thr gln Glu Ala Glu Arg Glu
          65          70          75          80

Glu phe phe Asp Glu Thr Arg Arg Leu cys Asp Leu Arg Leu phe gln
          85          90          95

Pro phe Leu Lys val ile Glu Pro val Gly Asn Arg Glu Glu Lys ile
          100          105          110

Leu Asn Arg Glu ile Gly phe Ala ile Gly Met Pro val cys Glu phe
          115          120          125

Asp Met val Lys Asp Pro Glu val gln Asp phe Arg Arg Asn ile Leu
          130          135          140

Asn val cys Lys Glu Ala val Asp Leu Arg Asp Leu Asn Ser Pro His
          145          150          155          160

Ser Arg Ala Met Tyr val Tyr Pro Pro Asn val Glu Ser Ser Pro Glu
          165          170          175

Leu Pro Lys His ile Tyr Asn Lys Leu Asp Lys Gly gln ile ile val
          180          185          190
```

SEQL.txt

Val Ile Trp Val Ile Val Ser Pro Asn Asn Asp Lys Gln Lys Tyr Thr
 195 200 205
 Leu Lys Ile Asn His Asp Cys Val Pro Glu Gln Val Ile Ala Glu Ala
 210 215 220
 Ile Arg Lys Lys Thr Arg Ser Met Leu Leu Ser Ser Glu Gln Leu Lys
 225 230 235 240
 Leu Cys Val Leu Glu Tyr Gln Gly Lys Tyr Ile Leu Lys Val Cys Gly
 245 250 255
 Cys Asp Glu Tyr Phe Leu Glu Lys Tyr Pro Leu Ser Gln Tyr Lys Tyr
 260 265 270
 Ile Arg Ser Cys Ile Met Leu Gly Arg Met Pro Asn Leu Met Leu Met
 275 280 285
 Ala Lys Glu Ser Leu Tyr Ser Gln Leu Pro Met Asp Cys Phe Thr Met
 290 295 300
 Pro Ser Tyr Ser Arg Arg Ile Ser Thr Ala Thr Pro Tyr Met Asn Gly
 305 310 315 320
 Glu Thr Ser Thr Lys Ser Leu Trp Val Ile Asn Ser Ala Leu Arg Ile
 325 330 335
 Lys Ile Leu Cys Ala Thr Tyr Val Asn Val Asn Ile Arg Asp Ile Asp
 340 345 350
 Lys Ile Tyr Val Arg Thr Gly Ile Tyr His Gly Gly Glu Pro Leu Cys
 355 360 365
 Asp Asn Val Asn Thr Gln Arg Val Pro Cys Ser Asn Pro Arg Trp Asn
 370 375 380
 Glu Trp Leu Asn Tyr Asp Ile Tyr Ile Pro Asp Leu Pro Arg Ala Ala
 385 390 395 400
 Arg Leu Cys Leu Ser Ile Cys Ser Val Lys Gly Arg Lys Gly Ala Lys
 405 410 415
 Glu Glu His Cys Pro Leu Ala Trp Gly Asn Ile Asn Leu Phe Asp Tyr
 420 425 430
 Thr Asp Thr Leu Val Ser Gly Lys Met Ala Leu Asn Leu Trp Pro Val
 435 440 445
 Pro His Gly Leu Glu Asp Leu Leu Asn Pro Ile Gly Val Thr Gly Ser
 450 455 460

SEQL.txt

```

Asn Pro Asn Lys Glu Thr Pro Cys Leu Glu Leu Glu Phe Asp Trp Phe
465                               470                               475                               480

Ser Ser Val Val Lys Phe Pro Asp Met Ser Val Ile Glu Glu His Ala
                               485                               490                               495

Asn Trp Ser Val Ser Arg Glu Ala Gly Phe Ser Tyr Ser His Ala Gly
                               500                               505                               510

Leu Ser Asn Arg Leu Ala Arg Asp Asn Glu Leu Arg Glu Asn Asp Lys
                               515                               520                               525

Glu Gln Leu Lys Ala Ile Ser Thr Arg Asp Pro Leu Ser Glu Ile Thr
530                               535                               540

Glu Gln Glu Lys Asp Phe Leu Trp Ser His Arg His Tyr Cys Val Thr
545                               550                               555                               560

Ile Pro Glu Ile Leu Pro Lys Leu Leu Leu Ser Val Lys Trp Asn Ser
                               565                               570                               575

Arg Asp Glu Val Ala Gln Met Tyr Cys Leu Val Lys Asp Trp Pro Pro
                               580                               585                               590

Ile Lys Pro Glu Gln Ala Met Glu Leu Leu Asp Cys Asn Tyr Pro Asp
595                               600                               605

Pro Met Val Arg Gly Phe Ala Val Arg Cys Leu Glu Lys Tyr Leu Thr
610                               615                               620

Asp Asp Lys Leu Ser Gln Tyr Leu Ile Gln Leu Val Gln Val Leu Lys
625                               630                               635                               640

Tyr Glu Gln Tyr Leu Asp Asn Leu Leu Val Arg Phe Leu Leu Lys Lys
645                               650                               655

Ala Leu Thr Asn Gln Arg Ile Gly His Phe Phe Phe Trp His Leu Lys
660                               665                               670

Ser Glu Met His Asn Lys Thr Val Ser Gln Arg Phe Gly Leu Leu Leu
675                               680                               685

Glu Ser Tyr Cys Arg Ala Cys Gly Met Tyr Leu Lys His Leu Asn Arg
690                               695                               700

Gln Val Glu Ala Met Glu Lys Leu Ile Asn Leu Thr Asp Ile Leu Lys
705                               710                               715                               720

Gln Glu Lys Lys Asp Glu Thr Gln Lys Val Gln Met Lys Phe Leu Val
725                               730                               735

```

SEQL.txt

Glu Gln Met Arg Arg Pro Asp Phe Met Asp Ala Leu Gln Gly Phe Leu
 740 745 750
 Ser Pro Leu Asn Pro Ala His Gln Leu Gly Asn Leu Arg Leu Glu Glu
 755 760 765
 Cys Arg Ile Met Ser Ser Ala Lys Arg Pro Leu Trp Leu Asn Trp Glu
 770 775 780
 Asn Pro Asp Ile Met Ser Glu Leu Leu Phe Gln Asn Asn Glu Ile Ile
 785 790 795 800
 Phe Lys Asn Gly Asp Asp Leu Arg Gln Asp Met Leu Thr Leu Gln Ile
 805 810 815
 Ile Arg Ile Met Glu Asn Ile Trp Gln Asn Gln Gly Leu Asp Leu Arg
 820 825 830
 Met Leu Pro Tyr Gly Cys Leu Ser Ile Gly Asp Cys Val Gly Leu Ile
 835 840 845
 Glu Val Val Arg Asn Ser His Thr Ile Met Gln Ile Gln Cys Lys Gly
 850 855 860
 Gly Leu Lys Gly Ala Leu Gln Phe Asn Ser His Thr Leu His Gln Trp
 865 870 875 880
 Leu Lys Asp Lys Asn Lys Gly Glu Ile Tyr Asp Ala Ala Ile Asp Leu
 885 890 895
 Phe Thr Arg Ser Cys Ala Gly Tyr Cys Val Ala Thr Phe Ile Leu Gly
 900 905 910
 Ile Gly Asp Arg His Asn Ser Asn Ile Met Val Lys Asp Asp Gly Gln
 915 920 925
 Leu Phe His Ile Asp Phe Gly His Phe Leu Asp His Lys Lys Lys Lys
 930 935 940
 Phe Gly Tyr Lys Arg Glu Arg Val Pro Phe Val Leu Thr Gln Asp Phe
 945 950 955 960
 Leu Ile Val Ile Ser Lys Gly Ala Gln Glu Cys Thr Lys Thr Arg Glu
 965 970 975
 Phe Glu Arg Phe Gln Glu Met Cys Tyr Lys Ala Tyr Leu Ala Ile Arg
 980 985 990
 Gln His Ala Asn Leu Phe Ile Asn Leu Phe Ser Met Met Leu Gly Ser
 995 1000 1005

SEQL.txt

Gly Met Pro Glu Leu Gln Ser Phe Asp Asp Ile Ala Tyr Ile Arg
 1010 1015 1020

Lys Thr Leu Ala Leu Asp Lys Thr Glu Gln Glu Ala Leu Glu Tyr
 1025 1030 1035

Phe Met Lys Gln Met Asn Asp Ala His His Gly Gly Trp Thr Thr
 1040 1045 1050

Lys Met Asp Trp Ile Phe His Thr Ile Lys Gln His Ala Leu Asn
 1055 1060 1065

<210> 2
 <211> 3207
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 atgcctccac gaccatcatc aggtgaactg tggggcatcc acttgatgcc cccaagaatc 60
 ctagtagaat gtttactacc aaatggaatg atagtgaact tagaatgcct ccgtgaggct 120
 acattaataa ccataaagca tgaactatct aaagaagcaa gaaaataccc cctccatcaa 180
 cttcttcaag atgaatcttc ttacattttc gtaagtgtta ctcaagaagc agaaagggaa 240
 gaattttttg atgaaacaag acgactttgt gaccttcggc tttttcaacc ctttttaaaa 300
 gtaattgaac cagtaggcaa ccgtgaagaa aagatcctca atcgagaaat tggttttgct 360
 atcggcatgc cagtgtgtga atttgatatg gttaaagatc cagaagtaca ggacttcga 420
 agaaatattc tgaacgtttg taaagaagct gtggatctta gggacctcaa ttcacctcat 480
 agtagagcaa tgtatgtcta tctccaaat gtagaatctt caccagaatt gccaaagcac 540
 atatataata aattagataa agggcaaata atagtggatg tctgggtaat agtttctcca 600
 aataatgaca agcagaagta tactctgaaa atcaaccatg actgtgtacc agaacaagta 660
 attgtggaag caatcaggaa aaaaactcga agtatgttgc tatcctctga acaactaaaa 720
 ctctgtgttt tagaatatca gggcaagtat attttaaaag tgtgtggatg tgatgaatac 780
 ttcctagaaa aatatcctct gagtcagtat aagtatataa gaagctgtat aatgcttggg 840
 aggatgcccc atttgatgtt gatggctaaa gaaagccttt attctcaact gccaatggac 900
 tgtttttaca tgccatctta ttccagacgc atttccacag ctacaccata tatgaatgga 960
 gaaacatcta caaaatccct ttgggttata aatagtgcac tcagaataaa aattctttgt 1020
 gcaacctacg tgaatgtaaa tattcgagac attgataaga tctatgttcg aacaggatc 1080
 taccatggag gagaaccctt atgtgacaat gtgaacactc aaagagtacc ttgttccaat 1140
 cccaggtgga atgaatggct gaattatgat atatacattc ctgatcttcc tcgtgctgct 1200
 cgactttgcc tttccatttg ctctgttaaa ggccgaaagg gtgctaaaga ggaacactgt 1260
 ccattggcat ggggaaatat aaacttgttt gattacacag acactctagt atctggaaaa 1320

SEQL.txt

atggccttga atctttggcc agtacctcat ggattagaag atttgctgaa ccctattggt	1380
gttactggat caaatccaaa taaagaaact ccatgcttag agttggagtt tgactggttc	1440
agcagtgtgg taaagttccc agatatgtca gtgattgaag agcatgccaa ttggtctgta	1500
tcccgagaag caggatttag ctattcccac gcaggactga gtaacagact agctagagac	1560
aatgaattaa gggaaaatga caaagaacag ctcaaagcaa tttctacacg agatcctctc	1620
tctgaaatca ctgagcagga gaaagatttt ctatggagtc acagacacta ttgtgtaact	1680
atccccgaaa ttctacccaa attgcttctg tctgttaaata ggaattctag agatgaagta	1740
gcccagatgt attgcttggg aaaagattgg cctccaatca aacctgaaca ggctatggaa	1800
cttctggact gtaattaccc agatcctatg gttcgaggtt ttgctgttcg gtgcttgtaa	1860
aaatatttaa cagatgacaa actttctcag tatttaattc agctagtaca ggtcctaaaa	1920
tatgaacaat atttggataa cttgcttggt agatttttac tgaagaaagc attgactaat	1980
caaaggattg ggcacttttt cttttggcat ttaaaatctg agatgcacaa taaaacagtt	2040
agccagaggt ttggcctgct tttggagtcc tattgtcgtg catgtgggat gtatttgaag	2100
cacctgaata ggcaagtcca ggcaatggaa aagctcatta acttaactga cattctcaaa	2160
caggagaaga aggatgaaac acaaaaggta cagatgaagt ttttagttga gcaaatgagg	2220
cgaccagatt tcatggatgc tctacagggc tttctgtctc ctctaaacc tgctcatcaa	2280
ctaggaaacc tcaggcttga agagtgtcga attatgtcct ctgcaaaaag gccactgtgg	2340
ttgaattggg agaaccaga catcatgtca gagttactgt ttcagaacaa tgagatcatc	2400
tttaaaaatg gggatgattt acggcaagat atgctaacac ttcaaattat tcgtattatg	2460
gaaaatatct ggcaaaatca aggtcttgat cttcgaatgt taccttatgg ttgtctgtca	2520
atcggtgact gtgtgggact tattgaggtg gtgcgaaatt ctcacactat tatgcaaatt	2580
cagtgc aaag gggccttgaa aggtgcactg cagttcaaca gccacacact acatcagtgg	2640
ctcaaagaca agaacaaagg agaaatatat gatgcagcca ttgacctgtt tacacgttca	2700
tgtgctggat actgtgtagc taccttcatt ttgggaattg gagatcgtca caatagtaac	2760
atcatggtga aagacgatgg acaactgttt catatagatt ttggacactt tttggatcac	2820
aagaagaaaa aatttggtta taaacgagaa cgtgtgccat ttgttttgac acaggatttc	2880
ttaatagtga ttagtaaagg agcccaagaa tgcacaaaga caagagaatt tgagaggttt	2940
caggagatgt gttacaaggc ttatctagct attcgacagc atgccaatct cttcataaat	3000
cttttctcaa tgatgcttgg ctctggaatg ccagaactac aatcttttga tgacattgca	3060
tacattcgaa agaccctagc cttagataaa actgagcaag aggcctttgga gtatttcatg	3120
aaacaaatga atgatgcaca tcatggtggc tggacaacaa aatggattg gatcttcac	3180
acaattaaac agcatgcatt gaactga	3207

<210> 3
 <211> 70
 <212> ДНК

```

                                SEQL.txt
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> праймер
<400> 3
ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctg gggatccacc atgcctccaa gaccatcatc 60
aggtgaactg 70

<210> 4
<211> 60
<212> днк
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> праймер
<400> 4
ggggaccast ttgtacaaga aagctgggtg aagctttcag ttcaaagcat gctgcttaat 60

<210> 5
<211> 31
<212> днк
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> праймер
<400> 5
agcaactagt accatggccc ttatactagt t 31

<210> 6
<211> 60
<212> днк
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> праймер
<400> 6
ggggaccast ttgtacaaga aagctgggtg aagctttcag ttcaaagcat gctgcttaat 60

<210> 7
<211> 34
<212> днк
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> праймер
<400> 7
ccgcggatcc accatgagtg ctgaggggta ccag 34

<210> 8
<211> 34
<212> днк
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> праймер
<400> 8
gccggaattc tcatcgctc tgctgtgcat atac 34

                                SEQL.txt
<210> 9
<211> 44
<212> днк
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> праймер
<400> 9
gaaattctca cactataatg gctattcagt gtaaaggagg cctg 44

<210> 10
<211> 44
<212> днк
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> праймер
<400> 10
caggcctcct ttacttgaa tagccattat agtgtgagaa tttc 44

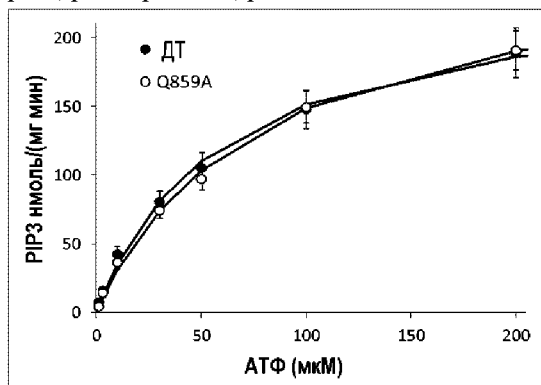
```

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

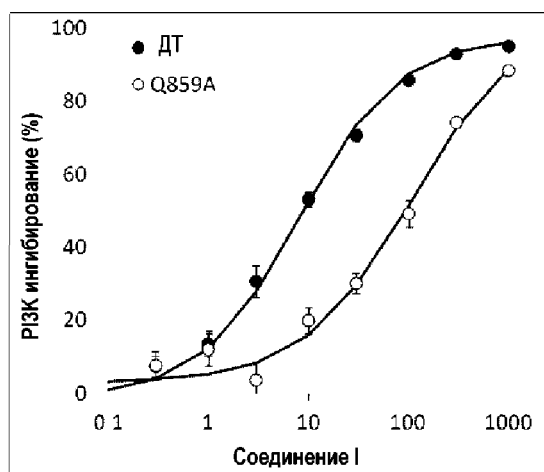
1. Применение (S)-пирролидин-1,2-дикарбоновой кислоты 2-амид 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилэтил)пиридин-4-ил]тиазол-2-ил}амида) или его фармацевтически приемлемой соли для лечения рака у пациента, имеющего глутамин в положении 859 каталитической субъединицы p110 α PI3K.

2. Применение (S)-пирролидин-1,2-дикарбоновой кислоты 2-амид 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилэтил)пиридин-4-ил]тиазол-2-ил}амида) или его фармацевтически приемлемой соли для лечения рака у пациента, имеющего последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует глутамин в положении 859 каталитической субъединицы p110 α PI3K.

3. Применение по любому из предшествующих пунктов, где рак выбран из группы, состоящей из глиобластомы, меланомы, рака яичников, рака молочной железы, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), эндометриального рака, рака простаты, рака толстой кишки и миеломы.



Фиг. 1



Фиг. 2



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2