



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **114808** (13) **C2**
(51) МПК (2017.01)
A61K 31/4439 (2006.01)
A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2014 09114	(72) Винахідник(и):	Фуре Паскаль (FR/CH), Фрітш Крістіна (FR/CH), Мера Совер-Мішель (FR/CH)
(22) Дата подання заявки:	27.03.2013	(73) Власник(и):	НОВАРТИС АГ, Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel, Switzerland (CH)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.08.2017	(74) Представник:	Ошарова Ірина Олександрівна, реєстр. №9
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/617,284, 61/767,848	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2012/016970 A1, 09.02.2012 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 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 EP 2377933 A1, 19.10.2011
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	29.03.2012, 22.02.2013		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US, US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.12.2014, Бюл.№ 23		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.08.2017, Бюл.№ 15		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2013/056600, 27.03.2013		

(54) ФАРМАЦЕВТИЧНА ДІАГНОСТИКА**(57) Реферат:**

Винахід стосується селективного лікування пацієнта, який має рак, що включає селективне введення терапевтично ефективної кількості (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід-1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-аміду) або його фармацевтично прийнятної солі пацієнту на підставі того, що пацієнт має глутамін у положенні 859 каталітичної субодиниці p110 α PI3K.

UA 114808 C2

За даною заявкою заявляється пріоритет попередньої заявки на патент США № 61/617284, поданої 29 березня 2012 року, та попередньої заявки на патент США № 61/767848, поданої 22 лютого 2013 року, повний зміст яких включено у даний опис як посилання у повному обсязі.

Галузь техніки, до якої відноситься винахід

Даний винахід відноситься до нових індивідуальних видів терапії, наборів, переданих форм інформації та способів застосування у лікуванні пацієнтів, що мають рак.

Попередній рівень техніки

Фосфатидилінозитол-3-кінази (PI3K) містять сімейство ліпідкіназ, які каталізують перенос фосфату у D-3' положення інозит-вмісних ліпідів з одержанням фосфоінозитол-3-фосфату (PIP), фосфоінозитол-3,4-дифосфату (PIP2) та фосфоінозитол-3,4,5-трифосфату (PIP3), які, у свою чергу, діють як вторинні месенджерів у сигнальних каскадах за допомогою стикуючих білків, що містять плекстрин-гомологічний, FYVE, Phox та інші фосфоліпід-зв'язуючі домени, у безлічі сигнальних комплексів, часто у плазматичній мембрані (Vanhaesebroeck et al., Annu. Rev. Biochem. 70:535 (2001); Katso et al., Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 17:615 (2001)). Із двох PI3K класу 1 PI3K класу 1A є гетеродимерами, складеними з каталітичної субодиниці p110 (α , β , δ ізоформи), конститутивно асоційованої з регуляторною субодиницею, яка може бути p85 α , p55 α , p50 α , p85 β або p55 γ . Підклас 1B класу має один член сімейства, гетеродимер, складений з каталітичної субодиниці p110 γ , асоційованої або з p101 або з p84 двох регуляторних субодиниць (Fruman et al., Annu. Rev. Biochem. 67:481 (1998); Suire et al., Curr. Biol. 15:566 (2005)). Модулярні домени p85/55/50 субодиниць містять домени Src гомології (SH2), які зв'язують фосфотирозинові залишки у контексті специфічної послідовності на активованому рецепторі та цитоплазматичні тирозинкінази, у результаті приводячи до активації та локалізації PI3K класу 1A. Клас 1B як і p110 β при деяких обставинах активується прямо білок-сполученими рецепторами, які зв'язують різноманітний репертуар пептидних та непептидних лігандів (Stephens et al., Cell 89:105 (1997)); Katso et al., Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 17:615-675 (2001)). Отже, отримувані у результаті фосфоліпідні продукти PI3K класу I зв'язують розташовані раніше рецептори з розташованими далі клітинними активностями, що включають проліферацію, виживаність, хемотаксис, клітинний транспорт, рухливість, метаболізм, запальний та алергійний відповіді, транскрипцію та трансляцію (Cantley et al., Cell 64:281 (1991); Escobedo and Williams, Nature 335:85 (1988); Fantl et al., Cell 69:413 (1992)).

PIP3 направляє Akt, продукт людського гомолога вірусного онкогену v-Akt, до плазматичної мембрани, де він діє як вузлова точка для багатьох внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, важливих для росту та виживаності (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)). Аберантне регулювання PI3K, яке звичайно підвищує виживаність через Akt активацію, є однією з найбільш переважаючих подій у раку людини та, як було продемонстровано, відбувається на безлічі рівнів. Ген-супресор пухлини PTEN, який дефосфорилує фосфоінозитиди у 3'-положенні інозитного кільця й, таким чином, протидіє PI3K активності, функціонально делетований у багатьох пухлинах. У інших пухлинах гени ізоформи p110 α , PIK3CA та Akt є ампліфікованими, та була продемонстрована підвищена експресія білку з їхніх генних продуктів у декількох видах раку людини. Крім того, мутації та транслокація p85 α , які слугують для підвищувальної регуляції комплексу p85-p110, були описані для видів раку людини. На закінчення, соматичні антисмислові мутації у PIK3CA, яка активує розташовані далі сигнальні шляхи, були описані зі значними частотами для широкої різноманітності видів раку людини (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)). Ці спостереження демонструють, що порушення регулювання фосфоінозитол-3 кінази та розташованих раніше та далі компонентів цього сигнального шляху є одним з найбільш частих порушень регулювання, асоційованих з видами раку людини та проліферативними захворюваннями (Parsons et al., Nature 436:792 (2005); Hennessey et al., Nature Rev. Drug Disc. 4:988-1004 (2005)).

Існує зростаюча сукупність даних, яка допускає, що генетичний профіль пацієнта може бути визначальним для сприйнятливості пацієнта до терапевтичного впливу. Враховуючи численні види терапії, доступні для індивідууму, що має рак, визначення генетичних факторів, які впливають, наприклад, на відповідну реакцію на конкретний лікарський засіб, може бути застосований для надання пацієнтові індивідуального режиму лікування. Такий індивідуальний режим лікування допускає можливість максимізації терапевтичної користі для пацієнта з мінімізацією при цьому пов'язаних із цим побічних ефектів, які асоційовані з альтернативними та менш ефективними режимами лікування. Таким чином, існує потреба у ідентифікації факторів, які можуть бути застосовані для прогнозування того, чи ймовірна відповідь пацієнта на конкретне терапевтичне лікування.

Суть винаходу

Даний винахід оснований на виявленні того, що ідентичність нуклеїнової кислоти, що кодує амінокислоту у положенні 859 у каталітичній субодиниці p110α PI3K, може бути застосована для відбору індивідумів, що мають рак, які можливо будуть піддаватися лікуванню з терапевтично ефективною кількістю специфічної до альфа-ізоформи PI3K інгібіторної сполуки, такої як (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амід) або його фармацевтично прийнятна сіль. Зокрема, було виявлено, що модифікація глутамінового залишку (також позначуваного у даному документі як Q або Gln) у положенні 859 у каталітичній p110α субодиниці PI3K у зразку, взятому у індивідумі, що має рак, може бути застосована для визначення того, чи буде індивідум піддаватися лікуванню із специфічною до альфа-ізоформи PI3K інгібіторною сполукою (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амідом) або його фармацевтично прийнятною сіллю. Визначальний етап може бути виконаний прямим аналізом біологічного зразку, взятого у індивідумі, на цільовий матеріал (наприклад, мРНК, кДНК, білок і т.д.), що представляє інтерес.

У першому варіанті винахід містить спосіб селективного лікування пацієнта, який має рак, що включає селективне введення терапевтично ефективної кількості (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-аміду) або його фармацевтично прийнятної солі пацієнту на підставі того, що пацієнт має глутамін у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K.

У іншому варіанті винахід містить спосіб селективного лікування пацієнта, який має рак, що включає:

а) аналіз біологічного зразку, взятого у пацієнта, на наявність або відсутність глутаміну у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K; та

б) селективне введення терапевтично ефективної кількості (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-аміду) або його фармацевтично прийнятної солі пацієнту на підставі того, що зразок містить глутамін у положенні 859.

У ще одному варіанті винахід містить спосіб селективного лікування пацієнта, який має рак, що включає або:

а) селективне введення терапевтично ефективної кількості (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-аміду) або його фармацевтично прийнятної солі пацієнту на підставі того, що зразок містить глутамін у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K; або

б) селективне введення терапевтично ефективної кількості іншої інгібуючої PI3K сполуки, відмінної від (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-аміду) пацієнту на підставі того, що зразок не містить глутаміну у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K.

У іншому варіанті винахід містить спосіб селективного лікування пацієнта, який має рак, що включає:

аналіз біологічного зразку, взятого у пацієнта, на наявність або відсутність глутаміну у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K; та

селективне введення або:

i) терапевтично ефективної кількості (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-аміду) або його фармацевтично прийнятної солі пацієнту на підставі того, що зразок містить глутамін у положенні 859; або

ii) терапевтично ефективної кількості іншої інгібуючої PI3K сполуки, відмінної від (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-аміду) пацієнту на підставі того, що зразок не містить глутаміну у положенні 859.

У ще одному варіанті винахід містить спосіб селективного лікування пацієнта, який має рак, що включає:

а) аналіз біологічного зразку, взятого у пацієнта, на наявність або відсутність глутаміну у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K;

б) подальший вибір пацієнта для лікування з (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амідом) або його фармацевтично прийнятною сіллю на підставі того, що пацієнт має глутамін у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K; та

с) подальше введення (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-аміду) або його фармацевтично прийнятної солі пацієнту на підставі того, що пацієнт має глутамін у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K.

5 У іншому варіанті винахід містить спосіб селективного лікування пацієнта, який має рак, що включає:

а) визначення наявності або відсутності глутаміну у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K у біологічному зразку, взятому у пацієнта, де присутність глутаміну у положенні 859 вказує на те, що існує підвищена вірогідність того, що пацієнт буде піддаватися лікуванню з інгібуючою альфа субодиницю PI3K сполукою (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-амідом) або його фармацевтично прийнятною сіллю; та

10 б) подальший вибір пацієнта для лікування з інгібуючою альфа субодиницю PI3K сполукою (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-амідом) або його фармацевтично прийнятною сіллю на підставі того, що зразок, взятий у пацієнта, містить глутамін у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K.

У іншому варіанті винахід містить спосіб вибору пацієнта, який має рак, для лікування, що включає визначення наявності або відсутності глутаміну у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K у біологічному зразку, взятому у пацієнта, де присутність глутаміну у положенні 859 вказує на те, що існує підвищена вірогідність того, що пацієнт буде піддаватися лікуванню з інгібуючою альфа субодиницю PI3K сполукою (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-амідом) або його фармацевтично прийнятною сіллю.

25 У іншому варіанті винахід містить спосіб селективного лікування пацієнта, який має рак, що включає селективне введення терапевтично ефективної кількості (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-аміду) або його фармацевтично прийнятної солі пацієнту на підставі того, що пацієнт має послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує глутамін у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K.

У ще одному варіанті винахід містить спосіб селективного лікування пацієнта, який має рак, що включає:

а) аналіз біологічного зразку, взятого у пацієнта, на присутність або відсутність мутації послідовності нуклеїнової кислоти у положенні 2575-2577 каталітичної субодиниці p110α PI3K, у порівнянні з референтною послідовністю; та

35 б) селективне введення терапевтично ефективної кількості (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-аміду) або його фармацевтично прийнятної солі пацієнту на підставі того, що зразок послідовності нуклеїнової кислоти не має мутації та кодує глутамін у положенні 859.

40 У ще одному варіанті винахід містить спосіб селективного лікування пацієнта, який має рак, що включає або:

а) селективне введення терапевтично ефективної кількості (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-аміду) або його фармацевтично прийнятної солі пацієнту на підставі того, що пацієнт має послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує глутамін у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K; або

45 б) селективне введення терапевтично ефективної кількості іншої інгібуючої PI3K сполуки пацієнту на підставі того, що пацієнт має послідовність нуклеїнової кислоти, яка не кодує глутамін у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K.

50 У ще одному варіанті винахід містить спосіб селективного лікування пацієнта, який має рак, що включає:

аналіз біологічного зразку, взятого у пацієнта, на присутність або відсутність мутації послідовності нуклеїнової кислоти у каталітичній субодиниці p110α PI3K, де мутація приводить до амінокислотної заміни глутаміну у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K; та

55 селективне введення або:

і) терапевтично ефективної кількості (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-аміда) або його фармацевтично прийнятної солі пацієнту на підставі того, що послідовність нуклеїнової кислоти кодує глутамін у положенні 859 у каталітичній субодиниці p110α PI3K; або

ii) терапевтично ефективної кількості іншої інгібуючої PI3K сполуки пацієнту на підставі того, що послідовність нуклеїнової кислоти має мутацію у каталітичній субодиниці p110α PI3K у положенні 859 та не кодує глутамін.

У ще одному варіанті винахід містить спосіб селективного лікування пацієнта, який має рак, що включає:

а) аналіз біологічного зразку, взятого у пацієнта, на присутність або відсутність мутації послідовності нуклеїнової кислоти у каталітичній субодиниці p110α PI3K, де мутація приводить до амінокислотної заміни глутаміну у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K;

б) подальший вибір пацієнта для лікування з (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-амідом) або його фармацевтично прийнятною сіллю, на підставі того, що у зразку, взятому у пацієнта, відсутня мутація та він кодує глутамін у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K; та

с) подальше введення (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-аміду) або його фармацевтично прийнятної солі пацієнту з відсутністю мутації.

У іншому варіанті винахід містить спосіб селективного лікування пацієнта, який має рак, що включає:

а) аналіз біологічного зразку, взятого у пацієнта, на присутність або відсутність мутації послідовності нуклеїнової кислоти у каталітичній субодиниці p110α PI3K, де мутація приводить до амінокислотної заміни глутаміну у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K, де відсутність мутації у послідовності нуклеїнової кислоти вказує на те, що існує підвищена вірогідність того, що пацієнт буде піддаватися лікуванню з інгібуючою альфа субодиницю PI3K сполукою (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-амідом) або його фармацевтично прийнятною сіллю; та

б) подальший вибір пацієнта для лікування з інгібуючою альфа субодиницю PI3K сполукою (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-амідом) або його фармацевтично прийнятною сіллю на підставі того, що у зразку, взятому у пацієнта, відсутня мутація у послідовності нуклеїнової кислоти, внаслідок чого послідовність нуклеїнової кислоти кодує глутамін у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K.

У ще одному варіанті винахід містить спосіб селективного лікування пацієнта, який має рак, що включає:

аналіз зразку нуклеїнової кислоти, отриманого від пацієнта, який має рак, на наявність мутації у молекулі нуклеїнової кислоти, що кодує каталітичну субодиницю p110α поліпептиду PI3K, що приводить до заміни глутаміну у положенні 859 кодуємої каталітичної субодиниці p110α;

далі селективне введення або:

а) терапевтично ефективної кількості (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-аміду) або його фармацевтично прийнятної солі пацієнту на підставі того, що нуклеїнова кислота кодує глутамін у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K; або

б) терапевтично ефективної кількості іншої інгібуючої PI3K сполуки пацієнту на підставі того, що нуклеїнова кислота не кодує глутамін у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K.

У іншому варіанті винахід містить спосіб вибору пацієнта, який має рак, для лікування, що включає аналіз зразку нуклеїнової кислоти, отриманого від пацієнта, який має рак на наявність мутації у молекулі нуклеїнової кислоти, що кодує каталітичну субодиницю p110α поліпептиду PI3K, яка приводить до заміни глутаміну у положенні 859 кодуємої каталітичної субодиниці p110α, де присутність глутаміну у положенні 859 вказує на те, що існує підвищена вірогідність того, що пацієнт буде піддаватися лікуванню з інгібуючою альфа субодиницю PI3K сполукою (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-амідом) або його фармацевтично прийнятною сіллю.

У ще одному варіанті винахід містить спосіб генотипування індивідуума, що включає детектування генетичного варіанту, який приводить до амінокислотного варіанту у положенні 859 кодуємої каталітичної субодиниці p110α PI3K, де відсутність варіанта у положенні 859 вказує на те, що (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-амід) повинен бути введений індивідууму.

У ще одному варіанті винахід містить спосіб генотипування індивідуума, що включає детектування відсутності або присутності САА у положенні 2575-2577 у гені каталітичної субодиниці p110α PI3K, отриманому від зазначеного індивідуума, де присутність САА вказує на

те, що індивідуум має підвищену вірогідність відповіді на (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амід).

Також у способах відповідно до винаходу, як описано у даному документі, рак може бути будь-яким раком, включаючи гліобластому; меланому; рак яєчників; рак молочної залози; недрібноклітинний рак легені (NSCLC); ендометріальний рак, рак передміхурової залози; рак товстої кишки та мієлому. Як правило, зразок являє собою зразок пухлини та може бути свіжозамороженим зразком або просоченим парафіном зразком тканини.

У способах відповідно до винаходу, як описано у даному документі, способи детектування глутаміну або іншого варіанту амінокислоти можуть бути здійснені попередньо будь-яким способом, відомим у даній галузі, таким як імунологічні аналізи, імуногістохімія, ELISA, проточна цитометрія, Вестерн-блоттинг, ВЕРХ та мас-спектроскопія. На додачу у способах відповідно до винаходу, як описано у даному документі, способи для детектування мутації у молекулі нуклеїнової кислоти, що кодує каталітичну субодиницю p110α PI3K, містять полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР), полімеразну ланцюгову реакцію із зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР), аналізи на основі TaqMan, пряме секвенування, динамічну алель-специфічну гібридизацію, аналізи олігонуклеотидних SNP з високою густиною, аналізи поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (ПДРФ), аналізи подовження праймеру, олігонуклеотид-лігазні аналізи, аналіз одноланцюгового конформаційного поліморфізму, електрофорез у гелі з використанням градієнту температури (TGGE), денатуруючу високоефективну рідинну хроматографію, високорозділюючий аналіз плавлення, аналізи з неправильно зв'язуючим ДНК білком, SNPLex® або капілярний електрофорез.

Винахід додатково містить спосіб одержання передаваної форми інформації для прогнозування сприйнятливості пацієнта, який має рак, до лікування з (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амідом), що містить:

а) визначення того, чи має пацієнт підвищену вірогідність того, що він буде піддаватися лікуванню з (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амідом), де пацієнт має підвищену вірогідність, оснований на наявності глутаміну у положенні 859 гену каталітичної субодиниці p110α PI3K, та

б) запис результату визначального етапу на матеріальну або нематеріальну форму носія для застосування при передачі.

У іншому варіанті винахід містить спосіб одержання передаваної форми інформації для прогнозування сприйнятливості пацієнта, який має рак, до лікування з (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амідом), що включає:

а) визначення того, чи має пацієнт підвищену вірогідність того, що він буде піддаватися лікуванню з (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амідом), де пацієнт має підвищену вірогідність, оснований на послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує глутамін у положенні 859 гену каталітичної субодиниці p110α PI3K; та

б) запис результату визначального етапу на матеріальну або нематеріальну форму носія для застосування при передачі.

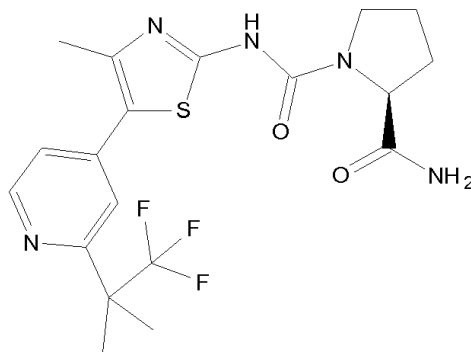
У ще одному варіанті винахід містить набір для визначення того, якщо пухлина є чутливою до лікування з інгібуючою альфа субодиницю PI3K сполукою (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амідом) або її фармацевтично прийнятною сіллю, що містить один або більше зондів або праймерів для детектування наявності мутації у локусі гену PI3K (нуклеїнова кислота 2575-2577 SEQ ID NO:2) та інструкції для застосування.

У іншому варіанті винахід містить набір для прогнозування того, чи отримає пацієнт з раком користь від лікування з інгібуючою альфа субодиницю PI3K сполукою (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амідом) або його фармацевтично прийнятною сіллю, при цьому набір містить:

а) ряд агентів для визначення наявності мутації, яка кодує у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K; та

б) інструкції для застосування.

У способах відповідно до винаходу, як описано у даному документі, інгібітор PI3K є будь-яким відомим у даній галузі інгібітором альфа субодиниці PI3K. Зокрема сполука може бути (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амідом) або його фармацевтично прийнятною сіллю; також продемонстрованим нижче у вигляді формули (A)



(A),

або його фармацевтично прийнятною сіллю.

У іншому варіанті винахід містить набір для визначення того, якщо пухлина є чутливою до лікування з інгібуючою альфа субодиницю PI3K сполукою (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амідом) або його фармацевтично прийнятною сіллю, що містить один або більше зондів або праймерів для детектування наявності або відсутності мутації, яка кодує варіант у каталітичній p110α субодиниці гену PI3K у положенні 859.

Короткий опис креслень

Фіг. 1 зображує графік, що демонструє криві кінетики АТФ активації для PI3K дикого типу (ДТ) (константа Міхаеліса (K_m)= 60 ± 6 мкМ) та для Q859A мутанту PI3Kα (K_m = 72 ± 8 мкМ).

Фіг. 2 показує графік, що демонструє криві інгібування для PI3K дикого типу (дт) та для Q859A мутанту PI3Kα.

Детальний опис винаходу

Даний винахід оснований на виявленні того, що наявність або відсутність мутації у послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує глутамін у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K, можуть бути застосовані для визначення вірогідності відповідної реакції пацієнта на терапію із специфічною до альфа-ізоформи PI3K інгібіторною сполукою, такою як (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амід) або його фармацевтично прийнятна сіль. Конкретно, було виявлено, що послідовність нуклеїнової кислоти із зразку від пацієнта, яка кодує каталітичну субодиницю дикого типу p110α PI3K, тобто, має глутамін у положенні 859, є більш вірогідно підданою лікуванню з інгібуючою альфа субодиницю PI3K сполукою (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амідом). Навпаки, послідовність нуклеїнової кислоти із зразку від пацієнта, що має мутацію, яка кодує варіант у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K, тобто кодує амінокислоту, відмінну від глутаміну у положенні 859, таку як аланін, є менш вірогідно підданою лікуванню з інгібуючою альфа субодиницю PI3K сполукою (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амідом). Такий пацієнт повинен піддаватися лікуванню з альтернативним видом терапії раку, таким як інший інгібітор PI3K (як це застосовується у даному документі, інший тип інгібітору PI3Kα, повинен бути інгібітором, який не є (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амідом)), та він може бути, але не обмежений ними, лікуванням з хіміотерапевтичним засобом або альтернативною інгібуючою PI3K терапією, такою як інгібітор, який може селективно інгібувати ізоформу, відмінну від альфа форми субодиниці PI3K, або інгібітором, який може інгібувати більше ніж одну ізоформу субодиниці PI3K.

У деяких варіантах здійснення способів відповідно до винаходу присутність або відсутність мутації у послідовності нуклеїнової кислоти, яка кодує глутамін у положенні 859 у каталітичній субодиниці p110α PI3K, може бути детектоване аналізуванням біологічного зразку на геномну послідовність, нуклеїнову кислоту-продукт, поліпептидний продукт або еквівалентний генетичний маркер.

У одному прикладі винахід містить генотипування зразку від індивідуума. Для генотипування нуклеотидні символи, які кодують глутамін у положенні 859, визначають або у одному алелі або обох алелях гену каталітичної субодиниці p110α PI3K. Стосовно до каталітичної субодиниці p110α гена PI3K, мутація відбувається у нуклеотиді 2575-2577 гену каталітичної субодиниці

p110α PI3K у одному або більше алелей. Генотип може бути гомозиготним або гетерозиготним. У способах відповідно до винаходу, визначення ідентичності послідовності нуклеїнової кислоти або білку, у положенні 859 може бути порівняне з послідовністю білку дикого типу (GenelD: 5290; що кодує, наприклад, білок з номером доступу у NCBI NP_006209.2; SEQ ID NO:1), або послідовністю ДНК (SEQ ID NO:2), або послідовністю нуклеїнової кислоти дикого типу (мРНК; номер референтної послідовності у NCBI NM_006218.2), або геномної ДНК (NCBI номер референтної послідовності у NCBI NG_012113.1), відповідним чином. Варіант у положенні 859 (тобто амінокислота, відмінна від глутаміну) каталітичної субодиниці p110α PI3K, застосовується у відношенні зміни у референтній послідовності (дикого типу) білку у положенні 859, що одержується у результаті генетичної мутації у послідовності гену каталітичної субодиниці p110α PI3K, яка кодує білок. У одному варіанті здійснення варіант може бути аланіном у положенні 859.

Дане відкриття, таким чином, надає способи прогнозування вірогідності того, що пацієнт, що має PI3K-експресуючий рак буде проявляти сприятливу відповідну реакцію на терапію з інгібуючою альфа субодиницю PI3K сполукою (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-амідом) або його фармацевтично прийнятною сіллю. Пацієнти для такої оцінки включають: 1) пацієнтів, які мають PI3K-експресуючий рак та які ще не піддавались якому-небудь лікуванню від раку; 2) пацієнтів, які мають PI3K-експресуючий рак та які піддавались повній або частковій резекції раку, наприклад, які піддавались хірургічному видаленню ракових тканин у клінічно можливому ступені; та 3) пацієнтів, які мають PI3K-експресуючий рак та які піддавались режиму лікування, відмінному від режиму лікування з інгібітором PI3K.

У способах відповідно до винаходу, зразок аналізується на присутність або відсутність мутації, що кодує глутамін у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K гену PIK3CA. У одному прикладі мутація приводить до заміни/варіанту глутаміну з аланіном у положенні 859 у людській каталітичній субодиниці p110α PI3K гену PIK3CA (Q859A) [GenelD: 5290; що кодує, наприклад, білок з номером доступу у NCBI NP_006209.2 (SEQ ID NO: 1)].

У одному варіанті винахід містить спосіб селективного лікування пацієнта, який має рак, що включає аналіз біологічного зразку, взятого у пацієнта, на наявність або відсутність глутаміну у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K; та селективне введення інгібуючої альфа субодиницю PI3K сполуки (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-аміду) або його фармацевтично прийнятної солі пацієнту на підставі того, що зразок містить глутамін у положенні 859.

У іншому варіанті винахід містить спосіб селективного лікування пацієнта, який має рак, що включає аналіз біологічного зразку, взятого у пацієнта, на присутність або відсутність мутації, яка кодує варіант у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K; та селективне введення інгібуючої альфа субодиницю PI3K сполуки (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-аміду) або його фармацевтично прийнятної солі пацієнту на підставі того, що у зразку, взятому у пацієнта, відсутня мутація у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K.

У іншому варіанті винахід містить спосіб селективного лікування пацієнта, який має рак, що включає аналіз біологічного зразку, взятого у пацієнта, на присутність або відсутність мутації, яка кодує варіант у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K; подальший вибір пацієнта для лікування з інгібуючою альфа субодиницю PI3K сполукою (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-амідом) або його фармацевтично прийнятною сіллю на підставі того, що у зразку, взятому у пацієнта, відсутня мутація у положенні 859 субодиниці p110α каталітичної субодиниці p110α PI3K (тобто послідовність нуклеїнової кислоти кодує глутамін); та введення інгібуючої альфа субодиницю PI3K сполуки (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-аміду) або його фармацевтично прийнятної солі пацієнту по причині відсутності у пацієнта мутації.

У ще одному варіанті винахід містить спосіб селективного лікування пацієнта, який має рак, що включає визначення наявності або відсутності мутації, яка кодує варіант у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K у біологічному зразку, взятому у пацієнта, де присутність мутації вказує на те, що існує підвищена вірогідність того, що пацієнт не буде піддаватися лікуванню з інгібуючою альфа субодиницю PI3K сполукою (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-амідом) або його фармацевтично прийнятною сіллю; та подальший вибір пацієнта для лікування з інгібуючою альфа субодиницю PI3K сполукою (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-

амідом) або його фармацевтично прийнятною сіллю на підставі того, що у зразку, взятому у пацієнта, відсутня мутація у положенні 859 каталітичної субодиноці p110α субодиноці p110α PI3K.

У ще одному варіанті винахід містить спосіб селективного лікування пацієнта, який має рак з інгібуючою альфа субодиноцю PI3K сполукою (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-амідом) або його фармацевтично прийнятною сіллю, що включає введення інгібуючої альфа субодиноцю PI3K сполуки (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-аміду) або його фармацевтично прийнятної солі пацієнту на підставі того, що у пацієнта має місце присутність глутаміну (Q) у положенні 859 каталітичної субодиноці p110α PI3K.

У ще одному варіанті винахід містить спосіб селективного лікування пацієнта, який має рак, що включає аналіз зразку нуклеїнової кислоти, отриманого від пацієнта, який має рак, на присутність однієї або більше мутацій у молекулі нуклеїнової кислоти у положеннях 2575-2577 каталітичної субодиноці p110α поліпептиду PI3K; та подальше селективне введення інгібуючої альфа субодиноцю PI3K сполуки (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-аміду) або його фармацевтично прийнятної солі пацієнту на підставі того, що у пацієнта відсутня мутація послідовності, та вона кодує глутамін у положенні 859 кодуємої каталітичної субодиноці p110α PI3K.

У ще одному варіанті винахід включає інгібуючу альфа субодиноцю PI3K сполуку (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-амід) або його фармацевтично прийнятну сіль для застосування у лікуванні раку, що характеризується тим, що терапевтично ефективну кількість зазначеної сполуки або її фармацевтично прийнятної солі вводять пацієнту на підставі того, що зазначений пацієнт має глутамін у положенні 859 каталітичної субодиноці p110α PI3K.

У ще одному варіанті винахід включає інгібуючу альфа субодиноцю PI3K сполуку (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-амід) або його фармацевтично прийнятну сіль для застосування у лікуванні раку, що характеризується тим, що терапевтично ефективну кількість зазначеної сполуки або її фармацевтично прийнятної солі вводять пацієнту на підставі того, що зазначений пацієнт, що має глутамін у положенні 859 каталітичної субодиноці p110α PI3K, вибраний з маючого глутамін у положенні 859 каталітичної субодиноці p110α PI3K та не маючого глутамін у положенні 859 каталітичної субодиноці p110α PI3K.

У ще одному варіанті винахід містить інгібуючу альфа субодиноцю PI3K сполуку (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-амід) або його фармацевтично прийнятну сіль для застосування у лікуванні раку, що характеризується тим, що терапевтично ефективну кількість зазначеної сполуки або її фармацевтично прийнятної солі вводять пацієнту на підставі того, що зазначений пацієнт має нуклеїнову кислоту, що кодує глутамін у положенні 859 каталітичної субодиноці p110α PI3K.

У ще одному варіанті винахід містить інгібуючу альфа субодиноцю PI3K сполуку (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-амід) або його фармацевтично прийнятну сіль для застосування у лікуванні раку, що характеризується тим, що терапевтично ефективну кількість зазначеної сполуки або її фармацевтично прийнятної солі вводять пацієнту на підставі того, що зазначений пацієнт, що має нуклеїнову кислоту, яка кодує глутамін у положенні 859 каталітичної субодиноці p110α PI3K, вибраний з маючого нуклеїнову кислоту, що кодує глутамін у положенні 859 каталітичної субодиноці p110α PI3K, та маючого нуклеїнову кислоту, що не кодує глутамін у положенні 859 каталітичної субодиноці p110α PI3K.

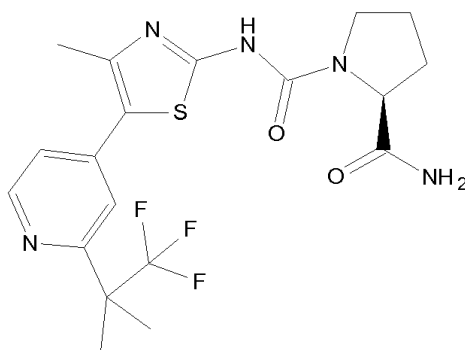
Інгібітори PI3K

Пацієнт, оцінюваний із застосуванням способу, розкритого у даному документі, є пацієнтом, якому рекомендовано лікування з інгібітором PI3K. Відповідно до даного винаходу пацієнти, що мають пухлини, які експресують форму дикого типу каталітичної субодиноці p110α PI3K, більш імовірно будуть піддані лікуванню з інгібуючою альфа субодиноцю PI3K сполукою (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-амідом) або його фармацевтично прийнятною сіллю.

У використовуваному у даному документі значенні термін "інгібітор альфа субодиноці PI3K" являє собою молекулу, яка може інгібувати каталітичну субодиноцю p110α PI3K. Мається на увазі, що інгібітор альфа субодиноці PI3K може селективно інгібувати альфа підтип PI3K, у

порівнянні з його здатністю інгібувати інші підтипи, включаючи бета, та/або дельта, та/або гама підтипи.

WO2010/029082 описує специфічні похідні 2-карбоксамідциклоаміносечовини, які, як було виявлено, мають переважні фармакологічні властивості та демонструють поліпшену селективність для PI3-кінази альфа підтипу, у порівнянні з іншими типами. Специфічні похідні 2-карбоксамідциклоаміносечовини, які є підходящими для даного винаходу, їх приготування та підходящі склади, що містять їх, описані у WO2010/029082. У способах по винаходу, описаних у даному документі, інгібітор альфа субодиноці PI3K може бути сполукою (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амідом) або його фармацевтично прийнятною сіллю. Інгібітор альфа субодиноці PI3K, застосовуваний у даному винаході, є сполукою з формулою (A)



(A),

або її фармацевтично прийнятною сіллю. Ця сполука детально описана у WO2010/029082. Синтез цієї сполуки описаний у WO2010/029082 як приклад 15.

Інгібуюча альфа субодиноці PI3K сполука, описана у даному документі, може бути самим агентом, його фармацевтично прийнятною сіллю, його фармацевтично прийнятним складним ефіром, також як і стереоізомером, енантіомером, рацемічною сумішшю та тому подібним.

Приготування зразків

Винахід надає серед іншого аналіз для детектування ідентичності послідовності нуклеїнової кислоти, яка кодує амінокислоту 859 каталітичної субодиноці p110α PI3K. Якщо нуклеїнова кислота кодує амінокислоту глутамін дикого типу, це вказує на те, що пацієнт повинен бути вибраний та піддатися лікуванню з інгібуючою альфа субодиноці PI3K сполукою (як зазначено вище). Однак якщо нуклеїнова кислота має мутацію та кодує варіант амінокислоти, тобто, кодує амінокислоту, відмінну від глутаміну, тоді пацієнт не повинен піддаватися лікуванню з інгібуючою альфа субодиноці PI3K сполукою (як зазначено вище).

Спосіб може містити детектування мутації у рідині організму, такий як кров (наприклад, сироватка або плазма), кістковий мозок, спинномозкова рідина, перитонеальна/плевральна рідина, лімфатична рідина, асцит, серозна рідина, слина, слізна рідина, кал та сеча або у тканині, такий як пухлинна тканина. Пухлинна тканина може бути свіжою тканиною або просоченої парафіном тканиною.

У використовуваному у даному документі значенні "пацієнт" відноситься до людини або тварини, включаючи всіх ссавців, таких як примати (особливо вищі примати), вівця, собака, гризуни (наприклад, миша або щур), морська свинка, коза, свиня, кішка, кролик та корова. У кращому варіанті здійснення пацієнт є людиною. У іншому варіанті здійснення пацієнт є експериментальною твариною або твариною, що підходить для моделі захворювання.

Зразки рідини організму можуть бути отримані від пацієнта із застосуванням будь-якого зі способів, відомих у даній галузі. Способи виділення клітинної ДНК зі зразків рідини організму добре відомі у даній галузі. Як правило, клітини лізують з детергентами. Після клітинного лізису білки видаляють із ДНК із застосуванням різних протеаз. ДНК потім виділяють із фенолом, осаджують у спирт та розчиняють у водному розчині. Способи виділення безклітинної ДНК зі зразків рідини організму також відомі у даній галузі. Звичайно безклітинну ДНК у зразку рідини організму відокремлюють від клітин, осаджують у спирт та розчиняють у водному розчині.

Як правило, твердий зразок пухлини може бути тестовим зразком клітин або тканини, які отримані від пацієнта з раком біопсією або хірургічною резекцією. Зразок клітин або тканини може бути вилучений біопсією аспірацією голкою. Для цього тонку голку, приєднану до шприца, вводять через шкіру у цільову тканину. Голку, як правило, направляють у цільову область із застосуванням ультразвуку або візуалізації комп'ютерною томографією (КТ). Коли голку вводять

у тканину, створюють вакуум шприцом, внаслідок чого клітини або рідина можуть бути витягнуті через голку та зібрані у шприці. Зразок клітин або тканини може також бути вилучений ексцизійною або товстоголковою біопсією. Для цього, конусоподібний, циліндричний або дуже маленький шматочок тканини видаляють із цільової області. КТ-візуалізацію, ультразвук або

ендоскоп, як правило, застосовують для направлення цього типу біопсії. Більш конкретно, увесь раковий осередок може бути вилучений ексцизійною біопсією або хірургічною резекцією. У даному винаході тестовий зразок, як правило, є зразком клітин, вилучених у вигляді частини хірургічної резекції.

Тестовий зразок, наприклад, тканина, може також зберігатися, наприклад, у RNAlater (Ambion; Austin Tex.), або бути відразу замороженим та зберігатися при -80°C для подальшого використання. Біопсований зразок тканини може також бути зафіксований у фіксаторі, такому як формальдегід, параформальдегід або оцтова кислота/етанол. Зафіксований зразок тканини може бути залитий воском (парафіном) або пластичною смолою. Залитий зразок тканини (або заморожений зразок тканини) може бути розрізаний на тонкі зрізи. РНК або білок можуть також

бути виділені із зафіксованого або залитого воском зразку тканини.

PI3K-експресуючі види раку, придатні для лікування відповідно до даного винаходу, включають види раку або клітинних проліферативних захворювань, такі як пухлина та/або раковий клітинний ріст, опосередковані PI3K. Захворювання можуть включати демонструючі надекспресію або ампліфікацію PI3K альфа, соматичну мутацію PIK3CA або мутації зародкових ліній або соматичну мутацію PTEN або мутації та транслокацію p85 α , що слугує для підвищувальної регуляції комплексу p85-p110. Зокрема, рак включає, наприклад, саркому; рак легені; бронхів; простати; молочної залози (включаючи спорадичні види раку молочної залози та потерпілих від хвороби Каудена); підшлункової залози; гастроінтестинальний рак; товстої кишки; прямої кишки; карциному товстої кишки; колоректальну аденому; щитовидної залози; печінки; внутрішньопечінкових жовчних проток; гепатоклітинний рак; надниркової залози; шлунку; гастральний рак; гліому; гліобластому; ендометріальний; меланому; нирки; ниркової балії; сечового міхура; тіла матки; шийки матки; піхви; яєчника; множинну мієлому; стравоходу; лейкемію; гостру мієлогенну лейкемію; хронічну мієлогенну лейкемію; лімфоцитарну лейкемію; мієлоїдну лейкемію; мозку; карциному мозку; ротової порожнини та глотки; гортані; тонкого кишечника; неходжкінську лімфому; меланому; ворсинчасту аденому товстої кишки; неоплазію; неоплазію епітеліального характеру; лімфоми; карциному молочної залози; базально-клітинну карциному; плоскоклітинну карциному; актинічний кератоз; пухлинні захворювання, включаючи тверді пухлини; пухлину шиї або голови; справжню поліцитемію; есенційну тромбоцитемію; мієлофіброз із мієлоїдною метаплазією та хворобу Вальденстрема.

Спосіб відповідно до винаходу не обмежений видами раку та може містити інші стани або порушення (наприклад, PI3K-опосередковані), такі як справжня поліцитемія, есенційна тромбоцитемія, мієлофіброз із мієлоїдною метаплазією, астма, ХНЗЛ, РДСД, синдром Леффлера, еозинофільна пневмонія, паразитична (зокрема багатоклітинна) інвазія (включаючи тропічну еозинофілію), бронхолегеневий аспергільоз, нодозний поліартеріїт (включаючи синдром Черджа-Стросса), еозинофільна гранулема, пов'язані з еозинофілами порушення, що впливають на дихальні шляхи, обумовлені реакцією лікарського засобу, псоріаз, контактний дерматит, атопічний дерматит, осередкова алопеція, поліморфна еритема, герпетичний дерматит, склеродермія, вітиліго, алергійні васкуліти, кропив'янка, булезний пемфігоїд, еритематозний вовчак, пемфігус, вроджений бульозний епідермоліз, аутоімунні гематологічні порушення (наприклад, гемолітична анемія, апластична анемія, вроджена справжня еритроцитарна анемія та ідіопатична тромбоцитопенія), системний червоний вовчак, поліхондрія, склеродермія, гранулематоз Вегенера, дерматоміозит, хронічний активний гепатит, важка міастенія, синдром Стівенса-Джонсона, ідіопатичні афти, аутоімунні запальні захворювання кишечника (наприклад, виразковий коліт та хвороба Крона), ендокринна офтальмопатія, базедова хвороба, саркоїдоз, альвеоліт, хронічний гіперчутливий пневмоніт, розсіяний склероз, первинний біліарний цироз, увеїт (передній та задній), інтерстиціальний фіброз легенів, псоріатичний артрит, гломерулонефрит, серцево-судинні захворювання, атеросклероз, гіпертензія, глибокий венозний тромбоз, інсульт, інфаркт міокарда, нестабільна стенокардія, тромбоемболія, легенева емболія, тромболітичні захворювання, гостра артеріальна ішемія, периферійні тромботичні оклюзії та захворювання коронарної артерії, реперфузійні ушкодження, ретинопатія, така як діабетична ретинопатія або викликана підвищеним тиском кисню ретинопатія, та стани, що характеризуються підвищеним внутрішньоочним тиском або секрецією окулярної

Детектування

Способи відповідно до винаходу знаходять включають детектування наявності або відсутності мутації у послідовності нуклеїнової кислоти, яка кодує амінокислоту глутамін у положенні 859 людської субодиниці p110α гену PI3K. У одному прикладі цей спосіб містить детектування нуклеїнової кислоти, що кодує мутантну амінокислоту у положенні 859 для прогнозування відповідної реакції пацієнта на лікування PI3K лікарським засобом. Так як мутації у каталітичній p110α субодиниці PI3K, як правило, відбуваються на рівні ДНК, способи відповідно до винаходу можуть бути основані на детектуванні мутацій у геномній ДНК, також як і у транскриптах (мРНК, кДНК) та самих білках.

Мутації у каталітичній субодиниці PI3K p110α, описані у даному документі, можуть бути детектовані будь-яким відомим у даній галузі способом. У описі мутації у каталітичній субодиниці PI3K p110α відповідно до винаходу мутація містить будь-яку аміно заміну глутамінової амінокислоти (Q), яка присутня у послідовності дикого типу у положенні 859, наприклад, може бути присутньою заміна глутаміну (Q) на аланін (A). На додаток мутація у каталітичній субодиниці p110α PI3K у даному документі відноситься до кодуючого ланцюгу гену для зручності. Як визнає фахівець у даній галузі, тим не менше, молекули нуклеїнових кислот, що містять ген, можуть бути комплементарними дволанцюговими молекулами та у такий спосіб посилання до конкретного сайту на кодуючому ланцюзі також відноситься до відповідного сайту на комплементарному антисмислового ланцюзі. Тобто, може бути здійснене посилання до мутантного сайту на будь-який з ланцюгів та олігонуклеотид може бути сконструйований для гібридизації специфічно з будь-яким ланцюгом у цільовій області, що містить поліморфний та/або мутантний сайт. Таким чином, винахід також містить одностанцюгові полінуклеотиди та мутації, які є комплементарними до кодуючого ланцюгу геномних варіантів, описаних у даному документі.

Більш різноманітні технології можуть бути застосовані для ідентифікації того, якщо послідовність нуклеїнової кислоти кодує мутацію у положенні 859 у каталітичній субодиниці p110α PI3K, включаючи аналіз одностанцюгового конформаційного поліморфізму (SSCP), гетеродуплексний аналіз денатуруючою високоефективною рідинною хроматографією (ДВЕРХ), пряме секвенування ДНК та обчислювальні способи (Shi et al, Clin Chem A1U6AA12 (2001)). Найпоширеніші способи у цей час містять гібридизацію, добування праймера та способи розщеплення. Кожен із цих способів повинен бути з'єднаний з відповідною детекторною системою. Технології детектування містять флуоресцентну поляризацію (Chan et al, Genome Res. 9:492-499 (1999)), люмінометричне детектування вивільнення пірофосфату (піросеквенування) (Ahmadiian et al, Anal. Biochem. 280:103-10 (2000)), аналізи розщеплення на основі резонансного переносу енергії флуоресценції (FRET), ДВЕРХ та мас-спектроскопію (Shi, Clin Chem 47:164-172 (2001); Патент США № 6300076 В1).

У одному варіанті здійснення автоматичний аналізатор (наприклад, пристрій для ПЛР або пристрій для автоматичного секвенування) застосовується для визначення наявності або відсутності мутації у положенні 2575-2577 (кодон, який кодує Gln у положенні 859) у каталітичній p110 альфа субодиниці PI3K. Усі такі способи добре відомі фахівцям у даній галузі.

У особливо кращому варіанті здійснення мутації можуть бути детектовані із застосуванням технології INVADER™ (доступної у Third Wave Technologies Inc. Madison, Wisconsin USA). У цьому аналізі специфічний розташований раніше олігонуклеотид "загарбник" та розташований далі зонд, що частково перекривається, разом утворюють специфічну структуру, коли вони пов'язані з комплементарною ДНК матрицею. Ця структура розпізнається та розрізається у специфічному сайті ферментом Клеваза, у результаті, приводячи до вивільнення 5' флєпів зонду олігонуклеотиду. Цей фрагмент потім слугує як олігонуклеотид "загарбника" стосовно синтетичних вторинних мішеней та вторинних флуоресцентно мічених сигнальних зондів, що містяться у реакційній суміші. Це приводить до специфічного розщеплення вторинних сигнальних зондів ферментом Клеваза. Флуоресцентний сигнал генерується, коли цей вторинний зонд (мічений з молекулами барвника, здатними до резонансного переносу енергії флуоресценції) розщеплюється. Клевази мають строгі вимоги щодо їхньої структури, утвореної перекриттям ДНК послідовностей або флєпів, та можуть, отже, застосовуватися для специфічного детектування невідповідності одностанцюгової пари основ безпосередньо перед сайтом розщеплення розташованого далі ланцюгу ДНК. Ryan D et al, Molecular Diagnosis 4(2): 135-144 (1999) and Lyamichev V et al. Nature Biotechnology 17: 292-296 (1999), див. також Патенти США № 5846717 та 6001567.

Винахід додатково містить композиції, які містять олігонуклеотидні зонди та праймери, сконструйовані для специфічної гібридизації з послідовністю нуклеїнової кислоти, яка кодує глутамін або варіант поліпептиду у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α або який є прилеглим до мутантного сайту. Область, що містить цільову мутацію може бути ампліфікована

із застосуванням будь-якого способу, спрямованого на олігонуклеотидну ампліфікацію, включаючи, але не обмежуючись ним, полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) (патент США № 4965188), лігазну ланцюгову реакцію (ЛЛР) (Barany et al, Proc. Natl. Acad. Sci USA 88:189-193 (1991); публікація патенту згідно PCT WO 90/01069) та лігування олігонуклеотидних зондів (ЛОЗ) (Landegren et al, Science 241: 1077-1080 (1988)). Олігонуклеотиди, придатні як праймери або зонди, у таких способах повинні специфічно гібридизуватися з областю нуклеїнової кислоти, яка містить або розташована близько до поліморфного/мутантного сайту. Як правило, олігонуклеотиди становлять між 10 та 35 нуклеотидами у довжину та переважно, між 15 та 30 нуклеотидами у довжину. Найбільш переважно олігонуклеотиди становлять від 20 до 25 нуклеотидів у довжину. Точна довжина олігонуклеотиду буде залежати від багатьох факторів, які звичайно розглядаються та застосовуються на практиці фахівцями у даній галузі.

Інші відомі процедури ампліфікації нуклеїнової кислоти можуть бути застосовані для ампліфікації області, що містить мутацію каталітичної субодиниці p110 α у положенні 859, містять системи ампліфікації на основі транскрипції (патент США № 5130238; EP 329822; патент США № 5169766, публікація патенту згідно PCT WO 89/06700) та ізотермічні способи (Walker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 392-396 (1992)).

Мутація у положенні 859 каталітичної субодиниці p110 α може бути проаналізована до або після ампліфікації з використанням декількох основаних на гібридизації способів, відомих у даній галузі. Як правило, у виконанні таких методів використовуються алель-специфічні олігонуклеотиди. Алель-специфічні олігонуклеотиди можуть бути застосовані у вигляді порізного мічених пар зондів, з одним членом пари, що демонструє повну відповідність із одним варіантом цільової послідовності та іншим членом, що демонструє повну відповідність із іншим варіантом. Переважно, члени набору мають температури плавлення у межах 5 градусів за Цельсієм та більш переважно у межах 2 градусів за Цельсієм, один від іншого, при гібридизації з якими детектують поліморфний або мутантний сайти. Гібридизація алель-специфічного олігонуклеотиду із цільовим полінуклеотидом може бути виконана з обома об'єктами у розчині або така гібридизація може бути виконана, коли будь-який з олігонуклеотиду або цільового полінуклеотиду ковалентно або нековалентно закріплений на твердій підкладці. Прикріплення може бути опосередковане, наприклад, взаємодією антитіло-антиген, полі-L-Lys, стрептавідин або авідин-біотин, сольовими містками, гідрофобними взаємодіями, хімічними зв'язками, УФ перехресним зшиванням, відпалом і т.д. Алель-специфічний олігонуклеотид може бути синтезований безпосередньо на твердій підкладці або прикріплений до твердої підкладки після синтезу. Тверді підкладки, що підходять для застосування у способах детектування відповідно до винаходу, містять основи, виготовлені із кремнію, скла, пластику, паперу та тому подібного, які можуть бути сформовані, наприклад, у вигляді лунок (як у 96-лункові планшети), слайдів, аркушів, мембран, волокон, крихти, тарілок та гранул. Тверда підкладка може бути оброблена, покрита або дериватизована для полегшення іммобілізації алель-специфічного олігонуклеотиду або цільової нуклеїнової кислоти.

Поліпептиди, що мають глутамін у положенні 859 або що мають заміну у положенні 859 каталітичної субодиниці p110, можуть також бути проаналізовані із застосуванням способів, відомих у даній галузі, таких як радіоімунологічні аналізи або фермент-зв'язані імунологічні аналізи, імунологічні аналізи з конкурентним зв'язуванням, мас-спектроскопія, технології/платформи для аналізу на місці, дот-блот, Вестерн-блоттинг, хроматографія, переважно вискоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) або тому подібне. Можуть бути застосовані мічені антитіла, що зв'язують їхні зв'язуючі ділянки або інші партнери по зв'язуванню. Антитіла можуть бути моноклонального або поліклонального походження та можуть бути продуктованими біосинтетично. Партнери по зв'язуванню можуть бути молекулами, що зустрічаються у природі, або продуктованими синтетично. Кількість зв'язаних у комплекс білків визначають із застосуванням стандартних методологій детектування білку, описаних у даній галузі. Детальний огляд конструкцій імунологічних аналізів, теорій та протоколів можна знайти у численних текстах у даній галузі, включаючи Practical Immunology, Butt, W. R., ed., Marcel Dekker, New York, 1984.

Безліч різних міток може бути застосовано у аналізах відповідно до винаходу, включаючи прямі мітки, такі як флуоресцентні або люмінесцентні мітки, метали, барвники, радіонукліди й таке інше, приєднані до антитіла. Непрямі мітки містять різні ферменти добре відомі у даній галузі, такі як лужна фосфатаза, гідроген пероксидаза та таке інше. У одноетапному аналізі цільовий білок (тобто, каталітичну субодиницю p110, що має глутамін у положенні 859) іммобілізують та інкубують з міченим антитілом. Мічене антитіло зв'язується з іммобілізованою цільовою молекулою. Після промивання для видалення незв'язаних молекул зразок аналізують

на наявність мітки. Численні імуногістохімічні способи включені у формати діагностики на місці та переносні набори, усі з яких можуть бути застосовані для визначення наявності білку.

Застосування імобілізованих антитіл, специфічних до білків або поліпептидів, також передбачене даним відкриттям. Антитіла можуть бути імобілізовані на багатьох твердих підкладах, таких як магнітні або хроматографічні частинки, поверхня місця аналізу (така як лунки для мікротитрування), шматки твердого матеріалу субстрату (такого як пластик, нейлон, папір) та тому подібному. Смужка для аналізу може бути приготовлена нанесенням антитіла або низки антитіл впорядковано на тверду підкладку. Потім смужка може бути занурена у тестовий зразок та піддана етапам промивання та детектування для генерування вимірюваного сигналу, наприклад, пофарбованої крапки.

У двоетапному аналізі імобілізований цільовий білок (наприклад, каталітична субодиниця p110, що має глутамін у положенні 859) може бути інкубований з неміченим антитілом. Комплекс із неміченим антитілом при його наявності потім зв'язується із вторинним, міченим антитілом, яке специфічне до неміченого антитіла. Зразок промивають та аналізують на наявність мітки. Вибір маркера, застосовуваного для мічення антитіла, буде варіюватися залежно від застосування. Однак, вибір маркера є легко визначуваним для фахівця у даній галузі.

Дот-блоттинг регулярно застосовується на практиці фахівцем у даній галузі для детектування необхідного білка із застосуванням антитіла як зонду (Promega Protocols and Applications Guide, Second Edition, 1991, Page 263, Promega Corporation). Зразки наносять на мембрану із застосуванням пристрою для дот-блоттингу. Мічений зонд інкубують мембраною та детектують наявність білку.

Вестерн-блоттинг аналіз добре відомий фахівцеві у даній галузі (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 1989, Vol. 3, Chapter 18, Cold Spring Harbor Laboratory). У Вестерн-блоттингу зразок розділяють за допомогою ДСН-ПААГ-електрофорезу. Гель переносять на мембрану. Мембрану інкубують з міченим антитілом для детектування необхідного білку.

Введення та фармацевтичні композиції

Інгібуюча альфа субодиницю PI3K сполука (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-амід) або його фармацевтично прийнятна сіль можуть бути введені у терапевтично ефективних кількостях шляхом будь-якого із звичайних та прийнятних способів, відомих у даній галузі, або окремо або у комбінації з одним або більше терапевтичних агентів. Терапевтично ефективна кількість може широко варіюватися в залежності від важкості захворювання, віку та стану здоров'я пацієнта, ефективності застосовуваної сполуки та інших факторів. Для приведених вище застосувань потрібне дозування без сумніву буде варіюватися в залежності від способу введення, конкретного стану, який буде піддаватися лікуванню, та бажаного ефекту.

У цілому, для задовільних результатів передбачене одержання систематичних добових дозувань від приблизно 0,03 до приблизно 100,0 мг/кг у розрахунку на масу тіла, наприклад, від приблизно 0,03 до приблизно 10,0 мг/кг у розрахунку на масу тіла сполуки (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-аміду) або його фармацевтично прийнятної солі. Зазначене добове дозування у більш великих ссавців, наприклад, людей, знаходиться у межах від приблизно 0,5 мг до приблизно 3 г, наприклад, від приблизно 5 мг до приблизно 1,5 г сполуки (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-аміду) або його фармацевтично прийнятної солі, зручно введеної, наприклад, у розділених дозах аж до чотирьох разів на добу або уповільненій формі. Підходящі одиничні форми дозування для перорального введення містять від приблизно 0,1 до приблизно 500 мг, наприклад, від приблизно 1,0 до приблизно 500 мг сполуки (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-аміду) або його фармацевтично прийнятної солі.

Інгібуюча альфа субодиницю PI3K сполука (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-амід) або його фармацевтично прийнятна сіль, як описано у даному документі, можуть бути введені у вигляді фармацевтичної композиції будь-яким стандартним шляхом, зокрема ентерально, наприклад, перорально, наприклад, у формі таблеток або капсул або парентерально, наприклад, у формі ін'єктуємих розчинів або суспензій, місцево, наприклад, у формі лосьйонів, гелів, мазей або кремів або у назальній або супозиторній формі. Фармацевтичні композиції, що містять інгібуючу альфа субодиницю PI3K сполуку відповідно до даного винаходу у вільній формі або у формі фармацевтично прийнятної солі у сполученні з щонайменше одним фармацевтично прийнятним носієм або розріджувачем, можуть бути зроблені звичайним чином за способами

змішування, гранулювання або покриття. Наприклад, пероральні композиції можуть бути таблетками або желатиновими капсулами, що містять активний інгредієнт разом з а) розріджувачами, наприклад, такими як лактоза, декстроза, сахароза, маніт, сорбіт, целюлоза та/або гліцин; б) змащувальними речовинами, наприклад, такими як діоксид кремнію, тальк, стеаринова кислота, їх сіль магнію або сіль кальцію та/або поліетиленгліколь; для таблеток також із с) зв'язувальними речовинами, наприклад, такими як алюмосилікат магнію, крохмальна паста, желатин, трагакант, метилцелюлоза, натрію карбоксиметилцелюлоза та полівінілпіролідон; якщо потрібно з d) розпушувачами, наприклад, такими як крохмалі, агар, альгінова кислота або її сіль натрію або шипучі суміші; та/або е) абсорбентами, барвниками, ароматизаторами та підсолоджувачами. Ін'єктуємі композиції можуть бути водними ізотонічними розчинами або суспензіями, та супозиторії можуть бути приготовлені з жирних емульсій або суспензій.

Інгібуюча альфа субодиноціу PI3K сполука (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-амід) або його фармацевтично прийнятна сіль можуть бути стерилізовані та/або містити ад'юванти, такі як консервуючі, стабілізуючі, змочуючі або емульгуючі агенти, стимулятори розчину, солі для регулювання осмотичного тиску та/або буфери. На додаток вони можуть також містити інші терапевтично значимі речовини. Підходящі складки для трансдермальних застосувань містять ефективну кількість сполуки відповідно до даного винаходу з носієм. Носій може містити абсорбуємі фармакологічно прийнятні розчинники для сприяння проходженню через шкіру хазяїна. Наприклад, трансдермальні пристрої мають форму пов'язки, що містить підтримуючий компонент, ємкість, що містить сполуку необов'язково з носіями, необов'язково регулюючи швидкість перегородку для доставки сполуки у шкіру хазяїна з контрольованою та заздалегідь визначеною швидкістю протягом тривалого періоду часу та засіб для гарантування безпеки обладнання для шкіри. Матричні трансдермальні складки також можуть бути застосовані. Підходящі складки для місцевого застосування, наприклад, на шкіру або очі, переважно являють собою водні розчини, мазі, креми або гелі, добре відомі у даній галузі. Вони можуть містити солюбілізатори, стабілізатори, агенти, що збільшують тонічність, буфери та консерванти.

Дані

У виконанні будь-яких способів, описаних у даному документі, у яких визначена наявність або відсутність мутації нуклеїнової кислоти у положенні 2575-2577 каталітичної субодиноціу p110 PI3K, лікарі або генетичні консультанти або пацієнти або інші дослідники можуть бути проінформовані про результат. Конкретно результат може бути підсумований у переданій формі інформації, яка може бути повідомлена або передана іншим дослідникам, або лікарям, або генетичним консультантам, або пацієнтам. Така форма може варіюватися та може бути матеріальною або нематеріальною. Результат може бути втілений у вигляді описових формулювань, діаграм, фотографій, схем, зображень або будь-яких інших ілюстративних форм. Наприклад, зображення електрофорезу у гелі продуктів ПЛР може бути застосоване у поясненні результатів. Діаграми, що демонструють наявність або відсутність варіанту, також є придатними у зазначенні результатів тестування. Такі формулювання та ілюстративні форми можуть бути записані на матеріальні носії, такі як папір, зчитувані комп'ютером носії, такі як гнучкі диски, компакт-диски тощо або нематеріальні носії, наприклад, електронні носії у формі електронної пошти або веб-сайту у Інтернеті або Інтранеті. На додаток результат може бути записаний у звуковій формі та переданий через будь-які підходящі носії, наприклад, аналогові або цифрові лінії кабелів, оптоволоконні кабелі і т.д., через телефон, факсимільний зв'язок, бездротовий мобільний телефон, Інтернет телефон і таке інше. Усі такі форми (матеріальні або нематеріальні) становлять "передану форму інформації". Таким чином, інформація та дані у результаті тесту можуть бути згенеровані де-небудь у світі та передані у інше місце розташування. Наприклад, коли аналіз генотипування проводиться у іншій країні, інформація та дані про результат тесту можуть бути згенеровані та підсумовані у переданій формі, як описано вище. Результат тестування у переданій формі, таким чином, може бути імпортований у США. Відповідно, дане відкриття також охоплює спосіб продукування переданої форми інформації, що містить дані про те, чи зустрічається мутація у положенні 859 p110 каталітичного домену індивідууму. Ця форма інформації придатна для прогнозування сприйнятливості пацієнта до лікування інгібітором PI3K, для вибору курсу лікування на підставі цієї інформації та для селективного лікування пацієнта на підставі цієї інформації.

Набори

Винахід додатково відноситься до наборів для визначення того, чи існує мутація у положенні 2575-2577 людської каталітичної субодиноціу p110α гену PI3K. Набори придатні для вибору пацієнтів, які отримують особливу користь від лікування з інгібуючою альфа субодиноціу PI3K

сполукою (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-((4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл)-амідом) або його фармацевтично прийнятною сіллю. Набір може містити праймери та зонди, придатні для детектування мутації у положенні 859 людської каталітичної субодиниці p110α гену PI3K. Набір може додатково містити контролю

нуклеїнової кислоти, буфери та інструкції для застосування. Спеціаліст у даній галузі визнає, що існує багато способів та матеріалів, подібних або еквівалентних описаним у даному документі, які можуть бути застосовані при втіленні на практиці даного винаходу. У дійсності даний винахід ніяким чином не обмежений описаними способами та матеріалами. У цілях даного винаходу наступні терміни визначені.

Приклади

Приклад 1: Матеріали та способи клонування та експресії каталітичної p110α дикого типу та мутанту Q859A з ізоформою 1 p85

Маніпулювання ДНК та плазмід: Стандартні технології молекулярної біології застосовували для конструювання описаних плазмід. Усі ферменти одержували у Roche Diagnostics та New England Biolabs. ДНК фрагменти були або очищеними із застосуванням набору GenElute PCR Clean-up (Sigma), або були виділеними із препаративних агарозних гелів з Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel). Лігування ДНК виконували від 1 до 4 годин при кімнатній температурі набором Rapid DNA Ligation (Roche Diagnostics) та трансформували у E.coli DH5 альфа (Invitrogen). Плазмідну ДНК очищали з набором Qiaprep 8 Miniprep (QIAGEN) або набором GenElute HP Plasmid Midiprep (Sigma). Усі процедури виконували, як описано у відповідних настановах.

Готували плазмиду His-Nativ hPI3k-alpha/p85 pDUAL Consensus. Для цього конструктор, бичачий ДНК фрагмент із 3243 п.о., що містить усю відкриту рамку зчитування бичачої p110α ізоформи PI3-K (Refseq NM_174574.1), ампліфікували ПЛР із плазмиди, наданої Matthias Wymann (Institute of Biochemistry, University of Freiburg), із застосуванням сумісних праймерів GATEWAY, показаних у таблиці 1. Коротко, прямий праймер PI3Ka_FOR_GATE містив сайт рестрикції BamH I (одинарне підкреслення), сайт розпізнавання Козака (подвійне підкреслення) та послідовність attB1, необхідну для GATEWAY клонування (курсив), тоді як зворотний праймер PI3_Ka_REV_GATE містив сайт рестрикції Hind III (одинарне підкреслення) та послідовність attB2 GATEWAY (курсив). ПЛР ампліфікації виконували із застосуванням ДНК полімерази High Fidelity Platinum Pfx (Invitrogen) згідно із протоколами виробника.

Таблица 1

Праймери, застосовувані для ампліфікації ПЛР бичачого PI3-Kα

Назва праймеру	Послідовність праймеру
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)

Після ПКР, фрагменти очищали із застосуванням 30 % PEG 8000; 30 мМ MgCl₂ для видалення димерів праймеру attB та транспонували у вихідний вектор GATEWAY pDONOR 201. Коротко, 4 мкл ПЛР продукту (10 нг/мкл) змішували з 2 мкл реакційної суміші, 1 мкл pDONOR 201 (150 нг/л), 2 мкл BP Clonase та 1 мкл TE та інкубували при кімнатній температурі протягом 60 хвилин перед додаванням 2 мкл протеїнази K (2 мкг/мкл). Потім зразки інкубували додатково протягом 60 хвилин при 37°C та потім застосовували для трансформації компетентних клітин DH5α. Позитивні рекомбінантні плазмиди PI3-Kα pDONOR згодом ідентифікували аналізом з рестрикційними ферментами та підтверджували послідовність (SOLVIAS). 2 мкл свіжоприготовленої PI3-Kα pDONOR потім змішували з 2 мкл pDEST 20 (150 нг/мкл), 2 мкл реакційної суміші, 2 мкл LR Clonase та 2 мкл TE. Зразки інкубували при кімнатній температурі, як описано вище, перед трансформацією компетентних клітин DH5α для створення GST-PI3-Kα pDEST 20.

ПЛР продукт із 3933 п.о., що містить усю відкриту рамку зчитування GST-PI3-Kα, потім ампліфікували із застосуванням ген-специфічних олігонуклеотидів, що містять фланкуючі сайти Spe I та Hind III (підкреслені) (Таблиця 2) з GST-PI3-Kα pDEST 20 та лігували у p50 pFastBac DUAL, як описано вище.

Таблиця 2

Праймери, застосовувані для ампліфікації GST-PI3-Kα ПЛР

Назва праймеру	Послідовність праймеру
GST-FOR	AGCA ACTAGT 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 AAGCTT TCA GTT CAA AGC ATG CTG CTT AAT (SEQ ID NO:6)

Позитивні рекомбінантні плазмиди, що містять як GST-PI3-Kα, так і усичені р85 адапторні білки (bovGST-PI3-Kα/p85 pFastbac DUAL), потім підтверджували аналізом рестрикційного розщеплення та перевіряли послідовність (SOLVIAS).

Номерами доступу у RefSeq для бичачого PIK3CA (p110α) та людського PIK3R1 (p85α ізоформа 1) є NM_174574.1 та NM_181523, відповідно.

Первинну послідовність усіх конструктів, отриманих із ПЛР, підтверджували секвенуванням у Solvias AG, Basel.

ПЛР ампліфікації: ПЛР-ампліфікації виконували на термоциклері MJ-Research DNA Engine PTC-200 у загальному об'ємі 100 мкл із Pwo Master (Roche).

Адапторний білок р85α (PIK3R1, 1-724 aa) повної довжини ампліфікували із 1 нг плазмиди pCMV6_XL5:p85α Ізоформа 1 (Номер по каталогу TC11320, Origene) з кінцевою концентрацією 500 нМ будь-якого праймеру, 1 x Master Mix, 5 % ДМСО та наступними праймерами: р85upnew: 5'-CCGCGGATCCACCATGAGTGCTGAGGGGTACCAG-3" (SEQ ID NO:7) та р85do: 5'-GCCGGAATTCTCATCGCCTCTGCTGTGCATATAC-3" (SEQ ID NO:8).

Параметри циклування були наступними: 94°C, 2 хвил.; (94°C, 15 с; 53°C, 30 с; 72°C, 60 с)₁₀; (72°C, 60 с + 5 с/цикл)₁₉; 72°C, 7 хвил.

Праймери р85upnew та р85do вводять сайти рестрикційного ферменту для BamHI та EcoRI на N-кінці та C-кінці, відповідно.

Клонування:

Клонування ізоформи 1 р85 альфа (PI3KR1) у pFastBac1

Бакуловірусний вектор pFastBac1 (Invitrogen) та ампліфіковану ДНК ізоформи 1 р85α розрізали з BamHI та EcoRI та піддавали очищенню через гель. Лігування виконували впродовж 1 години при кімнатній температурі, та компетентні клітини E. coli DH5α трансформували для одержання плазмиди pFastBac:p85α ізоформа 1.

Клонування каталітичної р110 альфа (PIK3CA) у pFastBac1

Плазмиду His-Nativ hPI3K-альфа р85 pDUAL розщепляли з BamHI та HindIII. Отриманий фрагмент очищали від агарозних гелів та лігували впродовж від 2 до 4 годин при кімнатній температурі у pFastBac1, розрізану такими ж рестрикційними ферментами. Трансформація у компетентні клітини E. coli DH5α привела до плазмиди pFastBac:p110α.

Мутагенез

Мутагенез для генерування мутанту Q859A PI3Kα (p110α) виконували з набором для сайт-направленого мутагенезу QuikChange II (Stratagene (номер по каталогу 200523) та олігонуклеотидами p110Q859Aup

(5'-GAAATTCTCACACTATAATGGCTATTTCAGTGTAAGGAGGCCTG-3") (SEQ ID NO:9) та p110Q859Ado

(5'-CAGGCCTCCTTTACACTGAATAGCCATTATAGTGTGAGAATTTTC-3") (SEQ ID NO:10) у відповідності з протоколом виробника.

Експресія білку:

(а) генерація вірусу та експресія білку

Рекомбінантну бакуловірусну ДНК генерували транспозуванням у E. coli DH10 Bac (Invitrogen). ДНК бакміди виділяли з одиничних колоній та потім трансфікували у клітини Sf9. Трансфекції, ампліфікації та аналіз бляшкоутворення виконували відповідно до настанови до бакуловірусної системи експресії Bac-to-Bac (Invitrogen) у середовищі TC-100 (Cambrex), доповненому 10 % FCS. Титри вірусу визначали стандартними аналізами бляшкоутворення. Експресію виконували у колбах, що струшуються, починаючи з 1×10^6 клітин/мл у середовищі ExCell-420 (JRH Biosciences Ltd), доповненому розчином 0,5 x Пеніцилін/Стрептоміцин (Sigma).

Для того щоб відтворити активний холофермент каталітичної субодиниці р110 та адапторний білок р85 під час експресії клітини Sf9 коінфікували обома вірусами одночасно.

Білки експресували у 100 мл культурального середовища протягом 72 год. при 27°C відповідно до протоколу TIPS, як описано у іншому місці (наприклад, Erdmann et al (2010), J.Biomol.Tech.; 21 (1): 9-17). Відносне співвідношення коінфекції p110 до p85 варіювали, та оптимальне співвідношення коінфекції склало 1:1. Білкову експресію візуалізували дослідженням цільноклітинних лізатів Вестерн-блоттингом. Розчинність білку PI3Kα є високою (85-90 % розчинне).

Очищення білку:

Рекомбінантні білки очищали від клітин комах, інфікованих бакуловірусом Sf9. Приблизно $1,5 \times 10^8$ клітин з однієї ферментації 100 мл ресуспендували у 12 мл буфері для лізису (50 mM Tris pH 7,2, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 1 % Triton X-100, 10 % гліцерин, 6 мкл Бензонази (25 U/мкл), 1 x повний інгібітор протеаз (Roche), 1 mM активованого ортованадату натрію) та руйнували ультразвуком (ультразвуковий дезінтегратор Branson Digital W-450D загалом 3 хвилини у бані лід/етанол (імпульси 30 с, охолодження 1 хвил. між імпульсами). Клітинний дебрис видаляли центрифугуванням при 14000 g (центрифуга Sorvall RC5-B, ротор SS-34, 11000 об/хвил., 45 хвил. при 4°C) та супернатант переносили у нову пробірку.

Для очищення з гістидиновою міткою p110α/p85α застосовували 1 мл His-Trap HP Ni-сефарозні колонки (номер по каталогу 17-5247-01, GE Healthcare), приєднані до системи Äkta explorer FPLC. Колонки урівноважували 25 mM Tris -HCl pH 7,5, 0,5M NaCl та освітлені лізати завантажували у суперпетлю при швидкості потоку 0,5 мл/хвил. Після промивання 10 об'ємами колонки розчином 25 mM Tris -HCl pH 7,5, 0,5M NaCl, 25 mM імідазолу, зв'язаний білок елюювали ступінчастим градієнтом імідазолу 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 250 та 500 mM імідазолу. Елюований білок концентрували приблизно 10-разово шляхом центрифугування із спин-колонками Amicon Ultra-15 та після додавання гліцерину до кінцевої 30 % (об./об.) розділяли на аліквоти та відразу заморожували у рідкому азоті.

Концентрацію білку визначали у двох повторях з набором для аналізу білку BCA (номер по каталогу 23227, Pierce) у мікротитрувальних планшетах відповідно до протоколу, наданому з набором.

Матеріали та способи для ферментативного аналізу HTRF®

Набір аналізу фосфоінозитид-3-кіназа (PI3-кіназа або PI3K), гомогенний з розділенням у часі (HTRF®), придбали у Upstate (у даний час Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). PIP2 та PIP3 придбали у Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA), мікропланшети у Greiner (Frickenhause, Germany; Catalog No. 781207). Всі інші реагенти придбали у Sigma (St Louis, MO, USA).

Аналіз ферментативної гомогенної флуоресценції з розділенням у часі (HTRF®) (від Upstate (зараз Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) виконували по суті як описано Sugita et al. (2008), Biochem. Biophys. Res. Commun. 377(3):941-5. PI3Kα (0,25-1,5 нг) інкубували впродовж 60 хвилин при кімнатній температурі у 20 мкл буферу, що містить 10 mM MgCl₂, 30 мкМ ATP, 20 мкМ 1,2-діоктаноїл-sn-гліцеро-3-фосфо-(1'-міо-інозит-4',5'-бісфосфату) (амонієва сіль) (PIP2), 150 mM NaCl, 5 mM (dl-дитіотреїтол) ДТТ та 25 mM Tris/HCl (pH 7,5) у 384-лункових білих планшетах. Кіназну реакцію ініціювали додаванням АТФ (30 мкМ) для дослідження інгібування та додаванням PI3Kα для АТФ кінетики (0-200 мкМ ATP).

PI3K інгібітор (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметил-етил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-амід) (далі позначуваний "Сполука I") розводили послідовно у диметилсульфоксиді (ДМСО) та у буфері (кінцева концентрація: 2,5 % ДМСО). Кіназну реакцію зупиняли додаванням реагентів HTRF у відповідності з інструкціями виробника. Планшет герметично закривали для попередження випаровування та витримували у темноті при кімнатній температурі впродовж 16 годин. Планшет зчитували із застосуванням багатоміткового зчитувача Tecan's GeniosPro® (від Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland) у режимі флуоресценції із розділенням у часі (фільтр збудження: 340 нм; фільтр випромінювання 1: 620 нм; фільтр випромінювання 2: 665 нм; дзеркало: dichroic2; час затримки: 150 мкс; час інтегрування: 500 мкс; 10 спалахів).

Сигнал HTRF визначали у відповідності з формулою:

HTRF сигнал=10000× (випромінювання при 665 нм/ випромінювання при 620 нм).

Сигнал HTRF поступово знижувався залежним від PIP3 чином та нормалізувався як % максимального зниження, отриманого з 30 мкМ 1,2-діоктаноїл-sn-гліцеро-3-фосфо-(1'-міо-інозит-3',4',5'-трисфосфатом) (амонієва сіль) (PIP3). Стандартну криву готували з PIP3 (EC₅₀=200 нМ) та застосовували для розрахунку кількості PIP3, продукуючої кіназною реакцією у відповідності з формулою:

[PIP3]=EC₅₀×(100-y)/y

де у означає нормалізований сигнал HTRF та EC_{50} концентрацію PIP3 при 50 % сигналу на стандартній кривій. Витрата АТФ та PIP2 ніколи не перевищувала 5 %.

АТР кінетика відповідала нелінійній регресії із рівнянням Міхаеліса-Ментен та криві інгібування Сполукою I відповідали 4-параметричному логічному рівнянню. Універсальну функцію подібності Xlfit® (ID Business Solutions, Guildford, UK) застосовували для універсальної відповідності всіх повторних експериментів.

Результат:

Застосовуючи наведені вище матеріали та способи, у експериментах продемонстрували кінетику АТФ активації PI3K α , як показано на фігурі 1, та інгібування PI3K α дикого типу (дт) та мутації Q859A Сполукою I, як показано на фігурі 2.

Фігура 1 надає середні значення \pm стандартна похибка (С.О.) 14 експериментів для PI3K дикого типу (дт) (константа Міхаеліса (K_m)= 60 ± 6 мкМ) та 5 експериментів для Q859A мутанту PI3K α (K_m = 72 ± 8 мкМ). Як підсумовано на фігурі 1 до цього документу, PI3K дикого типу (дт) та Q859A мутант PI3K α демонструють схожу кінетику АТФ активації PI3K α .

Фігура 2 надає середні значення \pm стандартна похибка (С.О.) 10 експериментів PI3K дикого типу (дт) та 7 експериментів для Q859A мутанту PI3K α . Як підсумовано на фігурі 2 до цього документу, мутація Q859A у PI3K α значно збільшує IC_{50} до 122 ± 28 нМ у порівнянні з диким типом (IC_{50} = $8,4 \pm 1,0$ нМ). Це 14,5-разове збільшення IC_{50} до 122 ± 28 нМ очевидно демонструє, що мутація Q859 у PI3K α є ключовим залишком для оцінки ефективності сполуки I при введенні.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

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

<120> СПОСОБИ ЛІКУВАННЯ РАКУ
<130> 55064-US-PSP

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

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 1068
<212> білок
<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

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
 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

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

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 atagtgactt tagaatgcct ccgtgaggct      120
acattaataa ccataaagca tgaactattt 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
atcgcatgac cagtgtgtga atttgatagc gttaagatc cagaagtaca ggacttcgga      420
agaaatattc tgaacgtttg taaagaagct gtggatctta gggacctcaa ttcacctcat      480
agtagagcaa tgtatgtcta tcctccaat gtagaatctt caccagaatt gccaaagcac      540
atataataa aattagataa agggcaaata atagtggtag tctgggtaat agtttctcca      600
aataatgaca agcagaagta tactctgaaa atcaaccatg actgtgtacc agaacaagta      660
attgctgaag caatcaggaa aaaaactcga agtatgttgc tatcctctga acaactaaaa      720
ctctgtgttt tagaataatca gggcaagtat atttaaaag tgtgtggatg tgatgaatac      780
ttcctagaaa aatatcctct gagtcagtat aagtatataa gaagctgtat aatgcttggg      840
aggatgcccc atttgatgtt gatggctaaa gaaagccttt attctcaact gccaatggac      900
tgttttacaa tgccatctta ttccagacgc atttcacag ctacaccata tatgaatgga      960
gaaacatcta caaaatccct ttgggttata aatagtgcac tcagaataaa aattctttgt      1020
gcaacctacg tgaatgtaaa tattcgagac attgataaga tctatgttcg aacaggatgc      1080
taccatggag gagaaccctt atgtgacaat gtgaacactc aaagagtacc ttgttccaat      1140
cccagggtga atgaatggct gaattatgat atatacatc ctgatcttcc tcgtgctgct      1200
cgactttgcc ttccatttg ctctgttaaa ggccgaaagg gtgctaaga ggaacactgt      1260
ccattggcat ggggaaatat aaacttggtt gattacacag acactctagt atctggaaaa      1320
atggctttga atctttggcc agtacctcat ggattagaag atttgctgaa ccctattggt      1380
gttactggat caaatccaaa taaagaaact ccatgcctag agttggagtt tgactgggtc      1440
agcagtggtg taaagtccc agatatgtca gtgattgaag agcatgccaa ttggtctgta      1500
tcccagaaag caggatttag ctattccac gcaggactga gtaacagact agctagagac      1560
aatgaattaa gggaaaatga caaagaacag ctcaaagcaa tttctacacg agatcctctc      1620
```


tctgaaatca ctgagcagga gaaagatttt ctatggagtc acagacacta ttgtgtaact	1680
atccccgaaa ttctacccaa attgcttctg tctgttaaat ggaattctag agatgaagta	1740
gcccgatgt attgcttggg aaaagattgg cctccaatca aacctgaaca ggctatggaa	1800
cttctggact gtaattacc agatcctatg gttcgagggt ttgctgttcg gtgcttggaa	1860
aaatatttaa cagatgacaa actttctcag tatttaattc agctagtaca ggtcctaaaa	1920
tatgaacaat atttgataa cttgcttgtg agatttttac tgaagaaagc attgactaat	1980
caaaggattg ggcaactttt cttttggcat ttaaaatctg agatgcacaa taaaacagtt	2040
agccagaggt ttggcctgct ttggagtc tttgtcgtg catgtgggat gtatttgaag	2100
cacctgaata ggcaagtcca ggcaatggaa aagctcatta acttaactga cattctcaaa	2160
caggagaaga aggatgaac acaaaaggta cagatgaagt ttttagttga gcaaatgagg	2220
cgaccagatt tcattggatg tctacagggc tttctgtctc ctctaaacc tgctcatcaa	2280
ctaggaatcc tcaggcttga agagtgtcga attatgtcct ctgcaaaaag gccactgtgg	2340
ttgaattggg agaaccaga catcatgtca gagttactgt ttcagaacaa tgagatcatc	2400
tttaaaaatg gggatgattt acggcaagat atgctaacc ttcaaatat tcgtattatg	2460
gaaaatatct ggcaaatca aggtcttgat cttcgaatgt taccttatgg ttgtctgtca	2520
atcgggtgact gtgtgggact tattgaggtg gtgcgaatc ctcacactat tatgcaaat	2580
cagtgcacaa gcggcttgaa aggtgcactg cagttcaaca gccacact acatcagtgg	2640
ctcaaaagaca agaacaagg agaaatatat gatgcagcca ttgacctgtt tacacgttca	2700
tggtctggat actgtgtagc taccttcatt ttgggaattg gagatcgtca caatagtaac	2760
atcatgggtga aagacgatgg acaactgttt catatagatt ttggacactt ttggatcac	2820
aagaagaaaa aatttgggta taaacgagaa cgtgtgccat ttgttttgac acaggatttc	2880
ttaatatgta ttagtaagg agccaagaa tgcacaaaga caagagaatt tgagaggttt	2940
caggagatgt gttacaaggc ttatctagct attcgacagc atgccaatct cttcataaat	3000
cttttctcaa tgatgcttgg ctctggaatg ccagaactac aatcttttga tgacattgca	3060
tacattcgaag agaccctagc cttagataaa actgagcaag aggccttggga gtatttcattg	3120
aaacaatatga atgatgcaca tcattggtggc tggacaacaa aaatggattg gatcttccac	3180
acaattaaac agcatgcatt gaactga	3207

<210> 3
 <211> 70
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>	3	
<223>	Праймер	
<400>	3	
ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctg gggatccacc atgcctccaa gaccatcatc	60	
agggtgaactg	70	

<210> 4
 <211> 60

```

<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер
<400> 4
ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtg aagctttcag ttcaaagcat gctgcttaat 60

<210> 5
<211> 31
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

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

<210> 6
<211> 60
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер
<400> 6
ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtg aagctttcag ttcaaagcat gctgcttaat 60

<210> 7
<211> 34
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

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

<210> 8
<211> 34
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер
<400> 8
gccggaattc tcatcgcttc tgctgtgcat atac 34

<210> 9
<211> 44
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

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

<210> 10

<211> 44
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер
<400> 10
caggcctcct ttacactgaa tagccattat agtgtgagaa tttc 44

```

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

5

1. Спосіб селективного лікування пацієнта, який має рак, що включає селективне введення терапевтично ефективної кількості (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід-1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-аміду) або його фармацевтично прийнятної солі пацієнту на підставі того, що пацієнт має глутамін у положенні 859 каталітичної субодиниці p110 α PI3K.

10

2. Спосіб селективного лікування пацієнта, який має рак, що включає:

а) аналіз біологічного зразка, взятого у пацієнта, на наявність або відсутність глутаміну у положенні 859 каталітичної субодиниці p110 α PI3K; та

15

б) селективне введення терапевтично ефективної кількості (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід-1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-аміду) або його фармацевтично прийнятної солі пацієнту на підставі того, що зразок містить глутамін у положенні 859.

3. Спосіб селективного лікування пацієнта, який має рак, що включає або:

а) селективне введення терапевтично ефективної кількості (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід-1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-аміду) або його фармацевтично прийнятної солі пацієнту на підставі того, що зразок містить

5 глутамін у положенні 859 каталітичної субодиниці p110 α PI3K; або

б) селективне введення терапевтично ефективної кількості іншої інгібуючої PI3K сполуки пацієнту на підставі того, що зразок не містить глутаміну у положенні 859 каталітичної субодиниці p110 α PI3K.

4. Спосіб селективного лікування пацієнта, який має рак, що включає:

10 аналіз біологічного зразка, взятого у пацієнта, на наявність або відсутність глутаміну у положенні 859 каталітичної субодиниці p110 α PI3K; та

селективне введення або:

i) терапевтично ефективної кількості (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід-1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-аміду) або його фармацевтично

15 прийнятної солі пацієнту на підставі того, що зразок містить глутамін у положенні 859; або

ii) терапевтично ефективної кількості іншої інгібуючої PI3K сполуки пацієнту на підставі того, що зразок не містить глутаміну у положенні 859.

5. Спосіб селективного лікування пацієнта, який має рак, що включає:

20 а) аналіз біологічного зразка, взятого у пацієнта, на наявність або відсутність глутаміну у положенні 859 каталітичної субодиниці p110 α PI3K;

б) подальший вибір пацієнта для лікування (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід-1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-амідом) або його фармацевтично прийнятною сіллю на підставі того, що пацієнт має глутамін у положенні 859 каталітичної субодиниці p110 α PI3K; та

25 с) подальше введення (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід-1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-аміду) або його фармацевтично прийнятної солі пацієнту на підставі того, що пацієнт має глутамін у положенні 859 каталітичної субодиниці p110 α PI3K.

6. Спосіб селективного лікування пацієнта, який має рак, що включає:

30 а) визначення наявності або відсутності глутаміну у положенні 859 каталітичної субодиниці p110 α PI3K у біологічному зразку, взятому у пацієнта, де присутність глутаміну у положенні 859 вказує на те, що існує підвищена імовірність того, що пацієнт буде піддаватися лікуванню інгібуючою альфа-субодиницю PI3K сполукою (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід-1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-амідом) або його

35 фармацевтично прийнятною сіллю; та
б) подальший вибір пацієнта для лікування інгібуючою альфа-субодиницю PI3K сполукою (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід-1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-амідом) або його фармацевтично прийнятною сіллю на підставі того, що зразок, взятий у пацієнта, має глутамін у положенні 859 каталітичної субодиниці p110 α PI3K.

40 7. Спосіб селективного лікування пацієнта, який має рак, що включає селективне введення терапевтично ефективної кількості (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід-1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-аміду) або його фармацевтично прийнятної солі пацієнту на підставі того, що пацієнт має послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує глутамін у положенні 859 каталітичної субодиниці p110 α PI3K.

45 8. Спосіб селективного лікування пацієнта, який має рак, що включає:

а) аналіз біологічного зразка, взятого у пацієнта, на присутність або відсутність мутації послідовності нуклеїнової кислоти у каталітичній субодиниці p110 α PI3K, де мутація приводить до амінокислотної заміни глутаміну у положенні 859 каталітичної субодиниці p110 α PI3K; та

50 б) селективне введення терапевтично ефективної кількості (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід-1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-аміду) або його фармацевтично прийнятної солі пацієнту на підставі того, що зразок послідовності нуклеїнової кислоти не має мутації та кодує глутамін у положенні 859.

9. Спосіб селективного лікування пацієнта, який має рак, що включає або:

55 а) селективне введення терапевтично ефективної кількості (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід-1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-аміду) або його фармацевтично прийнятної солі пацієнту на підставі того, що пацієнт має послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує глутамін у положенні 859 каталітичної субодиниці p110 α PI3K; або

b) селективне введення терапевтично ефективної кількості іншої інгібуючої PI3K сполуки пацієнту на підставі того, що пацієнт має послідовність нуклеїнової кислоти, яка не кодує глутамін у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K.

10. Спосіб селективного лікування пацієнта, який має рак, що включає:

5 аналіз біологічного зразка, взятого у пацієнта, на присутність або відсутність мутації послідовності нуклеїнової кислоти у каталітичній субодиниці p110α PI3K, де мутація приводить до амінокислотної заміни глутаміну у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K; та селективне введення або:

10 i) терапевтично ефективної кількості (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід-1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-аміду) або його фармацевтично прийнятної солі пацієнту на підставі того, що послідовність нуклеїнової кислоти кодує глутамін у положенні 859 у каталітичній субодиниці p110α PI3K; або

15 ii) терапевтично ефективної кількості іншої інгібуючої PI3K сполуки пацієнту на підставі того, що послідовність нуклеїнової кислоти має мутацію у каталітичній субодиниці p110α PI3K у положенні 859 та не кодує глутамін.

11. Спосіб селективного лікування пацієнта, який має рак, що включає:

а) аналіз біологічного зразка, взятого у пацієнта, на присутність або відсутність мутації послідовності нуклеїнової кислоти у каталітичній субодиниці p110α PI3K, де мутація приводить до амінокислотної заміни глутаміну у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K;

20 b) подальший вибір пацієнта для лікування (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід-1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амідом) або його фармацевтично прийнятною сіллю на підставі того, що у зразку, взятому у пацієнта, відсутня мутація, та він кодує глутамін у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K; та

25 c) подальше введення (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід-1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-аміду) або його фармацевтично прийнятної солі пацієнту з відсутністю мутації.

12. Спосіб селективного лікування пацієнта, який має рак, що включає:

а) аналіз біологічного зразка, взятого у пацієнта, на присутність або відсутність мутації послідовності нуклеїнової кислоти у каталітичній субодиниці p110α PI3K, де мутація приводить до амінокислотної заміни глутаміну у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K, де відсутність мутації у послідовності нуклеїнової кислоти вказує на те, що існує підвищена імовірність того, що пацієнт буде піддаватися лікуванню інгібуючою альфа-субодиницю PI3K сполукою (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід-1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амідом) або його фармацевтично прийнятною сіллю; та

35 b) подальший вибір пацієнта для лікування інгібуючою альфа-субодиницю PI3K сполукою (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід-1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амідом) або його фармацевтично прийнятною сіллю на підставі того, що у зразку, взятому у пацієнта, відсутня мутація у послідовності нуклеїнової кислоти, внаслідок чого послідовність нуклеїнової кислоти кодує глутамін у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K.

13. Спосіб селективного лікування пацієнта, який має рак, що включає:

аналіз зразка нуклеїнової кислоти, отриманого від пацієнта, який має рак, на наявність мутації у молекулі нуклеїнової кислоти, що кодує каталітичну субодиницю p110α поліпептиду PI3K, що приводить до заміни глутаміну у положенні 859 кодованої каталітичної субодиниці p110α;

45 подальше селективне введення або:

а) терапевтично ефективної кількості (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід-1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-аміду) або його фармацевтично прийнятної солі пацієнту на підставі того, що нуклеїнова кислота кодує глутамін у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K; або

50 b) терапевтично ефективної кількості іншої інгібуючої PI3K сполуки пацієнту на підставі того, що нуклеїнова кислота не кодує глутамін у положенні 859 каталітичної субодиниці p110α PI3K.

14. Спосіб генотипування індивідуума, що включає детектування генетичного варіанту, який приводить до амінокислотного варіанту у положенні 859 кодованої каталітичної субодиниці p110α PI3K, де відсутність варіанту у положенні 859 вказує на те, що (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід-1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл}-амід) повинен бути введений індивідууму.

55 15. Спосіб генотипування індивідуума, що включає детектування відсутності або присутності САА у положенні 2575-2577 у гені каталітичної субодиниці p110α PI3K, отриманому від зазначеного індивідуума, де присутність САА вказує на те, що індивідуум має підвищену

імовірність відповіді на (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід-1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-амід).

16. Спосіб за будь-яким з пп. 1-13, де рак вибраний з групи, що складається з гліобластоми, меланоми, раку яєчників, раку молочної залози, недрібноклітинного раку легені (NSCLC), ендометріального раку, раку передміхурової залози, раку товстої кишки та мієломи.

17. Спосіб за будь-яким з пп. 2-6, 8 та 10-13, де зразок є зразком пухлини.

18. Спосіб за п. 17, де зразок пухлини є свіжозамороженим зразком або залитим парафіном зразком тканини.

19. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6 та 14, де детектування може бути виконане імунологічними аналізами, імуногістохімією, ELISA, проточною цитометрією, Вестерн-блотингом, ВЕРХ та мас-спектроскопією.

20. Спосіб за будь-яким з пп. 7-13 та 15, де присутність або відсутність мутації у молекулі нуклеїнової кислоти, що кодує каталітичну субодиницю p110 α PI3K, може бути детектована технологією, вибраною з групи, що складається з Нозерн-блотингу, полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР), аналізів на основі TaqMan, прямого секвенування, динамічної алель-специфічної гібридизації, олігонуклеотидних SNP-чипів з високою густиною, аналізів поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (ПДРФ), аналізів подовження праймера, олігонуклеотид-лігазного аналізу, аналізу одноланцюгового конформаційного поліморфізму, електрофорезу у гелі з використанням градієнта температури (TGGE), денатуруючої високоефективної рідинної хроматографії, високорозрізняючого аналізу плавлення, аналізів з білком, що зв'язує неправильно спарену ДНК SNPLex®, капілярного електрофорезу, Саузерн-блотингу.

21. Спосіб за п. 7-12 або 15, де етап зазначеного детектування містить секвенування гену каталітичної субодиниці p110 α PI3K або його ділянки.

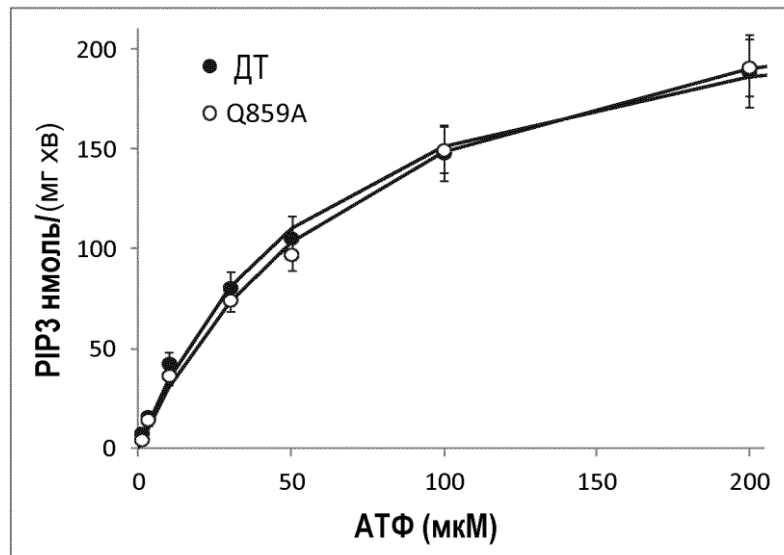
22. Спосіб одержання передаваної форми інформації для прогнозування сприйнятливості пацієнта, який має рак, до лікування (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід-1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-амідом), що включає:

а) визначення того, чи має пацієнт підвищену імовірність того, що буде піддаватися лікуванню (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід-1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-амідом), де пацієнт має підвищену імовірність на підставі того, що він має глутамін у положенні 859 каталітичної субодиниці p110 α PI3K, та б) запис результату визначального етапу на матеріальну або нематеріальну форму носія для застосування при передачі.

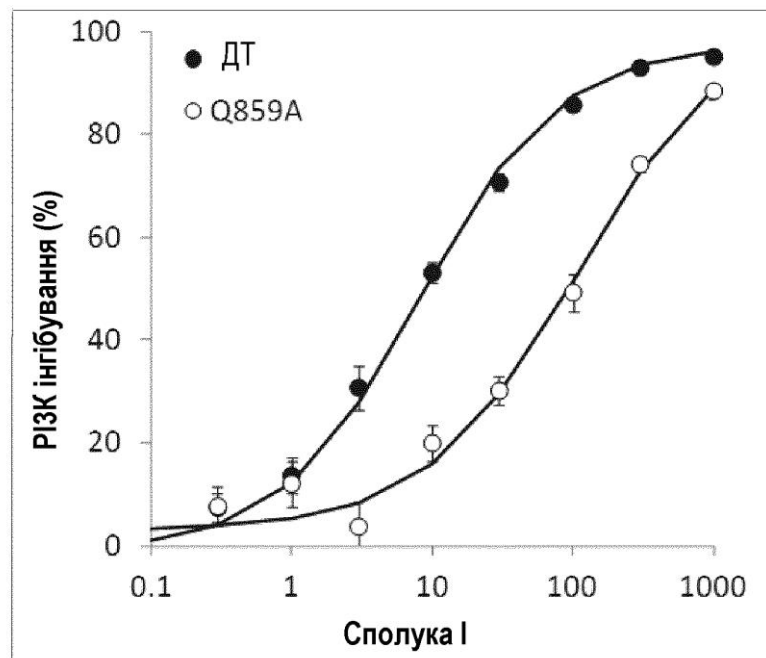
23. Спосіб одержання передаваної форми інформації для прогнозування сприйнятливості пацієнта, який має рак, до лікування (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід-1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-амідом), що включає:

а) визначення того, чи має пацієнт підвищену імовірність того, що він буде піддаватися лікуванню (S)-піролідін-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід-1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл]-амідом), де пацієнт має підвищену імовірність на підставі послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує глутамін у положенні 859 каталітичної субодиниці p110 α PI3K; та

б) запис результату визначального етапу на матеріальну або нематеріальну форму носія для застосування при передачі.



Фіг. 1



Фіг. 2

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601