

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041212**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.09.27

(21) Номер заявки
201991205

(22) Дата подачи заявки
2017.11.17

(51) Int. Cl. **C07K 14/705** (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01)
A61K 31/395 (2006.01)

**(54) СОЕДИНЕНИЯ С ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ В ОТНОШЕНИИ
РАКОВЫХ КЛЕТОК, НЕСУЩИХ МУТАЦИИ В 20 ЭКЗОНЕ EGFR ИЛИ HER2**

(31) 62/423,732; 62/427,692; 62/572,716

(32) 2016.11.17; 2016.11.29; 2017.10.16

(33) US

(43) 2019.11.29

(86) PCT/US2017/062326

(87) WO 2018/094225 2018.05.24

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БОРД ОФ РИДЖЕНТС, ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ТЕХАС
СИСТЕМ (US)**

(72) Изобретатель:
**Робишо Жаклин, Нилссон Моник,
Хеймах Джон В. (US)**

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

(56) Han et al.: A Phase II Study of Pozitotinib in Patients with Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-Mutant Lung Adenocarcinoma Who Have Acquired Resistance to EGFR-Tyrosine Kinase Inhibitors. *Cancer Res Treat Epub* 3 May 2016, Vol 49 No 1 Pages 10-19. Especially abstract, pg 11 col 1 para 1, pg 11 col 2 para 3, pg 12 col 1 para 1, pg 12 col 1 para 5, pg 12 col 2 para 2-3, pg 17 col 1 para 2.

Costa et al.: Pulse Afatinib for ERBB2 Exon 20 Insertion-Mutated Lung Adenocarcinomas. *J Thorac Oncol* June 2016, Vol 11 No 6, Pages 918-923. Especially abstract, pg 920 col 2 para 1, pg 921 table 1.

Kobayashi et al.: Not all epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer are created equal: Perspectives for individualized treatment strategy. *Cancer Sci Epub* 9 August 2016, Vol 107 No 9, Pages 1179-1186. Especially pg 1180 fig 1, pg 1182 col 1 para 3, pg 1182 col 2 para 4, pg 1183 table 3.

Suzawa et al.: Antitumor effect of afatinib, as a human epidermal growth factor receptor 2-targeted therapy, in lung cancers harboring HER2 oncogene alterations. *Cancer Science* January 2016, Vol 107 No 1 Pages 45-52. Especially abstract.

Besse et al.: Neratinib (N) with or without Temsirolimus (TEM) in Patients (PTS) with Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) carrying HER2 Somatic mutations: An International Randomized Phase II Study. *Annals of Oncology* 1 September 2014, Vol 25 Issue Suppl_4 mdu438.47, Abstract LBA39_PR. Especially abstract.

(57) Изобретение предлагает способы лечения рака у пациента, у которого определено наличие мутации в 20 экзоне EGFR и/или HER2, такой как инсерционная мутация, путем введения ингибитора тирозинкиназы третьего поколения, такого как позитотиниб или афатиниб.

B1

041212

041212 B1

По настоящей заявке испрашивается приоритет на основании предварительной патентной заявки США № 62/423732, поданной 17 ноября 2016 г., предварительной заявки США № 62/427692, поданной 29 ноября 2016 г., и предварительной заявки США № 62/572716, поданной 16 октября 2017 г., содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Список последовательностей, который содержится в файле с именем "UTFCP1306WO.txt", который имеет размер 4 КБ (согласно измерениям в Microsoft Windows), созданном 17 ноября 2017 г., подан в электронной форме с настоящим документом и включен в настоящий документ посредством ссылки.

Уровень техники

Настоящее изобретение было выполнено с государственной поддержкой за счет гранта № CA190628, выданного Национальными институтами здоровья. Государство обладает определенными правами на изобретение.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится в целом к области молекулярной биологии и медицины. Более конкретно, оно относится к способам лечения пациентов с мутациями в 20 экзоне EGFR и/или HER2, такими как инсерционные мутации.

Описание предшествующего уровня техники

Приблизительно при 10-15% НМРЛ происходит активация мутаций EGFR. Для большинства этих пациентов, у опухолей которых есть "классические" сенсibiliзирующие мутации (делеции L858R и в 19 экзоне), ИТК, такие как гефитиниб и эрлотиниб, обеспечивают значительное клиническое преимущество, причем приблизительно 70% демонстрируют объективные ответы (ОО), улучшение выживаемости без прогрессирования (PFS) и качество жизни, сравнимые с применяемой отдельно химиотерапией (Maemondo et al., 2010). Однако приблизительно 10-12% мутантных по EGFR опухолей при НМРЛ имеют вставку внутри рамки в 20 экзоне EGFR (Arcila et al., 2012) и в целом резистентны к ИТК EGFR. Кроме того, 90% мутаций HER2 при НМРЛ представляют собой мутации в 20 экзоне (Mazieres et al., 2013). Мутации в 20 экзоне EGFR и HER2 вместе содержат приблизительно 4% пациентов с НМРЛ. Имеющиеся к настоящему времени данные говорят о том, что доступные ИТК HER2 (афатиниб, лапатиниб, нератиниб, дакомитиниб) имеют ограниченную активность у пациентов с мутантными по HER2 опухолями, причем множество исследований сообщают о частоте ОО ниже 40% (Kosaka et al., 2017), хотя некоторую преclinical активность наблюдали на моделях мышей HER2, получавших афатиниб (Perera et al., 2009).

Экзон 20 EGFR и HER2 содержит две основные области, с-спираль (остатки 762-766 в EGFR и 770-774 в HER2) и петлю после с-спирали (остатки 161-11A в EGFR и 775-783 в HER2). Кристаллография вставки D770insNPG в 20 экзоне EGFR демонстрирует стабилизированную и имеющую вид гребня активную конформацию, вызывающую резистентность к ИТК первого поколения во вставках после остатка 764. Однако моделирование A763insFQEA EGFR продемонстрировало, что вставки до остатка 764 не дают этого эффекта и не вызывают лекарственную резистентность (Yasuda et al., 2013). Кроме того, в основанной на полученном у пациента ксенотрансплантате (PDX) модели НМРЛ, обусловленного 20 экзоном EGFR со вставками в петле после с-спирали (EGFR с H773insNPH), было обнаружено, что ИТК EGFR третьего поколения, осимертиниб (AZD9291) и роцилетиниб (CO-1696) обладают минимальной активностью (Yang et al., 2016). В недавнем исследовании редких мутаций в 20 экзоне EGFR и HER2 авторы обнаружили гетерогенный ответ на ингибиторы второго поколения на основе ковалентного хиназолина, такие как дакомитиниб и афатиниб. Однако концентрации, требуемые для воздействия на более распространенные инсерционные мутации в 20 экзоне, оказались выше клинически достижимых концентраций (Kosaka et al., 2017). Следовательно, существует значительная клиническая потребность в определении новых методов лечения для преодоления врожденной лекарственной резистентности опухолей при НМРЛ с мутациями в 20 экзоне, в частности инсерционными мутациями, в EGFR и HER2.

Сущность изобретения

Настоящее раскрытие предлагает способы и композиции для лечения рака у пациентов с мутациями в 20 экзоне EGFR и/или HER2, такими как инсерционные мутации в 20 экзоне. В одном варианте осуществления предлагается способ лечения рака у субъекта, содержащий введение субъекту эффективного количества позитиниба, причем у субъекта определено наличие одной или нескольких мутаций в 20 экзоне EGFR, такой как одна или несколько инсерционных мутаций в 20 экзоне EGFR. В определенных аспектах субъект является человеком.

В некоторых аспектах одна или несколько мутаций в 20 экзоне EGFR содержат одну или несколько точечных мутаций, вставок и/или делеций 3-18 нуклеотидов между аминокислотами 763-778. В некоторых аспектах у субъекта определено наличие 2, 3 или 4 мутаций в 20 экзоне EGFR. В некоторых аспектах одна или несколько мутаций в 20 экзоне EGFR находятся в одном или нескольких остатках, выбранных из группы, состоящей из A763, A767, S768, V769, D770, N771, P772 и H773. В некоторых аспектах у субъекта определено отсутствие мутации EGFR в остатке C797. В некоторых аспектах одну или несколько мутаций в 20 экзоне выбирают из группы, состоящей из A763insFQEA, A767insASV, S768dupSVD, V769insASV, D770insSVD, D770insNPG, H773insNPH, N771del insGY, N771del insFH и N771dupNPH.

В некоторых аспектах у субъекта определяют наличие мутации в 20 экзоне EGFR, такой как инсер-

ционная мутация, с помощью анализа геномного образца субъекта. В некоторых аспектах геномный образец выделяют из слюны, крови, мочи, нормальной ткани или опухолевой ткани. В определенных аспектах наличие мутации в 20 экзоне EGFR определяют с помощью секвенирования нуклеиновой кислоты (например, секвенирования ДНК опухолевой ткани или циркулирующей свободной ДНК из плазмы) или ПЦР-анализа.

В некоторых аспектах способ дополнительно содержит введение дополнительной противораковой терапии. В некоторых аспектах противораковая терапия представляет собой химиотерапию, лучевую терапию, генную терапию, хирургическое вмешательство, гормональную терапию, антиангиогенную терапию или иммунотерапию.

В некоторых аспектах poziотиниб и/или противораковую терапию вводят внутривенно, подкожно, внутрикостно, перорально, трансдермально, с замедленным высвобождением, с контролируемым высвобождением, с отсроченным высвобождением, в виде суппозитория или сублингвально. В некоторых аспектах введение poziотиниба и/или противораковой терапии содержит местное, регионарное или системное введение. В определенных аспектах poziотиниб и/или противораковую терапию вводят два или более раз, например раз в день, через день или раз в неделю.

В некоторых аспектах рак представляет собой рак ротовой полости, рак ротоглотки, рак носоглотки, рак дыхательных путей, рак мочеполовой системы, рак желудочно-кишечного тракта, рак ткани центральной или периферической нервной системы, эндокринный или нейроэндокринный рак или рак гемопозитических тканей, глиому, саркому, карциному, лимфому, меланому, фиброму, менингиому, рак головного мозга, рак ротоглотки, рак носоглотки, рак почки, рак желчных путей, феохромоцитому, рак из островковых клеток поджелудочной железы, опухоли Ли-Фраумени, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, опухоли гипофиза, опухоли надпочечников, опухоли при остеогенной саркоме, множественные нейроэндокринные опухоли I типа и II типа, рак молочной железы, рак легкого, рак головы и шеи, рак предстательной железы, рак пищевода, рак трахеи, рак печени, рак мочевого пузыря, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак яичников, рак матки, рак шейки матки, рак яичек, рак толстой кишки, рак прямой кишки или рак кожи. В определенных аспектах рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого.

В другом варианте осуществления предлагается фармацевтическая композиция, содержащая poziотиниб, для пациента, у которого определено наличие одной или нескольких мутаций в 20 экзоне EGFR, такой как одна или несколько инсерционных мутаций в 20 экзоне EGFR. В некоторых аспектах одна или несколько мутаций в 20 экзоне EGFR содержат точечную мутацию, вставку и/или делецию 3-18 нуклеотидов между аминокислотами 763-778. В некоторых аспектах у субъекта определено наличие 2, 3 или 4 мутаций в 20 экзоне EGFR.

В некоторых аспектах одна или несколько инсерционных мутаций в 20 экзоне EGFR находятся в одном или нескольких остатках, выбранных из группы, состоящей из A763, A767, S768, V769, D770, N771, P772 и H773. В некоторых аспектах у субъекта определено отсутствие мутации EGFR в остатке C797. В определенных аспектах одну или несколько мутаций в 20 экзоне выбирают из группы, состоящей из A763insFQEA, A767insASV, S768dupSVD, V769insASV, D770insSVD, D770insNPG, H773insNPH, N771del insGY, N771del insFH и N771dupNPH. В некоторых аспектах пациент получает лечение с помощью противораковой терапии.

В еще одном варианте осуществления предлагается способ прогнозирования ответа на poziотиниб отдельно или в комбинации с противораковой терапией у субъекта, имеющего рак, содержащий детектирование мутации в 20 экзоне EGFR (например, инсерционной мутации в 20 экзоне EGFR) в геномном образце, полученном у упомянутого пациента, причем если данный образец положителен по наличию мутации в 20 экзоне EGFR, то для пациента прогнозируют благоприятный ответ на poziотиниб отдельно или в комбинации с противораковой терапией. В некоторых аспектах геномный образец выделяют из слюны, крови, мочи, нормальной ткани или опухолевой ткани. В некоторых аспектах наличие мутации в 20 экзоне EGFR определяют с помощью секвенирования нуклеиновой кислоты или ПЦР-анализа. В некоторых аспектах мутация в 20 экзоне EGFR содержит одну или несколько точечных мутаций, вставок и/или делеций 3-18 нуклеотидов между аминокислотами 763-778. В некоторых аспектах мутация в 20 экзоне EGFR находится в остатке A763, H773, A767, S768, V769, D770, N771 и/или D773. В некоторых аспектах мутацию в 20 экзоне EGFR выбирают из группы, состоящей из A763insFQEA, A767insASV, S768dupSVD, V769insASV, D770insSVD, D770insNPG, H773insNPH, N771del insGY, N771del insFH и N771dupNPH. В некоторых аспектах благоприятный ответ на ингибитор poziотиниб отдельно или в комбинации с противораковой терапией содержит уменьшение размера или нагрузки опухоли, блокирование роста опухоли, уменьшение связанной с опухолью боли, уменьшение связанной с раком патологии, уменьшение связанных с раком симптомов, отсутствие прогрессирования рака, увеличение интервала между заболеваниями, увеличение времени до прогрессирования, индуцирование ремиссии, уменьшение метастазирования или увеличение выживаемости пациентов. В дополнительных аспектах пациенту, для которого сделан прогноз о благоприятном ответе, вводят poziотиниб отдельно или в комбинации со второй противораковой терапией.

Еще один вариант осуществления предлагает способ лечения рака у пациента, содержащий введе-

ние эффективного количества poziотиниба или афатиниба субъекту, причем у субъекта определено наличие одной или нескольких мутаций в 20 экзоне HER2, выбранных из группы, состоящей из A775insV G776C, A775insYVMA, G776C V777insC, G776del insVV, G776del insVC и P780insGSP. В некоторых аспектах одна или несколько мутаций в 20 экзоне HER2 дополнительно содержат одну или несколько точечных мутаций, вставок и/или делеций 3-18 нуклеотидов между аминокислотами 770-785. В некоторых аспектах одна или несколько мутаций в 20 экзоне HER2 находятся в остатке A775, G776, S779 и/или P780. В определенных аспектах субъект является человеком.

В некоторых аспектах способ дополнительно содержит введение ингибитора mTOR. В некоторых аспектах ингибитор mTOR представляет собой рапамицин, темсиролимус, эверолимус, рифафоролимус или MLN4924. В определенных аспектах ингибитор mTOR представляет собой эверолимус.

В некоторых аспектах poziотиниб или афатиниб и/или ингибитор mTOR вводят внутривенно, подкожно, внутрикостно, перорально, трансдермально, с замедленным высвобождением, с контролируемым высвобождением, с отсроченным высвобождением, в виде суппозитория или сублингвально. В некоторых аспектах у пациента определяют наличие мутации в 20 экзоне HER2 с помощью анализа геномного образца пациента. В некоторых аспектах геномный образец выделяют из слюны, крови, мочи, нормальной ткани или опухолевой ткани. В некоторых аспектах наличие мутации в 20 экзоне HER2 определяют с помощью секвенирования нуклеиновой кислоты или ПЦР-анализа.

В дополнительных аспектах способ дополнительно содержит введение дополнительной противораковой терапии. В некоторых аспектах противораковая терапия представляет собой химиотерапию, лучевую терапию, генную терапию, хирургическое вмешательство, гормональную терапию, антиангиогенную терапию или иммунотерапию.

В некоторых аспектах рак представляет собой рак ротовой полости, рак ротоглотки, рак носоглотки, рак дыхательных путей, рак мочеполовой системы, рак желудочно-кишечного тракта, рак ткани центральной или периферической нервной системы, эндокринный или нейроэндокринный рак или рак гемопозитических тканей, глиому, саркому, карциному, лимфому, меланому, фиброму, менингиому, рак головного мозга, рак ротоглотки, рак носоглотки, рак почки, рак желчных путей, феохромоцитому, рак из островковых клеток поджелудочной железы, опухоли Ли-Фраумени, рак щитовидной железы, рак парашитовидной железы, опухоли гипофиза, опухоли надпочечников, опухоли при остеогенной саркоме, множественные нейроэндокринные опухоли I типа и II типа, рак молочной железы, рак легкого, рак головы и шеи, рак предстательной железы, рак пищевода, рак трахеи, рак печени, рак мочевого пузыря, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак яичников, рак матки, рак шейки матки, рак яичек, рак толстой кишки, рак прямой кишки или рак кожи. В некоторых аспектах рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого.

В другом варианте осуществления предлагается фармацевтическая композиция, содержащая poziотиниб или афатиниб, для пациента, у которого определено наличие одной или нескольких мутаций в 20 экзоне HER2, выбранных из группы, состоящей из A775insV G776C, A775insYVMA, G776C V777insC, G776del insVV, G776del insVC и P780insGSP. В некоторых аспектах мутация в 20 экзоне HER2 дополнительно содержит одну или несколько точечных мутаций, вставок и/или делеций 3-18 нуклеотидов между аминокислотами 770-785. В некоторых аспектах мутация в 20 экзоне HER2 находится в остатке A775, G776, S779 и/или P780. В некоторых аспектах пациент получает лечение с помощью противораковой терапии.

В еще одном варианте осуществления предлагается способ прогнозирования ответа на poziотиниб или афатиниб отдельно или в комбинации с противораковой терапией у пациента, имеющего рак, содержащий детектирование мутации в 20 экзоне HER2 (например, инсерционной мутации в 20 экзоне HER2), выбранной из группы, состоящей из A775insV G776C, A775insYVMA, G776C V777insC, G776del insVV, G776del insVC и P780insGSP, в геномном образце, полученном у упомянутого пациента, причем если данный образец положителен по наличию мутации в 20 экзоне HER2, то для пациента прогнозируют благоприятный ответ на poziотиниб или афатиниб отдельно или в комбинации с противораковой терапией. В некоторых аспектах мутация в 20 экзоне HER2 дополнительно содержит одну или несколько точечных мутаций, вставок и/или делеций 3-18 нуклеотидов между аминокислотами 770-785. В некоторых аспектах мутация в 20 экзоне HER2 находится в остатке A775, G776, S779 и/или P780.

В некоторых аспектах геномный образец выделяют из слюны, крови, мочи, нормальной ткани или опухолевой ткани. В некоторых аспектах наличие мутации в 20 экзоне HER2 определяют с помощью секвенирования нуклеиновой кислоты или ПЦР-анализа. В определенных аспектах противораковая терапия представляет собой ингибитор mTOR. В некоторых аспектах благоприятный ответ на ингибитор poziотиниб или афатиниб отдельно или в комбинации с противораковой терапией содержит уменьшение размера или нагрузки опухоли, блокирование роста опухоли, уменьшение связанной с опухолью боли, уменьшение связанной с раком патологии, уменьшение связанных с раком симптомов, отсутствие прогрессирования рака, увеличение интервала между заболеваниями, увеличение времени до прогрессирования, индуцирование ремиссии, уменьшение метастазирования или увеличение выживаемости пациентов. В дополнительных аспектах пациенту, для которого сделан прогноз о благоприятном ответе, вводят poziотиниб отдельно или в комбинации со второй противораковой терапией.

Также в настоящем документе предлагается композиция, содержащая нуклеиновые кислоты, выделенные из человеческих раковых клеток; и пара праймеров, которая может амплифицировать по меньшей мере первую часть 20 экзона кодирующей последовательности EGFR или HER2 человека. В некоторых аспектах композиция дополнительно содержит меченую молекулу зонда, которая может специфически гибридизоваться с первой частью 20 экзона кодирующей последовательности EGFR или HER2 человека при наличии мутации в последовательности. В некоторых аспектах композиция дополнительно содержит термостабильную ДНК-полимеразу. В некоторых аспектах композиция дополнительно содержит dNTPS. В некоторых аспектах меченый зонд гибридизуется с первой частью 20 экзона кодирующей последовательности EGFR человека при наличии мутации, выбранной из группы, состоящей из A763insFQEA, A767insASV, S768dupSVD, V769insASV, D770insSVD, D770insNPG, H773insNPH, N771del insGY, N771del insFH и N771dupNPH. В некоторых аспектах меченый зонд гибридизуется с первой частью 20 экзона кодирующей последовательности HER2 человека при наличии мутации, выбранной из группы, состоящей из A775insV G776C, A775insYVMA, G776V, G776C V777insV, G776C V777insC, G776del insVV, G776del insVC и P780insGSP.

В другом варианте осуществления предлагается выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая мутантный белок EGFR, причем упомянутый мутантный белок отличается от человеческого EGFR дикого типа одной или несколькими мутациями в 20 экзоне EGFR, включая точечную мутацию, вставку и/или делецию 3-18 нуклеотидов между аминокислотами 763-778. В некоторых аспектах одна или несколько мутаций в 20 экзоне EGFR находятся в одном или нескольких остатках, выбранных из группы, состоящей из A763, A767, S768, V769, D770, N771, P772 и H773. В некоторых аспектах одну или несколько мутаций в 20 экзоне выбирают из группы, состоящей из A763insFQEA, A767insASV, S768dupSVD, V769insASV, D770insSVD, D770insNPG, H773insNPH, N771del insGY, N771del insFH и N771dupNPH. В конкретных аспектах нуклеиновая кислота содержит последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11 или 12.

В еще одном варианте осуществления предлагается выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая мутантный белок HER2, причем упомянутый мутантный белок отличается от человеческого HER2 дикого типа одной или несколькими мутациями в 20 экзоне HER2, включая одну или несколько точечных мутаций, вставок и/или делеций 3-18 нуклеотидов между аминокислотами 770-785. В некоторых аспектах одна или несколько мутаций в 20 экзоне HER2 находятся в остатке A775, G776, S779 и/или P780. В некоторых аспектах одну или несколько мутаций в 20 экзоне HER2 выбирают из группы, состоящей из A775insV G776C, A775insYVMA, G776V, G776C V777insV, G776C V777insC, G776del insVV, G776del insVC и P780insGSP. В конкретных аспектах нуклеиновая кислота содержит последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17 или 18.

Другие объекты, признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из нижеследующего подробного описания. Однако следует понимать, что подробное описание и конкретные примеры, хотя и указывают на предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, приведены только в качестве иллюстрации, поскольку из этого подробного описания специалистам в данной области техники будут очевидны различные изменения и модификации в пределах сущности и объема настоящего изобретения.

Краткое описание чертежей

Следующие чертежи составляют часть настоящего описания и включены для дополнительной демонстрации определенных аспектов настоящего изобретения. Настоящее изобретение может быть лучше понято при обращении к одному или нескольким из этих чертежей в сочетании с подробным описанием конкретных вариантов осуществления, представленным в настоящем документе.

Фиг. 1A-1J: Инсерционные мутации в 20 экзоне вызывают резистентность de novo к ковалентным и нековалентным ИТК. (Фиг. 1A) Выживаемость без прогрессирования (PFS) у пациентов с классической мутацией и мутацией в 20 экзоне EGFR демонстрирует резистентность к терапии первой линии. У пациентов с вставками в 20 экзоне снижена процентная выживаемость. (Фиг. 1B) Схема инсерционных мутаций в 20 экзоне EGFR и HER2, полученная в модели на стабильных Ва/F3. Кривые дозовой зависимости жизнеспособности клеток линий клеток Ва/F3, экспрессирующих инсерционные мутации в 20 экзоне EGFR (фиг. 1C-E) и HER2 (фиг. 1F-H), обработанных ИТК 1-го, 2-го и 3-го поколения в течение 72 ч. (Фиг. 1C-H) Для каждой концентрации (n=3) наносили на график среднее±СОС по 6 линиям клеток. (Фиг. 1I) 3D-моделирование EGFR с D770insNPG и T790M. Сдвиги Р-петли и α-спирали в связывающий карман приводят к стерическому несоответствию, выталкивающему AZD9291 из связывающего кармана. (Фиг. 1J) 3D-моделирование HER2 с A775insYVMA и WT. Общие сдвиги Р-петли и α-спирали в связывающий карман приводят к общему уменьшению размера связывающего кармана.

Фиг. 2A-2G: Позитивиниб сильно ингибирует инсерционные мутации в 20 экзоне EGFR и HER2. Кривые дозовой зависимости жизнеспособности клеток линий клеток Ва/F3, экспрессирующих инсерционные мутации в 20 экзоне EGFR (фиг. 2A) и HER2 (фиг. 2B), обработанных позитивинибом в течение 72 ч. Для каждой концентрации (n=3) наносили на график среднее±СОС для каждой отдельной линии клеток. (Фиг. 2C) Вестерн-блоттинг подтверждает ингибирование р-EGFR и р-HER2 в линии клеток Ва/F3

после 2 ч обработки poziотинибом (n=2). (Фиг. 2D) Корреляция местоположения вставки в 20 экзоне EGFR Va/F3 с местоположением аминокислоты (n=2). Корреляцию Пирсона и р-значение определяли с использованием GraphPad Prism. (Фиг. 2E) Кривые дозовой зависимости жизнеспособности клеток линии полученных от пациента клеток CUTO14, экспрессирующих EGFR с A767dupASV, и (фиг. 2F) YUL0019, экспрессирующих EGFR с N771del insFH, обработанных poziотинибом или афатинибом в течение 72 ч (n=3). (Фиг. 2F) Значения IC₅₀ мутантных по EGFR клеток Va/F3, нормализованные по значениям IC₅₀ линии клеток Va/F3 EGFR T790M после инкубации с афатинибом, осимертинибом, роцилетинибом или poziотинибом в течение 72 ч (n=3). (Фиг. 2G) Столбцы представляют среднее ± СОС. Значения, превышающие 1, указывают на менее сильное ингибирование по сравнению с T790M, тогда как значения меньше единицы указывают на более сильное ингибирование вставок в 20 экзоне по сравнению с T790M.

Фиг. 3А-3Н: Poziотиниб уменьшает опухолевую нагрузку в моделях на мышцах с инсерционной мутацией в 20 экзоне EGFR и HER2. Мышам с EGFR с D770insNPG (фиг. 3А) или HER2 с A775insYVMA (фиг. 3В) давали раз в день носитель (EGFR n=5 и HER2 n=4), 20 мг/кг афатиниба (EGFR n=4) или 10 мг/кг poziотиниба (EGFR n=5 и HER2 n=6) в течение 4 недель. Каскадные диаграммы изменения объема опухоли, измеренного с помощью МРТ, демонстрируют ингибирование опухоли poziотинибом на 85 и 60% через 4 недели в GEMM EGFR и HER2, соответственно. (Фиг. 3А-В) Для вычисления р-значения использовали двусторонний t-критерий Стьюдента. Типичные МРТ-изображения GEMM EGFR (фиг. 3С) и HER2 (фиг. 3D) до и после 4 недель лечения poziотинибом демонстрируют устойчивую регрессию опухоли. Графики объема опухоли для EGFR с D770insNPG (фиг. 3Е) (n=4) и HER2 с A775insYVMA (фиг. 3F) (n=6), получавших с 10 мг/кг poziотиниба 5 дней в неделю в течение 12 недель, демонстрируют, что мыши продолжают отвечать на лечение poziотинибом. (Фиг. 3G) Клетки YUL-0019 (EGFR с N771delinsFH) обрабатывали афатинибом или poziотинибом. Клетки, обработанные poziотинибом 10 мг/кг, имели самый маленький объем опухоли, а 5 мг/кг имели 2-й с конца по величине объем опухоли. (Фиг. 3H) Мыши с PDX с EGFR с H773insNPH получали контроль с носителем (n=6), 5 мг/кг (n=6) или 10 мг/кг (n=3) poziотиниба. У мышей, получавших poziотиниб, объем опухоли уменьшился. Каскадные диаграммы демонстрируют, что опухолевая нагрузка уменьшилась на >85% у всех получавших poziотиниб мышей, и что у 8 из 9 получавших poziотиниб мышей ксенотрансплантаты уменьшились полностью до остаточного болуса. Для определения статистической значимости использовали однофакторный анализ ANOVA в сочетании с тестом Тьюки, ***, p<0,0001.

Фиг. 4А-4С: Инсерционные мутации в 20 экзоне EGFR и HER2 являются активирующими мутациями. (Фиг. 4А) Каскадные диаграммы отдельных пациентов с вставками в 20 экзоне EGFR демонстрируют резистентность de novo к эрлотинибу, гефитинибу или афатинибу. Мутации пациентов приведены под каждым представляющим их столбцом. (Фиг. 4В) Стабильные линии клеток Va/F3, экспрессирующих инсерционные мутации в 20 экзоне EGFR, жизнеспособны в независимых от IL-3 условиях, в отличие от экспрессирующих пустой вектор Va/F3 клеток или экспрессирующих EGFR WT клеток Va/F3, что указывает на то, что вставки в 20 экзоне EGFR являются активирующими мутациями. (Фиг. 4С) Независимый от IL-3 рост 11 стабильных линий клеток Va/F3, экспрессирующих различные мутации HER2, демонстрирует, что большинство активирующих мутаций HER2 находятся в 20 экзоне HER2. За исключением L755P, все активирующие мутации являлись инсерционными мутациями в 20 экзоне HER2. (Фиг. 4В-С) Жизнеспособность клеток определяли с помощью анализа Cell Titer Glo. Для каждой линии клеток (n=3) наносили на график среднее± СОС.

Фиг. 5: Кривые дозовой зависимости жизнеспособности клеток отдельных линий клеток Va/F3, экспрессирующих инсерционные мутации в 20 экзоне EGFR, обработанных ИТК 1-го, 2-го, и 3-го поколения в течение 72 ч. Для каждой линии клеток (n=3) наносили на график среднее± СОС.

Фиг. 6: Кривые дозовой зависимости жизнеспособности клеток отдельных линий клеток Va/F3, экспрессирующих инсерционные мутации в 20 экзоне HER2, обработанных ИТК 1-го, 2-го, и 3-го поколения в течение 72 ч. Для каждой линии клеток (n=3) наносили на график среднее± СОС.

Фиг. 7А-7D: Инсерционные мутации в 20 экзоне EGFR и HER2 после остатка А763 резистентны к ИТК 1-го и 3-го поколения. Клетки Va/F3 с вставками в 20 экзоне EGFR лишали сыворотки на 1 ч, затем обрабатывали указанными дозами (фиг. 7А) эрлотиниба или (фиг. 7С) осимертиниба в течение 2 ч (N=2). Уровни р-EGFR и р-HER2 после (фиг. 7В) обработки эрлотинибом и (фиг. 7D) обработки осимертинибом количественно определяли с использованием Photoshop. Значения наносили на график в Graphpad Prism, столбцы представляют среднее± СОС. (N=2) p < 0,05 (*), p < 0,01 (* *) или p < 0,001 (***)).

Фиг. 8А-8Е: Инсерционные мутации в 20 экзоне EGFR и HER2 чувствительны к poziотинибу in vitro. (Фиг. 8А) Вестерн-блоты р-EGFR и р-HER2 после 2 ч обработки poziотинибом указанных линий клеток Va/F3 количественно оценивали с использованием Photoshop. Значения наносили на график в Graphpad Prism, столбцы представляют среднее± СОС. (N=2) (Фиг. 8В) Вестерн-блот линии полученных от пациента клеток CUTO-14 после 3 ч указанных доз афатиниба или poziотиниба (N=3). (Фиг. 8С) Количественная оценка р-EGFR по вестерн-блотам после 3 ч указанных доз афатиниба или poziотиниба в линии клеток CUTO-14. Обработка poziотинибом приводила к уменьшению р-EGFR. (Фиг. 8D) График линейной регрессии значений IC₅₀ в зависимости от относительной экспрессии линий клеток Va/F3 про-

демонстрировал, что отсутствует корреляция между экспрессией и чувствительностью к позитинибу (n=2). (Фиг. 8E) График линейной регрессии значений IC₅₀ в зависимости от местоположения мутации в рецепторе HER2 продемонстрировал, что отсутствует корреляция между местоположением и чувствительностью к позитинибу в линиях мутантных по HER2 клеток Ba/F3 (n=2). Корреляции Пирсона и r-значения рассчитывали с использованием Graphpad Prism, p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), или p < 0,001 (***)

Фиг. 9: C797S и EMT являются двумя различными механизмами резистентности к позитинибу in vitro. Кривые дозовой зависимости жизнеспособности клеток линий мутантных по EGFR клеток Ba/F3, обработанных позитинибом в течение 72 ч. Для каждой линии клеток (n=3) наносили на график среднее ± СОС.

Фиг. 10: Кривые дозовой зависимости жизнеспособности клеток линии клеток MCF10A с HER2 с G776del insVC, обработанных указанными ИТК.

Описание иллюстративных вариантов осуществления

Хотя большинство активирующих мутаций немелкоклеточных раков легких (НМРЛ), мутантных по рецептору эпидермального фактора роста (EGFR), чувствительны к доступным ингибиторам тирозинкиназы EGFR (ИТК), подгруппе с изменениями в 20 экзоне of EGFR и HER2 присуща резистентность. В исследованиях настоящего изобретения использовали тестирование in silico, in vitro и in vivo для моделирования структурных изменений, вызываемых этими мутациями в 20 экзоне, и выявления эффективных ингибиторов. 3D-моделирование выявило значительные изменения, ограничивающие размер связывающего лекарственное средство кармана при связывании больших жестких ингибиторов. Было обнаружено, что позитиниб благодаря своему небольшому размеру и гибкости способен обходить эти стерические изменения и является сильным и относительно селективным ингибитором мутантных по 20 экзону EGFR или HER2 белков. Позитиниб также обладал сильной активностью в моделях мутантного по 20 экзону EGFR или HER2 НМРЛ на полученном у пациента ксенотрансплантате (PDX) и моделях на генетически модифицированных мышах. Таким образом, эти данные определяют позитиниб как сильный клинически активный ингибитор мутаций в 20 экзоне EGFR/HER2 и освещают молекулярные особенности ингибиторов киназы, которые могут обходить стерические изменения, вызываемые этими вставками.

Соответственно, некоторые варианты осуществления настоящего раскрытия предлагают способы лечения пациентов с раком с мутациями в 20 экзоне EGFR и/или HER2, такими как вставки в 20 экзоне. В частности, способы настоящего изобретения содержат введение позитиниба (также известного как HM781-36B) или афатиниба пациентам, у которых выявлены инсерционные мутации в 20 экзоне EGFR и/или HER. Размер и гибкость позитиниба преодолевает стерическое несоответствие, ингибируя мутанты по 20 экзону EGFR и HER2 в низких наномолярных концентрациях. Таким образом, позитиниб или афатиниб, а также структурно схожие ингибиторы, являются сильными ингибиторами EGFR или HER2, которые можно использовать для воздействия на вставки в 20 экзоне как EGFR, так и HER2, которые резистентны к необратимым ИТК 2-го и 3-го поколения.

I. Определения.

Как используется в настоящем документе в описании изобретения, единственное число может означать "один или несколько". Как используется в настоящем документе в формуле изобретения при использовании в сочетании со словом "содержащий" единственное число может означать "один или больше, чем один".

Термин "или" в формуле изобретения используется для обозначения "и/или", если явно не указано, что он относится только к альтернативным вариантам, или что альтернативные варианты являются взаимоисключающими, хотя настоящее раскрытие предусматривает определение, которое относится только к альтернативным вариантам и "и/или". Как используется в настоящем документе, "еще один" может означать по меньшей мере второй или более.

На протяжении данной заявки термин "приблизительно" используется указания на то, что значение включает собственную изменчивость ошибки для устройства, способа, используемого для определения, или изменчивость, которая существует среди субъектов исследования.

"Лечение" включает в себя (1) ингибирование заболевания у субъекта или пациента, испытывающего или проявляющего патологию или симптоматику заболевания (например, прекращение дальнейшего развития патологии и/или симптоматики), (2) ослабление заболевания у субъекта или пациента, который испытывает или проявляет патологию или симптоматику заболевания (например, купирование патологии и/или симптоматики), и/или (3) осуществление любого измеримого уменьшения заболевания у субъекта или пациента, который испытывает или проявляет патологию или симптоматику заболевания. Например, лечение может включать в себя введение эффективного количества позитиниба или афатиниба.

"Предотвращение" включает в себя: (1) ингибирование начала заболевания у субъекта или пациента, который может быть подвержен риску и/или предрасположен к заболеванию, но еще не испытывает или не проявляет частично или полностью патологию или симптоматику заболевания, и/или (2) замедление появления патологии или симптоматики заболевания у субъекта или пациента, который может быть подвержен риску и/или предрасположен к заболеванию, но еще не испытывает или не проявляет частично или полностью патологию или симптоматику заболевания.

Как используется в настоящем документе, термин "пациент" или "субъект" относится к живому организму млекопитающего, такого как человек, обезьяна, корова, овца, коза, собака, кошка, мышь, крыса, морская свинка или их трансгенные виды. В определенных вариантах осуществления пациент или субъект является приматом. Неограничивающими примерами пациентов-людей являются взрослые, подростки, младенцы и зародыши.

Термин "эффективный", как этот термин используется в настоящем описании и/или формуле изобретения, означает достаточный для достижения желаемого, ожидаемого или предполагаемого результата. "Эффективное количество", "терапевтически эффективное количество" или "фармацевтически эффективное количество" при использовании в контексте лечения пациента или субъекта с помощью соединения означает такое количество соединения, которое при введении субъекту или пациенту для лечения или предотвращения заболевания, представляет собой количество, достаточное для осуществления такого лечения или предотвращения заболевания.

Как используется в настоящем документе, термин "IC₅₀" относится к ингибирующей дозе, которая составляет 50% от максимального полученного ответа. Эта количественная мера показывает, сколько конкретного лекарственного средства или другого вещества (ингибитора) необходимо для ингибирования данного биологического, биохимического или химического процесса (или компонента процесса, т.е. фермента, клетки, клеточного рецептора или микроорганизма) наполовину.

"Противораковое" средство способно отрицательно влиять на раковую клетку/опухоль у субъекта, например, путем стимулирования гибели раковых клеток, индуцирования апоптоза в раковых клетках, снижения скорости роста раковых клеток, уменьшения возникновения или количества метастазов, уменьшения размера опухоли, ингибирования роста опухоли, уменьшения кровоснабжения опухоли или раковых клеток, стимулирования иммунного ответа на раковые клетки или опухоль, предотвращения или ингибирования прогрессирования рака или увеличения продолжительности жизни субъекта с раком.

Термин "вставка(и)" или "инсерционная мутация(и)" относится к добавлению одной или нескольких пар нуклеотидных оснований в последовательность ДНК. Например, инсерционная мутация в 20 экзоне EGFR может иметь место между аминокислотами 767-774, приблизительно 2-21 пар оснований. В другом примере инсерционная мутация в 20 экзоне HER2 содержит одну или несколько вставок 3-18 нуклеотидов между аминокислотами 770-785. Типичные инсерционные мутации в 20 экзоне EGFR и HER показаны на фиг. 1 настоящего раскрытия.

"Гибридизоваться" или "гибридизация" относится к связыванию между нуклеиновыми кислотами. Условия для гибридизации можно варьировать в зависимости от гомологии последовательностей нуклеиновых кислот, которые должны быть связаны. Таким образом, если гомология последовательностей между рассматриваемыми нуклеиновыми кислотами высока, используются строгие условия. Если гомология последовательностей низка, используются мягкие условия. Когда условия гибридизации являются строгими, специфичность гибридизации увеличивается, и это увеличение специфичности гибридизации приводит к снижению выхода неспецифических продуктов гибридизации. Однако в мягких условиях гибридизации специфичность гибридизации снижается, и это снижение специфичности гибридизации приводит к повышению выхода неспецифических продуктов гибридизации.

"Зонд" или "зонды" относится к полинуклеотиду, длина которого составляет по меньшей мере восемь (8) нуклеотидов и который образует гибридную структуру с целевой последовательностью благодаря комплементарности по меньшей мере одной последовательности в зонде с последовательностью в целевой области. Полинуклеотид может состоять из ДНК и/или РНК. Зонды в определенных вариантах осуществления помечены детектируемым образом. Зонды могут значительно различаться по размеру. Как правило, длина зондов составляет по меньшей мере от 8 до 15 нуклеотидов. Другие зонды имеют длину, например, по меньшей мере 20, 30 или 40 нуклеотидов. Другие зонды несколько длиннее, например по меньшей мере 50, 60, 70, 80 или 90 нуклеотидов длиной. Зонды также могут быть любой конкретной длины, которая попадает в вышеуказанные диапазоны. Предпочтительно зонд не содержит последовательности, комплементарной последовательности(ям), используемой как праймер для целевой последовательности во время полимеразной цепной реакции.

"Олигонуклеотид" или "полинуклеотид" относится к одноцепочечному или двухцепочечному полимеру дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидов, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК или модифицированную РНК или ДНК.

"Модифицированный рибонуклеотид" или дезоксирибонуклеотид относится к молекулам, которые можно использовать вместо природных оснований в нуклеиновой кислоте и включает, но без ограничения, модифицированные пурины и пиримидины, минорные основания, конвертируемые нуклеозиды, структурные аналоги пуринов и пиримидинов, меченые, дериватизированные и модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды, конъюгированные нуклеозиды и нуклеотиды, модификаторы последовательности, модификаторы концов, модификаторы спейсеров и нуклеотиды с модификациями остова, включая, но без ограничения, модифицированные рибозой нуклеотиды, фосфорамидаты, фосфоротиоаты, фосфо-намидиты, метилфосфонаты, метилфосфорамидиты, метилфосфо-намидиты, 5'-β-цианоэтилфосфорамидиты, метилфосфонаты, фосфородитиоаты, пептидно-нуклеиновые кислоты, ахиральные и нейтральные межнуклеотидные связи.

"Вариант" относится к полинуклеотиду или полипептиду, который отличается от формы дикого типа или наиболее распространенной формы в популяции индивидуумов заменой, делецией или вставкой одного или нескольких нуклеотидов или аминокислот, соответственно. Количество замененных, удаленных или вставленных нуклеотидов или аминокислот может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более, например 25, 30, 35, 40, 45 или 50.

"Праймер" или "последовательность праймера" относится к олигонуклеотиду, который гибридизуется с целевой последовательностью нуклеиновой кислоты (например, матрицей ДНК для амплификации) для запуска реакции синтеза нуклеиновой кислоты. Праймер может представлять собой олигонуклеотид ДНК, олигонуклеотид РНК или химерную последовательность. Праймер может содержать природные, синтетические или модифицированные нуклеотиды. Как верхний, так и нижний пределы длины праймера определяют эмпирически. Нижний предел длины праймера представляет собой минимальную длину, которая требуется для образования стабильного дуплекса при гибридизации с целевой нуклеиновой кислотой в условиях реакции амплификации нуклеиновой кислоты. Очень короткие праймеры (обычно длиной менее 3-4 нуклеотидов) не образуют термодинамически стабильные дуплексы с целевой нуклеиновой кислотой в таких условиях гибридизации. Верхний предел часто определяется возможностью образования дуплекса в области, отличной от предварительно определенной последовательности нуклеиновой кислоты в целевой нуклеиновой кислоте. Обычно подходящие длины праймеров находятся в диапазоне от приблизительно 10 до приблизительно 40 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления, например, праймер может иметь длину 10-40, 15-30 или 10-20 нуклеотидов. Праймер способен играть роль точки инициации синтеза на полинуклеотидной последовательности при помещении в соответствующие условия.

"Детектирование", "детектируемый" и их грамматические эквиваленты относятся к способам определения наличия, и/или количества, и/или идентичности целевой последовательности нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления детектирование происходит при амплификации целевой последовательности нуклеиновой кислоты. В других вариантах осуществления секвенирование целевой нуклеиновой кислоты можно охарактеризовать как "детектирование" целевой нуклеиновой кислоты. Метка, прикрепленная к зонду, может включать любую из множества различных меток, известных в данной области техники, которые могут быть детектированы с помощью, например, химических или физических средств. Метки, которые могут быть прикреплены к зондам, могут включать, например, флуоресцентные и люминесцентные материалы.

"Амплифицирование", "амплификация" и их грамматические эквиваленты относятся к любому способу, посредством которого по меньшей мере часть целевой последовательности нуклеиновой кислоты воспроизводится зависимым от шаблона образом, включая, без ограничения, широкий спектр методов амплификации последовательностей нуклеиновой кислоты, или линейно, или экспоненциально. Типичные средства для выполнения этапа амплификации включают лигазную цепную реакцию (ЛЦР), реакцию лигазной детекции (РЛД), лигирование с последующей Q-репликационной амплификацией, ПЦР, удлинение праймера, амплификацию с замещением цепи (SDA), амплификацию с замещением сверхразветвленной цепи, амплификацию с множественным замещением цепи (MDA), амплификацию на основе последовательности нуклеиновых кислот (NASBA), двухстадийные мультиплексные амплификации, амплификацию по типу катящегося кольца (RCA), рекомбинационную полимеразную амплификацию (RPA) (TwistDx, Cambridg, Великобритания) и самоподдерживающуюся репликацию последовательностей (3SR), включая мультиплексные варианты или их комбинации, например, но без ограничения, OLA/ПЦР, ПЦР/OLA, РЛД/ПЦР, ПЦР/ПЦР/РЛД, ПЦР/РЛД, ЛЦР/ПЦР, ПЦР/ЛЦР (также известна как комбинированная цепная реакция - CCR), и т.п. Описания таких методов можно найти, помимо прочего, в Sambrook et al. *Molecular Cloning*, 3rd Edition).

"EGFR", или "рецептор эпидермального фактора роста", или "EGFR" относится к тирозинкиназному рецептору клеточной поверхности и кодируется одним из четырех альтернативных транскриптов с номерами доступа в GenBank NM_005228.3, NM_201282.1, NM_201283.1 и NM_201284.1. Варианты EGFR содержат вставку в 20 экзоне.

"HER2" или "ERBB2" является членом семейства EGFR/ErbB и имеет номер доступа в GenBank NM_004448.2. Варианты HER2 содержат вставку в 20 экзоне.

Как обычно используется в настоящем документе "фармацевтически приемлемый" относится к тем соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые, в рамках здравого медицинского суждения, подходят для применения в контакте с тканями, органами и/или телесными жидкостями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений в соответствии с разумным соотношением риск-польза.

"Фармацевтически приемлемые соли" означает соли соединений настоящего изобретения, которые фармацевтически приемлемы, как определено выше, и которые обладают желаемой фармакологической активностью. Неограничивающие примеры таких солей включают соли присоединения кислоты, образованные с неорганическими кислотами, такими соляная кислота, бромистоводородная кислота, серная кислота, азотная кислота и фосфорная кислота; или с органическими кислотами, такими как 1,2-этанedisульфоновая кислота, 2-гидроксиэтансульфоновая кислота, 2-нафталинсульфоновая кислота, 3-

фенилпропионовая кислота, 4,4'-метиленбис(3-гидрокси-2-ен-1-карбоновая кислота), 4-метилбисцикло[2.2.2]окт-2-ен-1-карбоновая кислота, уксусная кислота, алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, алифатические серные кислоты, ароматические серные кислоты, бензолсульфоновая кислота, бензойная кислота, камфорсульфоновая кислота, угольная кислота, коричная кислота, лимонная кислота, циклопентанпропионовая кислота, этансульфоновая кислота, фумаровая кислота, глюкогептоновая кислота, глюконовая кислота, глутаминовая кислота, гликолевая кислота, гептановая кислота, гексановая кислота, гидроксинафтоевая кислота, молочная кислота, лаурилсерная кислота, малеиновая кислота, яблочная кислота, малоновая кислота, миндальная кислота, метансульфоновая кислота, муконовая кислота, о-(4-гидроксibenzoил)бензойная кислота, щавелевая кислота, п-хлорбензолсульфоновая кислота, фенилзамещенные алкановые кислоты, пропионовая кислота, п-толуолсульфоновая кислота, пировиноградная кислота, салициловая кислота, стеариновая кислота, янтарная кислота, винная кислота, третичная бутилуксусная кислота и триметилуксусная кислота. Фармацевтически приемлемые соли также включают протоны присоединения оснований, которые могут образовываться, когда присутствующие кислотные протоны способны реагировать с неорганическими или органическими основаниями. Приемлемые неорганические основания включают гидроксид натрия, карбонат натрия, гидроксид калия, гидроксид алюминия и гидроксид кальция. Неограничивающие примеры приемлемых органических оснований включают этаноламин, диэтиламин, триэтиламин, триметамин и N-метилглюкамин. Следует понимать, что конкретный анион или катион, образующий часть любой соли настоящего изобретения, не является критически важным, если соль в целом является фармакологически приемлемой. Дополнительные примеры фармацевтически приемлемых солей и способы их получения и применения представлены в Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, and Use (P. H. Stahl & C.G. Wermuth eds., Verlag Helvetica Chimica Acta, 2002).

II. Мутации в 20 экзоне EGFR и HER2.

Некоторые варианты осуществления настоящего раскрытия касаются определения, есть ли у субъекта одна или несколько мутаций в 20 экзоне EGFR и/или HER2, таких как инсерционные мутации, в частности одна или несколько инсерционных мутаций, изображенных на фиг. 1. У субъекта может быть 2, 3, 4 или более мутаций в 20 экзоне EGFR и/или мутаций в 20 экзоне HER2. В данной области техники известны способы детектирования мутаций, в том числе ПЦР-анализ и секвенирование нуклеиновой кислоты, а также FISH и CGH. В некоторых аспектах мутации в 20 экзоне детектируют с помощью секвенирования ДНК, например, из опухоли или циркулирующей свободной ДНК из плазмы.

Мутация(и) в 20 экзоне EGFR может содержать одну или несколько точечных мутаций, вставок и/или делеций 3-18 нуклеотидов между аминокислотами 763-778. Одна или несколько мутаций в 20 экзоне EGFR могут находиться в одном или нескольких остатках, выбранных из группы, состоящей из A763, A767, S768, V769, D770, N771, P772 и H773.

Вставки в 20 экзоне EGFR могут включать H773_V774insH, A767_v769ASV, N771_P772insH, D770_N771insG, H779_V774insH, N771delinsHH, S768_D770dupDVD, A767_V769dupASV, A767_V769dupASV, P772_H773dup, N771_H773dupNPH, S768_D770dupSVD, N771delinsGY, S768_D770delinsSVD, D770_D770delinsGY, A767_V769dupASV и/или H773dup. В определенных аспектах мутации в 20 экзоне представляют собой A763insFQEA, A767insASV, S768dupSVD, V769insASV, D770insSVD, D770insNPG, H773insNPH, N771del insGY, N771del insFH и/или N771dupNPH.

В некоторых аспектах у субъекта может быть или возникнуть мутация в остатке C797 EGFR, которая может приводить к резистентности к ИТК, такому как позитиниб. Таким образом, в некоторых аспектах у субъекта определено отсутствие мутации в C797 EGFR.

Мутация в 20 экзоне HER2 может содержать одну или несколько точечных мутаций, вставок и/или делеций 3-18 нуклеотидов между аминокислотами 770-785. Одна или несколько мутаций в 20 экзоне HER2 могут находиться в остатке A775, G776, S779 и/или P780. Одна или несколько мутаций в 20 экзоне HER2 могут представлять собой A775insV G776C, A775insYVMA, G776V, G776C V777insV, G776C V777insC, G776del insVV, G776del insVC и/или P780insGSP.

Образец пациента может представлять собой любую ткань или жидкость тела, которые включают в себя нуклеиновые кислоты рака легкого у субъекта. В определенных вариантах осуществления образец будет представлять собой образец крови, содержащий циркулирующие опухолевые клетки или свободную от клеток ДНК. В других вариантах осуществления образец может представлять собой ткань, такую как ткань легкого. Ткань легкого может быть из опухолевой ткани и может быть свежесамозамороженной или фиксированной формалином, залитой парафином (FFPE). В определенных вариантах осуществления получают FFPE образец опухоли легкого.

Образцы, которые подходят для применения в способах, описанных в настоящем документе, содержат генетический материал, например геномную ДНК (гДНК). Геномную ДНК обычно экстрагируют из биологических образцов, таких как мазки крови или слизи слизистой оболочки рта, но ее можно экстрагировать и из других биологических образцов, включая мочу, опухоль или экспекторант. Сам образец обычно содержит ядродержащие клетки (например, клетки крови или щеки) или ткань, удаленную у субъекта, включая нормальную или опухолевую ткань. В данной области техники известны способы и реагенты для получения, обработки и анализа образцов. В некоторых вариантах осуществления образец

получают с помощью медицинского работника, например при отборе крови. В некоторых вариантах осуществления образец получают без помощи медицинского работника, например, когда образец получают неинвазивно, например образец, содержащий буккальные клетки, который получают с использованием щечного мазка или щетки, или образец ополаскивателя для полости рта.

В некоторых случаях биологический образец может быть обработан для выделения ДНК. Например, ДНК в образце клеток или тканей может быть отделена от других компонентов образца. Клетки могут быть собраны из биологического образца с использованием стандартных методов, известных в данной области техники. Например, клетки могут быть собраны путем центрифугирования образца клеток и ресуспендирования осажденных клеток. Клетки могут быть ресуспендированы в буферном растворе, таком как фосфатно-солевой буфер (ФСБ). После центрифугирования клеточной суспензии для получения клеточного осадка клетки можно лизировать, чтобы экстрагировать ДНК, например гДНК. См., например, Ausubel et al. (2003). Образец может быть сконцентрирован и/или очищен для выделения ДНК. Все образцы, полученные от субъекта, включая образцы, подвергнутые какой-либо дальнейшей обработке, считаются полученными от субъекта. Для выделения геномной ДНК из биологического образца можно использовать обычные способы, включая, например, экстракцию фенолом. Альтернативно, геномная ДНК может быть экстрагирована с помощью наборов, таких как QIAamp® Tissue Kit (Qiagen, Chatsworth, Calif.) и набор для очистки геномной ДНК Wizard® (Promega). Неограничивающие примеры источников образцов включают мочу, кровь и ткань.

Наличие или отсутствие мутаций в 20 экзоне EGFR или HER2, таких как инсерционная мутация в 20 экзоне, описанная в настоящем документе, можно определять с использованием способов, известных в данной области техники. Например, для детектирования наличия или отсутствия инсерционных мутаций можно использовать гель-электрофорез, капиллярный электрофорез, эксклюзионную хроматографию, секвенирование и/или чипы. Амплификация нуклеиновых кислот, где это желательно, может быть осуществлена с использованием способов, известных в данной области техники, например ПЦР. В одном примере образец (например, образец, содержащий геномную ДНК) получают у субъекта. Затем ДНК в образце исследуют, чтобы определить идентичность инсерционной мутации, описанной в настоящем документе. Инсерционная мутация может быть детектирована с помощью любого способа, описанного в настоящем документе, например с помощью секвенирования или с помощью гибридизации гена в геномной ДНК, РНК или кДНК с зондом нуклеиновой кислоты, например ДНК-зондом (что включает кДНК и олигонуклеотидные зонды) или РНК-зондом. Зонд нуклеиновой кислоты может быть сконструирован так, чтобы специфически или предпочтительно гибридизоваться с конкретным вариантом.

Набор зондов, как правило, относится к набору праймеров, обычно пар праймеров, и/или детектируемым образом меченым зондам, которые используются для детектирования целевых генетических вариаций (например, мутаций в 20 экзоне EGFR и/или HER2), используемых в практических рекомендациях по лечению настоящего раскрытия. Пары праймеров используются в реакции амплификации для определения ампликона, который охватывает область для целевой генетической вариации для каждого из вышеупомянутых генов. Набор ампликонов детектируют с помощью набора соответствующих зондов. В типичном варианте осуществления в способах настоящего изобретения можно использовать анализ TaqMan™ (Roche Molecular Systems, Pleasanton, Calif.), который используется для детектирования набора целевых генетических вариаций, таких как мутации в 20 экзоне EGFR и/или HER2. В одном варианте осуществления набор зондов представляет собой набор праймеров, используемых для генерации ампликонов, которые детектируют с помощью реакции секвенирования нуклеиновой кислоты, такой как реакция секвенирования следующего поколения. В этих вариантах осуществления можно использовать, например, технологию AmpliSEQ™ (Life Technologies/Ion Torrent, Carlsbad, Calif.) или TruSEQ™ (Illumina, San Diego, Calif.).

Анализ маркеров нуклеиновой кислоты может быть выполнен с использованием методов, известных в данной области техники, включая, без ограничения, анализ последовательности и электрофоретический анализ. Неограничивающие примеры анализа последовательности включают секвенирование Максама-Гилберта, секвенирование Сенгера, секвенирование ДНК на капиллярном блоке, секвенирование в тепловом цикле (Sears et al., 1992), твердофазное секвенирование (Zimmerman et al., 1992), секвенирование с помощью масс-спектрометрии, такой как времяпролетная масс-спектрометрия с лазерной ионизацией и десорбцией с использованием матрицы (MALDI-TOF/MS; Fu et al., 1998), и секвенирование гибридизацией (Chee et al., 1996; Drmanac et al., 1993; Drmanac et al., 1998). Неограничивающие примеры электрофоретического анализа включают блочный гель-электрофорез, такой как электрофорез в агарозном или полиакриламидном геле, капиллярный электрофорез и денатурирующий градиентный гель-электрофорез. Кроме того, могут быть выполнены способы секвенирования следующего поколения с использованием коммерчески доступных наборов и инструментов таких компаний, как Life Technologies/Ion Torrent PGM или Proton, Illumina HiSEQ или MiSEQ и система секвенирования следующего поколения Roche/454.

Другие методы анализа нуклеиновых кислот могут включать прямое ручное секвенирование (Church and Gilbert, 1988; Sanger et al., 1977; патент США № 5288644); автоматическое флуоресцентное

секвенирование; анализ одноцепочечного конформационного полиморфизма (SSCP) (Schafer et al., 1995); постоянно денатурирующий гель-электрофорез (CDGE); двумерный гель-электрофорез (2DGE или TDGE); конформационно-чувствительный гель-электрофорез (CSGE); денатурирующий градиентный гель-электрофорез (DGGE) (Sheffield et al., 1989); денатурирующую высокоэффективную жидкостную хроматографию (DHPLC, Underbill et al., 1997); масс-спектрометрию с инфракрасной лазерной ионизацией и десорбцией с использованием матрицы (IR-MALDI) (WO 99/57318); анализ изменения подвижности (Orita et al., 1989); рестрикционный анализ (Flavell et al., 1978; Geever et al., 1981); количественную ПЦР в реальном времени (Raca et al., 2004); гетеродуплексный анализ; химическое расщепление ошибочных нуклеотидов (СМС) (Cotton et al., 1985); анализ защиты от РНКазы (Myers et al., 1985); использование полипептидов, которые распознают ошибочные нуклеотиды, например белок mutS E.coli; аллель-специфическую ПЦР и комбинацию таких способов. См., например, патентную публикацию США № 2004/0014095, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте.

В одном примере способ идентификации мутации EGFR и/или HER2 в образце содержит приведение нуклеиновой кислоты из упомянутого образца в контакт с зондом нуклеиновой кислоты, который способен к специфической гибридизации с нуклеиновой кислотой, кодирующей мутантный белок EGFR или HER2 или его фрагмент, включающий в себя мутацию, и детектирование упомянутой гибридизации. В конкретном варианте осуществления упомянутый зонд помечен детектируемым образом, например радиоизотопом (^3H , ^{32}P или ^{33}P), флуоресцентным средством (родамином или флуоресционом) или хромогенным средством. В конкретном варианте осуществления зонд представляет собой антисмысловый олигомер, например ПНК, морфолинофосфорамидаты, ЗНК или 2'-алкоксиалкокси. Зонд может содержать от приблизительно 8 нуклеотидов до приблизительно 100 нуклеотидов, или от приблизительно 10 до приблизительно 75, или от приблизительно 15 до приблизительно 50, или от приблизительно 20 до приблизительно 30. В другом аспекте упомянутые зонды настоящего раскрытия предлагаются в наборе для идентификации мутаций EGFR или HER2 в образце, причем упомянутый набор содержит олигонуклеотид, который специфически гибридизуется с сайтом мутации в гене EGFR или HER2 или соседствует с ним. Набор может дополнительно содержать инструкции по лечению пациентов с опухолями, которые содержат инсерционные мутации EGFR или HER2, позитинибом или афатинибом на основании результата теста гибридизации, с использованием набора.

В другом аспекте способ детектирования мутаций в 20 экзоне в образце содержит амплификацию из упомянутого образца нуклеиновых кислот, соответствующих 20 экзону упомянутого гена EGFR или HER2 или его фрагмента, предположительно содержащего мутацию, и сравнение электрофоретической подвижности амплифицированной нуклеиновой кислоты с электрофоретической подвижностью соответствующего гена EGFR или HER2 дикого типа или его фрагмента. Разница в подвижности указывает на наличие мутации в амплифицированной последовательности нуклеиновой кислоты. Электрофоретическая подвижность может быть определена на полиакриламидном геле.

Альтернативно, нуклеиновые кислоты для детектирования мутаций можно анализировать с использованием Enzymatic Mutation Detection (EMD) (Del Tito et al., 1998). В EMD используется резольваза бактериофага T₄ эндонуклеаза VII, которая сканирует вдоль двухцепочечной ДНК до тех пор, пока не обнаружит и не расщепит места нарушений структуры, вызванные несовпадением пар оснований в результате точечных мутаций, вставок и делеций. Детектирование двух коротких фрагментов, образованных расщеплением резольвазой, например с помощью гель-электрофореза, указывает на наличие мутации. Преимуществами метода EMD являются единый протокол для определения точечных мутаций, делеций и вставок, анализируемых непосредственно по реакциям ПЦР, что устраняет необходимость в очистке образца, сокращает время гибридизации и увеличивает отношение сигнал/шум. Можно анализировать смешанные образцы, содержащие вплоть до 20-кратного избытка нормальной ДНК и фрагменты размером вплоть до 4 т.п.о. Однако сканирование EMD не идентифицирует конкретные изменения оснований, которые происходят в положительных по мутации образцах, что вынуждает совершать дополнительные процедуры секвенирования для идентификации мутации, если это необходимо. Аналогично резольвазе T₄ эндонуклеаза VII можно использовать фермент CEL I, как показано в патенте США № 5869245.

III. Способы лечения

Далее в настоящем документе предлагаются способы лечения или задержки прогрессирования рака у индивидуума, содержащие введение индивидууму эффективного количества позитиниба, афатиниба или структурно схожего ингибитора, субъекту, у которого определено наличие мутаций в 20 экзоне EGFR и/или HER2, таких как вставка в 20 экзоне. У субъекта может быть больше одной мутации в 20 экзоне EGFR и/или HER.

Примеры раковых заболеваний, рассматриваемых для лечения, включают рак легкого, рак головы и шеи, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак почки, рак кости, рак яичек, рак шейки матки, рак желудочно-кишечного тракта, лимфомы, пренеопластические поражения в легком, рак толстой кишки, меланому и рак мочевого пузыря. В определенных аспектах рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого.

В некоторых вариантах осуществления субъектом является млекопитающее, например примат, предпочтительно высший примат, например человек (например, пациент, имеющий нарушение или риск

нарушения, описанного в настоящем документе). В одном варианте осуществления субъект нуждается в усилении иммунного ответа. В определенных вариантах осуществления субъект имеет ослабленный иммунитет или риск ослабления иммунитета. Например, субъект проходит или прошел курс химиотерапевтического лечения и/или лучевой терапии. Альтернативно или в комбинации, субъект имеет ослабленный иммунитет или риск ослабления иммунитета в результате инфекции.

Некоторые варианты осуществления относятся к введению poziотиниба (также известного как HM781-36B, HM781-36 и 1-[4-[4-(3,4-дихлор-2-фторанилино)-7-метоксиназолин-6-ил]оксипиперидин-1-ил]проп-2-ен-1-он) субъекту, у которого определено наличие мутации в 20 экзоне EGFR или HER2, такой как вставка в 20 экзоне. Позитиниб является ингибитором рап-HER на основе хиназолина, который необратимо блокирует передачу сигналов через семейство HER тирозинкиназных рецепторов, включая HER1, HER2 и HER4. Позитиниб или структурно схожие соединения (например, патент США № 8188102 и патентная публикация США № 20130071452; включенные в настоящий документ посредством ссылки) можно использовать в способах настоящего изобретения.

В. Фармацевтические композиции

Также в настоящем документе предлагаются фармацевтические композиции и составы, содержащие poziотиниб или афатиниб и фармацевтически приемлемый носитель, для субъектов, у которых определено наличие мутации в 20 экзоне EGFR или HER2, такой как вставка в 20 экзоне.

Фармацевтические композиции и составы, описанные в настоящем документе, могут быть получены путем смешивания активных ингредиентов (таких как антитело или полипептид) с желательной степенью чистоты с одним или несколькими необязательными фармацевтически приемлемыми носителями (Remington's Pharmaceutical Sciences, 22nd edition, 2012) в форме лиофилизированных составов или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители, как правило, нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях, и включают, но без ограничения: буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие средства, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ). Типичные фармацевтически приемлемые носители в настоящем документе дополнительно включают средства для диспергирования лекарственных средств в интерстициальном пространстве, такие как растворимые нейтрально-активные гликопротеины гиалуронидазы (sHASEGP), например человеческие растворимые гликопротеины гиалуронидазы PH-20, такие как rHuPH20 (HYLENEX® , Baxter International, Inc.). Некоторые типичные sHASEGP, включая rHuPH20, и способы их применения описаны в патентных публикациях США №№ 2005/0260186 и 2006/0104968. В одном аспекте sHASEGP комбинируют с одной или несколькими дополнительными гликозаминогликанами, такими как хондроитиназы.

С. Комбинированная терапия

В некоторых вариантах осуществления композиции и способы вариантов осуществления настоящего изобретения включают в себя poziотиниб или афатиниб в комбинации с по меньшей мере одной дополнительной терапией. Дополнительная терапия может представлять собой лучевую терапию, хирургическое вмешательство (например, люмпэктомию и мастэктомию), химиотерапию, генную терапию, ДНК-терапию, вирусную терапию, РНК-терапию, иммунотерапию, трансплантацию костного мозга, нанотерапию, терапию моноклональными антителами или комбинацию вышеуказанного. Дополнительная терапия может иметь форму адьювантной или неоадьювантной терапии.

В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой введение низкомолекулярного ферментативного ингибитора или антиметастатического средства. В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой введение ограничивающих побочные эффекты средств (например, средств, предназначенных для уменьшения возникновения и/или тяжести побочных эффектов лечения, таких как средства против тошноты и т.д.). В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой лучевую терапию. В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой хирургическое вмешательство. В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой комбинацию лучевой терапии и хирургического вмешательства. В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой гамма-облучение. В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой терапию, нацеленную на путь РВК/АКТ/mTOR, ингибитор HSP90, ингибитор тубулина, ингибитор апоптоза и/или химиопрофилактическое средство. Дополнительная терапия может представлять собой одно или несколько химиотерапевтических средств, известных в данной области техники.

Позиотиниб или афатиниб можно вводить до, во время, после или в различных комбинациях относительно дополнительной терапии рака, такой как терапия иммунных контрольных точек. Введение может осуществляться с интервалами от одновременного введения до нескольких минут, дней или недель. В вариантах осуществления, в которых позиотиниб или афатиниб предлагают пациенту отдельно от дополнительного терапевтического средства, обычно можно гарантировать, что между моментами каждой доставки не пройдет значительный период времени, так что два соединения будут все еще способны оказывать благоприятный комбинированный эффект на пациента. В таких случаях предполагается, что терапия антителами и противораковая терапия могут предлагаться пациенту в течение приблизительно 12-24 или 72 ч друг от друга и, более конкретно, в течение приблизительно 6-12 ч друг от друга. В некоторых ситуациях может быть желательным значительно увеличить период лечения, когда между соответствующими введениями проходит от нескольких дней (2, 3, 4, 5, 6 или 7) до нескольких недель (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8).

Можно использовать различные комбинации. В примере ниже позиотиниб или афатиниб представляют собой "А", а противораковая терапия представляет собой "В":

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

Введение любого соединения или терапии вариантов осуществления настоящего изобретения пациенту будет следовать общим протоколам для введения таких соединений, с учетом токсичности средств, если она имеет место. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления существует этап мониторинга токсичности, который относится к комбинированной терапии.

1. Химиотерапия

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения можно использовать широкий спектр химиотерапевтических средств. Термин "химиотерапия" относится к применению лекарственных средств для лечения рака.

"Химиотерапевтическое средство" используется для обозначения соединения или композиции, которые вводят при лечении рака. Эти средства или лекарственные средства классифицируют по способу их активности в клетке, например, влияют ли они на клеточный цикл и на какой стадии. Альтернативно, средство может быть охарактеризовано на основании его способности непосредственно сшивать ДНК, интеркалировать в ДНК или индуцировать хромосомные и митотические aberrации, влияя на синтез нуклеиновой кислоты.

Примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклосфосамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтре-тамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентифосфорамид и триметилломеламин; ацетогенины (особенно булатацин и булатацинон); камптотетин (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; СС-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); криптофицины (особенно криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и СВ1-ТМ1); элеутеробин; панкратистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, оксида мехлорэтамину гидрохлорид, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид и урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как энединовые антибиотики (например, калихеамицин, особенно калихеамицин гамма 11 и калихеамицин омега 11); динемидин, включая динемидин А; бисфосфонаты, такие как клодронат; эсперамицин; а также неокарциностабиновый хромофор и родственные хромофоры хромопротеиновых энединовых антибиотиков, алкациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (включая морфолинодоксорубицин, цианоморфолинодоксорубицин, 2-пирролидинодоксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марселломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофенольную кислоту, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфирамицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин и зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, птероптерин и триметрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн и тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин и флоксуридин; андрогены, такие как калу-стерон, дромостанолонпропионат, эпителиостанол, мепитиостан и тестостерон; антиадреналовые средства, такие как митотан и трилостан; пополнитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамидный гликозид; аминолевулиновую кислоту; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрон; эдатраксат; дефофамин; демеколлин; диазиквон; элфорнитин; ацетат эллиптиния; эпотиолон; этоглоцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидамин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитразрин; пентостатин; фенамет; пира-

рубицин; лозоксантрон; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK; разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (особенно токсин Т-2, верракурин А, риридин А и ангуидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ага-С"); циклофосфамид; таксоиды, например паклитаксел и доцетаксел, гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; координационные комплексы платины, такие как цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин; винбластин; платину; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; винорелбин; новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; кселоду; ибандронат; иринотекан (например, СРТ-11); ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин; карбоплатин, прокарбазин, пликомицин, гемцитабин, навельбин, ингибиторы фарнезилпротеинтрансферазы, трансплатин и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные всего вышеперечисленного.

2. Лучевая терапия

Другие факторы, которые вызывают повреждение ДНК и широко используются, включают так называемые γ -лучи, рентгеновские лучи и/или направленную доставку радиоизотопов в опухолевые клетки. Также рассматриваются другие формы повреждающих ДНК факторов, такие как микроволны, облучение протонным пучком (патенты США 5760395 и 4870287) и УФ-облучение. Наиболее вероятно, все эти факторы вызывают широкий спектр повреждений в ДНК, в предшественниках ДНК, в репликации и репарации ДНК и в сборке и сохранности хромосом. Диапазон доз для рентгеновских лучей варьируется от суточных доз 50-200 рентген в течение продолжительных периодов времени (3-4 недели) до разовых доз 2000-6000 рентген. Диапазоны доз для радиоизотопов варьируются в широких пределах и зависят от периода полураспада изотопа, силы и типа испускаемого излучения и захвата неопластическими клетками.

3. Иммунотерапия

Специалисту будет понятно, что можно использовать дополнительную иммунотерапию в комбинации или в сочетании со способами вариантов осуществления. В контексте лечения рака иммунотерапевтические препараты обычно основаны на использовании иммунных эффекторных клеток и молекул для воздействия на раковые клетки и их уничтожения. Таким примером является ритуксимаб (RITUXAN®). Иммунный эффектор может представлять собой, например, антитело, специфичное к какому-либо маркеру на поверхности опухолевой клетки. Единичное антитело может служить эффектором терапии или может привлекать другие клетки для фактического вызывания гибели клеток. Антитело также может быть конъюгировано с лекарственным средством или токсином (химиотерапевтическим средством, радионуклидом, цепью рицина А, токсином холеры, токсином коклюша и т.д.) и служить в качестве таргетирующего средства. Альтернативно, эффектор может представлять собой лимфоцит, несущий поверхностную молекулу, которая прямо или косвенно взаимодействует с целевой опухолевой клеткой. Различные эффекторные клетки включают цитотоксические Т-клетки и НК-клетки.

Появление конъюгатов антитело-лекарственное средство оказалось революционным подходом к разработке терапевтических средств от рака. Рак является одной из основных причин смертности в мире. Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) содержат моноклональное антитело (Mab), которые ковалентно связаны с лекарственными средствами, уничтожающими клетки. Этот подход сочетает в себе высокую специфичность MAb по отношению к их антигенным мишеням с высокоэффективными цитотоксическими лекарственными средствами, в результате чего получают "вооруженные" Mab, которые доставляют полезную нагрузку (лекарственное средство) в опухолевые клетки с повышенным уровнем антигена. Целевая доставка лекарственного средства также сводит к минимуму его воздействие на нормальные ткани, что приводит к снижению токсичности и улучшению терапевтического индекса. Одобрение FDA двух лекарственных средств-ADC, ADCETRIS® (брентуксимаб ведотин) в 2011 г. и KADCYLA® (трастузумаб эмтанзин или T-DM1) в 2013 г. утвердило этот подход. В настоящее время более 30 кандидатов в лекарственные средства-ADC находятся на различных этапах клинических испытаний лечения рака (Leal et al., 2014). По мере того, как разработка антител и оптимизация линкера-полезной нагрузки становятся все более совершенными, обнаружение и разработка новых ADC все больше зависят от выявления и проверки новых мишеней, подходящих для этого подхода, и создания таргетирующих MAb. Двумя критериями для мишеней являются повышенная регуляция/высокий уровень экспрессии в опухолевых клетках и надежная интернализация.

В одном аспекте иммунотерапии опухолевая клетка должна нести некоторый маркер, который поддается таргетированию, т.е. не присутствует на большинстве других клеток. Существует множество опухолевых маркеров, и любой из них может быть подходящим для таргетирования в контексте вариантов осуществления настоящего изобретения. Обычные опухолевые маркеры включают CD20, карциноэмбриональный антиген, тирозиназу (p97), gp68, TAG-72, HMFG, сиалированный Льюис-антиген, MucA, MucB, PLAP, рецептор ламинина, erb B и p155. Альтернативным аспектом иммунотерапии является сочетание противоопухолевых эффектов с иммуностимулирующими эффектами. Также существуют иммуностимулирующие молекулы, включая: цитокины, такие как IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, гамма-IFN, хемокины, такие как MIP-1, MCP-1, IL-8, и факторы роста, такие как лиганд FLT3.

Примеры иммунотерапии включают иммунные адъюванты, например *Mycobacterium bovis*, *Plasmodium falciparum*, динитрохлорбензол и ароматические соединения (патенты США 5801005 и 5739169; Hui and Hashimoto, 1998; Christodoulides et al., 1998); терапию цитокинами, например интерферонами α , β и γ , IL-1, GM-CSF и TNF (Bukowski et al., 1998; Davidson et al., 1998; Hellstrand et al., 1998); генную терапию, например TNF, IL-1, IL-2 и p53 (Qin et al., 1998; Austin-Ward and Villasaca, 1998; патенты США 5830880 и 5846945); и моноклональные антитела, например анти-CD20, антиганглиозид GM2 и анти-p185 (Hollander, 2012; Hanibuchi et al., 1998; патент США 5824311). Предполагается, что одну или несколько противораковых терапий можно применять с терапиями антителами, описанными в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления иммунотерапия может представлять собой ингибитор иммунных контрольных точек. Иммунные контрольные точки или увеличивают сигнал (например, коstimулирующие молекулы), или снижают сигнал. Ингибирующие иммунные контрольные точки, на которые может быть нацелена блокада иммунной контрольной точки, включают рецептор аденозина A2A (A2AR), B7-H3 (также известный как CD276), B и T-лимфоцитарный аттенюатор (BTLA), связанный с T-лимфоцитами цитотоксический белок 4 (CTLA-4, также известный как CD152), индоламин-2,3-диоксигеназу (IDO), иммуноглобулин клеток-киллеров (KIR), ген 3 активации лимфоцитов (LAG3), молекулу запрограммированной смерти 1 (PD-1), домен T-клеточного иммуноглобулина и домен муцина-3 (TM-3) и содержащий V-домен Ig супрессор активации T-клеток (VISTA). В частности, ингибиторы иммунных контрольных точек воздействуют на ось PD-1 и/или CTLA-4.

Ингибиторы иммунных контрольных точек могут представлять собой лекарственные средства, такие как малые молекулы, рекомбинантные формы лиганда или рецепторов или, в частности, представляют собой антитела, такие как человеческие антитела (например, международная патентная публикация WO 2015016718; Pardoll, *Nat Rev Cancer*, 12(4):252-64, 2012; оба документа включены в настоящий документ посредством ссылки). Могут быть использованы известные ингибиторы белков иммунной контрольной точки или их аналоги, в частности могут быть использованы химеризованные, гуманизированные или человеческие формы антител. Как известно специалисту, для определенных антител, упомянутых в настоящем раскрытии, можно использовать альтернативные и/или эквивалентные названия. Такие альтернативные и/или эквивалентные названия являются взаимозаменяемыми в контексте настоящего изобретения. Например, известно, что ламбролизумаб также известен под альтернативными и эквивалентными названиями MK-3475 и пембролизумаб.

В некоторых вариантах осуществления антагонист связывания PD-1 представляет собой молекулу, которая ингибирует связывание PD-1 со своими партнерами по связыванию лиганда. В конкретном аспекте PD-1 партнерами по связыванию лиганда являются PDL1 и/или PDL2. В другом варианте осуществления антагонист связывания PDL1 представляет собой молекулу, которая ингибирует связывание PDL1 со своими партнерами по связыванию. В конкретном аспекте партнерами по связыванию PDL1 являются PD-1 и/или B7-1. В другом варианте осуществления антагонист связывания PDL2 представляет собой молекулу, которая ингибирует связывание PDL2 со своими партнерами по связыванию. В конкретном аспекте партнером по связыванию PDL2 является PD-1. Антагонист может представлять собой антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, иммуноадгезин, слитый белок или олигопептид. Типичные антитела описаны в патентах США №№ 8735553, 8354509 и 8008449, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. Другие антагонисты оси PD-1 для применения в способах, предлагаемых в настоящем документе, известны в данной области техники, например описаны в патентных публикациях США №№ US 20140294898, US 2014022021 и US 20110008369, которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления антагонист связывания PD-1 представляет собой анти-PD-1 антитело (например, человеческое антитело, гуманизированное антитело или химерное антитело). В некоторых вариантах осуществления анти-PD-1 антитело выбирают из группы, состоящей из ниволумаба, пембролизумаба и CT-011. В некоторых вариантах осуществления антагонист связывания PD-1 представляет собой иммуноадгезин (например, иммуноадгезин, содержащий внеклеточную или PD-1-связывающую часть PDL1 или PDL2), слитую с константной областью (например, Fc-областью последовательности иммуноглобулина). В некоторых вариантах осуществления антагонистом связывания PD-1 является AMP-224. Ниволумаб, также известный как MDX-1106-04, MDX-1106, ONO-4538, BMS-936558 и OPDIVO® , представляет собой анти-PD-1 антитело, описанное в WO 2006/121168. Пембролизумаб, также известный как MK-3475, Merck 3475, ламбролизумаб, KEYTRUDA® и SCH-900475, представляет собой анти-PD-1 антитело, описанное в WO 2009/114335. CT-011, также известный как hBAT или hBAT-1, представляет собой анти-PD-1 антитело, описанное в WO 2009/101611. AMP-224, также известный как B7-DCIg, представляет собой слитый растворимый рецептор PDL2-FC, описанный в WO 2010/027827 и WO 2011/066342.

Другой иммунной контрольной точкой для таргетирования в способах, предлагаемых в настоящем документе, является связанный с T-лимфоцитами цитотоксический белок 4 (CTLA-4), также известный как CD152. Полная последовательность кДНК человеческого CTLA-4 имеет номер доступа в Genbank L15006. CTLA-4 обнаруживается на поверхности T-клеток и действует как выключатель при связывании

с CD80 или CD86 на поверхности антигенпрезентирующих клеток. CTLA4 является членом суперсемейства иммуноглобулинов, который экспрессируется на поверхности хелперных Т-клеток и передает ингибирующий сигнал Т-клеткам. CTLA4 похож на костимулирующий белок Т-клеток, CD28, и обе молекулы связываются с CD80 и CD86, также называемыми В7-1 и В7-2, соответственно, на антигенпрезентирующих клетках. CTLA4 передает ингибирующий сигнал Т-клеткам, тогда как CD28 передает стимулирующий сигнал. Внутриклеточный CTLA4 также обнаружен в регуляторных Т-клетках и может быть важен для их функции. Активация Т-клеток через Т-клеточный рецептор и CD28 приводит к повышенной экспрессии CTLA-4, ингибирующего рецептора для молекул В7.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунной контрольной точки является анти-CTLA-4 антителом (например, человеческим антителом, гуманизированным антителом или химерным антителом), его антигенсвязывающим фрагментом, иммуноадгезином, белком слияния или олигопептидом.

Антитела к человеческому CTLA-4 (или происходящим от него доменам VH и/или VL), подходящие для применения в способах настоящего изобретения, могут быть получены с использованием способов, хорошо известных в данной области техники. Альтернативно, могут быть использованы анти-CTLA-4 антитела, известные в данной области техники. Например, в способах раскрытых в настоящем документе, можно использовать анти-CTLA-4 антитела, раскрытые в: патенте США № 8119129; международных патентных публикациях №№ WO 01/14424, WO 98/42752 и WO 00/37504 (CP675206, также известный как тремелимуаб; ранее тицилимуаб); патенте США № 6207156; Hurwitz et al., 1998; Camacho et al., 2004; и Mokyr et al., 1998. Идеи каждой из вышеупомянутых публикаций настоящим включены посредством ссылки. Также можно использовать антитела, которые конкурируют с любым из этих известных в данной области техники антител за связывание с CTLA-4. Например, гуманизированное антитело к CTLA-4 описано в международных патентных заявках №№ WO 2001014424 и WO 2000037504 и патенте США № 8017114; которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

Типичным анти-CTLA-4-антителом является ипилимумаб (также известный как 10D1, MDX-010, MDX-101 и Yervoy®) или его антигенсвязывающие фрагменты и варианты (см., например, WO 01/14424). В других вариантах осуществления антитело содержит CDR тяжелой и легкой цепи или VR ипилимумаба. Соответственно, в одном варианте осуществления антитело содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 области VH ипилимумаба и домены CDR1, CDR2 и CDR3 области VL ипилимумаба. В другом варианте осуществления антитело конкурирует за связывание и/или связывается с тем же эпитопом на CTLA-4, что и вышеупомянутые антитела. В другом варианте осуществления антитело имеет идентичность аминокислотной последовательности вариабельной области с вышеупомянутыми антителами по меньшей мере приблизительно 90% (например, идентичность вариабельной области с ипилимумабом по меньшей мере приблизительно 90%, 95% или 99%).

Другие молекулы для модуляции CTLA-4 включают лиганды и рецепторы CTLA-4, например описанные в патентах США №№ 5844905, 5885796 и в международных патентных заявках №№ WO 1995001994 и WO 1998042752; которые включены в настоящий документ посредством ссылки, и иммуноадгезины, например описанные в патенте США № 8329867, который включен в настоящий документ посредством ссылки.

4. Хирургическое вмешательство

Приблизительно 60% больных раком будут подвергаться хирургическому вмешательству определенного типа, включая профилактическое, диагностическое или этапное, лечебное и паллиативное хирургическое вмешательство. Лечебное хирургическое вмешательство включает резекцию, при которой всю или часть раковой ткани физически удаляют, иссекают и/или разрушают и может быть использовано в сочетании с другими терапиями, такими как лечение в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, химиотерапия, лучевая терапия, гормональная терапия, генная терапия, иммунотерапия и/или альтернативные терапии. Резекция опухоли относится к физическому удалению по меньшей мере части опухоли. Помимо резекции опухоли к лечению с помощью хирургического вмешательства относятся лазерная хирургия, криохирургия, электрохирургия и микроскопически контролируемая хирургия (хирургия Мохса).

При удалении части или всех раковых клеток, тканей или опухоли в теле может образовываться полость. Лечение может быть осуществлено с помощью перфузии, прямой инъекции или местного нанесения на участок дополнительной противораковой терапии. Такое лечение может быть повторено, например, каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней, или каждые 1, 2, 3, 4 и 5 недель, или каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев. Это лечение может также быть проведено с варьированием дозировки.

5. Другие средства

Предполагается, что для улучшения терапевтической эффективности лечения можно использовать другие средства в комбинации с некоторыми аспектами вариантов осуществления настоящего изобретения. Эти дополнительные средства включают средства, которые влияют на повышающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности и щелевые соединения, цитостатические и дифференцирующие средства, ингибиторы клеточной адгезии, средства, которые повышают чувствительность гиперпролиферативных клеток к индукторам апоптоза, или другие биологические средства. Увеличение межклеточной

передачи сигналов за счет увеличения числа щелевых соединений увеличит антигиперпролиферативное воздействие на популяцию ближайших гиперпролиферативных клеток. В других вариантах осуществления для улучшения антигиперпролиферативной эффективности лечения можно использовать цитостатические или дифференцирующие средства в комбинации с некоторыми аспектами вариантов осуществления настоящего изобретения. Предполагается, что ингибиторы клеточной адгезии улучшают эффективность вариантов осуществления настоящего изобретения. Примерами ингибиторов клеточной адгезии являются ингибиторы киназы фокальной адгезии (ФАК) и ловастатин. Кроме того, предполагается, что для улучшения эффективности лечения можно использовать другие средства, которые повышают чувствительность гиперпролиферативной клетки к апоптозу, такие как антитело с225, в комбинации с некоторыми аспектами вариантов осуществления настоящего изобретения.

IV. Набор

Также в объем настоящего раскрытия попадают наборы для детектирования мутаций в 20 экзоне EGFR и/или HER2, таких как раскрытые в настоящем документе. Пример такого набора может включать в себя набор специфичного к мутации в 20 экзоне праймера. Набор может дополнительно содержать инструкции по применению праймеров для детектирования наличия или отсутствия конкретных мутаций в 20 экзоне EGFR и/или HER2, описанных в настоящем документе. Набор может дополнительно содержать инструкции для диагностических целей, указывающие, что положительная идентификация мутаций в 20 экзоне EGFR и/или HER2, описанных в настоящем документе, в образце пациента с раком указывает на чувствительность к ингибитору тирозинкиназы позитинибу или афатинибу или структурно схожему ингибитору. Набор может дополнительно содержать инструкции, которые указывают, что положительная идентификация мутаций в 20 экзоне EGFR и/или HER2, описанных в настоящем документе, в образце пациента с раком указывает на то, что пациента следует лечить позитинибом, афатинибом или структурно схожим ингибитором.

V. Примеры

Следующие примеры включены для демонстрации предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что методы, раскрытые в следующих примерах, представляют методы, которые, как обнаружено автором настоящего изобретения, хорошо работают при практическом использовании настоящего изобретения и поэтому могут рассматриваться как составляющие предпочтительные способы его применения. Однако специалистам в данной области техники в свете настоящего раскрытия должно быть понятно, что в конкретных раскрытых вариантах осуществления можно сделать множество изменений и все же получить аналогичный или схожий результат без отклонения от сущности и объема настоящего изобретения.

Пример 1. Идентификация лекарственных средств для раковых клеток с помощью вставок в 20 экзоне EGFR или HER

Были исследованы клинические ответы на ИТК у пациентов с опухолями, несущими вставки в 20 экзоне EGFR, в клинической базе данных; и среди 280 пациентов с мутантным по EGFR НМРЛ было идентифицировано 129 пациентов с классическими мутациями EGFR (делеция в 19 экзоне, L858R и L861Q) и 9 пациентов с вставками в 20 экзоне EGFR, которых лечили с помощью одного средства, эрлотиниба, gefитиниба или афатиниба. Пациенты с НМРЛ с классическими мутациями EGFR имели медианную PFS 14 месяцев, тогда как пациенты с вставками в 20 экзоне EGFR имели медианную PFS только 2 месяца ($p < 0,0001$, логарифмический ранговый критерий; фиг. 1A). Из 9 пациентов со вставкой в 20 экзоне EGFR 00 наблюдали только у 1 пациента, несущего мутацию S768del-insIL, который получал афатиниб (фиг. 4A). Эти клинические данные демонстрируют ограниченную активность доступных ИТК EGFR при НМРЛ, вызванном вставкой в 20 экзоне EGFR, и подтверждают, что для этих специфических опухолей необходимы альтернативные стратегии лечения.

В качестве начальной стадии скрининга лекарственного средства в клетках Ва/Ф3 были экспрессированы 7 мутаций EGFR и 11 мутаций HER2. Местоположения мутаций в 20 экзоне EGFR и HER2 приведены на фиг. 1B. Для оценки того, какие мутации в 20 экзоне EGFR и HER2 являются активирующими, линии клеток Ва/Ф3 подвергали скринингу на не зависящую от ИЛ-3 выживаемость. Было обнаружено, что все протестированные вставки в 20 экзоне EGFR оказались активирующими мутациями (фиг. 4B), 6 мутаций в 20 экзоне HER2 и L755P, расположенная в 19 экзоне, оказались активирующими мутациями (фиг. 4C). Затем протестировали чувствительность вставок в 20 экзоне к ИТК EGFR и HER2, которые прошли клиническую оценку, включая обратимые (первого поколения), необратимые (второго поколения) и необратимые мутант-специфичные (третьего поколения) ИТК, и затем сравнили чувствительность для EGFR с L858R, классической сенсibiliзирующей мутации. За исключением EGFR с A763insFQEA, вставки в 20 экзоне EGFR ($n=6$) оказались резистентны к ИТК EGFR первого (фиг. 1C, $IC_{50} = 3,3 \geq 10$ мкМ), второго (фиг. 1d, $IC_{50} = 40-135$ нМ) и третьего (фиг. 1e, $IC_{50} = 03-850$ нМ) поколений (фиг. 5, табл. 1). Кроме того, мутанты по 20 экзону HER2 ($n=6$) оказались резистентны к ИТК первого (фиг. 1F, $IC_{50} = 1/2-13$ мкМ) и третьего (фиг. 1H, $IC_{50} = 114-505$ нМ) поколений. ИТК второго поколения имели некоторую активность в отношении линий клеток Ва/Ф3, мутантных по 20 экзону HER2 (фиг. 1G, $IC_{50} = 10-12$ нМ, фиг. 6, табл. 1). В соответствии со скринингом лекарственного средства, за исключением EGFR с A763insFQEA, ко-

торый показал частичное ингибирование при более низких дозах, вестерн-блоттинг продемонстрировал, что эрлотиниб и осимертиниб не ингибируют значительно p-EGFR2 при инсерционных мутациях в 20 экзоне EGFR, а лишь значительно ингибируют p-HER2 при инсерционных мутациях в 20 экзоне HER2 при 50 0 нМ (фиг. 7A-D).

Таблица 1. Значения IC₅₀ при вставках в 20 экзоне EGFR и HER2 для ИТК EGFR/HER2

		Среднее по вставкам в 20 экзоне EGFR (N=6 линий клеток)	Среднее по вставкам в 20 экзоне HER2 (N=6 линий клеток)
ИТК 1-го пок-я	Эрлотиниб	3310 нМ	3250 нМ
	Гефитиниб	>10000 нМ	12900 нМ
	Лепатиниб	-	1190 нМ
	L858R+эрлотиниб	17,0 нМ	
ИТК 2-го пок-я	Афатиниб	39,9 нМ	11,7 нМ
	Дакомитиниб	61,1 нМ	12,4 нМ
	Нератиниб	135 нМ	10,4 нМ
	L858R+афатиниб	0,876 нМ	
ИТК 3-го пок-я	Осимертиниб	103 нМ	444 нМ
	Роцилетиниб	850 нМ	505 нМ
	Ибрутиниб	143 нМ	114 нМ
	Олумтиниб	204 нМ	352 нМ
	Назартиниб	198 нМ	233 нМ
	L858R/T790M+осимертиниб	9,00 нМ	

Для того, чтобы выяснить, почему вставки в 20 экзоне резистентны к ИТК EGFR первого и третьего поколения, было выполнено 3D-моделирование определенных кристаллических структур EGFR с D770insNPG, EGFR с T790M и EGFR WT для визуализации изменений в связывающем лекарственное средство кармане. Моделирование показало, что вставки в 20 экзоне EGFR схожи с мутациями T790M по выравниванию остатка-привратника T790, что приводит к повышению аффинности к АТФ и уменьшению связывания ингибиторов первого поколения, что делает эти мутации резистентными к нековалентным ингибиторам. Кроме того, вставки в 20 экзоне HER2 индуцируют конститутивно активную конформацию, предотвращая связывание нековалентного ингибитора HER2 лепатиниба, который связывается с HER2 в неактивной конформации. Кроме того, вставки в 20 экзоне EGFR и HER2 оказывают существенное влияние на связывающий лекарственное средство карман. Моделирование *in silico* вставок в 20 экзоне EGFR (фиг. 1I) и HER2 (фиг. 1J) показало значительный сдвиг α -с-спирали в связывающий лекарственное средство карман (стрелка) из-за вставок в С-концевой области α -с-спирали (фиг. 1J), смещающих гребневидное местоположение α -с-спирали во внутреннее активированное положение. Кроме того, 3D-моделирование продемонстрировало значительный сдвиг Р-петли в связывающий лекарственное средство карман (фиг. 1I, 1J) обоих рецепторов. Вместе эти сдвиги приводят к стерическому затруднению связывающего лекарственного средства кармана с двух направлений в мутантных по 20 экзону как EGFR, так и HER2 белках. В соответствии с вышеупомянутым тестированием *in vitro* 3D-моделирование подтверждает наблюдение, что афатиниб ингибирует вставки в 20 экзоне более эффективно, чем осимертиниб. Осимертиниб имеет большую концевую 1-метилиндольную группу, соединенную непосредственно с жестким пиримидиновым ядром. Эта большая негибкая группа снижает способность осимертиниба достигать остатка С797 так же эффективно, как афатиниб, во вставках в 20 экзоне EGFR (фиг. 1I). Альтернативно, афатиниб имеет меньшую концевую 1-хлор-2-фторобензольную кольцевую группу, опосредованно связанную с хиनाзолиновым ядром через вторичную аминогруппу, что позволяет афатинибу помещаться в стерическое затрудненный связывающий карман. Кроме того, стерическое затруднение предотвращает связывание осимертиниба с HER2 с A775insYVMA. Взятые вместе, эти данные *in vitro* и моделирование *in silico* показывают, что небольшие гибкие производные хиназолина могут быть способны к воздействию на вставки в 20 экзоне EGFR/HER2.

Затем была предпринята попытка идентифицировать ИТК с повышенной активностью в отношении вставок в 20 экзоне. Позитиниб, как и афатиниб, также содержит небольшую концевую группу и гибкое хиназолиновое ядро. Однако позитиниб содержит меньшие группы заместителей, связывающие акцепторную группу Михаэля с хиназолиновым ядром, по сравнению с афатинибом и имеет повышенную галогенизацию концевой бензольного кольца по сравнению с афатинибом. Этот богатый электронами фрагмент также взаимодействует с основными остатками EGFR, такими как K745, еще больше стабилизируя его связывание. Поэтому позитиниб протестировали в системе Ва/Ф3. Позитиниб эффективно ингибировал *in vitro* рост линий мутантных по 20 экзону EGFR клеток Ва/Ф3 (фиг. 2A) и мутантных по 20

экзону HER2 клеток Ва/Ф3 (фиг. 2В). Позитиниб имел среднее значение IC_{50} 1/0 нМ в линиях мутантных по 20 экзону EGFR клеток Ва/Ф3, что делает позитиниб *in vitro* приблизительно в 100 раз более сильным, чем осимертиниб, и в 40 раз более сильным, чем афатиниб. Кроме того, позитиниб имел среднее значение IC_{50} 1/9 нМ в линиях мутантных по 20 экзону HER2 клеток Ва/Ф3, что делает позитиниб *in vitro* в 200 раз более сильным, чем осимертиниб, и в 6 раз более сильным, чем афатиниб. Эти результаты были подтверждены вестерн-блоттингом, причем позитиниб ингибировал фосфорилирование EGFR и HER2 при концентрациях всего 5 нМ (фиг. 2С, 8А). Кроме того, чтобы подтвердить, что чувствительность к позитинибу не была связана с уровнем экспрессии мутантов EGFR или HER2, экспрессию каждого мутанта определяли с помощью ELISA, а затем строили график зависимости от значений IC_{50} (фиг. 8D). В то время как никакой корреляции не было найдено между IC_{50} и экспрессией ($R=-0,056$, $p=0,856$), была обнаружена корреляция между чувствительностью к позитинибу и местоположением мутации для EGFR ($R=0,687$, $p=0,044$) (фиг. 2D), подтверждающая, что чем дальше вставка от α -с-спирали, тем выше IC_{50} . Интересно, что эта корреляция не была обнаружена для мутаций в 20 экзоне HER2, которые больше различаются по размеру, чем по местоположению вставки (фиг. 8Е). Эта корреляция подтверждает, что точное местоположение мутации оказывает различное влияние на связывающий лекарственное средство карман, способствуя гетерогенности наблюдаемого лекарственного ответа. Кроме того, позитиниб эффективно ингибировал рост линий полученных от пациента клеток CUTO14 (EGFR с A767dupASV) и YUL0019 (EGFR с N771del insFH) со средними значениями IC_{50} 1,84 нМ и 0,30 нМ, соответственно, что в 15 сильнее, чем афатиниб, для CUTO14 и более чем в 100 раз сильнее, чем афатиниб, для YUL0019 (фиг. 2Е, F). По вестерн-блоттингу линии клеток CUTO14 определили, что имело место значительное ингибирование p-EGFR при обработке позитинибом 10 нМ, но значительного ингибирования p-EGFR афатинибом вплоть до 1000 нМ не было (фиг. 8В, С).

Для определения специфичности позитиниба при ингибировании мутантов по 20 экзону по сравнению с мутантами с T790M значения IC_{50} афатиниба, осимертиниба, роцилетиниба и позитиниба у мутантов по 20 экзону сравнивали с значениями IC_{50} афатиниба, осимертиниба, роцилетиниба и позитиниба в линиях мутантных по T790M EGFR клеток Ва/Ф3. Значения IC_{50} приведены нормализованными к одной мутации T790M EGFR, причем значения меньше 1 указывают на специфичность к вставкам в 20 экзоне по сравнению с T790M (фиг. 2G). По сравнению с мутантами с T790M EGFR, вставки в 20 экзоне EGFR оказались в 65 раз более чувствительными к позитинибу. Кроме того, инсерционные мутации в 20 экзоне EGFR оказались в 1,4 раза более резистентными к афатинибу, в 5, 6 раза более резистентными к осимертинибу и в 24 раза более резистентными к роцилетинибу, чем мутанты с T790M EGFR (фиг. 2G).

Чтобы выяснить, почему позитиниб, но не ИТК третьего поколения, такие как осимертиниб, селективно и сильно ингибирует мутанты по 20 экзону по сравнению с мутациями T790M, было выполнено 3D-моделирование для определения того, как изменения в связывающем лекарственное средство кармане влияют на связывание лекарственного средства. В то время как осимертиниб помещается в связывающий лекарственное средство карман мутантного по T790M рецептора EGFR (фиг. 2H), в мутантах по 20 экзону большие изменения (фиг. 2I) в связывающем кармане стерически препятствуют связыванию ингибиторов третьего поколения. Однако позитиниб меньше по размеру и обладает большей гибкостью, что позволяет ему помещаться в стерически затрудненный связывающий карман 20 экзона (фиг. 2I). Кроме того, 3D-моделирование EGFR с D770insNPG с позитинибом и афатинибом подтверждает, что сдвинутая в связывающий лекарственное средство карман Р-петля вынуждает позитиниб прочнее связываться в связывающем лекарственное средство кармане, чем афатиниб. Расчеты структурного моделирования показывают, что свободная энергия связывания (AG Лондона) для позитиниба ниже, чем для афатиниба, что указывает на более сильную аффинность связывания позитиниба. 3D-моделирование HER2 WT с осимертинибом демонстрирует, что связывающий карман HER2 WT больше, чем связывающий карман HER2 с A775insYVMA. Таким образом, позитиниб прочно связывается глубоко в стерически затрудненном связывающем лекарственное средство кармане HER2 с A775insYVMA, преодолевая структурные изменения, вызванные вставками в 20 экзоне.

Эффективность позитиниба тестировали *in vivo* с использованием модели на GEM вызванного вставкой в 20 экзоне EGFR и HER2 HMPJ. У ранее описанных мышей с EGFR с D770insNPG (Cho et al., 2013) и HER2 с A775insYVMA (Perera et al., 2009) индуцировали опухоли легких, и животные перорально получали позитиниб (10 мг/кг) или контрольный носитель раз в день в течение 4 недель. Как определено по МРТ, позитиниб уменьшал опухолевую нагрузку на 85% в GEMM с вставками в 20 экзоне EGFR (фиг. 3А, С) и на 60% в GEMM с вставками в 20 экзоне HER2 (фиг. 3В, D), это более высокий уровень ингибирования, чем 37% в предшествующих наблюдениях для афатиниба в идентичной GEM-модели. Типичные МРТ-изображения опухолей до и после позитиниба показаны как для EGFR, так и для HER2 GEMM (фиг. 3С, D). В моделях как на EGFR, так и на HER2 GEM, мыши, получавшие 10 мг/кг позитиниба, демонстрировали долговременную регрессию без признаков прогрессирования через 12 недель (фиг. 3Е, F). Кроме того, лечение позитинибом (5 или 10 мг/кг) полностью уменьшало опухоли за 14 дней (>85% ингибирование) в модели LU0387 (H773insNPH) на основе PDX со вставками в 20 экзоне EGFR (фиг. 3G).

Чтобы определить, связывается ли poziотиниб как другие необратимые ингибиторы ковалентно с C797, получали линии клеток Ba/F3 с мутацией C797S, наблюдаемой у ~30% пациентов с резистентностью к осимертинибу (Thress et al., 2015). Было обнаружено, что мутация C797S индуцировала резистентность к poziотинибу с значением $IC_{50} > 10$ мкМ. Вместе эти эксперименты показывают, что poziотиниб могут быть уязвим для подобных механизмов приобретенной резистентности, как и другие ИТК третьего поколения.

Для подтверждения вышеуказанных результатов были проведены эксперименты с использованием линии клеток рака молочной железы MCF10A с HER2 с G776del insVC. Клетки обрабатывали различными ингибиторами в разных дозах, и было обнаружено, что линия клеток рака молочной железы чувствительна к poziотинибу, как наблюдали и на других протестированных линиях клеток (фиг. 10). Следовательно, poziотиниб можно использовать для лечения других видов рака с мутациями в 20 экзоне.

Таким образом, было обнаружено, что мутанты по 20 экзону проявляют резистентность *de novo* к ИТК первого, второго и третьего поколения. С помощью 3D-моделирования EGFR с D770insNPG и HER2 с A775insYVMA было определено, что poziотиниб имеет структурные особенности, которые могут преодолевать изменения в связывающем лекарственном средстве кармане, вызванные вставками в 20 экзоне. Кроме того, предсказанная активность poziотиниба была подтверждена с использованием моделей *in vitro* и *in vivo*, продемонстрировавших сильную противоопухолевую активность poziотиниба в клетках с этими мутациями.

Было обнаружено, что poziотиниб приблизительно в 40 раз сильнее, чем афатиниб, и в 65 раз сильнее, чем дакомитиниб, в отношении мутантов по 20 экзону EGFR. Кроме того, poziотиниб оказался в 6 раз сильнее, чем афатиниб и дакомитиниб, в отношении мутантов по 20 экзону HER2 *in vitro*. Взятые вместе, эти данные указывают на то, что хотя у poziотиниба схожий с афатинибом и дакомитинибом хиназолиновый остов, дополнительные особенности ингибитора киназы приводят к повышению активности и относительной специфичности к мутациям в 20 экзоне EGFR по сравнению с более распространенной мутацией T790M.

3D-моделирование показывает, что меньший размер, увеличенное галогенирование и гибкость poziотиниба дают ингибитору конкурентное преимущество в стерически затрудненном связывающем лекарственном средстве кармане мутанта по 20 экзону EGFR/HER2. Наблюдали отрицательную корреляцию между расстоянием от мутации до α -с-спирали и чувствительностью к лекарственному средству. Эта связь подтверждает, что точное местоположение мутации влияет на связывающий лекарственный средство карман и/или аффинность связывания ИТК. Кроме того, данные указывают на то, что размер вставки также влияет на чувствительность к лекарственному средству. Кроме того, линия полученных от пациента клеток, YUL0019 (N771del insFH), у которых добавлена только одна аминокислота, оказалась более чувствительной к пан-HER-ингибиторам на основе хиназолина, чем линии клеток с более крупными вставками в 20 экзоне EGFR.

Пример 2. Материалы и методы

Популяция пациентов и статистический анализ:

Были определены пациенты с НМРЛ с мутацией по EGFR для включения в базу перспективно собранных данных MD Anderson Lung Cancer Moon Shot GEMINI. Статус мутации в EGFR определяли с использованием одного из методов основанного на ПЦП секвенирования следующего поколения панелей из 50, 134 или 409 генов, используемых для обычной клинической работы. PFS рассчитывали по методу Каплана-Мейера. PFS определяли как время от начала действия ИТК EGFR до радиологического прогрессирования или смерти. Повторные сканы получали с интервалами 6-8 недель во время лечения и ретроспективно оценивали в соответствии с критериями оценки ответа при солидных опухолях (RECIST), версия 1.1, для определения частоты ответа у пациентов с НМРЛ с вставкой в 20 экзоне EGFR.

Получение линии клеток и депривация IL-3:

Линию клеток Ba/F3 культивировали в полной среде RPMI-1640 (R8758; Sigma Life Science), дополненной L-глутамином, 10% инактивированной нагреванием FBS (Gibco), 1% пенициллина/стрептомицина (Sigma Life Science) и 10 нг/мл мышинового IL-3 (R&D systems) в стерильных условиях. Стабильные линии клеток получали ретровирусной трансдукцией линии клеток Ba/F3 в течение 12 ч. Ретровирусы получали трансфекцией векторов на основе pBabe-Puro, приведенных в табл. 2 (Addgene and Bioinnovatise) в линию пакующих клеток Phoenix 293T ampho (Orbigen) с использованием липофектамина 2000 (Invitrogen). Через 72 ч после трансдукции в среду добавляли 2 мкг/мл пурамицина (Invitrogen). После 5 дней селекции клетки окрашивали с помощью FITC-HER2 (Biolegend) или PE-EGFR (Biolegend) и сортировали с помощью FACS. Затем линии клеток выращивали в отсутствие IL-3 в течение 15 дней и определяли жизнеспособность клеток каждые 3 дня с использованием анализа Cell Titer Glo (Promega). Полученные в результате стабильные линии клеток хранили в полной среде RPMI-1640, описанной выше, без IL-3. Линии клеток рака легкого HCC827 и HCC4006 получали от АТСС и хранили в 10% среде RPMI в стерильных условиях. Идентичность линий клеток подтверждали фингерпринтингом ДНК с помощью коротких tandemных повторов с использованием набора PowerPlex 1.2 (Promega). Результаты фингерпринтинга сравнивали с эталонными фингерпринтами, сохраняемыми первичным источником

клеточной линии. Все линии клеток были свободны от микоплазмы. Для получения резистентных к эрлотинибу линий клеток клетки HCC827 и HCC4006 (мутантные по EGFR) культивировали при повышении концентрации эрлотиниба до появления устойчивых вариантов.

Таблица 2. Вектор, используемый для получения стабильных линий клеток

Название	Мутация	Вендор
EGFR c A763insFQEA (SEQ ID NO:1)	c.2290_2291insTCCAGGAAG CCT (SEQ ID NO:2)	Создан Bioinnovatise из pBabe-puro- EGFR WT от Addgene (#11011)
EGFR c A767insASV	c.2302_2303insGCCAGCGTG	Приобретен у Addgene (#32066)
EGFR c S768dupSVD	c.2303_2304dupAGCGTGGAC	Создан Bioinnovatise из pBabe-puro- EGFR WT от Addgene (#11011)
EGFR c V769insASV	c.2308_2309insCCAGCGTGG	Создан Bioinnovatise из pBabe-puro- EGFR WT от Addgene (#11011)
EGFR c D770insNPG	c.2310_2311insAACCCCGGC	Приобретен у Addgene (#11016)
EGFR c D770insSVD	c.2311_2312insGCGTGGACA	Создан Bioinnovatise из pBabe-puro- EGFR WT от Addgene (#11011)
EGFR c H773insNPH	c.2319_2320insAACCCCCAC	Создан Bioinnovatise из pBabe-puro- EGFR WT от Addgene (#11011)
EGFR c T790M		Приобретен у Addgene (#32070)
EGFR c T790M L858R		Приобретен у Addgene (#32073)
EGFR c T790M Ex19del		Приобретен у Addgene (#32072)
EGFR c T790M L858R C797S	c.2389T>A	Создан Bioinnovatise из pBabe-puro- EGFR L858R/T790M от Addgene (#32073)
EGFR c T790M Ex19del C797S	c.2389T>A	Создан Bioinnovatise из pBabe-puro- EGFR Del1/T790M от Addgene (#32072)
HER2 c S310F	c.929C>T	Приобретен у Addgene (#40991)
HER2 c S310Y	c.929C>A	Приобретен у Addgene (#40992)
HER2 c C311R	c.931T>C	Приобретен у Addgene (#40980)
HER2 c L755P	c.2263_2264delinsCC	Создан Bioinnovatise из pBabe-puro HER2 WT от Addgene (#40978)
HER2 c A775insV G776C	c.2323-2324insTTT	Приобретен у Addgene (#40979)
HER2 c A775insYVMA (SEQ IDNO:3)	c.2323_2324insTATGTCATG GCT (SEQ ID NO:4)	Приобретен у Addgene (#40982)
HER2 c G776V	c.2327G>T	Создан Bioinnovatise из pBabe-puro HER2 WT от Addgene (#40978)
HER2 c G776C V777insV	c.2326G>T, c.2331_2332insTGT	Создан Bioinnovatise из pBabe-puro HER2 WT от Addgene (#40978)
HER2 c G776del insVV	c.2327delinsTTGT	Создан Bioinnovatise из pBabe-puro HER2 WT от Addgene (#40978)
HER2 c G776del insVC	c.2326_2328insTCT	Создан Bioinnovatise из pBabe-puro HER2 WT от Addgene (#40978)
HER2 c P780insGSP	c.2339_2340insTGGCTCCCC	Создан Bioinnovatise из pBabe-puro HER2 WT от Addgene (#40978)

Анализ жизнеспособности клеток и оценка IC₅₀:

Жизнеспособность клеток определяли с использованием анализа Cell Titer Glo (Promega). Клетки собирали из суспензионной среды, центрифугировали при 300×g в течение 5 мин, ресуспендировали в свежей среде RPMI и подсчитывали с использованием автоматического счетчика клеток Countess и трипанового синего (Invitrogen). 1500 клеток на лунку высевали в 384-луночные планшеты (Greiner Bio-One) в трех технических повторностях. Клетки обрабатывали семью различными концентрациями ингибиторов в серийно трехкратных разведенных ИТК или только носителем с конечным объемом 40 мкл на лун-

ку. Через 72 ч в каждую лунку добавляли 11 мкл Cell Titer Glo. Планшеты встряхивали в течение 10 минут, и определяли биолюминесценцию с использованием мультимодального считывателя микропланшетов FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH). Значения биолюминесценции нормализовывали к обработанным DMSO клеткам, и нормализованные значения наносили на график в GraphPad Prism с использованием нелинейной регрессии к нормализованным данным с переменным наклоном. Значения IC₅₀ рассчитывали с помощью GraphPad Prism при 50% ингибировании. Каждый эксперимент повторяли 3 раза, если не указано иное.

Ингибиторы тирозинкиназы:

Лапатиниб, афатиниб, дакомитиниб, AZD9291, CO-1686, EGF816, ибрутиниб и HM781-36B были приобретены у Selleck Chemical. Эрлотиниб и гефитиниб были получены аптеке при Онкологическом центре им. М.Д. Андерсона Техасского университета. BI-694 был предоставлен Boehringer-Ingelheim. Все ингибиторы были растворены в DMSO в концентрации 10 мМ и хранились при -80°C.

3D-моделирование:

Получали структуру белка EGFR с D770insNPG (код доступа в Protein Data Bank: 4LRM) и использовали ее в качестве шаблона для построения молекулярной структурной 3D-модели EGFR с D770insNPG. HER2 с A775insYVMA строили с использованием ранее опубликованной модели в Shen et al. Гомологичные модели строили с использованием MODELLER 9v6 и дополнительно минимизировали их по энергии с использованием программного пакета Molecular Operating Environment (Chemical Computing Group, Montreal, Канада). Молекулярную стыковку ИТК в мутантные по 20 экзону EGFR и HER2 проводили с использованием программного обеспечения GOLD с параметрами по умолчанию, если не указано иное. В процессе стыковки досрочное прекращение не допускалось. Для моделирования образования ковалентных связей между рецепторами и ингибиторами использовали ограничения. Гибкость остатков в связывающем кармане рассматривали с использованием программного обеспечения GOLD. Фигуры, демонстрирующие взаимодействия между EGFR/HER2 и ингибиторами визуализировали с использованием RYMOLO.

Вестерн-блоттинг мутантов Va/F3:

Для вестерн-блоттинга клетки промывали в фосфатно-солевом буфере и лизировали в буфере для лизиса белка (ThermoFisher) и таблетках со смесью ингибиторов протеазы (Roche). Белок (30-40 мкг) загружали в гели, приобретенные у BioRad. Использовали полусухой перенос BioRad и затем тестировали антителами против pEGFR (#2234), EGFR (#4267), pHER2 (#2247), HER2 (#4290) (1:1000; Cell Signaling). Блоты тестировали антителами против β-актина (Sigma-Aldrich, #A2228) или винкулина (Sigma-Aldrich, #V4505) в качестве контроля загрузки, и экспонировали с использованием хемилюминесцентного субстрата SuperSignal West Pico (ThermoFisher) и системы визуализации BioRad ChemiDoc Touch или рентгенографической пленки. Показаны типичные изображения двух отдельных выделений белка и блотов, выполненных в двух повторностях. Количественную оценку вестерн-блоттинга выполняли в Photoshop и рассчитывали по формуле (средняя интенсивность фона - средняя интенсивность образца) (количество пикселей)=интенсивность полосы. Образцы вначале нормализовывали по контролю загрузки (β-актин или винкулин), затем нормализовывали по DMSO и графически изображали в GraphPad Prism. Значимость от DMSO рассчитывали в GraphPad Prism.

ELISA и корреляция мутантов Va/F3:

Белок собирали из родительской линии клеток Va/F3, и было обнаружено, что все мутанты Va/F3 по 20 экзону являются активирующими мутациями, как описано выше. ELISA выполняли, как описано в инструкциях производителя для общего EGFR (Cell Signaling, #7250) и общего HER2 (Cell Signaling, #7310). Относительную экспрессию, определенную с помощью ELISA, наносили на график в зависимости от значений IC₅₀, рассчитанных, как описано выше. Корреляции Пирсона и р-значения определяли с помощью GraphPad Prism.

Исследования на полученной от пациента линии клеток:

Клетки CUTO14 получали из плеврального выпота пациента с аденокарциномой легкого после информированного согласия с использованием ранее описанных способов культивирования (Davies et al., 2013). Линии клеток обрабатывали указанными дозами афатиниба или позитиниба в течение 72 ч и определяли жизнеспособность клеток с помощью MTS-анализа (Promega). IC₅₀ рассчитывали, как описано ранее (n=3). Вестерн-блоттинг с полученными от пациента линиями клеток выполняли, как описано ранее (Hong et al., 2007) (n=3). Клетки обрабатывали в течение 2 ч указанными дозами афатиниба или позитиниба. Все антитела были приобретены у Cell Signaling Technology, за исключением общего EGFR (BD Transduction Laboratories) и GAPDH (Calbiochem).

Линию клеток YUL0019 получали из злокачественной перикардальной жидкости, полученной от пациента с распространенной аденокарциномой легкого в соответствии с протоколом, одобренным IRB. Линию клеток культивировали в RPMI+L-глутамин (Corning), дополненной 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки (Atlanta Biologicals) и 1% пенициллина/стрептомицина (Corning). Для подтверждения наличия мутации EGFR экстрагировали РНК из клеточного осадка с использованием мини-набора RNeasy (Qiagen #74104) в соответствии с инструкциями производителя. Синтезируют

вали кДНК с использованием набора для синтеза первой цепи кДНК Superscript III (Invitrogen #18080-051), и использовали ее в качестве матрицы для амплификации EGFR. Продукт ПЦР секвенировали с помощью секвенирования Сенгера с использованием следующих праймеров: EGFR-2080F: CTTACACCC AGTGGAGAAGC (SEQ ID NO: 5) и EGFR-2507R ACCAAGCGACGGTCCTCCAA (SEQ ID NO: 6). Прямое и обратное прослеживание последовательности проверяли вручную. Вариант, детектированный в полученной у пациента линии клеток, представлял собой сложную вставку в 20 экзоне EGFR (N771delinsFH), приводящую к замене аминокислоты аспарагина в положении 771 на две аминокислоты, фенилаланин и гистидин. Жизнеспособность клеток и оценку IC₅₀ проводили, как описано выше.

Исследования на полученном у пациента ксенотрансплантате (PDX):

Эксперименты с LU0387 PDX были выполнены Crown BioSciences. Кратко говоря, фрагменты опухоли от экспрессирующих EGFR с H773insNPH опухолей инокулировали 5-6-недельным самкам голых мышей nu/nu. Когда опухоли достигали 100-200 мм³, мышей рандомизировали на 3 группы: 5 мг/кг poziотиниба, 10 мг/кг poziотиниба или контрольный носитель (20% ПЭГ-400, 3% Tween-80 в dH₂O). Объемы опухолей и массу тела измеряли два раза в неделю. Мыши, получавшие 5 мг/кг poziотиниба, получали лекарственное средство в течение 4-5 дней, затем у них были лекарственные каникулы в течение 4 дней, после чего они получали 4 дополнительный дня дозирования. Затем мышей наблюдали в течение 2 дополнительных дней без дозирования. Мыши, получавшие 10 мг/кг poziотиниба, получали лекарственное средство в течение 3-4 дней, затем их наблюдали в течение 10 дней без дозирования. Мышей, умерщвленных человеком из-за событий, не связанных с опухолевой нагрузкой, исключали из окончательного анализа.

Исследования на модели на генетически модифицированных мышах (GEMM): GEMM с EGFR с D770insNPG и HER2 с A775insYVMA получали, как описано ранее (Perera et al., 2009; Cho et al., 2013). С мышами обращались в соответствии с надлежащей практикой в отношении животных, определенной Управлением по защите лабораторных животных, и умерщвляли их с одобрения Институтского комитета по уходу и использованию животных Института рака Дана-Фарбер (Boston, MA). Мышей были на постоянной доксициклиновой диете с 6-недельного возраста. Объем опухоли определяли по MPT, как описано ранее (Perera et al., 2009; Cho et al., 2013). Мышей с одинаковым начальным объемом опухоли рандомизировали не вслепую для получения носителя или 10 мг/кг poziотиниба раз в день после явного формирования опухоли, определенного по MPT. Мышей, умерщвленных человеком из-за событий, не связанных с опухолевой нагрузкой, исключали из окончательного анализа.

Все способы, раскрытые и заявленные в настоящем документе, могут быть осуществлены и выполнены в свете настоящего раскрытия без лишних экспериментов. Хотя композиции и способы настоящего изобретения были описаны в терминах предпочтительных вариантов осуществления, специалистам в данной области техники должно быть очевидно, что в способах и в этапах или в последовательности этапов описанного в настоящем документе способа могут быть сделаны изменения без отхода от концепции, сущности и объема настоящего изобретения. Более конкретно, должно быть очевидно, что некоторые средства, которые являются как химически, так и физиологически родственными, могут быть заменены на средства, описанные в настоящем документе, причем будут достигнуты такие же или аналогичные результаты. Предполагается, что все такие аналогичные заменители и модификации, очевидные для специалистов в данной области техники, находятся в пределах сущности, объема и концепции настоящего изобретения, как определено прилагаемой формулой изобретения.

Список литературы

Следующие ссылки в той мере, в которой они предоставляют типичные процедурные или иные подробности, дополняющие изложенные в настоящем документе, специально включены в настоящий документ посредством ссылки.

- Arcila et al., *Clin Cancer Res* 18:4910-8, 2012.
 Arcila et al., *Mol Cancer Ther* 12(2):220-229, 2013.
 Austin-Ward and Villaseca, *Revista Medica de Chile*, 126(7):838-845, 1998.
 Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*,

- John Wiley & Sons, New York, NY, 2003.
- Bukowski et al., *Clinical Cancer Res.*, 4(10):2337-2347, 1998.
- Camacho et al. *J Clin Oncology* 22(145): Abstract No. 2505 (antibody CP-675206), 2004.
- Cha et al. *Int J Cancer* 130:2445-54, 2012.
- Chee et al., *Science*, 274:610-614, 1996.
- Cho et al., *Cancer Res* 73:6770-9, 2013.
- Christodoulides et al., *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-3037, 1998.
- Church and Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1991-1995 (1988).
- Cotton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4397-4401 (1985).
- Davidson et al., *J. Immunother.*, 21(5):389-398, 1998.
- Davies et al., *Plos One* 8, 2013.
- Del Tito et al., *Clinical Chemistry* 44:731-739, 1998.
- Drmanac et al., *Nat. Biotechnol.*, 16:54-58, 1998.
- Drmanac et al., *Science*, 260:1649-1652, 1993.
- Flavell et al., *Cell* 15:25 (1978).
- Fu et al., *Nat. Biotechnol.*, 16:381-384, 1998/
- Geever et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:5081 (1981).
- Hanibuchi et al., *Int. J. Cancer*, 78(4):480-485, 1998.
- Hellstrand et al., *Acta Oncologica*, 37(4):347-353, 1998.
- Hollander, *Front. Immun.*, 3:3, 2012.
- Hong et al., *J Biol Chem* 282:19781-7, 2007.
- Hui and Hashimoto, *Infection Immun.*, 66(11):5329-5336, 1998.
- Hurwitz et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(17): 10067-10071, 1998.
- Международная патентная публикация № WO 99/57318
- Международная патентная публикация № WO1995001994
- Международная патентная публикация № WO1998042752
- Международная патентная публикация № WO2000037504
- Международная патентная публикация № WO2001014424
- Международная патентная публикация № WO2009/101611

- Международная патентная публикация № WO2009/114335
Международная патентная публикация № WO2010/027827
Международная патентная публикация № WO2011/066342
Международная патентная публикация № WO2015016718
Международная патентная публикация № WO 00/37504
Международная патентная публикация № WO01/14424
Международная патентная публикация № WO98/42752
Kosaka et al., *Cancer Res* 2017.
Leal, M., *Ann N Y Acad Sci* 1321, 41-54, 2014.
Lynch et al., *N Engl J Med.* 350(21):2129-2139, 2004.
Maemondo et al., *N Engl J Med* 362:2380-8, 2010.
Mitsudomi and Yatabe, *Cancer Sci.* 98(12):1817-1824, 2007.
Mokyr et al. *Cancer Res* 58:5301-5304, 1998.
Oxnard et al., *J Thorac Oncol.* 8(2):179-184, 2013.
Paez et al., *Science* 304(5676):1497-1500, 2004.
Pao et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 101(36):13306-13311,
2004.
Pardoll, *Nat Rev Cancer*, 12(4): 252-64, 2012.
Perera et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:474-9, 2009.
Qin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24):14411-14416,
1998.
Raca et al., *Genet Test* 8(4):387-94 (2004).
Sanger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467
(1977).
Sears et al., *Biotechniques*, 13:626-633, 1992.
Sheffield et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:232-236
(1989).
Shen et al., *J Recept Signal Transduct Res* 36:89-97, 2016.
Thress et al., *Nat Med* 21:560-2, 2015.
Патент США № 4870287
Патент США № 5288644
Патент США № 5739169
Патент США № 5760395
Патент США № 5801005
Патент США № 5824311
Патент США № 5830880

Патент США № 5844905
 Патент США № 5846945
 Патент США № 5869245
 Патент США № 5885796
 Патент США № 6207156
 Патент США № 8008449
 Патент США № 8017114
 Патент США № 8119129
 Патент США № 8188102
 Патент США № 8329867
 Патент США № 8354509
 Патент США № 8735553
 Патентная публикация США № 2004/0014095
 Патентная публикация США № 2005/0260186
 Патентная публикация США № 2006/0104968
 Патентная публикация США № 20110008369
 Патентная публикация США № 20130071452
 Патентная публикация США № 2014022021
 Патентная публикация США № 20140294898
 Underhill et al., *Genome Res.* 7:996-1005 (1997).
 Yang et al., *Int J Cancer* 2016.
 Yasuda et al., *Sci Transl Med* 5(216):216ra177, 2013.
 Zimmerman et al., *Methods Mol. Cell. Biol.*, 3:39-42, 1992.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака у субъекта, содержащий введение субъекту эффективного количества позиотиниба, причем у субъекта определено наличие одной или нескольких инсерционных мутаций в 20 экзоне EGFR, причем мутации содержат вставку 3-18 нуклеотидов между аминокислотами 763-778, и у субъекта определено отсутствие мутации EGFR в остатке C797.

2. Способ по п.1, причем у субъекта определено наличие 2, 3 или 4 инсерционных мутаций в 20 экзоне EGFR.

3. Способ по п.2, причем одна или несколько инсерционных мутаций в 20 экзоне EGFR находятся в одном или нескольких остатках, выбранных из группы, состоящей из A763, A767, S768, V769, D770, N771, P772 и H773.

4. Способ по п.1, причем у субъекта определена мутация T790M.

5. Способ по п.1, причем одну или несколько инсерционных мутаций в 20 экзоне выбирают из группы, состоящей из A763insFQEA, A767insASV, S768dupSVD, V769insASV, D770insSVD, D770insNPG, H773insNPH, N771del insGY, N771del insFH и N771dupNPH.

6. Способ по п.1, дополнительно содержащий введение дополнительной противораковой терапии, включая химиотерапию, лучевую терапию, генную терапию, хирургическое вмешательство, гормональную терапию, антиангиогенную терапию или иммунотерапию.

7. Способ по п.1, в котором рак представляет собой рак ротовой полости, рак ротоглотки, рак носоглотки, рак дыхательных путей, рак мочеполовой системы, рак желудочно-кишечного тракта, рак ткани центральной или периферической нервной системы, эндокринный или нейроэндокринный рак или рак гемопоэтических тканей, глиому, саркому, карциному, лимфому, меланому, фиброму, менингиому, рак головного мозга, рак ротоглотки, рак носоглотки, рак почки, рак желчных путей, феохромоцитому, рак из островковых клеток поджелудочной железы, опухоли Ли-Фраумени, рак щитовидной железы, рак парашитовидной железы, опухоли гипофиза, опухоли надпочечников, опухоли при остеогенной саркоме, множественные нейроэндокринные опухоли I типа и II типа, рак молочной железы, рак легкого, рак головы и шеи, рак предстательной железы, рак пищевода, рак трахеи, рак печени, рак мочевого пузыря, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак яичников, рак матки, рак шейки матки, рак яичек, рак толстой кишки, рак прямой кишки или рак кожи.

8. Способ по п.1, в котором рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого.

9. Применение фармацевтической композиции, содержащей позиотиниб, для лечения рака у субъекта, у которого определено наличие одной или нескольких инсерционных мутаций в 20 экзоне EGFR, где мутации содержат вставку 3-18 между аминокислотами 763-778, и у субъекта определено отсутствие мутации EGFR в остатке C797.

10. Применение по п.9, причем одну или несколько мутаций в 20 экзоне выбирают из группы, состоящей из A763insFQEA, A767insASV, S768dupSVD, V769insASV, D770insSVD, D770insNPG,

H773insNPH, N771del insGY, N771del insFH и N771dupNPH.

11. Способ прогнозирования ответа на poziотиниб отдельно или в комбинации со второй противо-раковой терапией у субъекта, имеющего рак, содержащий детектирование мутации в 20 экзоне EGFR в геномном образце, полученном у упомянутого пациента, причем если данный образец положителен по наличию мутации в 20 экзоне EGFR, то для пациента прогнозируют благоприятный ответ на poziотиниб отдельно или в комбинации с противораковой терапией, где мутации содержат вставку 3-18 между аминокислотами 763-778, и у субъекта определено отсутствие мутации EGFR в остатке C797.

12. Способ по п.1, где инсерционная мутация в 20 экзоне представляет собой A763insFQEA.

13. Способ по п.1, где инсерционная мутация в 20 экзоне представляет собой A767insASV.

14. Способ по п.1, где инсерционная мутация в 20 экзоне представляет собой S768dupSVD.

15. Способ по п.1, где инсерционная мутация в 20 экзоне представляет собой V769insASV.

16. Способ по п.1, где инсерционная мутация в 20 экзоне представляет собой D770insSVD.

17. Способ по п.1, где инсерционная мутация в 20 экзоне представляет собой D770insNPG.

18. Способ по п.1, где инсерционная мутация в 20 экзоне представляет собой H773insNPH.

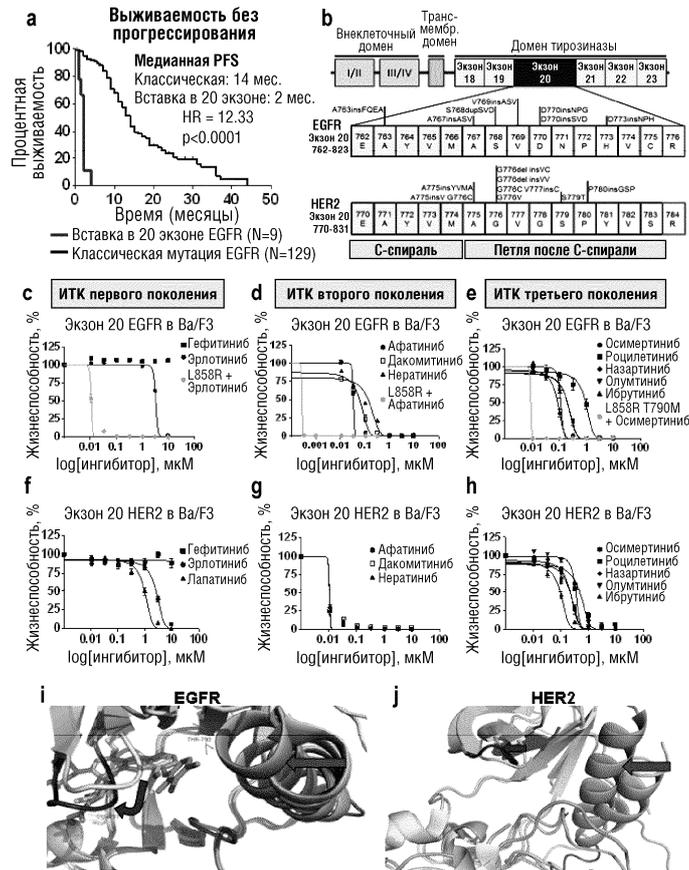
19. Способ по п.1, где инсерционная мутация в 20 экзоне представляет собой N771del insGY.

20. Способ по п.1, где инсерционная мутация в 20 экзоне представляет собой N771del insFH.

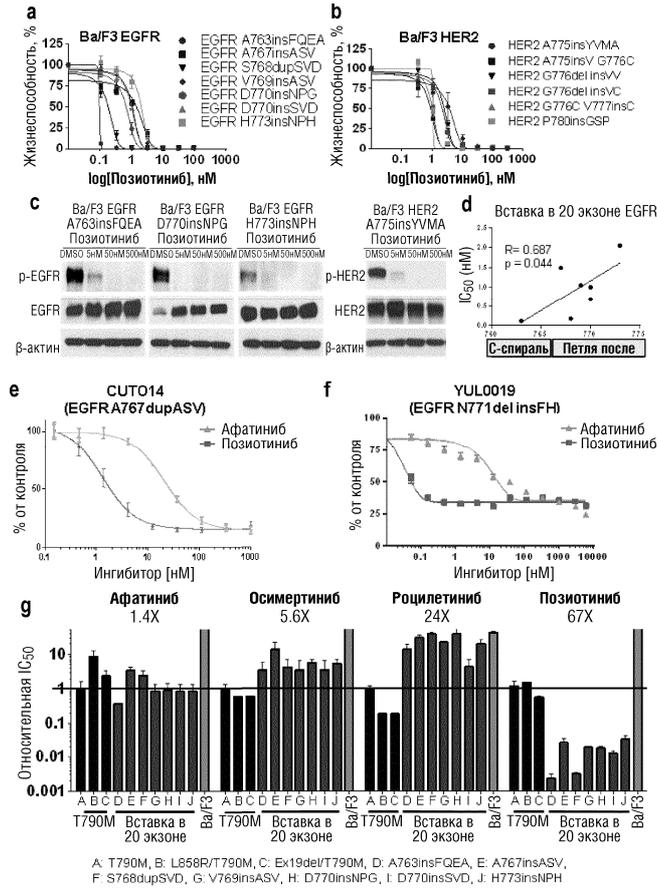
21. Способ по п.1, где инсерционная мутация в 20 экзоне представляет собой N771dupNPH.

22. Способ по п.6, где дополнительная противоопухолевая терапия представляет собой ингибитор mTOR, выбранный из группы, состоящей из рапамицина, темсиролимуса, эверолимуса, ридафоролимуса или MLN4924, более предпочтительно, где ингибитор mTOR представляет собой эверолимус.

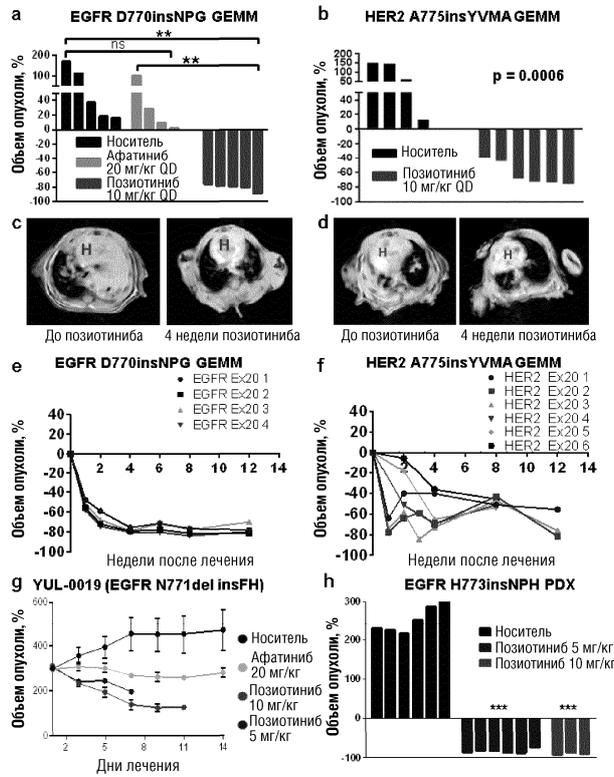
23. Способ по п.6, где дополнительная противоопухолевая терапия представляет собой трастузумаб эмтанзин.



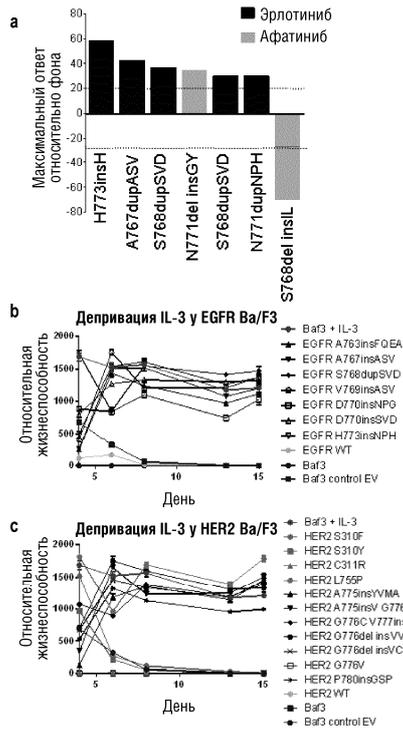
Фиг. 1А-Ј



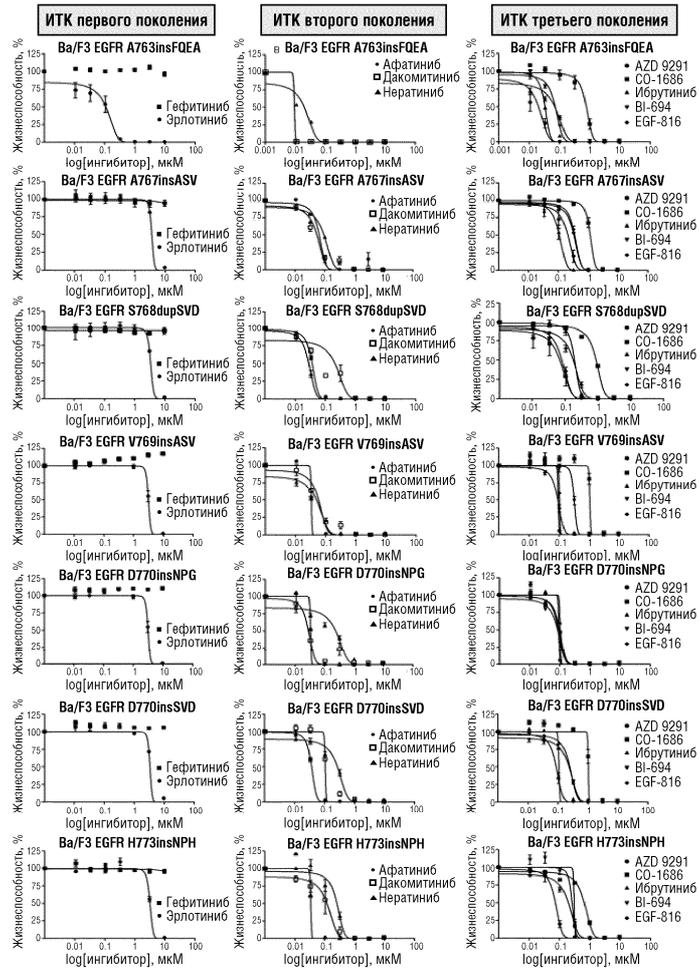
Фиг. 2А-Г



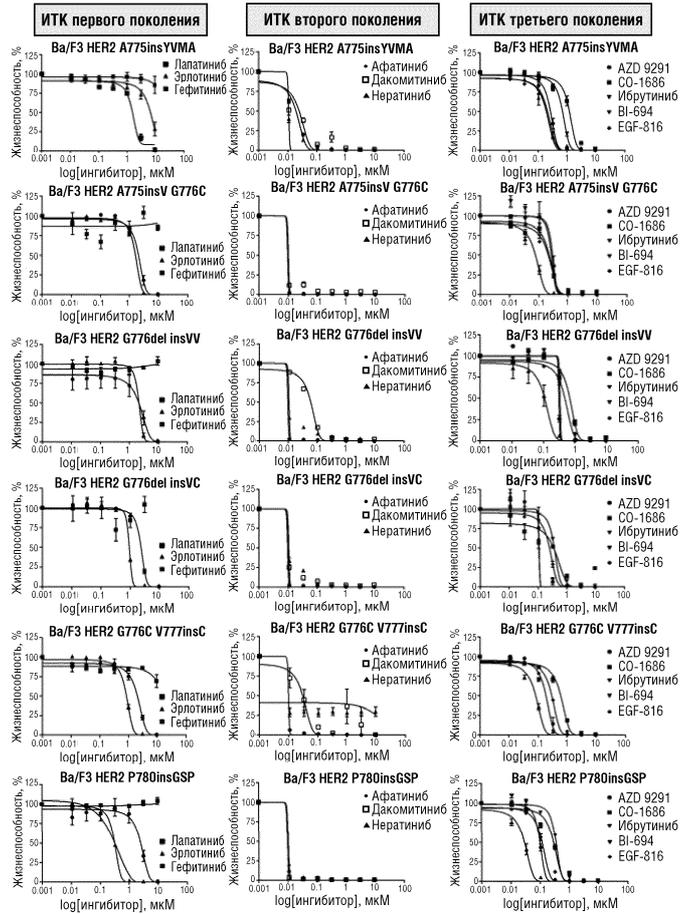
Фиг. 3А-Н



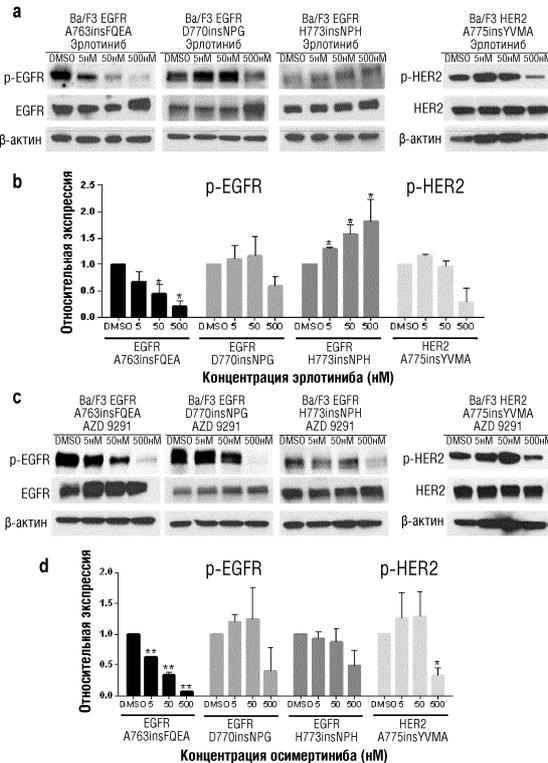
Фиг. 4А-С



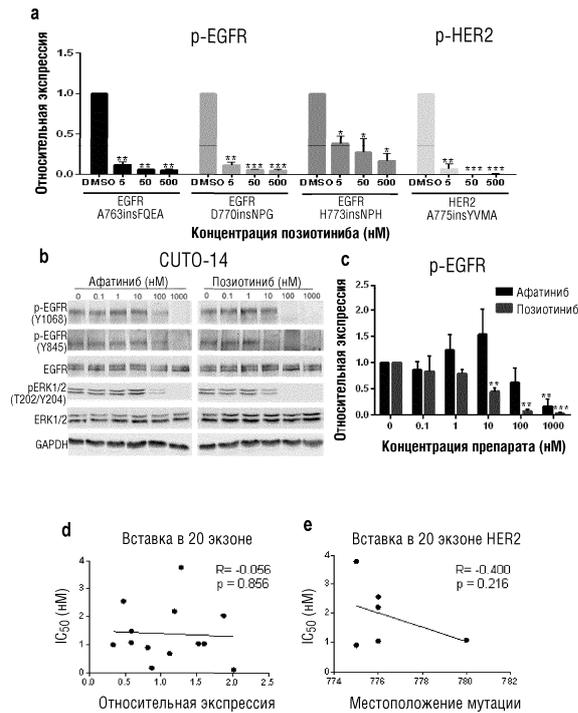
Фиг. 5



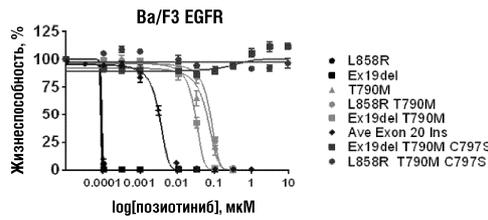
Фиг. 6



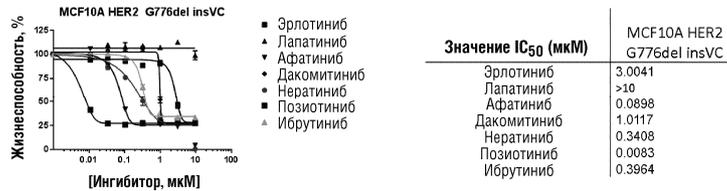
Фиг. 7А-Д



Фиг. 8А-Е



Фиг. 9



Фиг. 10