

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201692150 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2017.02.28(22) Дата подачи заявки
2015.04.27

(51) Int. Cl. A61K 31/337 (2006.01)
A61K 31/47 (2006.01)
A61K 31/517 (2006.01)
A61K 31/7068 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО

(31) 61/984,599

(32) 2014.04.25

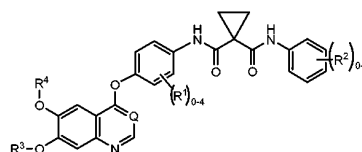
(33) US

(86) PCT/US2015/027800

(87) WO 2015/164869 2015.10.29

(71) Заявитель:
ЭКСЕЛИКСИС, ИНК. (US)(72) Изобретатель:
Афтаб Дана Т., Юй Пэйвэнь (US)(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к лечению рака у пациента, в частности у пациента с аденокарциномой легкого и более конкретно у пациента с немелкоклеточным раком легкого, позитивным по слиянию SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 или FIG-ROS1, с помощью ингибитора MET, VEGFR2 и ROS1, который представляет собой соединение формулы I



I

или его фармацевтически приемлемую соль.

201692150

A1

A1

201692150

СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО

Перекрестная ссылка на родственные заявки

[0001] Настоящая заявка РСТ заявляет приоритет по предварительной заявке на патент США с серийным № 61/984599, поданной 25 апреля 2014 года, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Перечень последовательностей

[0002] Настоящая заявка включает ссылку в полном объеме на перечень последовательностей в виде файла под названием «EX14-003C-PC_2015_04_20_SEQUENCE_LISTING_ST25.txt», созданного 27 апреля 2015 года в 12:54 pm, размером 26 кБ, и поданного в электронном виде вместе с ней.

Область техники

[0003] Настоящее изобретение относится к обнаружению, диагностике и лечению рака, в частности, аденокарциномы легкого, с применением ингибитора рецепторных тирозинкиназ.

Уровень техники

[0004] Рак легкого является основной причиной смертности вследствие рака во всем мире. Недавние разработки в области таргетной терапии привели к изменению стандартного метода лечения немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ). Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, Sunpaweravong P, Han B, Margono B, Ichinose Y, Nishiwaki Y, Ohe Y, Yang JJ, Chewaskulyong B, Jiang H, Duffield EL, Watkins CL, Armour AA, Fukuoka M. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. N Engl J Med. 2009 Sep 3; 361(10):947-57. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, Gemma A, Harada M, Yoshizawa H, Kinoshita I, Fujita Y, Okinaga S, Hirano H, Yoshimori K, Harada T, Ogura T, Ando M, Miyazawa H, Tanaka T, Saijo Y, Hagiwara K, Morita S, Nukiwa T; North-East Japan Study Group. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. N Engl J Med. 2010 Jun 24; 362(25):2380-8. Тирозинкиназные ингибиторы (TKI) рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR), гефитиниб и эрлотиниб, а также TKI киназы анапластической лимфомы (ALK), кризотиниб, продемонстрировали клиническую активность у пациентов с НМРЛ с мутациями *EGFR* или перестройкой генов *ALK*. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, Ou SH, Dezube BJ, Jänne PA, Costa DB, Varella-Garcia M, Kim WH, Lynch TJ, Fidias P, Stubbs H, Engelman JA, Sequist LV, Tan W, Gandhi L, Mino-Kenudson M, Wei GC, Shreeve SM, Ratain MJ, Settleman J, Christensen JG, Haber DA, Wilner K, Salgia R, Shapiro GI, Clark JW, Iafrate AJ. Anaplastic

lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. N Engl J Med. 2010 Oct 28; 363(18):1693-703. Shaw AT, Camidge, Engelman JA, Solomon BJ, Kwak EL, Clark JW, Salgia R, Shapiro, Bang YJ, Tan W, Tye L, Wilner KD, Stephenson P, Varella-Garcia M, Bergethson K, Iafrate AJ, Ou SH. Clinical activity of crizotinib in advanced non-small cell lung cancer (HMPЛ) harboring *ROS1* gene rearrangement. J Clin Oncol. 2012 30 (доп.; реф. 7508). Недавно описано, что слияние гена *KIF5B* (семейства кинезинов 5В) и онкогена *RET* представляет собой драйверную мутацию у 1–2 % пациентов с HMPЛ и терапевтическую мишень. Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, Sakamoto H, Tsuta K, Furuta K, Shimada Y, Iwakawa R, Ogiwara H, Oike T, Enari M, Schetter AJ, Okayama H, Haugen A, Skaug V, Chiku S, Yamanaka I, Arai Y, Watanabe S, Sekine I, Ogawa S, Harris CC, Tsuda H, Yoshida T, Yokota J, Shibata T. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. Nat Med. 2012 Feb 12; 18(3):375-7. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, Asaka R, Hamanaka W, Ninomiya H, Uehara H, Lim Choi Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Mano H, Ishikawa Y. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. Nat Med. 2012 Feb 12; 18(3):378-81. Lipson D, Capelletti M, Yelensky R, Otto G, Parker A, Jarosz M, Curran JA, Balasubramanian S, Bloom T, Brennan KW, Donahue A, Downing SR, Frampton GM, Garcia L, Juhn F, Mitchell KC, White E, White J, Zwirko Z, Peretz T, Nechushtan H, Soussan-Gutman L, Kim J, Sasaki H, Kim HR, Park SI, Ercan D, Sheehan CE, Ross JS, Cronin MT, Jänne PA, Stephens PJ. Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. Nat Med. 2012 Feb 12; 18(3):382-4. Таким образом, все более важной становится идентификация ключевых драйверных генов в HMPЛ и разработка методов лечения каждого геномного подмножества пациентов.

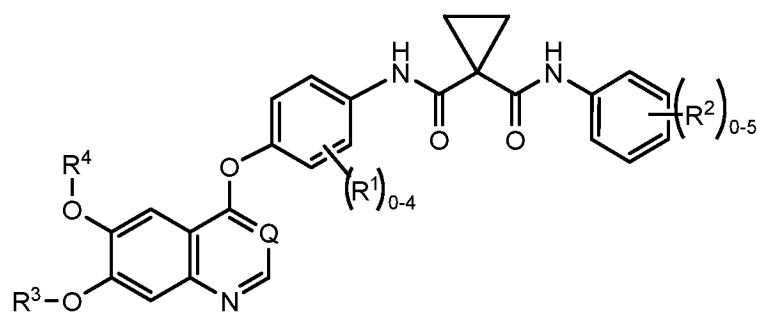
Сущность изобретения

[0005] Указанные и другие потребности удовлетворены настоящим изобретением, которое относится к способу лечения аденокарциномы легкого с применением ингибитора активности тирозинкиназы, в частности, активности киназы ROS1. Указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества соединения или его фармацевтически приемлемой соли, которое модулирует киназу ROS1 и/или химерный белок ROS1, пациенту, нуждающемуся в таком лечении. В одном из вариантов реализации аденокарцинома легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого (HMPЛ). Более конкретно, аденокарцинома легкого наиболее часто представляет собой позитивный по слиянию SLC34A2-ROS1 HMPЛ, позитивный по слиянию CD74-ROS1 HMPЛ, позитивный по слиянию FIG-ROS1 HMPЛ (например, CD74-ROS1, FIG-ROS1, FIG-

ROS1(L), FIG-ROS1(S) и FIG-ROS1(VL)) и HMPЛ, несущие другие известные химерные белки ROS1. У людей киназа ROS1 кодируется геном ROS1 на 6 хромосоме (6q22).

[0006] В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения HMPЛ у пациента, нуждающегося в таком лечении, включающему введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения или его фармацевтически приемлемой соли, которое одновременно модулирует ROS1 и/или химерный белок ROS1.

[0007] В одном из вариантов реализации указанного и других аспектов ингибитор киназы ROS1 или ингибитор химерной киназы ROS1 представляет собой соединение Формулы I:



I

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

R^1 представляет собой галоген;

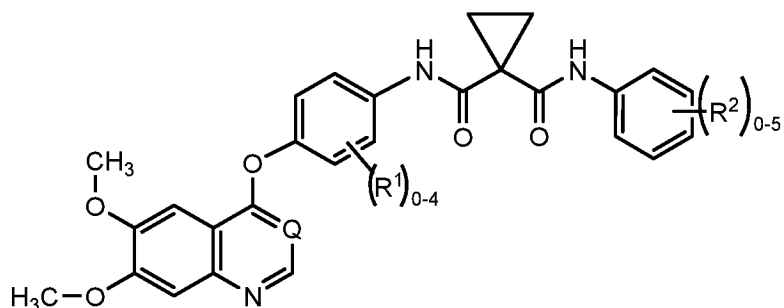
R^2 представляет собой галоген;

R^3 представляет собой (C_1-C_6) алкил;

R^4 представляет собой (C_1-C_6) алкил; и

Q представляет собой CH или N.

[0008] В другом варианте реализации соединение Формулы I представляет собой соединение Формулы Ia



Формула Ia

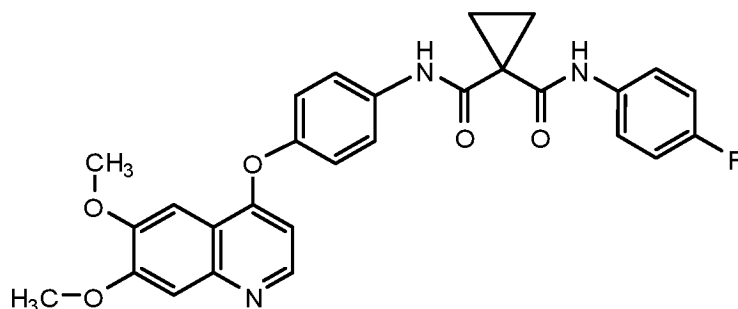
или его фармацевтически приемлемую соль, где:

R^1 представляет собой галоген;

R² представляет собой галоген; и

Q представляет собой CH или N.

[0009] В другом варианте реализации соединение Формулы I представляет собой соединение 1:



соединение 1

[0010] или его фармацевтически приемлемую соль. Соединение 1 известно как N-(4-{[6,7-бис(метилокси)хинолин-4-ил]окси}фенил)-N'-(4-фторфенил)циклопропан-1,1-дикарбоксамид и под названием кабозантиниб. 29 Ноября 2012 года S-малатная соль (т.е. L-малатная соль) N-{4-[(6,7-диметоксихинолин-4-ил)окси]фенил}-N'-(4-фторфенил)циклопропан-1,1-дикарбоксамида (также известная как кабозантиниб или COMETRIQ®) была одобрена Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США для лечения прогрессирующего метастатического медуллярного рака щитовидной железы (МТЦ). В декабре 2013 года Европейский Комитет по лекарственным препаратам для человека (CHMP) вынес положительное решение по заявке на регистрацию (МАН), представленной в Европейское агентство лекарственных средств, или ЕМА, для COMETRIQ, предназначенного для предлагаемого показания при прогрессирующем, нерезектабельном, местнораспространенном или метастатическом МТЦ. В настоящее время кабозантиниб оценивают в широкой программе развития, в том числе в непрерывных базовых клинических исследованиях фазы 3 при метастатическом почечно-клеточном раке (RCC) и распространенном гепатоцеллюлярном раке (HCC).

[0011] Соединение 1 представляет собой эффективный ингибитор c-MET, RET и VEGFR2. Yakes FM, Chen J, Tan J, Yamaguchi K, Shi Y, Yu P, Qian F, Chu F, Bentzien F, Cancilla B, Orf J, You A, Laird AD, Engst S, Lee L, Lesch J, Chou YC, Joly AH. Cabozantinib (XL184), a novel MET and VEGFR2 inhibitor, simultaneously suppresses metastasis, angiogenesis, and tumor growth. Mol Cancer Ther. 2011 Dec; 10(12):2298-308; Bentzien, F., Zuzow, M., Heald, N., Gibson, A., Shi, Y., Goon, L., Yu, P., Engst, S., Zhang, W., Huang, S., Zhao, L., Vysotskaia,

V., Chu, F., Bautista, R., Cancilla, B., Lamb, P., Joly, A. и Yakes, M. In vitro and in vivo activity of cabozantinib (XL184), an inhibitor of RET, MET, and VEGFR2, in a model of medullary thyroid cancer. *Thyroid*, 2013 (23) 1569-1577. В доклинических испытаниях ингибирование активности киназы, опосредованное соединением 1, обеспечивало быструю и устойчивую регрессию сосудистой системы опухоли, снижение инвазивности и метастазов опухоли, а также увеличение продолжительности выживания. Sennino B., Ishiguro-Oonuma T, Wei Y, Naylor RM, Williamson CW, Bhagwandin V, Tabruyn SP, You WK, Chapman HA, Christensen JG, Aftab DT, McDonald DM. (2012), "Suppression of tumor invasion and metastasis by concurrent inhibition of c-Met and VEGF signaling in pancreatic neuroendocrine tumors.", *Cancer Discovery*, 2(3):270-87 (публикация в электронном виде 02/24/2012).

[0012] В другом варианте реализации соединение Формулы I, Ia, соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят в виде фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемую добавку, разбавитель или вспомогательное вещество.

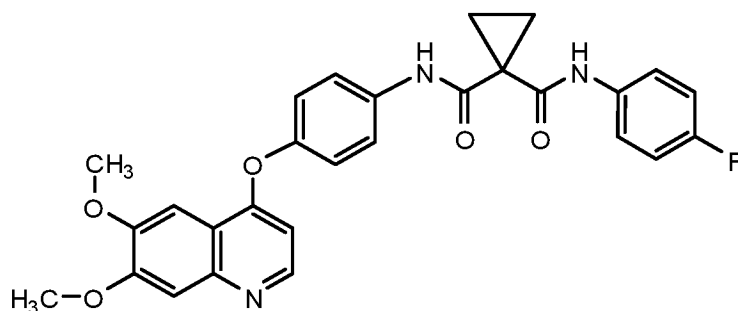
[0013] В одном из вариантов реализации соединение Формулы I, Ia или соединение 1, или его фармацевтически приемлемую соль вводят в виде фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемую добавку, разбавитель или вспомогательное вещество, для ингибирования онкогенных химерных киназ, затрагивающих тирозинкиназу рецептора-сироты ROS1, образующуюся в результате хромосомных перестроек, которые приводят к конститутивной активации активности киназы ROS1. Указанные химерной киназы ROS1 представляют собой мишень для ингибирования с применением соединения Формулы I, Ia или соединения 1, или его фармацевтически приемлемой соли. Указанные соединения могут быть введены в виде фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемую добавку, разбавитель или вспомогательное вещество, для лечения аденокарциномы легкого, например, немелкоклеточной карциномы легкого, несущей одну или более онкогенных химерных киназ ROS1.

[0014] В другом аспекте настоящего изобретения представлен способ ингибирования активности киназы ROS1 и/или химерной киназы ROS1 в одной или более клеточных линиях немелкоклеточного рака легкого или НМРЛ, включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей соединение Формулы I или малатную соль соединения Формулы I, или другую фармацевтически приемлемую соль соединения Формулы I, в указанные клеточные линии

немелкоклеточного рака легкого или HMPЛ, несущие киназу ROS1 и/или химерный полипептид ROS1.

[0015] В другом аспекте настоящего изобретения представлен способ обнаружения, диагностики и лечения позитивного по слиянию ROS1 HMPЛ, например, позитивного по слиянию SLC34A2-ROS1 HMPЛ, и других известных позитивных к слиянию ROS1 HMPЛ, включая химерные ROS1 CD74-ROS1, FIG-ROS1, FIG-ROS1(L), FIG-ROS1(S) и FIG-ROS1(VL), а также другие химерные белки ROS1, кодируемые у людей геном ROS1 на 6 хромосоме (см.: Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, Massion PP, Siwak-Tapp C, Gonzalez A, Fang R, Mark EJ, Batten JM, Chen H, Wilner KD, Kwak EL, Clark JW, Carbone DP, Ji H, Engelman JA, Mino-Kenudson M, Pao W, Iafrate AJ. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol.* 2012 Mar 10; 30(8):863-70), включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей соединение Формулы I или малатную соль соединения Формулы I, или другую фармацевтически приемлемую соль соединения Формулы I, пациенту, нуждающемуся в таком лечении. В конкретном варианте реализации соединение Формулы I представляет собой соединение 1 или малатную соль соединения 1, в частности, S-малатную соль соединения 1.

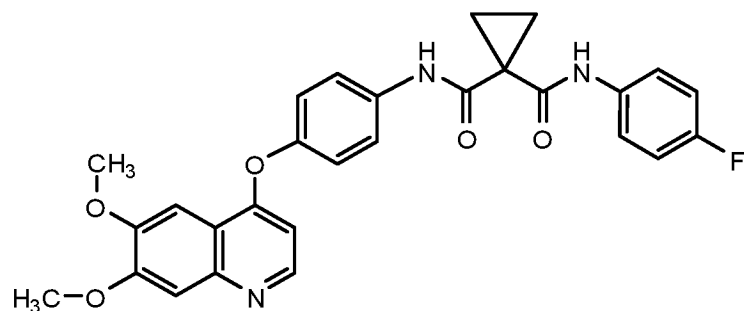
[0016] В другом аспекте настоящего изобретения представлен способ лечения аденокарциномы легкого, которая представляет собой позитивный по слиянию SLC34A2-ROS1 немелкоклеточный рак легкого, у пациента, нуждающегося в таком лечении, включающий введение пациенту эффективного количества соединения 1:



Соединение 1

или его фармацевтически приемлемую соль.

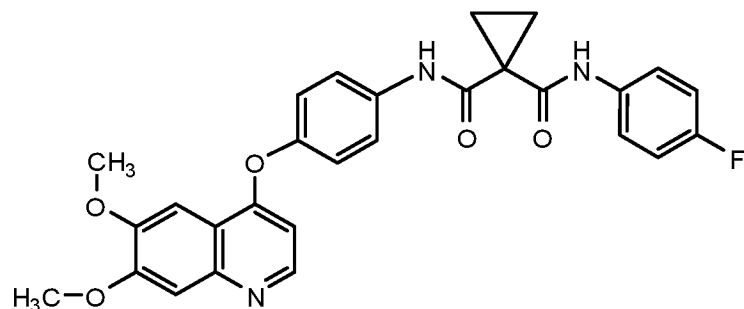
[0017] В другом аспекте настоящего изобретения представлен способ лечения аденокарциномы легкого, которая представляет собой позитивный по слиянию CD74-ROS1 немелкоклеточный рак легкого, у пациента, нуждающегося в таком лечении, включающий введение пациенту эффективного количества соединения 1:



Соединение 1

или его фармацевтически приемлемую соль.

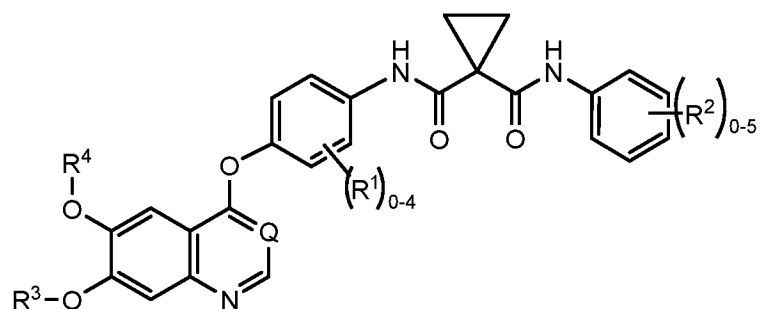
[0018] В другом аспекте настоящего изобретения представлен способ лечения аденокарциномы легкого, которая представляет собой позитивный по слиянию FIG-ROS1 немелкоклеточный рак легкого, у пациента, нуждающегося в таком лечении, включающий введение пациенту эффективного количества соединения 1:



Соединение 1

или его фармацевтически приемлемую соль.

[0019] В другом аспекте настоящего изобретения представлен способ ингибирования активности химерной киназы ROS1 в клетке НМРЛ, включающий приведение в контакт указанной клетки с эффективным количеством соединения Формулы I:



I

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

R¹ представляет собой галоген;

R² представляет собой галоген;

R³ представляет собой (C₁-C₆)алкил;

R⁴ представляет собой (C₁-C₆)алкил; и

Q представляет собой CH или N.

Краткое описание графических материалов

[0020] На фиг. 1 представлена графическая иллюстрация химерных белков ROS1, которые, как известно, существуют в образцах опухоли немелкоклеточной карциномы легкого (НМРЛ). Перестройка ROS1 при НМРЛ, глиобластоме и холангиокарциноме. CD74(L)/(S), кластер дифференцировки 74, длинные/короткие изоформы; EZR, эзрин; FIG, слитый в глиобластоме; LRIG3, богатые лейцином повторы и иммуноглобулиноподобные домены 3; ROS1 ТК, домен тирозинкиназы ROS1 с партнерами по слиянию; SDC4, синдекан-4; SLC34A2(L)/(S), семейство транспортера растворенных веществ 34 (фосфат натрия), 2 член, длинные/короткие изоформы; SDC4, синдекан-4; TPM3, тропомиозин 3. Номера экзонов E32, E34, E35 или E36 указывают положения разрыва ROS1. Красный прямоугольник обозначает трансмембранный домен, сохраненный в ROS1.

[0021] На фиг. 2 показано ингибирование фосфорилирования слияния SLC34A2-ROS1 *in vitro* в клетках НМРЛ HCC-78, в которые вводили однократные повышающиеся дозы соединения 1 или 3-[(1*R*)-1-(2,6-дихлор-3-фторфенил)этокси]-5-(1-пиперидин-4-илпирозол-4-ил)пиридин-2-амин (кризотиниб; XALKORI®).

[0022] На фиг. 3 представлена аминокислотная последовательность иллюстративного белка ROS1 человека, обозначенная в настоящем документе как SEQ ID NO: 1.

[0023] На фиг. 4 представлена иллюстративная аминокислотная последовательность домена киназы ROS1 человека, обозначенная в настоящем документе как SEQ ID NO: 2.

Подробное описание изобретения

Сокращения и определения

[0024] Следующие сокращения и термины имеют в настоящем описании указанные значения.

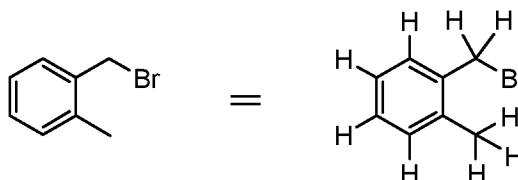
Сокращение	Значение
Ac	Ацетил
ш	Широкий
°C	Градусы Цельсия
цикло-	Цикло
CBZ	Карбобензоксид = бензилоксикарбонил

Сокращение	Значение
д	Дублет
дд	Дублет дублетов
дт	Дублет триплетов
ДХМ	Дихлорметан
DME	1,2-диметоксиэтан
ДМФА	<i>N,N</i> -Диметилформамид
ДМСО	диметилсульфоксид
ЭИ	Ионизация электронным ударом
г	грамм(-ы)
ч. или час	час(-ы)
ВЭЖХ	Жидкостная хроматография высокого давления
л	литр(-ы)
М	Молярный или молярность
м	Мультиплет
мг	Миллиграмм(-ы)
МГц	Мегагерц (частота)
Мин.	Минута(-ы)
мл	миллилитр(-ы)
мкл	микролитр(-ы)
мкМ	Микромоль(-и) или микромолярный
мМ	Миллимолярный
ммоль	Миллимоль(-и)
мол.	Моль(-и)
МС	Масс-спектральный анализ
н.	Нормальный или нормальность
нМ	Наномолярный
ЯМР	Спектроскопия ядерного магнитного резонанса
к	Квартет
комн. т-ра	Комнатная температура

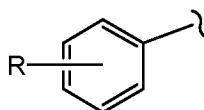
Сокращение	Значение
с	Синглет
т или тр	Триплет
ТФК	Трифторуксусная кислота
ТГФ	Тетрагидрофуран
ТСХ	Тонкослойная хроматография

[0025] Символ «-» означает одинарную связь, «=» означает двойную связь.

[0026] При изображении или описании химических структур, если однозначно не указано иное, все атомы углерода считаются имеющими водородные заместители для соответствия валентности, равной четырем. Например, в структуре в левой части схематического изображения, представленного ниже, присутствуют девять атомов водорода. Эти девять атомов водорода изображены в правой структуре. Иногда определенный атом в структуре описан текстовой формулой как имеющий в качестве заместителей атом или атомы водорода (явно указанный водород), например, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$. Специалистам в данной области техники понятно, что вышеуказанный описательный прием общепринят в области химии для обеспечения краткого и простого описания сложных в противном случае структур.

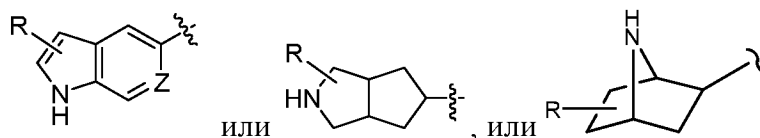


[0027] Если группа «R» изображена в кольцевой системе как «плавающая», как, например, в формуле:

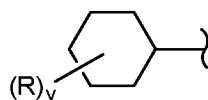


то, если не указано иное, заместитель «R» может занимать любой атом кольцевой системы, подразумевая замещение изображенного, подразумеваемого или явно определенного водорода у одного из кольцевых атомов, при условии образования устойчивой структуры.

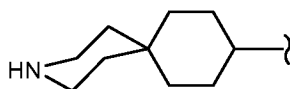
[0028] Если группа «R» изображена плавающей в конденсированной кольцевой системе, как, например, в формулах:



то, если не указано иное, заместитель «R» может занимать любой атом конденсированной кольцевой системы, подразумевая замещение изображенного атома водорода (например, -NH- в представленной выше формуле), подразумеваемого атома водорода (например, как в представленной выше формуле, где атомы водорода не показаны, но подразумеваются присутствующими), или явно определенного атома водорода (например, если в представленной выше формуле «Z» равен =CH-) у одного из кольцевых атомов, при условии образования устойчивой структуры. В изображенном примере группа «R» может находиться в 5-членном или 6-членном кольце конденсированной кольцевой системе. Если группа «R» изображена как существующая в кольцевой системе, содержащей насыщенные атомы углерода, как, например, в формуле:



причем в этом примере «у» может быть равным более одного, подразумевая, что каждый из них замещает изображенный, подразумеваемый или явно определенный водород в кольце; то, если не указано иное, при условии устойчивости образующейся структуры, два «R» могут находиться у одного атома углерода. Простым примером является случай, когда R представляет собой метиловую группу; у углерода изображенного кольца («кольцевого» углерода) может существовать геминальный диметил. В другом примере, два R у одного атома углерода, включая этот атом углерода, могут образовывать кольцо, создавая, таким образом, спироциклическую кольцевую («спироциклильную» группу) структуру, с кольцом, изображенным, например, в формуле:



[0029] «Галоген» или «гало» относится к фтору, хлору, бромю или йоду.

[0030] В данном контексте белок или полипептид «ROS1» включает белок киназы ROS1 млекопитающего, например, ROS1 человека (кодируемый геном ROS1), который представляет собой рецепторную тирозинкиназу длиной 2347 аминокислот, склонную к aberrantной экспрессии, приводящей к раку. Описание полноразмерной киназы ROS1 человека (с аминокислотной последовательностью белка ROS1 человека) представлено в

UniProt с номером доступа P08922. Кроме того, существует множество известных природных вариантов ROS1 (см., например, Greenman et al., *Nature* 446: 153-158, 2007). Известные нуклеотидные и аминокислотные последовательности полноразмерной ROS1 мышей (см., например, UniProt с номером доступа Q78DX7). С помощью обычного экспериментирования опытный биолог может легко определить соответствующие последовательности в гомологах ROS1 млекопитающих, не являющихся человеком.

[0031] ROS1 «дикого типа» означает полноразмерную киназу ROS1 (т.е. для человеческой ROS1 полипептид длиной 2347 аминокислот (SEQ ID NO:1) или полипептид длиной 2320 аминокислот (зрелая последовательность) после удаления последовательности сигнального пептида) в здоровой (или нормальной) ткани (например, нераковой ткани) нормального индивидуума (т.е. нормального индивидуума, не страдающего от рака). Киназа ROS1 (полноразмерная или усеченная) не экспрессируется в нормальной легочной ткани человека. Однако с помощью способов, описанных ниже, авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили специфическое ингибирование киназы ROS1 в клетках рака легкого с применением соединений, описанных в настоящем документе. Такая экспрессия в атипичной клетке (в данном случае раковой клетке), если в типичной клетке не наблюдают экспрессии (например, в нераковой клетке легкого), является aberrантной.

[0032] Aberrантно экспрессируемая киназа ROS1, в форме слияния с другим белком, например, SLC34A2, CD74 или FIG, описана в глиобластоме (см. Charest et al., Charest et al., *Genes Chromosomes Cancer* 37: 58-71, 2003; Charest et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 916-921, 2003), раке печени (см., например, публикацию PCT № WO2010/093928) и в раке желчного протока (см. Gu et al., *PLOS one* 2011 Jan 6;6(1):e15640. doi: 10.1371/journal.pone.0015640), а также в аденокарциноме HMPЛ (см. Kurtis D. Davies et al. *Identifying and Targeting ROS1 Gene Fusions in Non-Small Cell Lung Cancer*, *Clin Cancer Res.* 2012 September 1; 18(17): 4570–4579).

[0033] В данном контексте термин «слияние ROS1» относится к части полипептида ROS1, содержащей киназный домен белка ROS1 (или полинуклеотид, кодирующий его), конденсированной с целым или частью другого полипептида (или полинуклеотида, кодирующего его), где название второго полипептида или полинуклеотида указано в названии слияния. (Термин «слияние» означает просто целый или часть полипептида или полинуклеотида из первого гена, конденсированного с целым или частью полипептида или полинуклеотида из второго гена). Например, слияние SLC34A2-ROS1 представляет собой слияние между частью полипептида SLC34A2 (или полинуклеотида, кодирующего

его) и частью полипептида ROS1 (или полинуклеотида, кодирующего его), содержащего киназный домен ROS1. Слияние ROS1 зачастую возникает вследствие хромосомной транслокации или инверсии. Существует множество известных слияний ROS1, которые представляют собой слияния ROS1 согласно настоящему изобретению, и включают, без ограничения, химерные белки SLC34A2-ROS1, члены которого включают SLC34A2-ROS1(VS), SLC34A2-ROS1(S), SLC34A2-ROS1(L) (см. публикацию патента США № 20100143918), CD74-ROS1 (см. публикацию патента США № 20100221737) и химерные белки FIG-ROS1, члены которого включают FIG-ROS1(S), FIG-ROS1(L) и FIG-ROS1(XL) (см. публикацию PCT № WO2010/093928), описание которых включено в настоящий документ в полном объеме. Обозначение (L), (S), (VS), (VL) (XS) или (XL) после полипептида ROS1 или слияния ROS1 относится, в целом, к длинному, короткому, очень короткому, очень длинному, сверхкороткому и сверхдлинному полипептиду или полинуклеотиду ROS1, соответственно.

[0034] Все известные химерные белки ROS1 содержат полный домен киназы полноразмерной ROS1. Таким образом, в данном контексте «полипептид с активностью киназы ROS1» (или «полипептид, имеющий активность киназы ROS1») означает белок (или полипептид), который содержит полный домен киназы или полноразмерный белок ROS1 и, следовательно, сохраняет активность киназы ROS1. Неограничивающие примеры белков с активностью киназы ROS1 включают, без ограничения, полноразмерный белок ROS1, химерные белки SLC34A2-ROS1, члены которых включают SLC34A2-ROS1(VS), SLC34A2-ROS1(S), SLC34A2-ROS1(L) (см. публикацию патента США № 20100143918), CD74-ROS1 (см. публикацию патента США № 20100221737) и химерные белки FIG-ROS1, члены которого включают FIG-ROS1(S), FIG-ROS1(L) и FIG-ROS1(XL) (см. публикацию PCT № WO2010/093928), и любые усеченные или мутантные формы киназы ROS1, которые сохраняют домен киназы полноразмерного белка киназы ROS1.

Иллюстративный домен киназы ROS1 представлен в SEQ ID NO: 2, «полипептид с активностью киназы ROS1» представляет собой полипептид, аминокислотная последовательность которого содержит SEQ ID NO: 2, или ее часть с активностью киназы.

[0035] В данном контексте «полипептид» (или «аминокислотная последовательность» или «белок») относится к полимеру, образованному в результате связывания в определенном порядке, предпочтительно, α-аминокислот, D-, L-аминокислот и их комбинаций. Связь между одним аминокислотным остатком и следующим остатком называют амидной связью или пептидной связью. Неограничивающие примеры полипептидов включают последовательности олигопептидов, пептидов, полипептидов или белков и их фрагментов

или частей, а также природные или синтетические молекулы. Полипептиды включают также дериватизованные молекулы, такие как гликопротеины и липопротеины, а также низкомолекулярные полипептиды. «Аминокислотная последовательность» и подобные термины, такие как «полипептид» или «белок» не предназначены для ограничения указанной аминокислотной последовательности до полной, нативной аминокислотной последовательности, связанной с упомянутой молекулой белка.

[0036] В данной области техники понимают, что некоторые аминокислотные последовательности полипептида согласно настоящему изобретению могут быть изменены без существенного изменения структуры или функции мутантного белка. Если такие различия в последовательности являются предусмотренными, то следует помнить, что существуют критические области белка, которые определяют активность (например, киназный домен ROS1). В целом, могут быть заменены остатки, которые образуют третичную структуру, при условии использования остатков, выполняющих аналогичную функцию. В других случаях тип остатка может быть совершенно неважен, если изменение происходит в некритичной области белка.

[0037] Так, полипептид с активностью ROS1 согласно настоящему изобретению дополнительно включает варианты полноразмерного белка ROS1 или различные химерные полипептиды ROS1, описанные в настоящем документе, которые демонстрируют существенную активность киназы ROS1. Некоторые неограничивающие консервативные замещения включают замену одного на другое, среди алифатических аминокислот Ala, Val, Leu и Ile; замену гидроксильных остатков Ser и Thr; замену кислотных остатков Asp и Glu; замену амидных остатков Asn и Gln; замену основных остатков Lys и Arg; и замену ароматических остатков Phe и Tyr. Дополнительные примеры консервативных замен аминокислот, известные специалистам в данной области техники, представляют собой: ароматические: фенилаланин триптофан тирозин (например, остаток триптофана заменен фенилаланином); гидрофобные: лейцин изолейцин валин; полярные: глутамин аспарагин; основные: аргинин лизин гистидин; кислотные: аспарагиновая кислота глутаминовая кислота; небольшие: аланин серин треонин метионин глицин. Как подробно описано выше, дополнительное руководство, в соответствии с которым аминокислотные замены вероятно будут фенотипически молчащими (т.е. маловероятно будут оказывать существенный неблагоприятный эффект на функцию), представлено в публикации Bowie et al., Science 247, supra.

[0038] «SLC34A2» может относиться к натрийзависимому белку-переносчику фосфата 2В, кодируемому белком гена человека SLC34A2 или геном SLC34A2. Человеческий

белок SLC34A2 (изоформа А, которая имеет номер доступа NCBI NP_001171469) представляет собой белок длиной 689 аминокислот. SLC34A2 описан далее в настоящем документе.

[0039] CD74 также называют гамма-цепью антигена гистосовместимости HLA класса II, также известную как инвариантная цепь, ассоциированная с антигенами HLA-DR, или CD74 (кластер дифференцировки 74), и представляет собой белок, который у людей кодируется геном CD74. Иллюстративный человеческий белок CD74 имеет номер доступа NCBI NP_001020329 и номер доступа мРНК NM_001025158. CD74 имеет 160 аминокислот и кодируется геном CD74, расположенным в 5 хромосоме (5q32). CD74 имеет 9 экзонов. CD74 описан далее в настоящем документе.

[0040] Белок FIG (слитый в глиобластоме) называют также «ассоциированным с комплексом Гольджи PDZ и содержащим суперспиральный мотив» или белком «GOPC», и он кодируется геном, расположенным в хромосоме 6 в положении 6q21. Указанный белок у человека имеет 462 аминокислоты. FIG имеет 3 изоформы, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга. Иллюстративный человеческий белок FIG, упомянутый в настоящем изобретении, имеет идентификатор UniProtKB Q9HD26-1.

[0041] «Химерный белок или ген SLC34A2-ROS1» относится к соматическим генным слияниям партнеров SLC34A2 и ROS1. В некоторых вариантах реализации химерный белок SLC34A2-ROS1 содержит N-концевой домен партнера по слиянию, такого как SLC34A2, и С-концевой киназный домен белка ROS1. N-концевой домен партнера по слиянию может быть расположен на N-конце химерного белка, а С-концевой киназный домен белка ROS1 может быть расположен на С-конце химерного белка. Партнер по слиянию может представлять собой N-концевой домен белка SLC34A2, расположенный на N-конце химерного белка. В таком случае химерный белок может быть представлен как белок SLC34A2-ROS1, который содержит N-концевой домен белка SLC34A2 на N-конце и С-концевой киназный домен белка ROS1 на С-конце. В другом варианте реализации представлен химерный ген, кодирующий химерный белок, где ген, кодирующий N-концевой домен партнера по слиянию, расположен на 5'-конце, а ген, кодирующий С-концевой киназный домен белка ROS1, расположен на 3'-конце. В некоторых вариантах реализации части белка SLC34A2 слиты в рамке с частями белка ROS1, содержащими функциональный киназный домен, в результате абберрантной хромосомной транслокации, что приводит к хромосомной перестройке ROS1 с SLC34A2. В некоторых вариантах реализации химерный белок SLC34A2-ROS1 может содержать слияние SLC34A2 экзон 4-ROS1 экзон 32. В некоторых вариантах реализации химерный белок SLC34A2-ROS1

может содержать слияние SLC34A2 экзон 4-ROS1 экзон 34. Химерный белок или ген SLC34A2-ROS1, имеющий функциональный киназный домен ROS1, в соответствии с настоящим изобретением, может содержать другие точечные разрывы, затрагивающие двух партнеров по транслокации SLC34A2 и ROS1. Иллюстративные химерные белки SLC34A2-ROS1 представлены в каталоге соматических мутаций при раке COSMIC, в базе данных версии 68, на странице cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0042] «Химерный белок или ген CD74-ROS1» относится к соматическим генным слияниям партнеров CD74 и ROS1. Иллюстративные химерные белки CD74-ROS1 представлены в каталоге соматических мутаций при раке COSMIC, в базе данных версии 68, на странице cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0043] «Химерный белок или ген FIG-ROS1» относится к соматическим генным слияниям партнеров FIG и ROS1. В некоторых вариантах реализации внутрихромосомная гомозиготная делеция 240 тыс. оснований в 6 хромосоме человека, в положении 6q21, отвечает за образование локуса FIG-ROS1. В некоторых вариантах реализации транскрипт FIG-ROS1 кодируется 7 экзонами FIG и 9 экзонами, полученными из ROS1. В некоторых вариантах реализации ген FIG-ROS1 кодирует белок внутрирамочного слияния с конститутивно активным и функциональным кинасным доменом ROS1. Иллюстративные химерные белки FIG-ROS1 представлены в каталоге соматических мутаций при раке COSMIC, в базе данных версии 68, на странице cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0044] «Пациент», для целей настоящего изобретения, включает людей и других животных, в частности, млекопитающих, и другие организмы. Следовательно, представленные способы применимы как для лечения людей, так и для ветеринарных применений. В другом варианте реализации пациент представляет собой млекопитающее, и в другом варианте реализации пациент представляет собой человека.

[0045] «Фармацевтически приемлемая соль» соединения означает соль, которая является фармацевтически приемлемой и которая обладает требуемой фармакологической активностью исходного соединения. Понимается, что фармацевтически приемлемые соли являются нетоксичными. Дополнительная информация о подходящих фармацевтически приемлемых солях представлена в публикации *Remington, Pharmaceutical Sciences*, 17^{ое} изд., Mack Publishing Company, Истон, штат Пенсильвания, 1985, содержание которой

включено в настоящий документ посредством ссылки, или в публикации S. M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts," J. Pharm. Sci., 1977; 66:1-19, и содержание обеих публикаций включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0046] Примеры фармацевтически приемлемых солей присоединения кислот включают соли, образованные с неорганическими кислотами, такими как хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, серная кислота, азотная кислота, фосфорная кислота и т.п.; а также с органическими кислотами, такими как уксусная кислота, трифторуксусная кислота, пропионовая кислота, гексановая кислота, циклопентанпропионовая кислота, гликолевая кислота, пировиноградная кислота, молочная кислота, щавелевая кислота, малеиновая кислота, малоновая кислота, янтарная кислота, фумаровая кислота, винная кислота, яблочная кислота, лимонная кислота, бензойная кислота, коричная кислота, 3-(4-гидроксibenзоил)бензойная кислота, миндальная кислота, метансульфоновая кислота, этансульфоновая кислота, 1,2-этандисульфоновая кислота, 2-гидроксиэтансульфоновая кислота, бензолсульфоновая кислота, 4-хлорбензолсульфоновая кислота, 2-нафталинсульфоновая кислота, 4-толуолсульфоновая кислота, камфорсульфоновая кислота, глюкогептоновая кислота, 4,4'-метиленбис-(3-гидрокси-2-ен-1-карбоновая кислота), 3-фенилпропионовая кислота, триметилуксусная кислота, трет-бутилуксусная кислота, лаурилсерная кислота, глюконовая кислота, глутаминовая кислота, гидроксинафтойная кислота, салициловая кислота, стеариновая кислота, муконовая кислота, п-толуолсульфоновая кислота и салициловая кислота, и т.п.

[0047] «Пролекарство» относится к соединениям, которые преобразуются (обычно быстро) *in vivo* с образованием исходного соединения представленных выше формул, например, посредством гидролиза в крови. Общие примеры включают, но не ограничиваются ими, сложноэфирные и амидные формы соединения, имеющего активную форму, содержащую группу карбоновой кислоты. Примеры фармацевтически приемлемых сложных эфиров соединений настоящего изобретения включают, но не ограничиваются ими, алкиловые эфиры (например, содержащие от около одного до около шести атомов углерода), где алкильная группа имеет прямое или разветвленное строение. Приемлемые сложные эфиры включают также циклоалкиловые сложные эфиры и арилалкиловые сложные эфиры, такие как, но не ограничиваясь им, бензил. Примеры фармацевтически приемлемых амидов соединений настоящего изобретения включают, но не ограничиваются ими, первичные амиды и вторичные и третичные алкиловые амиды (например, содержащие от около одного до около шести атомов углерода). Амиды и

сложные эфиры соединений настоящего изобретения могут быть получены по стандартным способам. Полный обзор пролекарств представлен в публикации T. Higuchi и V. Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems," том 14 A.C.S. Symposium Series, и в Bioreversible Carriers in Drug Design, ред. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, которые включены в настоящий документ посредством ссылки для всех целей.

[0048] «ROS1» или «белок ROS1» представляет собой трансмембранную рецепторную тирозинкиназу и дополнительно описан в настоящем документе.

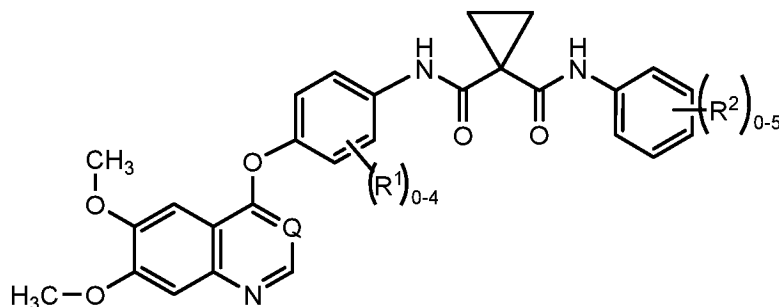
[0049] «Терапевтически эффективное количество» означает количество соединения согласно настоящему изобретению, которое при введении пациенту облегчает симптом заболевания. Терапевтически эффективное количество включает количество соединения, используемого отдельно или в комбинации с другими активными ингредиентами, эффективное для модулирования c-Met и/или VEGFR2, или эффективное для лечения или предупреждения рака. Количество соединения в соответствии с настоящим изобретением, которое составляет «терапевтически эффективное количество», меняется в зависимости от соединения, болезненного состояния и его тяжести, возраста пациента, подлежащего лечению, и т. п. Терапевтически эффективное количество может быть определено специалистом в данной области техники, с применением его знаний и настоящего описания.

[0050] «Лечить» или «лечение» заболевания, расстройства или синдрома в данном контексте включает (i) предупреждение возникновения заболевания, расстройства или синдрома у человека, т.е. предотвращение развития клинических симптомов заболевания, расстройства или синдрома у животного, который может быть подвержен или предрасположен заболеванию, расстройству или синдрому, но еще не испытывает или не проявляет симптомов заболевания, расстройства или синдрома; (ii) реверсирование или замедление заболевания, расстройства или синдрома, т.е. остановку его развития; и (iii) облегчение заболевания, расстройства или синдром, т.е. инициацию регрессии заболевания, расстройства или синдрома. Как известно в данной области техники, может быть необходима поправка на системную доставку вместо локализованной доставки, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол, питание, время введения, взаимодействие лекарств и тяжесть состояния, и она может быть установлена обычным экспериментированием.

[0051] «Выход» для каждой реакции, описанной в настоящем документе, выражен в процентах от теоретического выхода.

Варианты реализации изобретения

[0052] В одном из вариантов реализации соединение Формулы I представляет собой соединение Формулы Ia:



Формула Ia

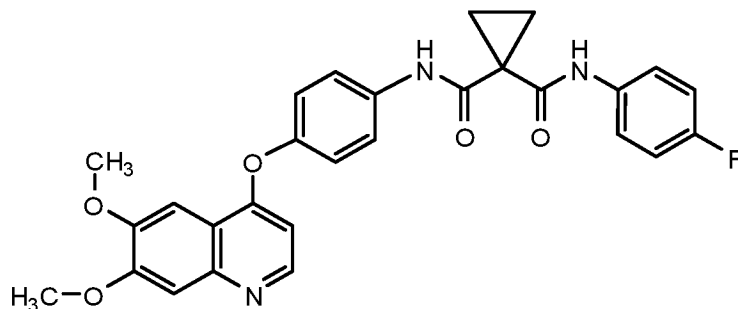
или его фармацевтически приемлемую соль, где:

R¹ представляет собой галоген;

R² представляет собой галоген; и

Q представляет собой CH или N.

[0053] В другом варианте реализации соединение Формулы I представляет собой соединение 1:



Соединение 1

или его фармацевтически приемлемую соль. Как указано ранее, соединение 1 упомянуто в настоящем документе как N-(4-{[6,7-бис(метилокси)хинолин-4-ил]окси}фенил)-N'-(4-фторфенил)циклопропан-1,1-дикарбоксамид. В WO 2005/030140, включенном в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме, описано соединение 1 и описан способ его получения (WO 2005/030140, пример 12, 37, 38 и 48), а также описана терапевтическая активность указанного соединения для ингибирования, регулирования и/или модулирования передачи сигналов киназ (WO 2005/030140, Анализ, таблица 4, строка 289). Пример 48 представлен в параграфе [0353] WO 2005/030140.

[0054] В других вариантах реализации соединение Формулы I, Ia или соединение 1, или его фармацевтически приемлемую соль вводят в виде фармацевтической композиции, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество или разбавитель. В конкретном варианте реализации соединение Формулы I представляет собой соединение 1.

[0055] Соединение Формулы I, Формулы Ia и соединение I, описанные в настоящем документе, включают указанные соединения, а также их отдельные изомеры и смеси. В каждом случае соединение Формулы I включает фармацевтически приемлемые соли, гидраты и/или сольваты указанных соединений и любые отдельные изомеры или смесь изомеров.

[0056] В других вариантах реализации соединение Формулы I, Ia или соединение 1 может представлять собой (L)-малатную соль. Малатная соль соединения Формулы I и соединения 1 описана в PCT/US2010/021194 и USSN 61/325095, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0057] В других вариантах реализации соединение Формулы I представляет собой (D)-малатную соль, которая упомянута также как R-малатная соль.

[0058] В других вариантах реализации соединение Формулы Ia представляет собой малатную соль.

[0059] В других вариантах реализации соединение Формулы Ia представляет собой (L)-малатную соль, которая упомянута также как S-малатная соль.

[0060] В других вариантах реализации соединение 1 представляет собой (D)-малатную соль, которая упомянута также как S-малатная соль.

[0061] В других вариантах реализации соединение 1 представляет собой малатную соль.

[0062] В других вариантах реализации соединение 1 представляет собой (L)-малатную соль, которая упомянута также как S-малатная соль.

[0063] В другом варианте реализации малатная соль представлена в кристаллической форме N-1 или в форме N-2 (L)-малатной соли и/или (D)-малатной соли соединения 1, как описано в заявке на патент США с серийным № 61/325095. См. также WO 2008/083319, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки, где описаны свойства кристаллических энантиомеров, включая кристаллические формы N-1 и/или N-2 малатной соли соединения 1. Способы получения и описания таких форм подробно описаны в PCT/US10/021194, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0064] В другом варианте реализации настоящее изобретение относится к способу реверсирования или ингибирования НМРЛ, включающему введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества соединения Формулы I или его фармацевтически приемлемой соли в любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе. В конкретном варианте реализации соединение Формулы I представляет собой соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль.

[0065] В другом варианте реализации настоящее изобретение относится к способу реверсирования или ингибирования позитивной к слиянию SLC34A2-ROS1 НМРЛ, включающему введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества соединения Формулы I или его фармацевтически приемлемой соли в любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе. В конкретном варианте реализации соединение Формулы I представляет собой соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль.

[0066] В другом варианте реализации настоящее изобретение относится к способу реверсирования или ингибирования позитивной к слиянию CD74-ROS1 НМРЛ, включающему введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества соединения Формулы I или его фармацевтически приемлемой соли в любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе. В конкретном варианте реализации соединение Формулы I представляет собой соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль.

[0067] В другом варианте реализации настоящее изобретение относится к способу реверсирования или ингибирования позитивной к слиянию FIG-ROS1 НМРЛ, включающему введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества соединения Формулы I или его фармацевтически приемлемой соли в любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе. В конкретном варианте реализации соединение Формулы I представляет собой соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль.

[0068] В другом варианте реализации соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемую соль вводят до, одновременно или после одного или более других способов лечения. В другом варианте реализации соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемую соль вводят после одного или более способов лечения. «Лечение» означает любой из вариантов лечения, доступных для опытного специалиста, включая хирургическое вмешательство, химиотерапевтические агенты, гормональные терапии,

антитела, иммунотерапии, терапию с радиоактивным йодом и облучение. В частности, «лечение» означает другой химиотерапевтический агент или антитело.

[0069] Так, в другом варианте реализации соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения цисплатином и/или гемцитабином.

[0070] В другом варианте реализации соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения доцетакселем.

[0071] В другом варианте реализации соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения антителом HER-2. В другом варианте реализации антитело HER-2 представляет собой трастузумаб.

[0072] В другом варианте реализации соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения цисплатином и/или гемцитабином, и/или доцетакселем.

[0073] В другом варианте реализации соединение Формулы I, Ia или соединение 1, или его фармацевтически приемлемую соль вводят перорально один раз в сутки в виде таблетки или капсулы. В этих и других вариантах реализации соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль.

[0074] В другом варианте реализации соединение 1 вводят перорально в форме свободного основания или его малатной соли в виде капсулы или таблетки.

[0075] В другом варианте реализации соединение 1 вводят перорально один раз в сутки в форме свободного основания или его малатной соли в виде капсулы или таблетки, содержащей до 100 мг соединения 1.

[0076] В другом варианте реализации соединение 1 вводят перорально один раз в сутки в форме свободного основания или его малатной соли в виде капсулы или таблетки, содержащей 100 мг соединения 1.

[0077] В другом варианте реализации соединение 1 вводят перорально один раз в сутки в форме свободного основания или его малатной соли в виде капсулы или таблетки, содержащей 95 мг соединения 1.

[0078] В другом варианте реализации соединение 1 вводят перорально один раз в сутки в форме свободного основания или его малатной соли в виде капсулы или таблетки, содержащей 90 мг соединения 1.

[0090] В другом варианте реализации соединение 1 вводят перорально один раз в сутки в форме свободного основания или его малатной соли в виде капсулы или таблетки, содержащей 30 мг соединения 1.

[0091] В другом варианте реализации соединение 1 вводят перорально один раз в сутки в форме свободного основания или его малатной соли в виде капсулы или таблетки, содержащей 25 мг соединения 1.

[0092] В другом варианте реализации соединение 1 вводят перорально один раз в сутки в форме свободного основания или его малатной соли в виде капсулы или таблетки, содержащей 20 мг соединения 1.

[0093] В другом варианте реализации соединение 1 вводят перорально один раз в сутки в форме свободного основания или его малатной соли в виде капсулы или таблетки, содержащей 15 мг соединения 1.

[0094] В другом варианте реализации соединение 1 вводят перорально один раз в сутки в форме свободного основания или его малатной соли в виде капсулы или таблетки, содержащей 10 мг соединения 1.

[0095] В другом варианте реализации соединение 1 вводят перорально один раз в сутки в форме свободного основания или его малатной соли в виде капсулы или таблетки, содержащей 5 мг соединения 1.

[0096] В другом варианте реализации соединение 1 вводят в форме свободного основания или малатной соли перорально один раз в сутки в виде таблетки, как показано в следующей таблице.

Ингредиент	(% масс./масс. с.)
Соединение 1	31,68
Микrokристаллическая целлюлоза	38,85
Безводная лактоза	19,42
Гидроксипропилцеллюлоза	3,00
Кроскармеллоза натрия	3,00
Общее содержание внутригранулярных компонентов	95,95
Диоксид кремния, коллоидный	0,30
Кроскармеллоза натрия	3,00
Стеарат магния	0,75
Всего	100,00

[0097] В другом варианте реализации соединение 1 вводят перорально в форме свободного основания или малатной соли один раз в сутки в виде таблетки, как показано в следующей таблице.

Ингредиент	(% масс./масс.)
Соединение 1	25,0-33,3
Микrokристаллическая целлюлоза	в достаточном количестве
Гидроксипропилцеллюлоза	3
Полоксамер	0-3
Кроскармеллоза натрия	6,0
Коллоидный диоксид кремния	0,5
Стеарат магния	0,5-1,0
Всего	100

[0098] В другом варианте реализации соединение 1 вводят перорально в форме свободного основания или малатной соли один раз в сутки в виде таблетки, как показано в следующей таблице.

Ингредиент	Теоретическое количество (мг/разовая доза)
Соединение 1	100,0
Микрокристаллическая целлюлоза РН-102	155,4
Лактоза 60М, безводная	77,7
Гидроксипропилцеллюлоза, EXF	12,0
Кроскармеллоза натрия	24
Коллоидный диоксид кремния	1,2
Стеарат магния (не бычий)	3,0
Опадрай желтый	16,0
Всего	416

[0099] Любые составы таблеток, представленные выше, могут быть подобраны в соответствии с необходимой дозой соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли. Таким образом, количество каждого из ингредиентов состава можно пропорционально регулировать для получения таблетированного состава, содержащего различные количества соединения 1, как это предусмотрено в предыдущих абзацах. В другом варианте реализации составы могут содержать 20, 40, 60 или 80 мг соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли.

[00100] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения представлен способ ингибирования или реверсирования прогресса патологического клеточного роста у млекопитающего, включающий введение соединения Формулы I или его фармацевтически приемлемой соли, где патологический клеточный рост представляет собой рак, опосредованный химерным белком ROS1, например, химерным белком SLC34A2-ROS1, химерным белком CD74-ROS1, химерным белком FIG-ROS1, химерным белком FIG-ROS1(L), химерным белком FIG-ROS1(S) и химерным белком FIG-ROS1(VL), а также другими химерными белками ROS1, содержащими функциональный С-концевой киназный домен ROS1 и кодируемыми у человека геном ROS1 в 6 хромосоме (6q22). В

одном из вариантов реализации рак представляет собой аденокарциному легкого. В другом варианте реализации аденокарцинома легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого. В другом варианте реализации аденокарцинома легкого представляет собой позитивный по слиянию SLC34A2-ROS1 немелкоклеточный рак легкого. В другом варианте реализации аденокарцинома легкого представляет собой позитивный по слиянию CD74-ROS1 немелкоклеточный рак легкого. В другом варианте реализации аденокарцинома легкого представляет собой позитивный по слиянию FIG-ROS1 немелкоклеточный рак легкого. В другом варианте реализации аденокарцинома легкого представляет собой позитивный по слиянию ROS1 немелкоклеточный рак легкого. В другом варианте реализации соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемую соль вводят в виде фармацевтической композиции, содержащей соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель. В другом варианте реализации соединение Формулы I вводят после другой формы лечения. В другом варианте реализации соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения цисплатином и/или гемцитабином. В другом варианте реализации соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения карбоплатином и/или гемцитабином. В другом варианте реализации соединение Формулы I вводят после лечения кризотинибом. В другом варианте реализации соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения кризотинибом и/или гемцитабином. В другом варианте реализации соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения доцетакселем. В другом варианте реализации соединение Формулы I вводят после лечения карбоплатином. В другом варианте реализации соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения цисплатином и/или гемцитабином, и/или доцетакселем. В другом варианте реализации соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения карбоплатином и/или гемцитабином, и/или доцетакселем. В другом варианте реализации соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения кризотинибом и/или гемцитабином, и/или доцетакселем.

[00101] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения представлен способ ингибирования или реверсирования прогресса патологического клеточного роста у млекопитающего, включающий введение соединения Формулы Ia или его фармацевтически приемлемой соли, где патологический клеточный рост представляет

собой рак, опосредованный химерным белком ROS1, например, химерным белком SLC34A2-ROS1, химерным белком CD74-ROS1, химерным белком FIG-ROS1, химерным белком FIG-ROS1(L), химерным белком FIG-ROS1(S) и химерным белком FIG-ROS1(VL), а также другими химерными белками ROS1, содержащими функциональный С-концевой киназный домен ROS1 и кодируемыми у человека геном ROS1 в 6 хромосоме (6q22). В одном из вариантов реализации рак представляет собой аденокарциному легкого. В другом варианте реализации аденокарцинома легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого. В другом варианте реализации аденокарцинома легкого представляет собой позитивный по слиянию SLC34A2-ROS1 немелкоклеточный рак легкого. В другом варианте реализации аденокарцинома легкого представляет собой позитивный по слиянию CD74-ROS1 немелкоклеточный рак легкого. В другом варианте реализации аденокарцинома легкого представляет собой позитивный по слиянию FIG-ROS1 немелкоклеточный рак легкого. В другом варианте реализации аденокарцинома легкого представляет собой позитивный по слиянию ROS1 немелкоклеточный рак легкого. В другом варианте реализации соединение Формулы Ia или его фармацевтически приемлемую соль вводят в виде фармацевтической композиции, содержащей соединение Формулы Ia или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель. В другом варианте реализации соединение Формулы Ia вводят после другой формы лечения. В другом варианте реализации соединение Формулы Ia или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения цисплатином и/или гемцитабином. В другом варианте реализации соединение Формулы Ia или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения доцетакселом. В другом варианте реализации соединение Формулы Ia или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения цисплатином и/или гемцитабином, и/или доцетакселом. В другом варианте реализации соединение Формулы Ia или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения карбоплатином и/или гемцитабином. В другом варианте реализации соединение Формулы Ia или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения кризотинибом. В другом варианте реализации соединение Формулы Ia или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения кризотинибом и/или гемцитабином. В другом варианте реализации соединение Формулы Ia или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения доцетакселом. В другом варианте реализации соединение Формулы Ia вводят после лечения карбоплатином. В другом варианте реализации соединение Формулы Ia или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения цисплатином и/или гемцитабином, и/или

доцетакселем. В другом варианте реализации соединение Формулы Ia или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения карбоплатином и/или гемцитабином, и/или доцетакселем. В другом варианте реализации соединение Формулы Ia или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения кризотинибом и/или гемцитабином, и/или доцетакселем.

[00102] В других вариантах реализации настоящего изобретения представлен способ ингибирования или реверсирования прогресса патологического клеточного роста у млекопитающего, включающий введение соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли, где патологический клеточный рост представляет собой рак, опосредованный химерным белком ROS1, например, химерным белком SLC34A2-ROS1, химерным белком CD74-ROS1, химерным белком FIG-ROS1, химерным белком FIG-ROS1(L), химерным белком FIG-ROS1(S) и химерным белком FIG-ROS1(VL), а также другими химерными белками ROS1, содержащими функциональный С-концевой киназный домен ROS1 и кодируемыми у человека геном ROS1 в 6 хромосоме (6q22). В одном из вариантов реализации рак представляет собой аденокарциному легкого. В другом варианте реализации аденокарцинома легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого. В другом варианте реализации аденокарцинома легкого представляет собой позитивный по слиянию SLC34A2-ROS1 немелкоклеточный рак легкого. В другом варианте реализации аденокарцинома легкого представляет собой позитивный по слиянию CD74-ROS1 немелкоклеточный рак легкого. В другом варианте реализации аденокарцинома легкого представляет собой позитивный по слиянию FIG-ROS1 немелкоклеточный рак легкого. В другом варианте реализации аденокарцинома легкого представляет собой позитивный по слиянию ROS1 немелкоклеточный рак легкого. В другом варианте реализации соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят в виде фармацевтической композиции, содержащей соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель. В другом варианте реализации соединение 1 вводят после другой формы лечения. В другом варианте реализации соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения цисплатином и/или гемцитабином. В другом варианте реализации соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения доцетакселем. В другом варианте реализации соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения цисплатином и/или гемцитабином, и/или доцетакселем. В другом варианте реализации соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения карбоплатином и/или

гемцитабином. В другом варианте реализации соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения кризотинибом. В другом варианте реализации соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения кризотинибом и/или гемцитабином. В другом варианте реализации соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения доцетакселом. В другом варианте реализации соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения карбоплатином. В другом варианте реализации соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения цисплатином и/или гемцитабином, и/или доцетакселом. В другом варианте реализации соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения карбоплатином и/или гемцитабином, и/или доцетакселом. В другом варианте реализации соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения кризотинибом и/или гемцитабином, и/или доцетакселом. В другом варианте реализации соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения кризотинибом и/или карбоплатином.

[00103] В другом варианте реализации настоящего изобретения представлен способ предупреждения, лечения, ингибирования или реверсирования прогресса патологического клеточного роста у млекопитающего, включающий введение соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли, где патологический клеточный рост представляет собой рак, опосредованный химерным белком ROS1, например, химерным белком SLC34A2-ROS1, химерным белком CD74-ROS1, химерным белком слияния FIG-ROS1, химерным белком FIG-ROS1(L), химерным белком FIG-ROS1(S), химерным белком FIG-ROS1(VL) или другими химерными белками ROS1, при этом рак ранее лечили с применением терапевтической схемы введения кризотиниба и/или карбоплатина, и рак является резистентным к кризотинибу и/или карбоплатину. В некоторых вариантах реализации рак, резистентный к кризотинибу и/или карбоплатину, несет один или более химерных белков ROS1, выбранных из: химерного белка SLC34A2-ROS1, химерного белка CD74-ROS1, химерного белка FIG-ROS1, химерного белка FIG-ROS1(L), химерного белка FIG-ROS1(S) и химерного белка FIG-ROS1(VL), и/или содержит мутацию в киназном домене ROS1 химерного белка SLC34A2-ROS1, химерного белка CD74-ROS1, химерного белка FIG-ROS1, химерного белка FIG-ROS1(L), химерного белка FIG-ROS1(S) или химерного белка FIG-ROS1(VL). В одном из вариантов реализации рак, резистентный к кризотинибу и/или карбоплатину, представляет собой рак, имеющий мутацию в киназном домене ROS1 химерного белка CD74-ROS1. В родственном варианте реализации рак

представляет собой кризотиниб-рефрактерную, позитивную к слиянию CD74-ROS1 аденокарциному легкого, например, кризотиниб-рефрактерный, позитивный по слиянию CD74-ROS1 НМРЛ, несущий мутацию в киназном домене ROS1. В другом варианте реализации кризотиниб- и/или карбоплатин-резистентный рак представляет собой рак, например, кризотиниб-резистентную аденокарциному легкого, например, кризотиниб-резистентный НМРЛ, несущий мутацию, выбранную из E1990G, G2032R, L2026M, L1951R, M2128V, K2003I и их комбинаций, в киназном домене ROS1 химерного белка CD74-ROS1.

[00104] В другом варианте реализации настоящего изобретения представлен способ предупреждения, лечения, ингибирования или реверсирования прогресса патологического клеточного роста у млекопитающего, например, рака, включающий введение соединения Формулы I или его фармацевтически приемлемой соли, где патологический клеточный рост представляет собой рак, опосредованный химерным белком ROS1, например, химерным белком SLC34A2-ROS1, химерным белком CD74-ROS1, химерным белком FIG-ROS1, химерным белком FIG-ROS1(L), химерным белком FIG-ROS1(S), химерным белком FIG-ROS1(VL) или другими химерными белками ROS1, при этом рак ранее лечили с применением терапевтической схемы введения кризотиниба и/или карбоплатина, и рак является резистентным к кризотинибу и/или карбоплатину. В некоторых вариантах реализации рак, резистентный к кризотинибу и/или карбоплатину, несет один или более химерных белков ROS1, выбранных из: химерного белка SLC34A2-ROS1, химерного белка CD74-ROS1, химерного белка FIG-ROS1, химерного белка FIG-ROS1(L), химерного белка FIG-ROS1(S) и химерного белка FIG-ROS1(VL), и/или содержит мутацию в киназном домене ROS1 химерного белка SLC34A2-ROS1, химерного белка CD74-ROS1, химерного белка FIG-ROS1, химерного белка FIG-ROS1(L), химерного белка FIG-ROS1(S) или химерного белка FIG-ROS1(VL). В одном из вариантов реализации рак, резистентный к кризотинибу, представляет собой рак, имеющий мутацию в киназном домене ROS1 химерного белка CD74-ROS1. В родственном варианте реализации рак представляет собой кризотиниб-рефрактерную, позитивную к слиянию CD74-ROS1 аденокарциному легкого, например, кризотиниб-рефрактерный, позитивный по слиянию CD74-ROS1 НМРЛ, несущий мутацию в киназном домене ROS1. В другом варианте реализации кризотиниб-резистентный рак представляет собой рак, например, кризотиниб-резистентную аденокарциному легкого, например, кризотинин-резистентный НМРЛ, несущий мутацию, выбранную из E1990G, G2032R, L2026M, L1951R, M2128V, K2003I и их комбинаций, в киназном домене ROS1 химерного белка CD74-ROS1. В различных

вариантах реализации, описанных выше, способ предупреждения, лечения, ингибирования или реверсирования прогресса патологического клеточного роста у млекопитающего включает введение соединения Формулы I или соединения Формулы Ia, или соединения 1, или его фармацевтически приемлемой соли, в иллюстративной терапевтически эффективной дозе от около 0,01 мг/кг до около 100 мг/кг или от около 0,1 мг/кг до около 75 мг/кг, или от около 0,1 мг/кг до около 50 мг/кг, или от около 0,1 мг/кг до около 40 мг/кг, или от около 0,1 мг/кг до около 30 мг/кг, или от около 0,1 мг/кг до около 20 мг/кг, или от около 0,1 мг/кг до около 15 мг/кг, или от около 0,1 мг/кг до около 10 мг/кг, или от около 0,1 мг/кг до около 5 мг/кг, или от около 0,1 мг/кг до около 1 мг/кг пациенту, нуждающемуся в этом, где патологический клеточный рост представляет собой рак, опосредованный химерным белком ROS1, например, химерным белком SLC34A2-ROS1, химерным белком CD74-ROS1, химерным белком FIG-ROS1, химерным белком FIG-ROS1(L), химерным белком FIG-ROS1(S), химерным белком FIG-ROS1(VL) или другим химерным белком ROS1; или рак, несущий одну или более мутаций в химерном белке ROS1, например, мутацию в киназном домене ROS1 в химерном белке SLC34A2-ROS1, в химерном белке CD74-ROS1, в химерном белке FIG-ROS1, в химерном белке FIG-ROS1(L), в химерном белке FIG-ROS1(S), в химерном белке FIG-ROS1(VL) или в других химерных белках ROS1, включая, в некоторых вариантах реализации, рак, который ранее лечили с применением терапевтической схемы введения кризотиниба и/или карбоплатина, и рак является резистентным к кризотинибу и/или карбоплатину, например, кризотиниб-резистентный рак, например, кризотиниб-резистентная аденокарцинома легкого, например, кризотиниб-резистентный НМРЛ.

Введение

[00105] Введение соединения Формулы I, Формулы Ia или соединения 1, или его фармацевтически приемлемой соли в чистой форме или в подходящей фармацевтической композиции может быть осуществлено любым приемлемым способом введения или средств, предназначенных для подобных целей. Так, введение может быть, например, осуществлено перорально, назально, парентерально (внутривенно, внутримышечно или подкожно), местно, трансдермально, внутривагинально, интравезикально, интрацистернально или ректально, в форме твердых, полутвердых, лиофилизированных порошков или в жидких лекарственных формах, таких как, например, таблетки, суппозитории, пилюли, мягкие эластичные и твердые желатиновые формы (которые могут быть в виде капсул или таблеток), порошки, растворы, суспензии или аэрозоли, или т.п., в

частности, в единичных лекарственных формах, подходящих для простого введения точных доз.

[00106] Композиции содержат стандартный фармацевтический носитель или вспомогательное вещество и соединение Формулы I в качестве активного агента, а также, помимо этого, могут содержать носители и адъюванты и т.д.

[00107] Адъюванты включают консервирующие, увлажняющие, суспендирующие, подслащивающие, вкусовые, ароматизирующие, эмульгирующие добавки и добавки для дозирования. Предотвращение действия микроорганизмов может быть обеспечено с помощью различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты и т.п. Необходимым также может быть включение изотонических средств, например, сахаров, хлорида натрия и т.п. Пролонгированная абсорбция инъекционной фармацевтической формы может быть обеспечена применением агентов, замедляющих абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

[00108] При необходимости фармацевтическая композиция соединения Формулы I также может содержать незначительные количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, pH-буферные агенты, антиоксиданты и т.п., такие как, например, лимонная кислота, сорбитанмонолаурат, триэтаноламинолеат, бутилированный гидрокситолуол и т.д.

[00109] Выбор композиции зависит от различных факторов, таких как способ введения лекарства (например, для перорального введения композиции представляют в форме таблеток, пилюль или капсул) и биодоступность лекарственного вещества. Недавно были разработаны фармацевтические композиции специально для лекарств, демонстрирующих недостаточную биодоступность, на основании того принципа, что биодоступность может быть увеличена посредством увеличения площади поверхности, т.е. уменьшения размера частиц. Например, в патенте США № 4107288 описана фармацевтическая композиция, содержащая частицы размером от 10 до 1000 нм, в которой активный материал нанесен на поперечно-сшитую матрицу из макромолекул. В патенте США № 5145684 описано получение фармацевтической композиции, в которой лекарственное вещество напылено на наночастицы (средний размер частиц 400 нм) в присутствии модификатора поверхности, а затем диспергировано в жидкой среде с получением фармацевтической композиции, которая демонстрирует заметно высокую биодоступность.

[00110] Композиции, подходящие для парентеральной инъекции, могут содержать физиологически приемлемые, стерильные водные или неводные растворы, дисперсии, суспензии или эмульсии и стерильные порошки для разведения с получением стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Примеры подходящих водных и неводных носителей, разбавителей, растворителей или жидких носителей включают воду, этанол, полиолы (пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, глицерин и т.п.), подходящие их смеси, растительные масла (такие как оливковое масло) и органические сложные эфиры, пригодные для инъекций, такие как этилолеат. Надлежащая текучесть может быть обеспечена, например, посредством применения покрытия, такого как лецитин, поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсий и применения поверхностно-активных веществ.

[00111] Один из конкретных способов введения представляет собой пероральный, с применением удобного суточного режима дозирования, который может быть подобран в соответствии со степенью тяжести болезненного состояния, подлежащего лечению.

[00112] Твердые лекарственные формы для перорального введения включают капсулы, таблетки, пилюли, порошки и гранулы. В таких твердых лекарственных формах активное соединение смешано с по меньшей мере одним инертным стандартным вспомогательным веществом (или носителем), таким как цитрат натрия или фосфат дикальция, или с (a) наполнителями или сухими разбавителями, такими как, например, крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и кремниевая кислота, (b) связующими агентами, такими как, например, производные целлюлозы, крахмал, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и гуммиарабик, (c) увлажнителями, такими как, например, глицерин, (d) агентами для улучшения распадаемости таблеток, такими как, например, агар-агар, карбонат кальция, картофельный или тапиоковый крахмал, альгиновая кислота, кроскармеллоза натрия, сложные силикаты и карбонат натрия, (e) замедлителями растворения, такими как, например, парафин, (f) ускорителями абсорбции, такими как, например, четвертичные аммониевые соединения, (g) смачивающими агентами, такими как, например, цетиловый спирт и глицеринмоностеарат, стеарат магния и т.п., (h) адсорбентами, такими как, например, каолин и бентонит, и (i) смазывающими веществами, такими как, например, тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия, или их смесями. В случае капсул, таблеток и пилюль лекарственные формы также могут содержать буферные агенты.

[00113] Твердые лекарственные формы, описанные выше, могут быть получены с покрытиями и оболочками, такими как энтеросолюбильные покрытия и другие хорошо

известные из уровня техники. Они могут содержать замутняющие средства, а также могут иметь такой состав, чтобы высвободить активное соединение или соединения в определенном отделе кишечника с задержкой. Примеры инкапсулирующих композиций, которые могут быть использованы, представляют собой полимерные вещества и воски. При необходимости активные соединения также могут находиться в микроинкапсулированной форме с одним или более из вышеуказанных вспомогательных веществ.

[00114] Жидкие лекарственные формы для перорального введения включают фармацевтически приемлемые эмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. Такие лекарственные формы получают, например, растворением, диспергированием и т.д. соединения Формулы I или его фармацевтически приемлемой соли и необязательных фармацевтических адъювантов в носителе, таком как, например, вода, солевой раствор, водная декстроза, глицерин, этанол и т.п.; солюбилизующих агентов и эмульгаторов, таких как, например, этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид; масел, в частности, хлопкового масла, арахисового масла, масла проростков кукурузы, оливкового масла, касторового масла и кунжутного масла, глицерина, тетрагидрофуранового спирта, полиэтиленгликолей и сложных эфиров жирных кислот и сорбита; или смесей указанных веществ и т.п., с получением раствора или суспензии.

[00115] Суспензии, помимо активных соединений, могут содержать суспендирующие агенты, как например, этоксилированные изостеариловые спирты, полиоксиэтиленсорбит и сложные эфиры сорбита, микрокристаллическую целлюлозу, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант, или смеси таких веществ и т.п.

[00116] Композиции для ректального введения представляют собой, например, суппозитории, которые могут быть получены смешиванием соединения Формулы I или его фармацевтически приемлемой соли, например, с подходящими нераздражающими вспомогательными веществами или носителями, такими как масло какао, полиэтиленгликоль или воск для суппозитория, которые являются твердыми при обычных температурах, но жидкими при температуре тела и, следовательно, плавятся в подходящей полости тела и высвобождают в ней активный компонент.

[00117] Лекарственные формы для местного применения соединения Формулы I или его фармацевтически приемлемой соли включают мази, порошки, спреи и ингаляционные формы. Активный компонент смешивают в стерильных условиях с физиологически

приемлемым носителем и любыми необходимыми консервантами, буферами или газами-вытеснителями. Офтальмологические композиции, глазные мази, порошки и растворы также входят в объем настоящего описания.

[00118] Газы под давлением могут быть использованы для диспергирования соединения Формулы I или его фармацевтически приемлемой соли в форме аэрозоля. Инертные газы, подходящие для указанной цели, представляют собой азот, диоксид углерода и т.д.

[00119] В целом, в зависимости от предполагаемого способа введения фармацевтически активные композиции содержат от около 1 % до около 99 % по массе соединения(-ий) Формулы I или его фармацевтически приемлемой соли и от 99 % до 1 % по массе подходящего фармацевтического вспомогательного вещества. В одном примере композиция содержит от около 5 % до около 75 % по массе соединения(-ий) Формулы I, Формулы Ia или соединения 1, или его фармацевтически приемлемой соли, а остальное составляют подходящие фармацевтические вспомогательные вещества.

[00120] Существующие способы получения таких лекарственных форм известны или понятны специалистам в данной области техники; см., например, Remington, Pharmaceutical Sciences, 18ое изд., (Mack Publishing Company, Истон, штат Пенсильвания, 1990). Композиция, подлежащая введению, в любом случае содержит терапевтически эффективное количество соединения Формулы I или его фармацевтически приемлемой соли для лечения болезненного состояния в соответствии с идеей настоящего описания.

[00121] Соединения согласно настоящему описанию или их фармацевтически приемлемые соли, или сольваты вводят в терапевтически эффективном количестве, которое варьируется в зависимости от множества факторов, включая активность конкретного используемого соединения, метаболическую стабильность и продолжительность действия соединения, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол, рацион, способ и время введения, скорость экскреции, комбинацию лекарств, тяжесть конкретного болезненного состояния и реципиента, проходящего лечение. Соединение Формулы I, Формулы Ia или соединение 1, или его фармацевтически приемлемая соль может быть введена пациенту в дозе от около 0,1 до около 1000 мг в сутки. Для нормального взрослого человека с массой тела около 70 кг доза примером может служить доза от около 0,01 до около 100 мг на килограмм массы тела в сутки. Однако конкретная используемая доза может варьироваться. Например, доза может зависеть от множества факторов, включая требования пациента, тяжесть состояния, подлежащего лечению, и

фармакологическую активность используемого соединения. Определение оптимальных доз для конкретного пациента хорошо известно специалистам в данной области техники.

[00122] В других вариантах реализации соединение Формулы I, Формулы Ia или соединение 1, или его фармацевтически приемлемая соль может быть введена пациенту одновременно с другими средствами лечения рака. Такие средства лечения включают другие противораковые химиотерапевтические агенты, гормонозаместительную терапию, радиационную терапию или иммунотерапию, среди прочих. Выбор другой терапии зависит от множества факторов, включая метаболическую стабильность и продолжительность действия соединения, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол, рацион, способ и время введения, скорость экскреции, комбинацию лекарств, тяжесть конкретного болезненного состояния и реципиента, проходящего лечение.

[00123] В другом аспекте настоящего изобретения представлен способ обнаружения, диагностики и лечения заболевания, связанного со слияниями ROS1, таких как позитивный по слиянию SLC34A2-ROS1 HMPJ, позитивный по слиянию CD74-ROS1 HMPJ и позитивный по слиянию FIG-ROS1 HMPJ, помимо других позитивных к слиянию ROS1 HMPJ. В настоящем документе более подробно описаны способы обнаружения и диагностики таких расстройств. Лечение указанных расстройств может быть улучшено посредством введения терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей соединение Формулы I или малатную соль соединения Формулы I, или другую фармацевтически приемлемую соль соединения Формулы I, включая, в конкретном варианте реализации, соединение Формулы I, представляющее собой соединение 1 или малатную соль соединения 1, пациенту, у которого идентифицировано или диагностировано заболевание, связанное со слиянием ROS1, такое как позитивный по слиянию SLC34A2-ROS1 HMPJ, позитивный по слиянию CD74-ROS1 HMPJ и позитивный по слиянию FIG-ROS1 HMPJ.

[00124] В другом аспекте соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемую соль вводят пациенту для предупреждения или лечения рака легкого. В некоторых из таких вариантов реализации указанный способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, композиции, содержащей по меньшей мере один ингибитор химерного белка ROS1, по меньшей мере один ингибитор химерного гена ROS1, кодирующего химерный белок, по меньшей мере один ингибитор гена, кодирующего ROS1, или их комбинацию в качестве активного ингредиента.

ROS1 и партнеры по слиянию SLC34A2, CD74 и FIG

[00125] Белок ROS1, белок SLC34A2, белок CD74 и белок FIG, слияние SLC34A2-ROS1 или слияние CD74-ROS1; или слияние FIG-ROS1, или иногда просто называемые «химерный белок и нуклеиновые кислоты ROS1», включая способы обнаружения, диагностики, наборы для обнаружения и диагностики, способы скрининга, способы лечения и предупреждения, а также различные терапевтические способы лечения пациентов с раком легкого, способы измерения эффективности лечения и другие фармацевтические ингредиенты могут быть использованы в комбинации с различными способами лечения, описанными ниже.

[00126] Белок ROS1 представляет собой «сиротскую» трансмембранную рецепторную тирозинкиназу. Белок киназы ROS1 человека (кодируемый геном ROS1) представляет собой рецепторную тирозинкиназу длиной 2347 аминокислот, которая склонна к aberrantной экспрессии, приводящей к раку. Описание полноразмерной киназы ROS1 человека (с аминокислотной последовательностью белка ROS1 человека) представлено в UniProt с номером доступа P08922 (E.C.- 2.7.10.1). Как показано в таблице 1, сигнальный пептид, внеклеточные, трансмембранные и киназные домены ROS1 обнаружены в следующих аминокислотных остатках в SEQ ID NO: 1

[00127] Таблица 1. Аминокислотные остатки и домены белка ROS1 в SEQ ID NO: 1
 Сигнальный пептид 1-27 Внеклеточный домен 28-1859 Трансмаббранный домен 1860-1882 Киназный домен 1945-2222

Белок

Домен	Аминокислотные остатки в SEQ ID NO: 1
Сигнальный пептид	1-27
Внеклеточный домен	28-1859
Трансмембранный домен	1860-1882
Киназный домен	1945-2222

[00128] Белок ROS1 человека может кодироваться человеческим геном ROS1, расположенным в 6 хромосоме человека. С-концевой домен белка ROS1 может содержать аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидом с 31^{ого} или 32^{ого}, или 34^{ого} экзона по последний экзон (например, 32^{ой} или 34^{ый} экзон) или его фрагментом гена ROS1. С-концевой домен белка ROS1 может содержать последовательно по меньшей мере около 100 аминокислот от стартового положения 31^{ого} или 32^{ого} экзона. Например, С-

концевой домен белка ROS1 может содержать последовательно от около 100 до около 700 аминокислот, последовательно от около 200 до около 600 аминокислот или последовательно от около 250 до около 500 аминокислот, или последовательно от около 270 до около 425 аминокислот, или последовательно от около 270 до около 450 аминокислот, или последовательно от около 475 до около 625 аминокислот от стартового положения 32^{ого} экзона (длинная форма) или 34^{ого} экзона (короткая форма) в сторону С-конца белка ROS1. Предполагаемый точечный разрыв белка ROS1 происходит у 1750 или 1852-1853 аминокислоты для химерных белков SLC34A2-ROS1 и химерных белков CD74-ROS1, и у 1880-1881 аминокислоты для химерных белков FIG-ROS1.

[00129] В одном иллюстративном варианте реализации человеческий ген SLC34A2, кодирующий человеческий белок SLC34A2 (мПНК NM_001177998), локализован в 4 хромосоме человека (4p15.2) и содержит 13 экзонов, и имеет около 690 аминокислот в длину. Белок, кодируемый указанным геном, представляет собой рН-чувствительный натрийзависимый транспортер фосфата. Дефекты в указанном гене являются причиной альвеолярного микролитиаза легкого. Для данного гена установлены три транскриптных варианта, кодирующие две различные изоформы. Белок SLC34A2 может быть получен из организма млекопитающего, такого как человек. N-концевой домен химерного белка SLC34A2-ROS1 может содержать аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидом с первого экзона по 12-ый экзон, или с первого экзона по четвертый экзон, или с первого экзона по второй экзон гена SLC34A2. Последние наблюдаемые экзоны в структуре гена SLC34A2 имеют предполагаемые точечные разрывы в положениях 429 и 2076. N-концевой домен химерного белка SLC34A2-ROS1 может содержать последовательно по меньшей мере около 30-250 аминокислот с 1^{ого} положения (то есть по меньшей мере аминокислотная последовательность с 1^{ого} по 250^{ое} положения, или ее фрагменты) белка SLC34A2. N-концевой домен химерного белка SLC34A2-ROS1 может содержать последовательно от около 30 до 250 аминокислот, последовательно от около 30 до 225 аминокислот, последовательно от около 40 до 200 аминокислот или последовательно от около 40 до 175 аминокислот с 1^{ого} аминокислотного положения белка SLC34A2.

[00130] В одном иллюстративном варианте реализации слияние SLC34A2-ROS1 представляет собой хромосомную транслокацию между человеческими хромосомами 6 и 4, которая гибридизует 3'-область ROS1 с 5'-областью SLC34A2. Химерный белок обнаруживают и подтверждают с помощью различных способов, известных специалистам в данной области техники или описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах

реализации соединения Формулы I или его фармацевтически приемлемую соль затем вводят пациенту, нуждающемуся в этом, для предотвращения или лечения рака легкого. В некоторых вариантах реализации пациенту, нуждающемуся в этом, вводят композицию, содержащую по меньшей мере один ингибитор слияния SLC34A2-ROS1, по меньшей мере один ингибитор химерного гена SLC34A2-ROS1, кодирующего химерный белок, по меньшей мере один ингибитор гена, кодирующего ROS1, или их комбинацию, в качестве активного ингредиента.

[00131] В химерном белке SLC34A2-ROS1 слияние или область слияния может быть расположена между различными экзонами гена SLC34A2 и гена ROS1. Специалистам в данной области техники известные многочисленные слияния. Примеры таких слияний включают 2^{ой} и/или 4^{ый} экзон гена SLC34A2 и 32^{ой} (длинный, L) и/или 34^{ый} экзон (короткий, S) гена ROS1, который называют точкой слияния или точечным разрывом. Известные другие слияния или точечные разрывы ROS1 и SLC34A2, и они представлены в каталоге соматических мутаций при раке COSMIC, в базе данных версии 68, на странице cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/. Термин «область слияния» может относиться к фрагменту полинуклеотида (около 10-30 нуклеотидов) или к фрагменту полипептида (около 5-30 аминокислот) вокруг точки слияния.

[00132] Слияние CD74-ROS1 представляет собой хромосомную транслокацию с участием ROS1 между человеческими хромосомами 5 и 6, которая гибридизует 3'-область ROS1 с 5'-областью CD74. Химерный белок обнаруживают и подтверждают с помощью различных способов, известных специалистам в данной области техники или описанных в настоящем документе. N-концевой домен химерного белка CD74-ROS1 может содержать аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидом с первого экзона по 12-ый экзон, или с первого экзона по четвертый экзон, или с первого экзона по второй экзон гена CD74. N-концевой домен химерного белка CD74-ROS1 может содержать последовательно по меньшей мере около 30-250 аминокислот с 1^{ого} положения (то есть по меньшей мере аминокислотная последовательность с 1^{ого} по 250^{ое} положения, или ее фрагменты) белка CD74. N-концевой домен химерного белка CD74-ROS1 может содержать последовательно от около 30 до 250 аминокислот, последовательно от около 30 до 225 аминокислот, последовательно от около 40 до 200 аминокислот или последовательно от около 40 до 210 аминокислот с 1^{ого} аминокислотного положения белка CD74.

[00133] В химерном белке слияние или область слияния может находиться между различными экзонами гена CD74 и гена ROS1. Специалистам в данной области техники

известные многочисленные слияния. Примеры таких слияний CD74-ROS1 включают 6-ой экзон гена CD74, слитый с 32-ым или 34-ым экзоном гена ROS1, который называют точкой слияния или точечным разрывом. Другие слияния или точечные разрывы ROS1 и CD74 известны и представлены в каталоге соматических мутаций при раке COSMIC, в базе данных версии 68, на странице cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/. Термин «область слияния» может относиться к фрагменту полинуклеотида (около 10-30 нуклеотидов) или к фрагменту полипептида (около 5-30 аминокислот) вокруг точки слияния.

[00134] Химерный белок FIG-ROS1 образуется в результате внутривхромосомной делеции в человеческой хромосоме 6, гибридизирующей 5'-область FIG (также известного как GOPC) с 3'-областью ROS1. Слияния FIG-ROS1 идентифицированы в образцах, полученных от пациентов с холангиокарциномой и раком яичников, с частотой 8,7 % и 0,5 %, соответственно. Химерный белок FIG-ROS1 может быть обнаружен и подтвержден с помощью различных способов, известных специалистам в данной области техники или описанных в настоящем документе. N-концевой домен химерного белка FIG-ROS1 может содержать последовательно по меньшей мере около 150-500 аминокислот с 1^{ого} положения (то есть по меньшей мере аминокислотная последовательность с 1^{ого} по 500^{ое} положения, или ее фрагменты) белка FIG. N-концевой домен химерного белка FIG-ROS1 может содержать последовательно от около 150 до около 500 аминокислот, последовательно от около 200 до около 450 аминокислот, последовательно от около 220 до 425 аминокислот или последовательно от около 220 до около 420 аминокислот, или их фрагменты с 1^{ого} аминокислотного положения белка FIG.

[00135] В химерном белке FIG-ROS1 слияние или область слияния может находиться между различными экзонами гена FIG и гена ROS1. Специалистам в данной области техники известны некоторые слияния FIG-ROS1. Примеры таких слияний включают 4^{ый} или 8^{ой} экзон гена FIG, гибридизованный с 35-ым или 36-ым экзоном белка ROS1, который называют точкой слияния или точечным разрывом. Известные другие слияния или точечные разрывы ROS1 и FIG, и они представлены в каталоге соматических мутаций при раке COSMIC, в базе данных версии 68, на странице cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/. Термин «область слияния» может относиться к фрагменту полинуклеотида (около 10-30 нуклеотидов) или к фрагменту полипептида (около 5-30 аминокислот) вокруг точки слияния.

[00136] Другие партнеры ROS1 по слиянию могут включать TPM3, SDC4, EZR и LRIG3, помимо слияний SLC34A2, CD74 и FIG, подробно описанных в настоящем

документе. (См. фиг. 1 в настоящем документе и, например, Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, et al. *RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer*. Nat Med. 2012, и Kurtis D. Davies, Anh T. Le, Mariana F. Theodoro, Margaret C. Skokan, Dara L. Aisner, Eamon M. Berge, Luigi M. Terracciano, Matteo Incarbone, Massimo Roncalli, Federico Cappuzzo, D. Ross Camidge, Marileila Varela-Garcia и Robert C. Doebelet, *Identifying and Targeting ROS1 Gene Fusions in Non-Small Cell Lung Cancer*, (2012), *Clin Cancer Res*. 2012 September 1; 18(17): 4570–4579, содержание указанных описаний, касающееся химерных белков ROS1, включено в настоящий документ в полном объеме.

[00137] В одном из вариантов реализации химерный белок ROS1 согласно настоящему изобретению содержит С-концевой домен человеческого белка ROS1 (например, человеческого ROS1, представленного в SEQ ID NO. 1), обеспечивающий функциональный киназный домен, который состоит по существу из около 50-300 аминокислот, расположенных последовательно, начиная с аминокислоты, соответствующей стартовому положению 32^{ого} экзона белка ROS1, и в сторону С- конца белка ROS1.

[00138] В данном контексте номер экзона соответствует номеру экзона, присвоенному Национальным центром биотехнологической информации (NCBI), возглавляемым Национальным институтом здравоохранения, Бетесда, штат Мэриленд, США. В некоторых иллюстративных вариантах реализации химерный белок SLC34A2-ROS1 может иметь любую аминокислотную последовательность, идентифицированную таковой центром NCBI. Нуклеотидные последовательности молекул ДНК и аминокислотные последовательности белков, кодируемых молекулами ДНК, могут быть определены с помощью автоматического секвенатора ДНК или автоматического секвенатора пептидов. (Нуклеотидные или аминокислотные) последовательности, определенные такими автоматическими средствами секвенирования, могут содержать частную погрешность по сравнению с реальными последовательностями. В целом, последовательности, определенные автоматическим секвенированием, могут иметь идентичность последовательностей по меньшей мере около 90 %, по меньшей мере 20 около 95 %, по меньшей мере около 99 % или по меньшей мере около 99,9 % по сравнению с реальными последовательностями. Следовательно, химерный белок, химерный ген или химерная область может иметь аминокислотную последовательность или нуклеотидную последовательность, имеющую идентичность по меньшей мере около 90 %, по меньшей мере около 95 %, по меньшей мере около 99 % или по меньшей мере около 99,9 % по сравнению с последовательностями, идентифицированными таковыми центром NCBI.

[00139] Для простоты следующее описание относится к химерному белку ROS1 SLC34A2-ROS1, но оно также может относиться к другим химерным белкам ROS1, описанным в настоящем документе. Иллюстративный химерный белок SLC34A2-ROS1 в некоторых вариантах реализации может состоять из 80-200 N-концевых аминокислотных остатков белка SLC34A2 и по меньшей мере 300 С-концевых остатков ROS1, предпочтительно 300-500 С-концевых аминокислотных остатков. Химерный ген имеет домен протеинтирозинкиназы вместе с геликальными доменами. Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что третичная конформация химерного белка SLC34A2-ROS1 включает гомо-димеризацию, которая активирует онкогенный домен протеинтирозинкиназы посредством аутофосфорилирования. В итоге, химерный ген SLC34A2-ROS1 может быть в значительной степени экспрессирован, а затем димеризован после трансляции, обусловленной SLC34A2. Затем димеризованный протеинтирозинкиназный домен ROS1 может быть патологически стимулирован, что облегчает стимуляцию онкогенного каскада, например, как в случае рака легкого НМРЛ, связанного со слиянием ROS1.

[00140] После обнаружения слияния оно становится известным как химерный ген SLC34A2-ROS1, кодирующий химерный белок SLC34A2-ROS1. В настоящем документе описан способ обеспечения информации для диагностики рака легкого, включающий стадию обнаружения слияния в испытуемом образце, полученном от субъекта. При диагностике проводят сравнение химерного гена, кодирующего химерный белок; и сверхэкспрессию ROS1 в сравнении со стандартным образцом, полученным от индивидуума, не страдающего раком, где при выборе и обнаружении в испытуемом образце по меньшей мере одного элемента субъекта идентифицируют как принадлежащего к одной или всем следующим группам: пациент, страдающий раком; пациент, страдающий раком легкого; пациент, страдающий раком легкого НМРЛ; пациент, страдающий НМРЛ, связанным со слиянием ROS1; и/или пациент, страдающий НМРЛ, связанным со слиянием SLC34A2-ROS1.

[00141] Делеция, инверсия или транслокация 6 хромосомы может быть обнаружена с помощью полинуклеотида (зонда), способного к гибридизации (комплементарному связыванию) с областью делеции, инверсии или транслокации в 6 хромосоме человека, и/или праймерной пары, способной к обнаружению делеции, инверсии или транслокации 6 хромосомы человека, например, способной образовывать полинуклеотидный фрагмент, имеющий 100-200 последовательных нуклеотидов, содержащих область инверсии в 6 хромосоме человека. Химерный белок, химерный ген и химерная область описаны в

настоящем документе. В иллюстративном варианте реализации химерный белок также может быть обнаружен посредством обнаружения наличия химерного белка или химерного гена, или мРНК, соответствующей химерному гену, например, с помощью ROS1-специфичных или специфичных к слиянию ROS1 антител, известных в данной области техники и описанных в настоящем документе.

[00142] Наличие химерного белка может быть обнаружено с помощью общего анализа, в котором измеряют взаимодействие между химерным белком и материалом (например, антителом или аптамером), специфически связывающимся с химерным белком. Общий анализ может представлять собой иммунохроматографию, иммуногистохимическое окрашивание, иммуноферментный твердофазный анализ (ELISA), радиоиммунологический анализ (RIA), иммуноферментный анализ (ИФА), флуоресцентный иммунологический анализ (FIA), люминесцентный иммунологический анализ (LIA), вестерн-блоттинг, сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS) и т.п.

[00143] Кроме того, наличие химерного гена или мРНК может быть обнаружено с помощью общего анализа, такого как ПЦР, FISH (флуоресцентная гибридизация *in situ*) и т.п., с помощью полинуклеотида, способного к гибридизации (комплементарному связыванию) с химерным геном или мРНК. FISH более подробно описана ниже.

Химерный ген может быть обнаружен и/или подтвержден с помощью методов интеграции общего транскриптомного (РНК) и/или общего геномного ДНК секвенирования посредством технологий массового параллельного секвенирования. Полинуклеотид, способный к гибридизации с химерным геном или мРНК, может представлять собой миРНК, олигонуклеотид, зонд ДНК или праймер ДНК, который может обнаруживать химерный ген или мРНК путем непосредственной гибридизации со слитым или усеченным геном или транскриптом в испытуемом образце.

[00144] В дополнительных вариантах реализации в способах согласно настоящему изобретению используют флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) (как описано в Verma et al. Human Chromosomes: A Manual Of Basic Techniques, Pergamon Press, Нью-Йорк, штат Нью-Йорк (1988)). Анализ FISH может быть осуществлен с помощью одного или более наборов зондов, ниже представлены варианты реализации: (1) первый набор зонда, который представляет собой первый набор зонда, нацеленный на хромосомный сайт, который содержит ген ROS1 (первый хромосомный сайт); он состоит из зонда 1A, меченного первым флуоресцентным веществом, и зонда 1B, меченного вторым флуоресцентным веществом; зонд 1A комплементарен первой области, которая

представляет собой 5'-область в вышеупомянутом первом хромосомном сайте, зонд 1B комплементарен второй области, которая находится на расстоянии от вышеупомянутой первой области и представляет собой 3'-область в вышеупомянутом первом хромосомном сайте, и точечный разрыв в гене ROS1, если химерный ген SLC34A2-ROS1 образован в результате транслокации между генами SLC34A2 и ROS1, расположен на 3'-конце вышеуказанной первой области, между вышеуказанной первой и второй областями, или на 5'-конце вышеуказанной второй области; (2) второй набор зонда, который представляет собой второй набор зонда, нацеленный на хромосомный сайт, который содержит ген SLC34A2 (второй хромосомный сайт); он состоит из зонда 2A, меченного первым флуоресцентным веществом, и зонда 2B, меченного вторым флуоресцентным веществом; зонд 2A комплементарен первой области, которая представляет собой 5'-область в вышеуказанном втором хромосомном сайте, зонд 2B комплементарен второй области, которая находится на расстоянии от вышеуказанной первой области и представляет собой 3'-область в вышеуказанном втором хромосомном сайте, и точечный разрыв в гене SLC34A2, если химерный ген SLC34A2-ROS1 образован в результате транслокации между генами SLC34A2 и ROS1, расположен на 3'-конце вышеуказанной первой области, между вышеуказанной первой и второй областями или на 5'-конце вышеуказанной второй области; (3) третий набор зонда, состоящий из вышеуказанного зонда 2A и вышеуказанного зонда 1B; и (4) четвертый набор зонда, состоящий из зонда 4A, который комплементарен хромосомному сайту, содержащему ген ROS1 (третий хромосомный сайт), и зонда 4B, который комплементарен хромосомному сайту, содержащему ген SLC34A2 (четвертый хромосомный сайт).

[00145] Длина вышеуказанного первого хромосомного сайта может составлять 0,5-2,0 мегабаз. Длина вышеуказанного второго хромосомного сайта может составлять 0,5-2,0 мегабаз. Длина вышеуказанного третьего хромосомного сайта может составлять 0,5-2,0 мегабаз. Длина вышеуказанного четвертого хромосомного сайта может составлять 0,5-2,0 мегабаз.

[00146] В некоторых вариантах реализации анализ FISH может коррелировать с другими физическими технологиями хромосомного картирования и данными генетической карты. Технология FISH общеизвестна (см., например, В патенте США № 5756696; 5447841; 5776688; и 5663319). Примеры данных генетической карты представлены в публикации Genome Issue of Science, 1994 (265: 1981f). Корреляция между локализацией гена, кодирующего белок ROS1 и/или, в случае химерных полипептидов ROS1, гена, кодирующего партнера по слиянию химерного белка ROS1 (например, гена

FIG, гена SLC34A2 или гена CD74), и физической хромосомной картой и конкретным заболеванием или предрасположенностью к конкретному заболеванию может облегчать определение границ области ДНК, связанной с конкретным генетическим заболеванием. Нуклеотидные последовательности согласно настоящему изобретению могут быть использованы для обнаружения разницы в генных последовательностях между нормальными индивидуумами, индивидуумами-носителями или пораженными индивидуумами.

[00147] *In situ* гибридизация хромосомных препаратов и технологии физического картирования, такие как анализ групп сцепления с помощью установленных хромосомных маркеров, могут быть использованы для расширения генетических карт. Зачастую расположение гена в хромосоме другого млекопитающего вида, такого как мыши, может выявлять ассоциированные маркеры даже если номер или плечо конкретной человеческой хромосомы неизвестны. Новые последовательности могут быть отнесены к хромосомным плечам или их частям посредством физического картирования. Это обеспечивает ценную информацию для исследователей, производящих поиск генов заболеваний с помощью позиционного клонирования или других технологий открытия генов. После грубой локализации заболевания или синдрома по генетической связи с определенной геномной областью, например, от АТ до 11q22-23 (Gatti et al., Nature 336: 577-580 (1988)), любые последовательности, картированные на указанной области, могут представлять собой ассоциированные или регуляторные гены для дополнительного исследования.

Нуклеотидные последовательности, кодирующие слияния ROS1 согласно настоящему изобретению, или их части, также могут быть использованы для обнаружения различий в хромосомной локализации вследствие транслокации, инверсии и т.д., между нормальными индивидуумами, индивидуумами-носителями или пораженными индивидуумами.

[00148] Следует понимать, что все способы (например, ПЦР и FISH), которые обнаруживают полинуклеотиды, кодирующие полипептид с активностью киназы ROS1 (например, полноразмерный ROS1 или химерные полинуклеотиды ROS1, такие как SLC34A2-ROS1, или CD74-ROS1, или FIG-ROS1(S)), могут быть объединены с другими способами, которые обнаруживают полипептиды с активностью киназы ROS1 или полинуклеотиды, кодирующие полипептид с активностью киназы ROS1. Например, обнаружение химерного белка FIG-ROS1 в генетическом материале биологического образца (например, FIG-ROS1 в циркулирующей в крови опухолевой клетке) может быть продолжено анализом вестерн-блоттинга или иммуногистохимическим (ИHC) анализом

белков образца для определения того, действительно ли полинуклеотид FIG-ROS1 экспрессируется в биологическом образце как химерный белок FIG-ROS1. Указанные анализы вестерн-блоттинга или ИНС могут быть осуществлены с применением антитела, которое специфически связывается с полипептидом, кодируемым обнаруженным полинуклеотидом FIG-ROS1, или указанные анализы могут быть осуществлены с применением антител, которые специфически связываются с полноразмерным FIG (например, связываются с N-концом белка) или с полноразмерным ROS1 (например, связываются в эпитопом в киназном домене ROS1). Такие анализы известны в данной области техники (см., например, патент США № 7468252).

[00149] В другом примере технология CISH компании Dako обеспечивает возможность хроматогенной *in situ* гибридизации с иммуногистохимией на одном тканевом срезе. См. Elliot et al., Br J Biomed Sci 2008; 65(4): 167- 171, 2008, где представлено сравнение CISH и FISH.

[00150] В другом аспекте настоящего изобретения представлен способ диагностики пациента с раком легкого или с подозрением на рак легкого, обусловленный киназой ROS1. Указанный способ включает приведение в контакт биологического образца указанного рака легкого или предполагаемого рака легкого (где биологический образец содержит по меньшей мере одну молекулу нуклеиновой кислоты) с зондом, который гибридизуется в жестких условиях с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид с активностью киназы ROS1, такой как полноразмерный полинуклеотид ROS1 или химерный полинуклеотид ROS1 (например, химерный полинуклеотид FIG-ROS1, химерный полинуклеотид SLC34A2-ROS1 или химерный полинуклеотид CD74-ROS1), и где гибридизация указанного зонда с по меньшей мере одной молекулой нуклеиновой кислоты в указанном биологическом образце обеспечивает идентификацию указанного пациента как имеющего рак легкого или предполагаемый рак легкого, обусловленный киназой ROS1.

[00151] В другом аспекте настоящего изобретения представлен способ диагностики пациента как имеющего рак легкого или предположительно имеющего рак легкого, обусловленный киназой ROS1. Указанный способ включает приведение в контакт биологического образца указанного рака легкого или предполагаемого рака легкого (где указанный биологический образец содержит по меньшей мере один полипептид) с реагентом, который специфически связывается с полипептидом с активностью киназы ROS1 (например, химерный полипептид FIG-ROS1, химерный полипептид SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1), где специфическое связывание указанного реагента с по меньшей

мере одним химерным полипептидом в указанном биологическом образце обеспечивает идентификацию указанного пациента как имеющего рак легкого или предполагаемый рак легкого, обусловленный киназой ROS1.

[00152] В различных вариантах реализации идентификация рака легкого или предполагаемого рака легкого, обусловленного киназой ROS1, обеспечивает определение того, что пациент, имеющий рак легкого или предполагаемый рак легкого, вероятно отвечает на ROS1-ингибирующее терапевтическое средством.

[00153] Набор для обнаружения транслокаций между генами SLC34A2 и ROS1 может содержать один или более наборов зондов. (1) Первый набор зондов содержит зонд 1A, меченный первым флуоресцентным соединением, и зонд 1B, меченный вторым флуоресцентным соединением; зонд 1A комплементарен первой области, которая представляет собой 5'-область в вышеуказанном первом хромосомном сайте, зонд 1B комплементарен второй области, которая находится на некотором расстоянии от вышеуказанной первой области и представляет собой 3'-область в вышеуказанном первом хромосомном сайте, и точечный разрыв в гене ROS1, если химерный ген SLC34A2-ROS1 образован в результате транслокации между генами SLC32A2 и ROS1, расположен в 3'-хвосте вышеуказанной первой области, между вышеуказанной первой и второй областями, или в 5'-хвосте вышеуказанной второй области; (2) второй набор зондов, который представляет собой второй набор зондов, нацеленный на хромосомный сайт, который содержит ген SLC32A2 (второй хромосомный сайт); состоит из зонда 2A, меченного первым флуоресцентным соединением, и зонда 2B, меченного вторым флуоресцентным соединением; зонд 2A комплементарен первой области, которая представляет собой 5'-область в вышеуказанном втором хромосомном сайте, зонд 2B комплементарен второй области, которая находится на некотором расстоянии от вышеуказанной первой области и представляет собой 3'-область в вышеуказанном втором хромосомном сайте, и точечный разрыв в гене SLC32A2, если химерный ген SLC34A2-ROS1 образован в результате транслокации между генами SLC32A2 и ROS1, расположен в 3'-хвосте вышеуказанной первой области, между вышеупомянутой первой и второй областями, или в 5'-хвосте вышеупомянутой второй области; (3) третий набор зондов, состоящий из вышеуказанного зонда 2A и вышеуказанного зонда 1B; и четвертый набор зондов, состоящий из зонда 4A, который комплементарен хромосомному сайту, содержащему ген ROS1 (третий хромосомный сайт), и зонда 4B, который комплементарен хромосомному сайту, содержащему ген SLC32A2 (четвертый хромосомный сайт).

[00154] Набор, подходящий для идентификации пациентов, подверженных транслокации SLC34A2-ROS1, содержит один или более элементов, выбранных из группы, содержащей пояснения по применению зондов, контрастного красителя ДНК, буфера для применения при гибридизации, инкапсулирующего агента и контрольного слайда. Набор обеспечивает возможность удобной и эффективной реализации способа согласно настоящему изобретению. Набор может содержать, в качестве необходимых элементов (незаменимых ингредиентов), вышеуказанный первый набор зондов, второй набор зондов, третий набор зондов или четвертый набор зондов. В набор также могут быть включены два или более типов наборов зондов. Например, набор может содержать первый набор зондов и третий набор зондов. Поскольку подробное описание каждого набора зондов описано выше, их повторное описание не приводится.

[00155] Обнаружение наличия или отсутствия химерного полинуклеотида SLC34A2-ROS1 может быть осуществлено непосредственно с применением геномной ДНК, которая кодирует вышеуказанный химерный полипептид, или транскрипта из указанной геномной ДНК, а также может быть осуществлено косвенно с применением продукта трансляции из указанного транскрипта (вышеуказанного химерного полипептида).

[00156] Поскольку геномная ДНК, которая кодирует химерный полипептид, образована в результате инверсии между областью размером 117,61-117,75 мегабаз 6 хромосомы, (6q22), то явление согласно настоящему изобретению может быть обнаружено как «обнаружение наличия или отсутствия химерного полинуклеотида SLC34A2-ROS1». При обнаружении такой инверсии, например, может быть обнаружено расщепление между 5'-боковой областью, расположенной против хода транскрипции от кодирующей области киназного домена гена ROS1, и 3'-боковой областью, расположенной по ходу транскрипции от указанной кодирующей области гена ROS1, или может быть обнаружено расщепление между кодирующей областью части или полных спиральных доменов и 5'-боковой областью, расположенной против хода транскрипции от указанной кодирующей области гена SLC32A2, и 3'-боковой областью, расположенной по ходу транскрипции от указанной кодирующей области спиральных доменов гена SLC34A2.

[00157] Технологии, известные опытным специалистам, могут быть использованы для «обнаружения наличия или отсутствия химерного полинуклеотида SLC34A2-ROS1» согласно настоящему изобретению. Если объектом является «геномная ДНК, которая кодирует вышеупомянутый химерный полипептид», то может быть использована, например, *in situ* гибридизация (ISH) с применением флуоресценции или т.п., геномная ПЦР, прямое секвенирование, саузерн-блоттинг или микроматричный анализ генома.

Если объектом является «транскрипт из вышеупомянутой геномной ДНК», то может быть использована, например, ОТ-ПЦР, прямое секвенирование, нозерн-блоттинг, дот-блоттинг или микроматричный анализ кДНК.

[00158] Набор согласно настоящему изобретению также может содержать другие элементы. Примеры указанных других элементов представляют собой технические условия по применению зондов, контрастный краситель ДНК, такой как DAPI, буфер для гибридизации, промывочный буфер, растворители, заливочную среду, контрольные слайды, реакционные сосуды и другое оборудование. Также могут быть включены спецификации для диагностических целей. Кроме того, могут быть включены также спецификации и т.д., которые указывают способы настройки обнаружения (положительная идентификация) транслокации SLC34A2-ROS1 в образцах хромосом, полученных от онкологических пациентов, у указанных пациентов с применением ингибитора киназы ROS1. Кроме того, может быть включен также план определения курса лечения и пояснение указанного плана.

[00159] Предусмотрены относительно длинные зонды (от примерно 200 килобаз (зонд 1A) до примерно 1370 килобаз (зонд 4B). Таким образом, комплементация между зондами и целевыми последовательностями не обязательно должна быть строго ограничивающей, до той степени, в которой достигается специфическая гибридизация, предполагаемая в настоящем изобретении. Пример сходства между целевыми последовательностями составляет по меньшей мере 90 %, предпочтительно по меньшей мере 95 %, и более предпочтительно по меньшей мере 98 %.

[00160] В случае применения первого набора зондов и второго набора зондов, в хромосомных образцах, в которых имеет место транслокация между геном SLC34A2 и геном ROS1, разделяют и обнаруживают по отдельности два флуоресцентных сигнала; в хромосомных образцах, в которых транслокация не происходит, два флуоресцентных сигнала обычно наблюдают как следующие друг за другом, или наблюдают сигнал (желтый), который представляет собой комбинацию двух флуоресцентных сигналов. Таким образом, наличие или отсутствие транслокации между геном SLC34A2 и геном ROS1 отражено в характере флуоресцентного сигнала. Следовательно, транслокация между геном SLC34A2 и геном ROS1 может быть определена по характеру флуоресцентного сигнала.

[00161] Решение относительно вышеуказанного явления предпочтительно и обычно принимают на основании сравнения результата с контролем (контрольным образцом). В данном контексте контроль представляет собой хромосомный образец, полученный от

пациента с немелкоклеточным раком легкого, или хромосомный образец, полученный от пациента, демонстрирующего предопухолевое состояние. Кроме того, в качестве контроля могут быть использованы хромосомные образцы, полученные от пациента с предопухолевым состоянием, хромосомные образцы, полученные от пациентов, не имеющих рака, или хромосомные образцы, взятые у нормальных, здоровых субъектов. В качестве контроля также могут быть использованы хромосомные образцы, полученные из штаммов клеток.

[00162] Если химерный ген представляет собой химерный ген SLC34A2-ROS1, кодирующий химерный белок SLC34A2-ROS1, то химерный ген SLC34A2-ROS1 (или любой другой химерный ген ROS1, например, CD74-ROS1 и FIG-ROS1) может быть обнаружен с помощью полинуклеотида (зонда), способного к гибридизации (комплементарному связыванию) с химерной областью и/или праймерной парой, способной к образованию фрагмента полинуклеотида, имеющего 100-200 последовательных нуклеотидов, содержащего химерную область. Кроме того, в одном иллюстративном варианте реализации химерный белок SLC34A2-ROS1 может быть обнаружен с помощью антитела или аптамера, специфически связывающегося с химерной областью химерного белка SLC34A2-ROS1.

[00163] Кроме того, обнаружение может быть осуществлено с помощью анализа слияния, который представляет собой комбинацию метода хромогенной *in situ* гибридизации (CISH) и метода *in situ* гибридизации с серебром (SISH). «Точка слияния» в тексте настоящего описания относится к точке, в которой часть, образованная из соответствующих генов SLC34A2, гибридизована с частью, образованной из гена ROS1.

[00164] Термин «способная к гибридизации с химерной областью (или областью инверсии)» может относиться к наличию комплементарной последовательности или последовательности, имеющей идентичность последовательностей по меньшей мере 90 % с последовательностью химерной области (или области инверсии). В другом варианте реализации представлена композиция для диагностики рака, содержащая один или более элементов, выбранных из группы, состоящей из полинуклеотида, способного к гибридизации с химерной областью, праймерной пары, способной к образованию полинуклеотидного фрагмента, содержащего 100-200 последовательных нуклеотидов, содержащего химерную область. Также полинуклеотид, способный к гибридизации с областью инверсии в 6 хромосоме человека, праймерная пара, способная к образованию полинуклеотидного фрагмента, содержащего 100-200 последовательных нуклеотидов, содержащего область инверсии 6 хромосомы человека, и антитело или аптамер,

связывающийся с химерной областью. В другом варианте реализации представлено применение химерного белка и/или химерного гена для диагностики рака. Пациент может представлять собой любое млекопитающее, например, примата, такого как человек или обезьяна, грызуна, такого как мышь или крыса, в частности, человека. Испытуемый образец, подходящий для применения в любых упомянутых анализах, может представлять собой клетку (например, клетку легкого); ткань (например, легочную ткань); жидкость организма (например, кровь); циркулирующую опухолевую ДНК, циркулирующие опухолевые клетки. Образцы могут быть собраны любым способом, известным специалистам в данной области техники, включая получение в результате хирургической биопсии опухоли, кор-биопсии опухоли, тонкоигольной аспирации опухоли, плеврального экссудата и других известных способов выделения клеток и тканей из организма пациента. Например, на циркулирующих опухолевых клетках может быть проведен анализ FISH (описанный в настоящем документе).

[00165] Пациент может проходить лечение или иметь запланированное лечение ингибитором киназы. Испытуемый образец может содержать клетку, полученную из раковой клетки человека или ее экстракта.

[00166] В другом варианте реализации представлен химерный ген, кодирующий химерный белок, где ген, кодирующий N-концевой домен партнера по слиянию, расположен на 5'-конце, а ген, кодирующий C-концевой домен белка ROS1, расположен на 3'-конце. В одном иллюстративном варианте реализации, если химерный белок представляет собой белок SLC34A2-ROS1, химерный ген может быть представлен как ген SLC34A2-ROS1, где ген, кодирующий N-концевой домен SLC34A2, расположен на 5'-конце, а ген, кодирующий C-концевой домен белка ROS1, расположен на 3'-конце.

[00167] В другом варианте реализации представлен экспрессионный вектор, содержащий химерный ген и необязательно транскрипционные элементы (например, промотор и т.п.), функционально связанные с химерным геном. В другом варианте реализации представлена клетка-трансформант, трансформированная экспрессионным вектором.

[00168] Биологические образцы, полученные во время лечения или диагностики (биопсийные образцы и т.д.) зачастую фиксируют в формалине, и в этом случае применение *in situ* гибридизации является предпочтительным, поскольку геном ДНК, который является объектом обнаружения, стабилен при фиксации в формалине и поскольку чувствительность обнаружения является высокой.

[00169] При *in situ* гибридизации геномная ДНК, которая кодирует химерный полипептид SLC34A2-ROS1 в биологическом образце, может быть обнаружена гибридизацией полинуклеотида по пункту (а) или (b), описанного ниже, имеющего цепь длиной по меньшей мере 15 нуклеотидных оснований:

(а) полинуклеотид, который представляет собой по меньшей мере один зонд, выбранный из группы, состоящей из зондов, которые гибридизуются с полинуклеотидом, кодирующим белок SLC34A2, и зондов, которые гибридизуются с полинуклеотидом, кодирующим белок ROS1

(b) полинуклеотид, который представляет собой зонд, который гибридизуется с сайтом слияния полинуклеотида, кодирующего белок SLC34A2, и полинуклеотида, кодирующего белок ROS1.

[00170] При *in situ* гибридизации геномная ДНК, которая кодирует химерный полипептид CD74-ROS1 в биологическом образце может быть обнаружена гибридизацией полинуклеотида по пункту (а) или (b), описанного ниже, имеющего цепь длиной по меньшей мере 15 оснований:

(а) полинуклеотид, который представляет собой по меньшей мере один зонд, выбранный из группы, состоящей из зондов, которые гибридизуются с полинуклеотидом, кодирующим белок CD74, и зондов, которые гибридизуются с полинуклеотидом, кодирующим белок ROS1

(b) полинуклеотид, который представляет собой зонд, который гибридизуется с сайтом слияния полинуклеотида, кодирующего белок CD74, и полинуклеотида, кодирующего белок ROS1.

[00171] При *in situ* гибридизации геномная ДНК, которая кодирует химерный полипептид FIG-ROS1 в биологическом образце может быть обнаружена гибридизацией полинуклеотида по пункту (а) или (b), описанного ниже, имеющего цепь длиной по меньшей мере 15 оснований:

(а) полинуклеотид, который представляет собой по меньшей мере один зонд, выбранный из группы, состоящей из зондов, которые гибридизуются с полинуклеотидом, кодирующим белок FIG, и зондов, которые гибридизуются с полинуклеотидом, кодирующим белок ROS1

(b) полинуклеотид, который представляет собой зонд, который гибридизуется с сайтом слияния полинуклеотида, кодирующего белок FIG, и полинуклеотида, кодирующего белок ROS1.

[00172] Однако последовательность ДНК гена может мутировать в естественных условиях (то есть не искусственным образом). Соответственно, такие природные варианты также могут быть объектом настоящего изобретения (аналогичным образом здесь и далее).

[00173] Полинуклеотид, указанный в пункте (а) настоящего изобретения, может быть любым, при условии, что он может обнаруживать наличие геномной ДНК, которая кодирует вышеупомянутый химерный белок ROS1 в биологическом образце, посредством гибридизации с полинуклеотидом, который кодирует партнера по связыванию ROS1, т.е. белок SLC34A2, CD74 или FIG, или с полинуклеотидом, который кодирует белок ROS1, которые являются целевыми последовательностями оснований указанного полинуклеотида. Предпочтительно, он представляет собой полинуклеотид, указанный ниже в пунктах (a1)-(a4).

[00174] (a1) Комбинация полинуклеотида, который гибридизуется с кодирующей областью части или полного спирального домена экзонов 1-2 и 5'-боковой областью, расположенной против хода транскрипции от указанной кодирующей области гена SLC34A2 (здесь и далее упомянутого также как «5' SLC34A2 зонд 1»), и полинуклеотида, который гибридизуется с кодирующей областью киназного домена и 3'-боковой областью, расположенной по ходу транскрипции от указанной кодирующей области гена ROS1 (здесь и далее упомянутого также как «3' ROS1 зонд 1»).

[00175] (a2) Комбинация полинуклеотида, который гибридизуется с 5'-боковой областью, расположенной против хода транскрипции от указанной кодирующей области киназного домена гена ROS1 (здесь и далее упомянутого также как «5' ROS1 зонд 1»), и полинуклеотида, который гибридизуется с кодирующей областью киназного домена и 3'-боковой областью, расположенной по ходу транскрипции указанной кодирующей области гена ROS1 (здесь и далее упомянутого также как «3' ROS1 зонд 1»).

[00176] (a3) Комбинация полинуклеотида, который гибридизуется с кодирующей областью фибронектина III типа 9 и 5'-боковой областью, расположенной против хода транскрипции указанной от указанной области гена ROS1 (здесь и далее упомянутого также как «5' ROS1 зонд 2»), и полинуклеотида, который гибридизуется с кодирующей областью трансмембранного домена и 3'-боковой областью, расположенной по ходу транскрипции от указанной кодирующей области гена ROS1 (здесь и далее упомянутого также как «3' ROS1 зонд 2»).

[00177] (a4) Комбинация полинуклеотида, который гибридизуется с кодирующей областью части или полного спирального домена и 5'-боковой областью, расположенной

против хода транскрипции от указанной кодирующей области гена SLC34A2 (здесь и далее упомянутого также как «5' SLC34A2 зонд 1»), и полинуклеотида, который гибридизуется с кодирующей областью суперспирального домена и 3'-боковой областью, расположенной по ходу транскрипции от указанной кодирующей области гена SLC34A2 (здесь и далее упомянутого также как «3' SLC34A2 зонд 1»).

[00178] Область (целевая последовательность оснований), с которой гибридизуется полинуклеотид по пункту (a1), используемые в *in situ* гибридизации, предпочтительно представляет собой область в пределах 1000000 оснований от сайта слияния гена SLC34A2 и гена ROS1, что обусловлено соображениями специфичности к целевой последовательности оснований и чувствительности обнаружения, а область, с которой гибридизуются полинуклеотиды по пунктам (a2)-(a4), используемые в *in situ* гибридизации, предпочтительно представляет собой область в пределах 1000000 оснований от точечного разрыва в гене SLC34A2 или гене ROS1, по тем же причинам.

[00179] Полинуклеотид, указанный выше в пункте (a) или (b), используемый в *in situ* гибридизации, предпочтительно представляет собой коллекцию, составленную из множества типов полипептидов, которая может охватывать все вышеупомянутые целевые последовательности оснований, что обусловлено соображениями специфичности к целевой последовательности оснований и чувствительности обнаружения. В этом случае длина полинуклеотидов, которые образуют коллекцию, составляет по меньшей мере 15 оснований и предпочтительно от 100 до 1000 оснований.

[00180] Полинуклеотид, указанный выше в пунктах (a) или (b), используемый в *in situ* гибридизации, предпочтительно является меченным флуоресцентным красителем или подобным образом для обнаружения. Примеры таких флуоресцентных красителей включают DEAC, FITC, R6G, TexRed и Cy5, но не ограничиваются ими. Помимо флуоресцентного красителя, вышеупомянутый полинуклеотид может также быть мечен красителем (хромогеном), таким как DAB, или серебром и подобным образом, основанным на ферментативном осаждении металла.

[00181] При *in situ* гибридизации, при использовании 5' SLC34A2 зонда 1 и 3' ROS1 зонда 1, или при использовании 5' ROS1 зонда 1 и 3' ROS1 зонда 1, или при использовании 5' ROS1 зонда 2 и 3' ROS1 зонда 2, или при использовании 5' SLC34A2 зонда 1 и 3' SLC34A2 зонда 1, предпочтительно, чтобы указанные зонды были мечены взаимопротивоположными красителями. При проведении *in situ* гибридизации с применением комбинации зондов, меченных описанным образом различными красителями, если сигнал, создаваемый меткой 5' SLC34A2 зонда 1 (например,

флуоресцентный), и сигнал, создаваемый меткой 3' ROS1 зонда 1, перекрываются, может быть установлено, что обнаружена геномная ДНК, кодирующая химерный полипептид SLC34A2-ROS1. С другой стороны, если сигнал, созданный меткой 5' ROS1 зонда 1, и сигнал, созданный меткой 3' ROS1 зонда 1, расщепляются, или сигнал, созданный меткой 5' ROS1 зонда 2, и сигнал, созданный меткой 3' ROS1 зонда 2, расщепляются, или сигнал, созданный меткой 5' SLC34A2 зонда 1, и сигнал, созданный меткой 3' SLC34A2 зонда 1, расщепляются, может быть установлено, что обнаружена геномная ДНК, кодирующая химерный полипептид SLC34A2-ROS1.

[00182] Мечение полинуклеотида может быть осуществлено с помощью известной технологии. Например, основание подложки, меченное флуоресцентным красителем или подобным образом с помощью ник-трансляции или случайного праймирования, может быть внедрено в полинуклеотид с получением меченого полинуклеотида. При *in situ* гибридизации условия, используемые для гибридизации полинуклеотида, указанного выше в пункте (a) или (b), и вышеупомянутого биологического образца, могут варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как длина релевантного полинуклеотида, однако одним из примеров жестких условий гибридизации является 0,2xSSC, 65 °C, а примером нежестких условий гибридизации является 2,0xSSC, 50°C. Следует отметить, что условия гибридизации с такой же степенью строгости, как вышеуказанные условия, могут быть достигнуты специалистами в данной области техники посредством подходящего выбора различных условий, таких как концентрация соли (степень разбавления SSC) и температура, а также концентрация поверхностно-активного вещества (NP-40 и т.д.), концентрация формамида и pH. Например, для общих условий гибридизации для проведения скрининга, обеспечивают полинуклеотидные композиции, способные к гибридизации в умеренных-очень жестких условиях с полинуклеотидной последовательностью, представленной в настоящем документе, или ее частью, или ее комплементарной последовательностью. Технологии гибридизации общеизвестны в области молекулярной биологии. Для иллюстративных целей, подходящие умеренно жесткие условия для испытания гибридизации полинуклеотида согласно настоящему изобретению с другими полинуклеотидами включают предварительное промывание в растворе 5X SSC, 0,5 % SDS, 1,0 mM ЭДТК (pH 8,0); гибридизацию при 50 °C-60 °C, 5X SSC, в течение ночи; с последующим двукратным промыванием при 65 °C в течение 20 минут каждым из растворов 2X, 0,5X, и 0,2X SSC, содержащих 0,1 % SDS. Специалистам в данной области техники понятно, что жесткость гибридизации можно легко регулировать, например, изменением содержания соли в

растворе гибридизации и/или температуры, при которой проводят гибридизацию. Например, в другом варианте реализации подходящие жесткие условия гибридизации включают условия, описанные выше, за исключением повышения температуры гибридизации, например, до 60-65 °C или 65-70 °C.

[00183] Примеры способов обнаружения геномной ДНК, которая кодирует химерный полипептид SLC34A2-ROS1, с применением полинуклеотида, указанного выше в пункте (a) или (b), отличные от вышеуказанных способов *in situ* гибридизации, представляют собой саузерн-блоттинг, нозерн-блоттинг и дот-блоттинг. В указанных способах вышеупомянутый химерный ген обнаруживают посредством гибридизации в умеренных-очень жестких условиях полипептида, указанного выше в пункте (a) или (b), с мембраной, на которой транскрибирован экстракт нуклеиновой кислоты, полученный из вышеупомянутого биологического образца. При использовании полинуклеотида (a) может быть установлено, что обнаружена геномная ДНК, которая кодирует химерный полипептид SLC34A2-ROS1, если полипептид, который гибридизуется с полинуклеотидом, кодирующим белок SLC34A2, и полипептид, который гибридизуется с полинуклеотидом, кодирующим белок ROS1, распознают одну и ту же полосу, проявившуюся на мембране.

[00184] Микроматричный анализ генома и микроматричный анализ ДНК представляют собой дополнительные способы обнаружения геномной ДНК, которая кодирует химерный полипептид SLC34A2-ROS1, с применением описанного выше полинуклеотида по пункту (b). В указанных способах матрицу полинуклеотидов по пункту (b) фиксируют на подложке, и релевантную геномную ДНК обнаруживают приведением в контакт биологического образца с полинуклеотидами в матрице. При ПЦР или секвенировании полинуклеотиды по пункту (c), описанному ниже, могут быть использованы для специфической амплификации части или полного химерного полинуклеотида SLC34A2-ROS1, с применением ДНК (геномной ДНК, кДНК) или РНК, полученной из биологического образца в виде матрицы. (c) Полинуклеотид, который представляет собой пару праймеров, предназначенных для образования сэндвичевой структуры из сайта слияния полинуклеотида, кодирующего белок SLC34A2, и полинуклеотида, кодирующего белок ROS1. «Полинуклеотид, который представляет собой пару праймеров» представляет собой набор праймеров, из которых один праймер гибридизуется с полинуклеотидом, кодирующим белок SLC34A2, а другой праймер гибридизуется с полинуклеотидом, кодирующим белок ROS1, в последовательности оснований, такой как вышеупомянутый химерный полинуклеотид, который служит мишенью. Длина указанных

полинуклеотидов обычно составляет от 15 до 100 оснований и предпочтительно от 17 до 30 оснований.

[00185] С точки зрения точности и чувствительности обнаружения методом ПЦР, полинуклеотид, указанный в пункте (с) согласно настоящему изобретению, предпочтительно представляет собой последовательность, комплементарную последовательности оснований вышеупомянутого химерного полинуклеотида в пределах 5000 оснований от сайта слияния полинуклеотида, кодирующего белок SLC34A2, и полинуклеотида, кодирующего белок ROS1.

[00186] «Полинуклеотид, который представляет собой пару праймеров» может быть соответствующим образом спроектирован с помощью известных технологий, основанных на последовательности оснований химерного полинуклеотида SLC34A2-ROS1, служащего мишенью. Преимущественные примеры «полинуклеотида, который представляет собой пару праймеров», представляют собой наборы праймеров, состоящий из одного праймера, выбранного из группы, состоящей из SLC34A2-ROS1-F1, SLC34A2-int15-F1, SLC34A2-int15-F2, SLC34A2-ex16-F1, SLC34A2-ex23-F1, SLC34A2-ex24-F1, SLC34A2-F-orf2438 и SLC34A2-int15-F3.5, и одного праймера, выбранного из группы, состоящей из SLC34A2-ROS1-R1, ROS1-int11-R3, ROS1-int7-R1, ROS1-int11-R0.5, ROS1-int11-R1, ROS1-int7-R2 и ROS1-R-orf2364. Более предпочтительно, он представляет собой SLC34A2-ROS1-F1 и SLC34A2-ROS1-R1, SLC34A2-int15-F1 и SLC34A2-ROS1-R1, SLC34A2-int15-F2 и ROS1-int11-R3, SLC34A2-ex16-F1 и SLC34A2-ROS1-R1, SLC34A2-ex23-F1 и SLC34A2-ROS1-R1, или праймер SLC34A2-ex24-F1 и праймер ROS1-int7-R1.

[00187] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения представлены способы: идентификации, оценки или обнаружения слияния SLC34A2-ROS1; способы идентификации, определения, оценки и/или лечения субъекта, страдающего от рака, например, рака, имеющего слияние SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 или FIG-ROS1; выделения молекул нуклеиновых кислот SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 или FIG-ROS1, конструкторов нуклеиновых кислот, клеток-хозяев, содержащих указанные молекулы нуклеиновых кислот; очищенных полипептидов SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 или FIG-ROS1 и связывающих агентов; реагентов обнаружения (например, зондов, праймеров, антител, наборов, способных, например, к специфическому обнаружению нуклеиновых кислот или белков SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 или FIG-ROS1); анализов скрининга для идентификации молекул, которые взаимодействуют, например, ингибируют слияния 5'SLC34A2-3'ROS1, 5'CD74-3'ROS1 или 5'FIG-3'ROS1, например, новых ингибиторов киназы; а также анализы и наборы для определения, идентификации, оценки и/или

лечения субъекта, страдающего от рака, например, рака, имеющего одно или более слияний SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 или FIG-ROS1. Композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут быть использованы, например, для идентификации новых ингибиторов SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 или FIG-ROS1; для определения, идентификации или выбора субъекта, например, пациента, страдающего от рака; и для лечения или предупреждения рака.

[00188] Молекулы нуклеиновых кислот SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 и FIG-ROS1. В одном аспекте настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты (например, выделенной или очищенной), которая содержит фрагмент гена SLC34A2, или CD74, или FIG и фрагмент протоонкогена ROS1. В одном варианте реализации молекула нуклеиновой кислоты содержит слияние, например, внутрирамочное слияние по меньшей мере одного экзона SLC34A2, CD74 или FIG и экзона ROS1 (например, одного или более экзонов, кодирующих домен тирозинкиназы ROS1 или его фрагмент).

[00189] В иллюстративном варианте реализации молекула нуклеиновой кислоты 5'SLC34A2-3'ROS1 содержит достаточную последовательность SLC34A2 и достаточную последовательность ROS1, так что кодируемое слияние 5'SLC34A2-3'ROS1 имеет конститутивную активность киназы, например, имеет повышенную активность, например, активность киназы, по сравнению с ROS1 дикого типа, например, в клетке рака, упомянутого в настоящем документе. В одном из вариантов реализации кодируемое слияние 5'SLC34A2-3'ROS1 содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 или 11 экзонов из SLC34A2 и по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12 или 13 экзонов ROS1. В одном из вариантов реализации кодируемый химерный полипептид 5'SLC34A2-3'ROS1 содержит спиральный домен или его функциональный фрагмент и домен тирозинкиназы ROS1 или его функциональный фрагмент.

[00190] В иллюстративном варианте реализации молекула нуклеиновой кислоты 5'CD74-3'ROS1 содержит достаточную последовательность CD74 и достаточную последовательность ROS1, так что кодируемое слияние 5'CD74-3'ROS1 имеет конститутивную активность киназы, например, имеет повышенную активность, например, активность киназы, по сравнению с ROS1 дикого типа, например, в клетке рака, упомянутого в настоящем документе. В одном из вариантов реализации кодируемое слияние 5'CD74-3'ROS1 содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6 экзонов из CD74 и по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12 или 13 экзонов ROS1. В одном из вариантов реализации кодируемый химерный полипептид 5'CD74-3'ROS1 содержит спиральный;

сигнально-якорный домен для II типа мембранного белка или его функциональный фрагмент, и домен тирозинкиназы ROS1 или его функциональный фрагмент.

[00191] В иллюстративном варианте реализации молекула нуклеиновой кислоты 5'FIG-3'ROS1 содержит достаточную последовательность FIG и достаточную последовательность ROS1, так что кодируемое слияние 5'FIG-3'ROS1 имеет конститутивную активность киназы, например, имеет повышенную активность, например, активность киназы, по сравнению с ROS1 дикого типа, например, в клетке рака, упомянутого в настоящем документе. В одном из вариантов реализации кодируемое слияние 5'FIG-3'ROS1 содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 экзонов из FIG и по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12 или 13 экзонов ROS1. В одном из вариантов реализации кодируемый химерный полипептид 5'FIG-3'ROS1 содержит суперспиральный домен или его функциональный фрагмент и домен тирозинкиназы ROS1 или его функциональный фрагмент.

[00192] В одном из вариантов реализации молекула химерной нуклеиновой кислоты SLC34A2-ROS1 содержит нуклеотидную последовательность, которая имеет внутрирамочное слияние экзона 2 и/или 4 SLC34A2 с экзоном 32 и/или 34, и/или 35 ROS1. В другом варианте реализации молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая содержит точечный разрыв. Например, слияние SLC34A2-ROS1 может содержать внутрирамочное слияние по меньшей мере экзона 4 SLC34A2 или его фрагмента (например, экзонов 1-4 SLC34A2 или его фрагмента) с по меньшей мере экзоном 32 и/или 34 ROS1 или его фрагмента (например, экзоны 30-43 ROS1 или его фрагмента). В некоторых вариантах реализации слияние SLC34A2-ROS1 находится в конфигурации от 5'-SLC34A2 к 3'-ROS1. В одном из вариантов реализации молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность экзонов 1-4 гена SLC34A2 или его фрагмента. В другом варианте реализации молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность экзонов 30-43, например, 32 и/или 34, и/или 35 гена ROS1 или его фрагмента, или последовательность, по существу идентичную ей.

[00193] В одном из вариантов реализации молекула химерной нуклеиновой кислоты CD74-ROS1 содержит нуклеотидную последовательность, которая имеет внутрирамочное слияние экзонов 1-6 CD74 с экзоном 32 и/или 34 ROS1. В другом варианте реализации молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая содержит точечный разрыв. Например, слияние CD74-ROS1 может содержать внутрирамочное слияние по меньшей мере экзона 6 CD74 или его фрагмента (например,

экзонов 1-6 CD74 или его фрагмента) с по меньшей мере экзоном 32 и/или 34, и/или 35 ROS1 или его фрагмента (например, экзоны 30-43 ROS1 или его фрагмента). В некоторых вариантах реализации слияние CD74-ROS1 находится в конфигурации от 5'-CD74 к 3'-ROS1. В одном из вариантов реализации молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность экзонов 1-6 гена CD74 или его фрагмента. В другом варианте реализации молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность экзонов 30-43, например, 32 и/или 34, и/или 35 гена ROS1 или его фрагмента, или последовательность, по существу идентичную ей.

[00194] В одном из вариантов реализации молекула химерной нуклеиновой кислоты FIG-ROS1 содержит нуклеотидную последовательность, которая имеет внутрирамочное слияние экзонов 1-8, например, 1-4 или 1-8 FIG с экзоном 32 и/или 34, и/или 35 ROS1. В другом варианте реализации молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая содержит точечный разрыв. Например, слияние FIG-ROS1 может содержать внутрирамочное слияние по меньшей мере экзона 4 и/или экзона 8 FIG или его фрагмента (например, экзонов 1-4 или 1-8 FIG или его фрагмента) с по меньшей мере экзоном 32 и/или 34, и/или 35 ROS1 или его фрагмента (например, экзоны 30-43 ROS1 или его фрагмента). В некоторых вариантах реализации слияние FIG-ROS1 находится в конфигурации от 5'-CD74 к 3'-ROS1. В одном из вариантов реализации молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность экзонов 1-6 гена CD74 или его фрагмента. В другом варианте реализации молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность экзонов 30-43, например, 32 и/или 34, и/или 35 гена ROS1 или его фрагмента, или последовательность, по существу идентичную ей.

[00195] В других вариантах реализации молекула химерной нуклеиновой кислоты SLC34A2-ROS1 содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный полипептид SLC34A2-ROS1, который содержит фрагмент гена SLC34A2 и фрагмент протоонкогена ROS1. В одном из вариантов реализации нуклеотидная последовательность кодирует химерный полипептид SLC34A2-ROS1, который содержит спиральный домен или его функциональный фрагмент и домен тирозинкиназы ROS1 или его функциональный фрагмент.

[00196] В другом варианте реализации молекула химерной нуклеиновой кислоты CD74-ROS1 содержит слияние CD74-ROS1, которое содержит сочленение слияния между транскриптом ROS1 и транскриптом CD74. В другом варианте реализации молекула нуклеиновой кислоты содержит слияние, например, внутрирамочное слияние, по меньшей

мере экзона 32, или 34, или 35 ROS1 или его фрагмента (например, экзоны 30-43 ROS1 или его фрагмента) и по меньшей мере экзона 1 или его фрагмента (например, экзоны 1-6 CD74 или его фрагмента). В некоторых вариантах реализации слияние CD74-ROS1 находится в конфигурации от 5'-CD74 к 3'-ROS1. В одном из вариантов реализации молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотиды, соответствующие экзонам 30-43 гена ROS1, например, экзонам 32, 34 или 35 или его фрагменту, или последовательность, по существу идентичную им.

[00197] В другом варианте реализации молекула химерной нуклеиновой кислоты FIG-ROS1 содержит слияние FIG-ROS1, которое содержит сочленение слияния между транскриптом ROS1 и транскриптом FIG. В другом варианте реализации молекула нуклеиновой кислоты содержит слияние, например, внутрирамочное слияние, по меньшей мере экзона 32, или 34, или 35 ROS1 или его фрагмента (например, экзоны 30-43 ROS1 или его фрагмента) и по меньшей мере экзона 4 или 8, или его фрагмента (например, экзоны 1-8 FIG или его фрагмента). В некоторых вариантах реализации слияние FIG-ROS1 находится в конфигурации от 5'-FIG к 3'-ROS1. В одном из вариантов реализации молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотиды, соответствующие экзонам 30-43 гена ROS1, например, экзонам 32, 34 или 35 или его фрагменту, или последовательность, по существу идентичную им.

[00198] В родственном аспекте настоящее изобретение относится к конструктам нуклеиновой кислоты, которые содержат молекулы химерных нуклеиновых кислот SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 и FIG-ROS1, описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации молекулы нуклеиновых кислот функционально связаны с нативной или гетерологичной регуляторной последовательностью. Включены также векторы и клетки-хозяева, которые содержат молекулы нуклеиновой кислоты SLC34A2-ROS1, описанные в настоящем документе, например, векторы и клетки-хозяева, подходящие для получения молекул нуклеиновых кислот и полипептидов, описанных в настоящем документе.

[00199] В другом аспекте настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновых кислот, которые снижают или ингибируют экспрессию нуклеиновой кислоты, кодирующей слияние SLC34A2-ROS1, описанное в настоящем документе. Примеры таких молекул нуклеиновых кислот включают, например, антисмысловые молекулы, рибозимы, РНКи, тройные спиральные молекулы, которые гибридизуются с нуклеиновой кислотой, кодирующей SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 и FIG-ROS1 или

транскрипционную регуляторную область SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 и FIG-ROS1, и блокируют или снижают экспрессию мПНК SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 или FIG-ROS1.

[00200] Настоящее изобретение относится также к молекуле нуклеиновой кислоты, например, к фрагменту нуклеиновой кислоты, подходящему в качестве зонда, праймера, затравки или библиотечного элемента, который содержит, фланкирует, гибридизуется с и подходит для идентификации или иным образом основан на слияниях ROS1, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации зонд, праймер или затравочная молекула представляет собой олигонуклеотид, обеспечивающий возможность захвата, обнаружения или выделения молекулы химерной нуклеиновой кислоты ROS1, описанной в настоящем документе. Олигонуклеотид может содержать нуклеотидную последовательность, по существу комплементарную фрагменту молекул химерных нуклеиновых кислот ROS1, описанных в настоящем документе. Идентичность последовательностей между фрагментом нуклеиновой кислоты, например, олигонуклеотидом, и целевой последовательностью слияния ROS1 не обязательно должна быть точной, при условии, что указанные последовательности достаточно комплементарны для обеспечения возможности захвата, обнаружения или выделения целевой последовательности. В одном из вариантов реализации фрагмент нуклеиновой кислоты представляет собой зонд или праймер, который содержит олигонуклеотид длиной от около 5 до 25, например, от 10 до 20 или от 10 до 15 нуклеотидов. В других вариантах реализации фрагмент нуклеиновой кислоты представляет собой затравку, которая содержит олигонуклеотид длиной от около 100 до 300 нуклеотидов, от 130 до 230 нуклеотидов, от 150 до 200 нуклеотидов, от 200 до 350, от 350 до 950, от 300 до 600, от 500 до 1000, от 750 до 2000 нуклеотидов, 00 нуклеотидов, и не обязательно содержит химерные нуклеиновые кислоты ROS1.

[00201] В одном из вариантов реализации фрагмент нуклеиновой кислоты может быть использован для идентификации или захвата, например, посредством гибридизации, слияния SLC34A2-ROS1 или слияния CD74-ROS1, или слияния FIG-ROS1. В иллюстративном примере фрагмент нуклеиновой кислоты может представлять собой зонд, праймер для применения при идентификации или захвате, например, посредством гибридизации в умеренных-очень жестких условиях, слияния SLC34A2-ROS1 или слияния CD74-ROS1, или слияния FIG-ROS1, описанного в настоящем документе. В одном из вариантов реализации фрагмент нуклеиновой кислоты может быть использован для идентификации или захвата точечного разрыва SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1. В одном иллюстративном варианте реализации фрагмент нуклеиновой

кислоты гибридизуется с нуклеотидной последовательностью в пределах хромосомной перестройки, которая приводит к внутрирамочному слиянию экзона 4 или 13 SLC34A2 с экзонами 32, 34 или 35 ROS1 (например, последовательность в пределах транслокации на 6 хромосоме).

[00202] Зонды или праймеры, описанные в настоящем документе, могут быть использованы, например, для FISH обнаружения или ПЦР амплификации, или для подтверждения с помощью ОТ-ПЦР перестроек ROS1 и идентификации партнеров по связыванию. В одном иллюстративном варианте реализации, в котором обнаружение основано на ПЦР, амплификация сочленений слияния SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1 может быть осуществлена с помощью праймера или пары праймеров, например, для амплификации последовательности, фланкирующей сочленения слияния SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1, описанные в настоящем документе, например, мутации или сочленение хромосомной перестройки, описанной в настоящем документе. В одном из вариантов реализации пара выделенных олигонуклеотидных праймеров может амплифицировать область, содержащую или расположенную рядом с положением слияния SLC34A2-ROS1. Например, прямые праймеры могут быть предназначены для гибридизации с нуклеотидной последовательностью в пределах геномной или мПНК последовательности SLC34A2, CD74 или FIG. В различных вариантах реализации праймеры к ROS1, SLC34A2 и FIG (различные виды, включая человека) имеются в продаже у компании Qiagen (кат. № QF0018545, QF00449078 и QF00278992 Qiagen, Гейтерсбёрг, штат Мэриленд, США). В других вариантах реализации подтверждение наличия химерных полинуклеотидов ROS1 может быть проведено на образцах опухоли пациента с применением панели праймеров ПЦР, содержащей прямые праймеры экзона 4 SLC34A2 и экзона 6 CD74, спаренные с обратными праймерами экзона 32 и экзона 34 ROS1. ПНК из образца опухоли может быть извлечена из ткани FFPE по способу Agencourt Formapure (Agencourt Biosciences, Беверли, штат Массачусетс, США) и обратно транскрибирована с помощью набора для синтеза кДНК Superscript III, имеющегося в продаже у компании Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния, США. Для определения точечных разрывов SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1 могут быть использованы следующие праймеры: SLC34A2 экзон 4, прямая последовательность TCGGATTTCTCTACTTTTTCGTG (SEQ ID NO:3); CD74 экзон 6, обратная последовательность CTCCTGTTTGAAATGAGCAGG (SEQ ID NO:4); ROS1 экзон 32, обратная последовательность GGAATGCCTGGTTTATTTGG (SEQ ID NO:5); и ROS1 экзон 34, обратная последовательность TGAAACTTGTTTCTGGTATCCAA (SEQ ID

НО:6). ПЦР амплификации могут быть осуществлены в любом термоциклере ПЦР, например, Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, Гамбург, Германия), с применением Taq-полимеразы Platinum (Invitrogen) в стандартных условиях с 40 нг кДНК. кДНК секвенировали с помощью набора BigDye 3.0 kit (Life Technologies, Карлсбад, штат Калифорния).

[00203] Фрагмент нуклеиновой кислоты может быть обнаруживаемым образом помечен, например, радиоактивной меткой, флуоресцентной меткой, биOLUMИнесцентной меткой, хемилюМИнесцентной меткой, ферментной меткой, меткой связывающей пары или может содержать аффинную метку; или меткой, или идентификатором (например, адаптором, штрихкодом или другим идентификатором последовательности).

[00204] В другом иллюстративном варианте реализации способ определения наличия слияния SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1 включает: непосредственное получение информации о наличии молекулы химерной нуклеиновой кислоты или полипептида SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1 в образце, полученном от субъекта. Образец может представлять собой образец, состоящий из жидкости, клеток, ткани, например, опухолевой ткани, он может содержать образец нуклеиновой кислоты, образец белка, биопсию опухоли или циркулирующую опухолевую клетку или нуклеиновую кислоту, он может быть выбран из рака легкого, включая HMPЛ, SCLC, SCC или их комбинацию, и аденокарциному или меланому.

[00205] Способ обнаружения слияния SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1 в молекуле нуклеиновой кислоты с помощью любого из следующих способов: анализ гибридизации нуклеиновой кислоты, анализы на основе амплификации, анализ ПЦР-ПДРФ, ОТ-ПЦР, секвенирование, скрининговый анализ, FISH, спектральное кариотипирование или MFISH, сравнительная геномная гибридизация), *in situ* гибридизация, SSP, ВЭЖХ или масс-спектрометрическое генотипирование.

[00206] Описан способ обнаружения химерного полипептида или белка SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1, включающий приведение в контакт образца белка с реагентом, который специфически связывается с химерным полипептидом SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1; и обнаружение образования комплекса химерного полипептида SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1 и указанного реагента. Способы обнаружения полипептида включают применение реагента, меченного обнаруживаемой группой, для облегчения обнаружения связанного и несвязанного реагента, где реагент представляет собой молекулу антитела, где уровень или активность слияния SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1 повышена, где слияние

SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1 обнаруживают до начала, во время или после лечения субъекта, где слияние SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1 обнаруживают во время диагностики рака, где слияние SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1 обнаруживают в определенном интервале, например, в первой точке времени и по меньшей мере в одной последующей точке времени.

[00207] Включены также реакции на лечение, в частности в которых использован восприимчивый к обнаружению наличия слияния SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1 один или более из следующих элементов: (1) разделение группы пациентов; (2) идентификация или выбор субъекта как вероятно или маловероятно отвечающего на лечение; (3) выбор варианта лечения; и/или (4) прогнозирование временной динамики заболевания у субъекта.

[00208] Выделенная или очищенная молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует слияние SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1 или его фрагмент, содержащий точечный разрыв, может быть использован с целью подтверждения и прямого специфического лечения положительного к слиянию ROS1 рака HMPЛ и аденокарциномы легкого с применением соединений согласно настоящему изобретению. Другие конструкторы могут быть использованы для прямого специфического лечения рака, позитивного по слиянию ROS1, например, HMPЛ с перестроенным ROS1, включая: выделенную или очищенную молекулу химерной нуклеиновой кислоты SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1, функционально связанную с нативной или гетерологической регуляторной последовательностью. Выделенный или очищенный вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует слияние SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1, или его точечный фрагмент, содержащий точечный разрыв. Клетку-хозяина, содержащего вектор. Молекулу нуклеиновой кислоты, которая специфически снижает или ингибирует экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты, которая кодирует слияние SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1, которая может быть выбрана из антисмысловой молекулы, рибозима, миРНК или тройной спиральной молекулы. Выделенный или очищенный химерный полипептид SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1, или его фрагмент, содержащий точечный разрыв. Выделенный или очищенный химерный полипептид SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1, имеющий активность киназы ROS1 и/или активность димеризации или мультимеризации. Выделенную или очищенную молекулу антитела, которая специфически связывается с химерным полипептидом SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1. Молекулу антитела, где указанная молекула антитела представляет собой

молекулу моноспецифического антитела к химерному полипептиду SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1.

[00209] Примеры способа обнаружения продукта трансляции химерного полинуклеотида SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1 согласно настоящему изобретению представляют собой иммуноокрашивание, вестерн-блоттинг, твердофазный иммуноферментный анализ, проточную цитометрию, иммунопреципитацию и матричный анализ антител. В указанных способах используют антитело, которое связывается с химерным полипептидом SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1. Примеры такого антитела представляют собой антитело, специфичное к полипептиду, содержащему сайт слияния белка SLC34A2 или CD74, или FIG и белок ROS1 (здесь и далее также упоминаемое как специфичное к сайту слияния антитело»), антитело, которое связывается с полипептидом, состоящим из области С-концевой части от вышеупомянутого сайта слияния белка ROS1 (здесь и далее также упоминаемое как «ROS1-С концевое антитело») и антитело, которое связывается с полипептидом, состоящим из области на N-концевой части от вышеупомянутого сайта слияния белка SLC34A2 или CD74, или FIG (здесь и далее также упоминаемое как SLC34A2 или CD74, или FIG-N концевое антитело»). В данном контексте «специфическое к сайту слияния антитело» означает антитело, которое специфически связывается с полипептидом, содержащим вышеуказанный сайт слияния, но не связывается ни с белком SLC34A2 или CD74, или FIG дикого типа (нормального типа), ни с белком ROS1 дикого типа (нормального типа).

[00210] Химерный полипептид SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1 может быть обнаружен с помощью вышеупомянутого специфического к сайту слияния антитела или комбинации вышеупомянутого ROS1-С терминального антитела и SLC34A2 или CD74, или FIG-N терминального антитела. Однако поскольку в нормальных клетках легкого, например, практически не обнаруживают экспрессию белка ROS1, то наличие химерного полипептида SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1 в ткани аденокарциномы легкого может быть обнаружено даже при использовании только ROS1-С терминального антитела при иммуноокрашивании.

[00211] В различных вариантах реализации применение иммуногистохимического окрашивания (ИHC) и вестерн-блоттинга для идентификации химерных полипептидов ROS1 согласно настоящему изобретению может быть осуществлено с применением фосфо-ROS1, антител ROS1, имеющих в продаже у компании Cell Signaling Technology (Данверс, штат Массачусетс, США). В одном из вариантов реализации идентификация позитивных к слиянию ROS1 раковых клеток, например, клеток рака легкого HMPЛ с

перестройкой ROS1, может быть осуществлена с помощью кроличьего анти-ROS1 моноклонального антитела D4D6, кат. № 3287 (Cell Signaling Technology, Данверс, штат Массачусетс, США).

[00212] В некоторых вариантах реализации «антитело, которое связывается с химерным полипептидом SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1», может быть получено специалистом в данной области техники, выбравшим подходящий известный способ. Пример таких известных способов представляет собой способ, в котором иммунное животное инокулируют вышеупомянутым полипептидом, состоящим из С-концевой части белка ROS1, химерным полипептидом SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1, вышеупомянутый пептид состоит из N-концевой части белка SLC34A2 или CD74, или FIG и т.д., активируя тем самым иммунную систему животного, а затем выделяют сыворотку (поликлональное антитело) крови животного, и используют способы получения моноклональных антител, такие как метод гибридомы, метод рекомбинантной ДНК и метод фагового дисплея. При использовании антитела, с которым связывается меченное соединение, целевой белок может быть напрямую обнаружен посредством обнаружения указанной метки. Меченное соединение не имеет определенного ограничения, при условии, что оно может связываться с антителом и может быть обнаружено. Примеры включают пероксидазу, β -D-галактозидазу, микропероксидазу, пероксидазу хрена (HRP), флуоресцеина изотиоцианат (FITC), родамина изотиоцианат (RITC), щелочную фосфатазу, биотин и радиоактивные соединения. Кроме того, помимо способов, которые обеспечивают прямое обнаружение целевого белка с применением антитела, с которым связывается меченное соединение, могут быть использованы также способы, которые обеспечивают косвенное обнаружение целевого белка с применением белка G, белка A или вторичного антитела, с которым связывается меченное антитело.

[00213] При обнаружении химерного полинуклеотида или полипептида SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1 в образце, выделенном из организма субъекта вышеупомянутыми способами, считают, что эффективность лечения рака с применением ингибитора тирозинкиназы ROS1, такого как соединение Формулы I, Ia или соединение 1, или его фармацевтически приемлемой соли, будет высоким у такого пациента, тогда как при отсутствии обнаружения наличия химерного полинуклеотида SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1 считают, что эффективность лечения рака ингибитором тирозинкиназы ROS1 будет низкой у указанного пациента.

[00214] Как описано выше, любой из полинуклеотидов, указанных ниже в пунктах (a)-(c), имеющих длину цепи по меньшей мере 15 оснований, может быть преимущественно

используют для обнаружения наличия или отсутствия химерного полинуклеотида SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1;

(a) полинуклеотид, который представляет собой по меньшей мере один зонд, выбранный из группы, состоящей из зондов, которые гибридизуются с полинуклеотидом, кодирующим белок SLC34A2 или CD74, или FIG, и зондов, которые гибридизуются с полинуклеотидом, кодирующим белок ROS1;

(b) полинуклеотид, который представляет собой зонд, который гибридизуется с сайтом слияния полинуклеотида, кодирующего белок SLC34A2 или CD74, или FIG, и полинуклеотида, кодирующего белок ROS1;

(c) полинуклеотид, который представляет собой пару праймеров, предназначенных для образования сэндвичевой структуры из сайта слияния полинуклеотида, кодирующего белок SLC34A2 или CD74, или FIG, и полинуклеотида, кодирующего белок ROS1;

[00215] Указанные полинуклеотиды имеют последовательность оснований, комплементарную определенной последовательности оснований гена-мишени. В данном контексте «комплементарный» может означать не полностью комплементарный, при условии, что он гибридизуется, например, в умеренных-очень жестких условиях. Например, указанные полипептиды имеют 80 % или более, предпочтительно 90 % или более, более предпочтительно 95 % или более, и наиболее предпочтительно 100 % гомологии с определенной последовательностью оснований.

[00216] В полинуклеотидах (a)-(c), в части или полной ДНК или РНК нуклеотиды могут быть замещены искусственными нуклеиновыми кислотами, такими как ПНК (полиамидная нуклеиновая кислота, пептидная нуклеиновая кислота), ЗНК (торговая марка, замкнутая нуклеиновая кислота, мостиковая нуклеиновая кислота), ЭНК (торговая марка, 2'-О, 4'-С-этилен-мостиковые нуклеиновые кислоты), ГНК (глицериннуклеиновая кислота) и ТНК (треозонуклеиновая кислота).

[00217] Кроме того, как описано выше, антитело, которое связывается с химерным полипептидом SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1, преимущественно используют при обнаружении продукта трансляции химерного полинуклеотида SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1. Соответственно, в настоящем изобретении представлено лекарство для определения эффективности лечения рака ингибитором тирозинкиназы ROS1, содержащим указанное антитело.

[00218] Способ обнаружения химерного гена согласно настоящему изобретению включает стадию обнаружения наличия полинуклеотидов согласно настоящему описанию

в образце, полученном от испытуемого субъекта. В качестве образца, полученного от испытуемого субъекта, используют вещества, полученные от испытуемого субъекта (образцы, выделенные из живого организма), в частности, собирают любые типы жидкости организма (предпочтительно кровь) альвеолярные и бронхиальные смывы, подвергнутые биопсии образцы и образцы флегмы. Предпочтительно используют биопсийный образец или образец флегмы из пораженной области легкого испытуемого субъекта. Из образца может быть выделена и использована геномная ДНК. Кроме того, могут быть использованы ее транскрипты (продукты, получаемые в результате транскрипции и трансляции генома; например, мРНК, кДНК и белки). В частности, предпочтительно получать и использовать мРНК или кДНК.

[00219] Геномная ДНК может быть выделена известными методами, и выделение может быть легко осуществлено с помощью имеющегося в продаже набора для выделения ДНК.

[00220] Стадия обнаружения может быть осуществлена в соответствии с известными методами анализа гена (например, известными методами, которые обычно используют в качестве методов обнаружения генов, такими как ПЦР, ЛЦР (лигазная цепная реакция), SDA (амплификация с замещением цепей), NASBA (амплификация на основе последовательности нуклеиновой кислоты), ICAN (изотермическая иницируемая химерным праймером амплификация нуклеиновой кислоты), метод LAMP (петлевая изотермическая амплификация), метод TMA (система транскрипционно опосредованной амплификации Gen-Probe), метод *in situ* гибридизации и микроматричные анализы. Например, используют технологию гибридизации, в которой в качестве зонда используют нуклеиновую кислоту, гибридизованную с полинуклеотидом, подлежащим обнаружению, используют технологию генной амплификации, в которой в качестве праймера используют ДНК, гибридизованную с полинуклеотидом, подлежащим обнаружению, или подобные способы.

[00221] В частности, обнаружение проводят с применением нуклеиновых кислот, полученных из образца, взятого от испытуемого субъекта, например, мРНК и т.п. Количество мРНК измеряют методом реакции генной амплификации с применением праймеров, предназначенных для специфической амплификации последовательности полинуклеотида, подлежащего обнаружению. Праймеры, используемые в способе обнаружения согласно настоящему изобретению, или праймеры, включенные в набор для обнаружения, не имеют определенного ограничения, при условии, что указанные праймеры могут специфически амплифицировать последовательность полинуклеотида,

подлежащего обнаружению, и сконструированы на основании последовательности оснований полинуклеотида, подлежащего обнаружению. Праймеры, используемые в методе мониторинга амплификации ПЦР, могут быть спроектированы с помощью программного обеспечения для конструирования праймеров (например, Primer Express производства компании PE Biosystems) и т.п. Кроме того, поскольку чем больше размер продукта ПЦР, тем сильнее ухудшается эффективность амплификации, необходимо конструировать смысловой праймер и антисмысловой праймер так, чтобы размер продуктов амплификации, получаемых при амплификации мРНК или кДНК, был меньше 1 килобаз или менее.

[00222] Более конкретно, смысловой праймер (5'-праймер) конструируют из части, кодирующей SLC34A2, а антисмысловой праймер (3'-праймер) конструируют из части, кодирующей ROS1. Предпочтительно использовать праймер, включенный в набор для обнаружения согласно настоящему изобретению, и более предпочтительно использовать наиболее подходящий праймер, включенный в набор для обнаружения. В методе мониторинга амплификации ПЦР может быть также сконструирована мультиплексная ПЦР для обнаружения всех химерных полинуклеотидов в одной реакционной жидкости посредством смешивания вышеуказанных смысловых праймеров, которые соответствуют соответствующим генам. С помощью метода, подходящего для каждой технологии амплификации может быть подтвержден факт наличия или отсутствия амплификации гена-мишени (всего гена или его определенной части). Например, в методе ПЦР продукты ПЦР анализируют электрофорезом в агарозном геле и подвергают окрашиванию бромидом этидия, и т.п., что обеспечивает возможность подтверждения получения или не получения амплифицированных фрагментов, имеющих требуемый размер. Получение амплифицированных фрагментов, имеющих требуемый размер, указывает на то, что полинуклеотид, подлежащий обнаружению, присутствует в образце, полученном от испытуемого субъекта. Таким образом, может быть обнаружено наличие полинуклеотида, подлежащего обнаружению.

[00223] Способ обнаружения химерного гена согласно настоящему изобретению предпочтительно включает стадию обнаружения наличия определенного полинуклеотида в образце, полученном от испытуемого субъекта, с помощью реакции амплификации гена, и стадию обнаружения получения или не получения амплифицированных фрагментов, имеющих требуемый размер.

[00224] Обнаружение с применением технологии гибридизации проводят с применением, например, нозерн-гибридизации, метода дот-блоттинга, метода

микроматриц ДНК и метода защиты РНК. В качестве зондов, используемых для гибридизации, может быть использован зонд, который содержит последовательности, состоящие из 16 оснований, соответственно, против хода и по ходу транскрипции от точки слияния как центра молекулы нуклеиновой кислоты, состоящей из по меньшей мере 32 последовательных оснований, гибридизующейся с полинуклеотидом, подлежащим обнаружению, или с его комплементарной спиралью в умеренных-очень жестких условиях (предпочтительно в очень жестких условиях), или содержит их комплементарные спирали.

[00225] Также может быть использована технология амплификации гена, такая как ОТ-ПЦР. В методе ОТ-ПЦР метод мониторинга амплификации ПЦР (ПЦР в реальном времени) осуществляют во время процесса амплификации гена, поэтому наличие полинуклеотида, подлежащего обнаружению, может быть проанализировано количественно. Могут быть использованы методы мониторинга амплификации ПЦР. ПЦР в реальном времени представляет собой известный метод, и он может быть легко реализован с применением имеющихся в продаже инструментов и наборов для указанного метода.

[00226] Способ обнаружения химерного белка согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения включает стадию обнаружения наличия определенного полипептида в образце, полученном от испытуемого субъекта, то есть полипептида, кодируемого полинуклеотидом, подлежащим обнаружению (здесь и далее называемого полипептидом, подлежащим обнаружению). Такая стадия обнаружения может быть осуществлена методом иммунологического анализа или методом анализа ферментной активности, который проводят посредством получения солюбилизированной жидкости, полученной из образца, взятого у испытуемого субъекта (например, раковой ткани или клеток, полученных от испытуемого субъекта), и смешивания полипептида, подлежащего обнаружению, содержащегося в указанной жидкости, с антителом анти-SLC34A2 или анти-CD74, или анти-FIG и антителом анти-ROS1. Предпочтительно, могут быть использованы технологии с применением моноклонального антитела или поликлонального антитела, специфичного к полипептиду, подлежащему обнаружению, такие как метод ферментативного иммуноанализа, иммуноферментный сэндвичевый метод двойных антител, метод флуоресцентного иммуноанализа, радиоиммунологический метод и метод вестерн-блоттинга.

[00227] При обнаружении полинуклеотида, подлежащего обнаружению, или полипептида, подлежащего обнаружению, способом обнаружения согласно настоящему

изобретению в образце, полученном от испытуемого субъекта, испытуемый субъект представляет собой субъекта (пациента), имеющего рак, позитивный по указанному нуклеотиду, и подлежит лечению с применением ингибиторов ROS1.

[00228] Набор для обнаружения согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере смысловой и антисмысловой праймеры, которые сконструированы для специфической амплификации полинуклеотида, подлежащего обнаружению, в способе обнаружения согласно настоящему изобретению. Набор смыслового и антисмыслового праймера представляет собой набор полинуклеотидов, действующих как праймеры для амплификации полинуклеотида, подлежащего обнаружению.

[00229] В одном из вариантов реализации набор праймеров согласно настоящему изобретению для обнаружения химерного гена содержит (1) набор праймеров, который содержит смысловой праймер, сконструированный из части, кодирующей SLC34A2 или CD74, или FIG, и антисмысловой праймер, сконструированный из части, кодирующей ROS1, и предназначен для обнаружения химерного гена SLC34A2 или CD74, или FIG и гена ROS1, где антисмысловой праймер состоит из молекулы нуклеиновой кислоты (предпочтительно молекулы нуклеиновой кислоты, состоящей из по меньшей мере 16 оснований), гибридизующейся с «полинуклеотидом, подлежащим обнаружению» в умеренных-очень жестких условиях (предпочтительно в очень жестких условиях), а смысловой праймер состоит из молекулы нуклеиновой кислоты (предпочтительно молекулы нуклеиновой кислоты, состоящей из по меньшей мере 16 оснований), гибридизующейся с комплементарной спиралью «полинуклеотида, подлежащего обнаружению» в жестких условиях (предпочтительно в очень жестких условиях).

[00230] Следующие наборы праймеров (2) и (3) включены в набор праймеров как более конкретные варианты набора праймеров (1).

[00231] (2) Набор праймеров из смыслового праймера, который состоит из олигонуклеотида, состоящего из по меньшей мере любых 16 последовательных оснований.

[00232] (3) Набор праймеров из смыслового праймера, который состоит из олигонуклеотида, состоящего из по меньшей мере любых 16 последовательных оснований.

[00233] В указанных наборах праймеров (1)-(3) интервал между положениями, в которых выбирают смысловой праймер и антисмысловой праймер, предпочтительно составляет 1 килобаз или менее, или размер продукта амплификации,

амплифицированного смысловым праймером и антисмысловым праймером, предпочтительно составляет 1 килобаз или менее.

[00234] Кроме того, праймер имеет длину спирали, состоящую, в целом, из 15-40 оснований, предпочтительно состоящую из 16-24 оснований, более предпочтительно состоящую из 18-24 оснований и особенно предпочтительно состоящую из 20-24 оснований.

[00235] Набор праймеров может быть использован для амплификации и обнаружения полинуклеотида, подлежащего обнаружению. Кроме того, несмотря на отсутствие конкретного ограничения, соответствующие праймеры, включенные в набор праймеров согласно настоящему изобретению, могут быть получены, например, химическим синтезом.

[00236] Иллюстративные праймеры ROS1, SLC34A2 или CD74, способные к обнаружению химерных полинуклеотидов ROS1, представлены в таблице 2.

Таблица 2. Иллюстративный набор праймеров для идентификации различных химерных белков ROS1 в соответствии с настоящим изобретением.

Название	Последовательность праймера (5'-3')
<i>ROS1</i> InvPCR F1	GTCTGGCATAGAAGATTAAAG (SEQ ID NO: 7)
<i>ROS1</i> InvPCR F2	AAACGAAGACAAAGAGTTGG (SEQ ID NO: 8)
<i>ROS1</i> InvPCR R1	GTCAGTGGGATTGTAACAAC (SEQ ID NO: 9)
<i>ROS1</i> InvPCR R2	AAACTTGTTTCTGGTATCC (SEQ ID NO: 10)
<i>ROS1</i> Break Rev1	CAGCTCAGCCAACTCTTT (SEQ ID NO: 11)
<i>ROS1</i> E43R1	TCTATTTCCCAAACAACGCTATTAATCAGACCC (SEQ ID NO: 12)
<i>ROS1</i> E34R	TGAAACTTGTTTCTGGTATCCAA (SEQ ID NO: 13)
<i>CD74</i> E5F	CCTGAGACACCTTAAGAACACCA (SEQ ID NO: 14)
<i>SLC34A2</i> E4F	TCGGATTCTCTACTTTTTCGTG (SEQ ID NO: 15)

[00237] Способ отбора противоракового лекарства включает: приведение в контакт исследуемого соединения с клеткой, экспрессирующей химерный белок; и измерение уровня экспрессии химерного белка в клетке, и если уровень экспрессии химерного белка в клетке, обработанной исследуемым соединением, снижен по сравнению с уровнем до

обработки исследуемым соединением или уровнем в необработанной клетке, исследуемое соединение определяют как потенциальное соединение для противоракового лекарства.

[00238] Способ отбора противоракового лекарства может дополнительно включать стадию измерения уровня экспрессии химерного белка в клетке до обработки исследуемым соединением. В этом случае исследуемое соединение может быть определено как потенциальное соединение для противоракового лекарства, если уровень экспрессии химерного белка после обработки исследуемым соединением снижен по сравнению с уровнем до обработки исследуемым соединением в той же клетке. В альтернативном варианте способ отбора противоракового лекарства может включать получение клеток, экспрессирующих химерный белок, и приведение в контакт исследуемого соединения с частью полученных клеток. В этом случае исследуемое соединение может быть определено как потенциальное соединение для противоракового лекарства, если уровень экспрессии химерного белка в клетке, приведенной в контакт с исследуемым соединением, снижен по сравнению с уровнем в клетках, которые не были приведены в контакт с исследуемым соединением.

[00239] Клетка, используемая в отборочном способе, может представлять собой клетку, полученную из раковой клетки, где экспрессируется и/или активируется химерный ген или химерный белок, экстракт указанной клетки или культуру указанной клетки. Раковая клетка может представлять собой клетку солидного рака, в частности, рака легкого, например, немелкоклеточного рака легкого, такого как аденокарцинома легкого, как описано выше.

[00240] В другом варианте реализации представлен способ отбора противоракового лекарства против рака легкого, включающий: обработку клетки, экспрессирующей химерный белок, исследуемым соединением; измерение уровня экспрессии химерного белка в клетке, и если уровень экспрессии химерного белка в клетке, обработанной исследуемым соединением, снижен по сравнению с уровнем до обработки исследуемым соединением или с уровнем в необработанной клетке, то исследуемое соединение определяют как потенциальное соединение для противоракового лекарства против рака легкого.

[00241] Химерные белки ROS1 (т.е. SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 и FIG-ROS1) могут быть использованы в качестве маркера для диагностики рака легкого или для лечения или предупреждения, или лечения рака легкого. Лечение или предупреждение рака легкого включает стадию введения пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного ингибитора против химерного белка,

по меньшей мере одного ингибитора против химерного гена, кодирующего химерный белок, по меньшей мере одного ингибитора против гена, кодирующего ROS1, или их комбинации. Ингибитор может представлять собой соединение Формулы I, Ia или соединение 1, или его фармацевтически приемлемую соль.

[00242] В другом варианте реализации представлен способ предупреждения и/или лечения рака, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, фармацевтически (терапевтически) эффективного количества по меньшей мере одного ингибитора против химерного белка, по меньшей мере одного ингибитора против химерного гена, кодирующего химерный белок, по меньшей мере одного ингибитора против гена, кодирующего ROS1, или их комбинации, любой из которых может представлять собой соединения Формулы 1 и другие конкретные соединения, описанные в настоящем документе. Указанный способ может дополнительно включать стадию идентификации пациента, нуждающегося в предупреждении и/или лечении рака, до стадии введения такого лечения. Лечение или предупреждение рака легкого включает стадию введения пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного ингибитора против химерного белка, включая соединение Формулы 1, по меньшей мере одного ингибитора против химерного гена, кодирующего химерный белок, по меньшей мере одного ингибитора против гена, кодирующего ROS1, или их комбинации. В другом варианте реализации представлено применение ингибитора против химерного белка, ингибитора против химерного гена, кодирующего химерный белок, ингибитора против гена, кодирующего ROS1, или их комбинации для предупреждения и/или лечения рака. Ингибитор может представлять собой соединение Формулы I, Ia или соединение 1, или его фармацевтически приемлемую соль.

[00243] В настоящем изобретении рак может представлять собой рак легкого, в частности, мелкоклеточный рак легкого (SCLC) или немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), такой как аденокарцинома легкого, плоскоклеточная карцинома легкого или крупноклеточная карцинома легкого.

[00244] Композиция, в которой ингибитор против химерного белка ROS1 представляет собой по меньшей мере один элемент, выбранный из группы, состоящей из аптамера, специфически связывающегося с химерным белком антитела, специфически связывающегося с химерным белком, и ингибитора против химерного гена или гена, кодирующего ROS1, представляет собой по меньшей мере одну, выбранную из группы, состоящей из миРНК, кшРНК, микроРНК и аптамера, которые способны специфически связываться с химерным геном или геном, кодирующим ROS1.

[00245] Любой ингибитор киназы ROS1, который ингибирует экспрессию ROS1 и/или активность киназы ROS1 (например, транскрипцию, трансляцию или стабильность), может быть использован отдельно или в комбинации с соединением Формулы I, Ia или соединением 1, или его фармацевтически приемлемой солью.

[00246] Такой ингибирующий агент может быть ROS1-специфичным или может быть неспецифичным (например, неспецифические ингибиторы киназы, многоцелевые ингибиторы). Разработаны несколько ингибиторов киназы ROS1, и в настоящее время проводится изучение их клинического применения. От активности киназы ROS1 зависят следующие киназы, такие как фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) и внеклеточные сигнальные киназы 1/2 (ERK) (Wixted JH et al. J Biol Chem 2011), и STAT3 (Hwang JH et al. Mol Endocrinol 2003; 17: 1155-1166). Лекарство, которое ингибирует такие нисходящие каскады передачи сигналов, также может быть использовано в качестве альтернативы ингибитору киназы ROS1 или в качестве адъюванта, отдельно или в комбинации с соединениями Формулы 1.

[00247] В одном из вариантов субъектов, рассматриваемых как имеющих SLC34A2-ROS1 или транслокацию CD74-FIG, или делецию FIG-ROS1, также рассматривают как имеющих мутацию ROS1 в сайте за сайтом транслокации. Пример мутации ROS1 представляет собой активирующую мутацию, которая обеспечивает конститутивную активность киназы. Активирующая мутация ROS1 представляет собой случайную мутацию, которая вызывает повышение активации по сравнению с мутацией дикого типа. Например, активирующая мутация ROS1 может приводить к постоянной активации ROS1. Может существовать даже вариант вторичной активирующей мутации ROS1, связанной с применением или обусловленной применением ингибитора ROS1. Мутации, которые приводят к повышению сигнальной активности ROS1, возникают, например, вследствие точечной мутации киназного домена, делеции, вставки, дупликации или инверсии, или комбинации двух или более из них, что приводит к увеличению сигнала ROS1. В отношении субъектов, определенных как имеющих транслокацию или делецию слияния ROS1, как описано в настоящем документе, и мутацию ROS1, также может быть принято решение об их лечении ингибитором киназы ROS1. Кроме того, их лечение/терапия может быть проведена на основании такого решения.

[00248] Как описано выше, эффективность лечения рака ингибитором тирозинкиназы ROS1 считается высокой у пациента, у которого способом согласно настоящему изобретению обнаружен химерный полинуклеотид SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1. По этой причине лечение рака может быть эффективно осуществлено

введением ингибитора тирозинкиназы ROS1, селективной в отношении тех онкологических пациентов, которые имеют химерный ген SLC34A2-ROS1 или CD74-ROS1, или FIG-ROS1 и ген ROS1. Соответственно, в настоящем изобретении представлен способ лечения рака, включающий стадию введения ингибитора тирозинкиназы ROS1, который представляет собой соединение Формулы I, Ia или соединение 1, или его фармацевтически приемлемую соль, пациенту, у которого установлена высокая эффективность лечения рака таким ингибитором тирозинкиназы ROS1 с помощью вышеуказанного способа диагностики, описанного в настоящем документе.

[00249] В тексте настоящего изобретения «образец» представляет собой не только биологический образец (например, клетки, ткань, орган, жидкость (кровь, лимфатическая жидкость и т.д.), пищеварительный сок, слюна, смыв альвеолярного/бронхиального лаважа, моча, кал), но и включает экстракты нуклеиновых кислот (экстракт геномной ДНК, экстракт мРНК или препарат кДНК, или препарат рРНК, полученный из экстракта мРНК), или экстракты белков, полученные из указанных биологических образцов. Указанный образец также может быть подвержен фиксации в формалине, фиксации в спирте, замораживанию или заливке в парафин.

[00250] Кроме того, геномная ДНК, мРНК, кДНК или белок могут быть получены специалистом в данной области техники после выбора подходящей технологии с учетом типа, состояния и т.д. образца.

[00251] Помимо вышеуказанных веществ (полинуклеотидов, антител) в качестве активных ингредиентов, лекарство согласно настоящему изобретению может содержать другие фармацевтически приемлемые ингредиенты. Примеры таких ингредиентов включают буферные агенты, эмульгаторы, суспендирующие агенты, стабилизаторы, консерванты, физиологический солевой раствор и т.д. В качестве буферных агентов могут быть использованы фосфаты, цитраты, ацетаты и т.д. В качестве эмульгаторов может быть использован гуммиарабик, альгинат натрия, трагакант и т.д. В качестве суспендирующих агентов может быть использован глицерилмоностеарат, моностеарат алюминия, метилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, гидроксиметилцеллюлоза, лаурилсульфат натрия и т.д. В качестве стабилизаторов может быть использован пропиленгликоль, диэтилсульфит, аскорбиновая кислота и т.д. В качестве консервантов может быть использован азид натрия, хлорид бензалкония, пара-оксибензойная кислота, хлорбутанол и т.д.

[00252] Кроме того, помимо препарата, который содержит полинуклеотиды и антитела, препараты, такие как субстрат, положительный контроль (например, химерные

полинуклеотиды SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 или FIG-ROS1, химерные полипептиды SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 или FIG-ROS1, или клетки, имеющие их, и т.д.) и отрицательный контроль, необходимые для обнаружения метки, прикрепленной к полинуклеотидам и антителам, а также контрастный окрашивающий реагент (DAPI и т.д.), используемый для *in situ* гибридизации или т.п., молекула, необходимая для обнаружения антитела (например, вторичное антитело, белок G, белок A) и буферный раствор, используемый для разбавления или промывания антитела, могут быть объединены в виде набора для применения в способе согласно настоящему изобретению. Указанный набор может содержать инструкции по применению набора. В настоящем изобретении представлен также вышеупомянутый набор для применения в способе согласно настоящему изобретению.

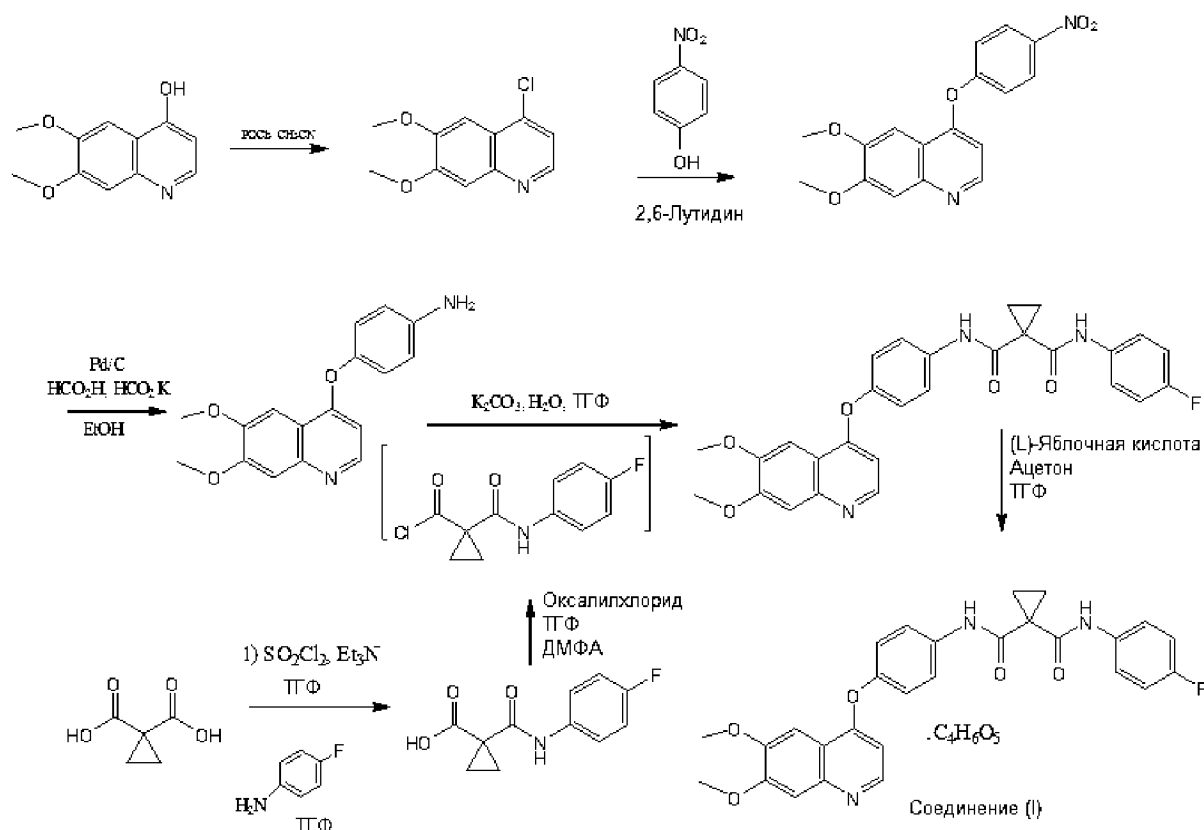
[00253] Способы обнаружения, описанные в настоящем документе, особенно подходят при обнаружении химерного белка, который состоит по существу из N-концевого домена партнера по слиянию и C-концевого домена белка ROS1, кодирующего киназный домен. Химерный белок может представлять собой химерный белок SLC34A2-ROS1, состоящий по существу из N-концевого домена белка SLC34A2 или его фрагмента и C-концевого домена белка ROS1, кодирующего киназный домен. Химерный белок может представлять собой химерный белок CD74-ROS1, состоящий по существу из N-концевого домена белка CD74 или его фрагмента и C-концевого домена белка ROS1, кодирующего киназный домен. Химерный белок может представлять собой химерный белок FIG-ROS1, состоящий по существу из N-концевого домена белка FIG или его фрагмента и C-концевого домена белка ROS1, кодирующего киназный домен. Указанный способ может быть использован для диагностики рака легкого, в частности, немелкоклеточного рака легкого, и включает: обнаружение по меньшей мере одной хромосомной перестройки с участием ROS1, включая инверсию, транслокацию или делецию в 6 хромосоме; химерного белка, где белок гибридизован с другим белком; химерного гена, кодирующего химерный белок; и сверхэкспрессии ROS1 по сравнению со стандартным образцом, полученным от индивидуума, не имеющего рака. При обнаружении в испытуемом образце одной из хромосомных перестроек, описанных выше, выбранных из описанной выше группы, индивидуум подлежит лечению ингибитором ROS1, таким как соединение Формулы I, Ia или соединение 1, или его фармацевтически приемлемая соль.

Получение Соединения 1

[00254] Получение N-(4-{[6,7-бис(метилокси)хинолин-4-ил]окси}фенил)-N'-(4-фторфенил)циклопропан-1,1-дикарбоамида и его (L)-малатной соли.

[00255] Способ синтеза, использованный для получения N-(4-[6,7-бис(метилокси)хинолин-4-ил]окси}фенил)-N'-(4-фторфенил)циклопропан-1,1-дикарбоамида и его (L)-малатной соли, представлен на Схеме 1:

Схема 1



Получение 4-хлор-6,7-диметоксихинолина

[00256] В реактор последовательно загружали 6,7-диметоксихинолин-4-ол (10,0 кг) и ацетонитрил (64,0 л). Полученную смесь нагревали до около 65 °С и добавляли оксихлорид фосфора (POCl_3 , 50,0 кг). После добавления POCl_3 температуру реакционной смеси повышали до около 80 °С. Реакцию считали завершенной (около 9,0 часов), когда осталось менее 2 процентов исходного вещества (встроенный анализ высокоэффективной жидкостной хроматографии [ВЭЖХ]). Реакционную смесь охлаждали до около 10 °С, а затем гасили в холодном растворе дихлорметана (ДХМ, 238,0 кг) 30 % NH_4OH (135,0 кг) и льда (440,0 кг). Полученную смесь нагревали до около 14 °С и разделяли фазы.

Органическую фазу промывали водой (40,0 кг) и концентрировали вакуумной перегонкой для удаления растворителя (около 190,0 кг). К смеси добавляли метил-трет-бутиловый эфир (МТБЭ, 50,0 кг) и охлаждали смесь до около 10 °С, и за это время продукт кристаллизовался. Твердое вещество выделяли центрифугированием, промывали н-гептаном (20,0 кг) и сушили при около 40 °С с получением указанного в заголовке соединения (8,0 кг).

Получение 6,7-диметил-4-(4-нитрофенокси)хинолина

[00257] В реактор последовательно загружали 4-хлор-6,7-диметоксихинолин (8,0 кг), 4-нитрофенол (7,0 кг), 4-диметиламинопиридин (0,9 кг) и 2,6-лутидин (40,0 кг). Содержимое реактора нагревали до около 147 °С. По завершении реакции (осталось менее 5 процентов исходного вещества, по результатам определения с помощью встроенного ВЭЖХ анализа, около 20 часов) содержимое реактора оставили остывать до около 25 °С. Добавляли метанол (26,0 кг), затем карбонат калия (3,0 кг), растворенный в воде (50,0 кг). Содержимое реактора перемешивали в течение около 2 часов. Полученный твердый осадок фильтровали, промывали водой (67,0 кг) и сушили при 25 °С в течение около 12 часов с получением указанного в заголовке соединения (4,0 кг).

Получение 4-(6,7-диметоксихинолин-4-илокси)фениламина

[00258] Раствор, содержащий формиат калия (5,0 кг), муравьиную кислоту (3,0 кг) и воду (16,0 кг), добавляли к смеси 6,7-диметокси-4-(4-нитрофенокси)хинолина (4,0 кг), 10-процентного палладия на углероде (содержание влаги 50 процентов, 0,4 кг) в тетрагидрофуране (ТГФ, 40,0 кг), которую нагревали до около 60 °С. Добавление проводили так, чтобы температура реакционной смеси оставалась на уровне около 60 °С. По завершении реакции, по результатам определения с помощью встроенного ВЭЖХ анализа (осталось менее 2 процентов исходного вещества, обычно 15 часов), содержимое реактора отфильтровали. Фильтрат концентрировали вакуумной перегонкой при около 35 °С до половины исходного объема, в результате чего продукт выпал в осадок. Продукт выделяли фильтрацией, промывали водой (12,0 кг) и сушили под вакуумом при около 50 °С с получением указанного в заголовке соединения (3,0 кг; площадь под кривой (AUC) 97 процентов).

Получение 1-(4-фторфенилкарбамоил)циклопропанкарбоновой кислоты

[00259] Триэтиламин (8,0 кг) добавляли к охлажденному (около 4 °С) раствору имеющейся в продаже циклопропан-1,1-дикарбоновой кислоты (21, 10,0 кг) в ТГФ (63,0 кг) с такой скоростью, чтобы температура смеси не превышала 10 °С. Раствор перемешивали в течение около 30 минут, а затем добавляли тионилхлорид (9,0 кг),

поддерживая температуру смеси ниже 10 °С. По завершении добавления добавляли раствор 4-фторанилина (9,0 кг) в ТГФ (25,0 кг) с такой скоростью, чтобы температура смеси не превышала 10 °С. Смесь перемешивали в течение около 4 часов, а затем разбавляли изопропилацетатом (87,0 кг). Раствор последовательно промывали водным раствором гидроксида натрия (2,0 кг, растворенные в 50,0 л воды), водой (40,0 л) и водным раствором хлорида натрия (10,0 кг, растворенные в 40,0 л воды). Органический раствор концентрировали вакуумной перегонкой, затем добавляли гептан, в результате чего в осадок выпало твердое вещество. Твердое вещество выделяли центрифугированием, а затем сушили при около 35 °С под вакуумом с получением указанного в заголовке соединения (10,0 кг).

Получение 1-(4-фторфенилкарбамоил)циклопропанкарбонилхлорида

[00260] Оксалилхлорид (1,0 кг) добавляли к раствору 1-(4-фторфенилкарбамоил)циклопропанкарбоновой кислоты (2,0 кг) в смеси ТГФ (11 кг) и N,N-диметилформамида (ДМФА; 0,02 кг) с такой скоростью, чтобы температура смеси не превышала 30 °С. Полученный раствор использовали на следующей стадии без дополнительной обработки.

Получение N-(4-{[6,7-бис(метилокси)хинолин-4-ил]окси}фенил)-N'-(4-фторфенил)циклопропан-1,1-дикарбоксиамида

[00261] Раствор из предыдущей стадии, содержащий 1-(4-фторфенилкарбамоил)циклопропанкарбонилхлорид, добавляли к смеси 4-(6,7-диметоксихинолин-4-илокси)фениламина (3,0 кг) и карбоната калия (4,0 кг) в ТГФ (27,0 кг) и воде (13,0 кг) с такой скоростью, чтобы температура смеси не превышала 30 °С. По завершении реакции (обычно 10 минут) добавляли воду (74,0 кг). Смесь перемешивали при 15-30 °С в течение около 10 часов, в результате чего продукт выпал в осадок. Продукт выделяли фильтрацией, промывали предварительно полученным раствором ТГФ (11,0 кг) и воды (24,0 кг) и сушили при около 65 °С под вакуумом в течение около 12 часов с получением указанного в заголовке соединения (свободное основание, 5,0 кг). ¹H ЯМР (400 МГц, d₆-ДМСО): δ 10,2 (с, 1H), 10,05 (с, 1H), 8,4 (с, 1H), 7,8 (м, 2H), 7,65 (м, 2H), 7,5 (с, 1H), 7,35 (с, 1H), 7,25 (м, 2H), 7,15 (м, 2H), 6,4 (с, 1H), 4,0 (д, 6H), 1,5 (с, 4H). ЖХ/МС: M+H= 502.

Получение N-(4-{[6,7-бис(метилокси)хинолин-4-ил]окси}фенил)-N'-(4-фторфенил)циклопропан-1,1-дикарбоксиамида, (L)-малатной соли

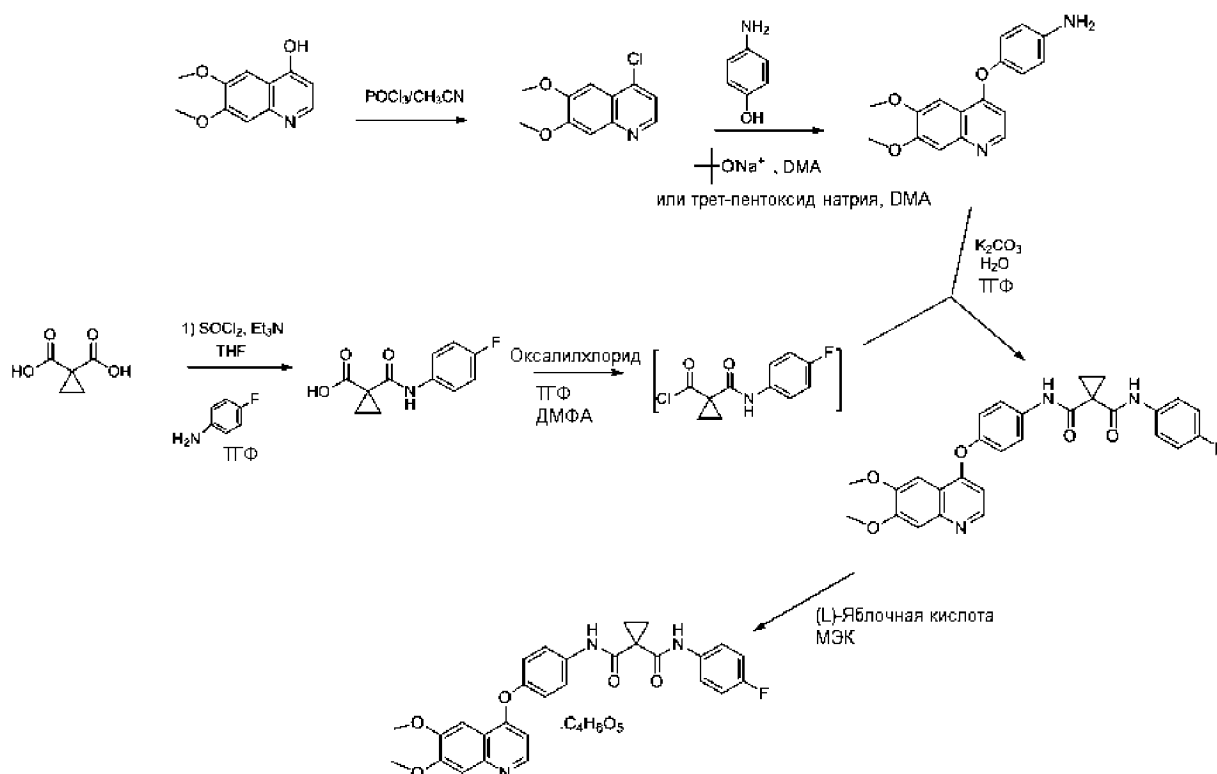
[00262] Раствор L-яблочной кислоты (2,0 кг) в воде (2,0 кг) добавляли к раствору [4-(6,7-диметоксихинолин-4-илокси)фенил]амид-(4-фторфенил)амида циклопропан-1,1-

дикарбоновой кислоты, свободного основания (15, 5,0 кг) в этаноле, поддерживая температуру смеси около 25 °С. Затем добавляли углерод (0,5 кг) и кремний-тиол (0,1 кг), и полученную смесь нагревали до около 78 °С, при которой добавляли воду (6,0 кг). Затем реакционную смесь фильтровали с последующим добавлением изопропанола (38,0 кг) и оставляли остывать до около 25 °С. Продукт выделяли фильтрацией и промывали изопропанолом (20,0 кг), и сушили при около 65 °С с получением указанного в заголовке соединения (5,0 кг).

Альтернативное получение N-(4-{6,7-бис(метилокси)хинолин-4-ил}окси}фенил)-N'-(4-фторфенил)циклопропан-1,1-дикарбоксиамида и его (L)-малатной соли.

[00263] Альтернативный способ синтеза, который может быть использован для получения N-(4-[6,7-бис(метилокси)хинолин-4-ил]окси}фенил)-N'-(4-фторфенил)циклопропан-1,1-дикарбоксиамида и его (L)-малатной соли, представлен на Схеме 2, как описано в РСТ/US2012/024591, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Схема 2



Получение 4-хлор-6,7-диметоксихинолина

[00264] В реактор последовательно загружали 6,7-диметоксихинолин-4-ол (47,0 кг) и ацетонитрил (318,8 кг). Полученную смесь нагревали до около 60 °С и добавляли

оксихлорид фосфора (POCl_3 , 130,6 кг). После добавления POCl_3 температуру реакционной смеси повышали до около 77 °С. Реакцию считали завершенной (около 13 часов), когда осталось менее 3 % исходного вещества (встроенный анализ высокоэффективной жидкостной хроматографии [ВЭЖХ]). Реакционную смесь охлаждали до около 2-7 °С, а затем гасили в холодном растворе дихлорметана (ДХМ, 482,8 кг), 26-процентного NH_4OH (251,3 кг) и воды (900 л). Полученную смесь нагревали до около 20-25 °С и разделяли фазы. Органическую фазу фильтровали через слой AW Nyflo Super-Cel NF (целит; 5,4 кг) и промывали осадок на фильтре ДХМ (118,9 кг). Объединенную органическую фазу промывали насыщенным солевым раствором (282,9 кг) и смешивали с водой (120 л). Фазы разделяли и концентрировали органическую фазу вакуумной перегонкой для удаления растворителя (остаточный объем около 95 л). ДХМ (686,5 кг) загружали в реактор, содержащий органическую фазу, и концентрировали вакуумной перегонкой для удаления растворителя (остаточный объем около 90 л). Затем загружали метил-трет-бутиловый эфир (МТБЭ, 226,0 кг) и доводили температуру смеси до значения от -20 до -25 °С, и выдерживали в течение 2, 5 часов с получением твердого осадка, который затем отфильтровывали и промывали н-гептаном (92,0 кг) и сушили на фильтре при около 25 °С в атмосфере азота с получением указанного в заголовке соединения. (35,6 кг).

Получение 4-(6,7-диметоксихинолин-4-илокси)фениламина

[00265] 4-Аминофенол (24,4 кг), растворенный в N,N-диметилацетамиде (DMA, 184,3 кг), загружали в реактор, содержащий 4-хлор-6,7-диметоксихинолин (35,3 кг), трет-бутоксид натрия (21,4 кг) и DMA (167,2 кг) при 20-25 °С. Затем смесь нагревали до 100-105 °С в течение около 13 часов. По завершении реакции, по результатам определения с помощью встроенного ВЭЖХ анализа (осталось менее 2 процентов исходного вещества), содержимое реактора охлаждали при 15-20 °С и загружали воду (предварительно охлажденную, 2-7 °С, 587 л) с такой скоростью, чтобы поддерживать температуру 15-30 °С. Полученный твердый осадок фильтровали, промывали смесью воды (47 л) и DMA (89,1 кг) и, наконец, водой (214 л). Затем осадок на фильтре сушили при около 25 °С на фильтре с получением неочищенного 4-(6,7-диметоксихинолин-4-илокси)фениламина (59,4 кг влажного, 41,6 кг сухого, расчет на основании потерь при высушивании). Неочищенный 4-(6,7-диметоксихинолин-4-илокси)фениламин кипятили с обратным холодильником (около 75 °С) в смеси тетрагидрофурана (ТГФ, 211,4 кг) и DMA (108,8 кг) в течение около 1 часа, а затем охлаждали до 0-5 °С и выдерживали в течение около 1 часа, после чего отфильтровывали твердое вещество, промывали ТГФ (147,6 кг) и сушили

на фильтре под вакуумом при около 25 °С с получением 4-(6,7-диметоксихинолин-4-илокси)фениламина (34,0 кг).

Альтернативное получение 4-(6,7-диметоксихинолин-4-илокси)фениламина

[00266] 4-Хлор-6,7-диметоксихинолин (34,8 кг) и 4-аминофенол (30,8 кг), и трет-пентоксид натрия (1,8 эквивалента, 88,7 кг, 35 масс. процента в ТГФ) загружали в реактор, затем добавляли N,N-диметилацетамид (DMA, 293,3 кг). Затем полученную смесь нагревали до 105-115 °С в течение около 9 часов. По завершении реакции, по результатам определения с помощью встроенного ВЭЖХ анализа (осталось менее 2 процентов исходного вещества), содержимое реактора охлаждали при 15-25 °С и добавляли воду (315 кг) в течение двух часов, поддерживая температуру 20-30 °С. Затем реакцию смесь перемешивали в течение еще одного часа при 20-25 °С. Неочищенный продукт собирали фильтрацией и промывали смесью 88 кг воды и 82,1 кг DMA, затем 175 кг воды. Продукт сушили на фильтре-влагоотделителе в течение 53 часов. Анализ потерь при высушивании показал менее 1 процента масс./масс.

[00267] В альтернативном способе использовали 1,6 эквивалента трет-пентоксида натрия и повышали температуру реакции до 110-120 °С. Кроме того, температуру охлаждения повышали до 35-40 °С, и исходную температуру добавления воды доводили до 35-40 °С, с последующим нагреванием до 45 °С.

Получение 1-(4-фторфенилкарбамоил)циклопропанкарбоновой кислоты

[00268] Триэтиламин (19,5 кг) добавляли к охлажденному (около 5 °С) раствору циклопропан-1,1-дикарбоновой кислоты (24,7 кг) в ТГФ (89,6 кг) с такой скоростью, чтобы температура смеси не превышала 5 °С. Раствор перемешивали в течение около 1,3 часа, а затем добавляли тионилхлорид (23,1 кг), поддерживая температуру смеси ниже 10 °С. По завершении добавления раствор перемешивали в течение около 4 часов, поддерживая температуру ниже 10 °С. Затем добавляли раствор 4-фторанилина (18,0 кг) в ТГФ (33,1 кг) с такой скоростью, чтобы температура смеси не превышала 10 °С. Смесь перемешивали в течение около 10 часов, после чего считали реакцию завершенной. Затем реакцию смесь разбавляли изопропилацетатом (218,1 кг). Полученный раствор последовательно промывали водным раствором гидроксид натрия (10,4 кг, 50 процентов, растворенные в 119 л воды), дополнительно разбавленным водой (415 л), затем водой (100 л) и, наконец, водным раствором хлорида натрия (20,0 кг, растворенные в 100 л воды). Органический раствор концентрировали вакуумной перегонкой (остаточный объем 100 л) ниже 40 °С, затем добавляли н-гептан (171, 4 кг), в результате чего в осадок выпало твердое вещество. Твердое вещество выделяли фильтрацией и промывали н-гептаном

(102,4 кг) с получением влажной, неочищенной 1-(4-фторфенилкарбамоил)циклопропанкарбоновой кислоты (29,0 кг). Неочищенную 1-(4-фторфенилкарбамоил)циклопропанкарбоновую кислоту растворяли в метаноле (139,7 кг) при около 25 °С, затем добавляли воду (320 л) с получением суспензии, которую выделяли фильтрацией, последовательно промывали водой (20 л) и н-гептаном (103,1 кг), а затем сушили на фильтре при около 25 °С в атмосфере азота с получением указанного в заголовке соединения (25,4 кг).

Получение 1-(4-фторфенилкарбамоил)циклопропанкарбонилхлорида

[00269] Оксалилхлорид (12,6 кг) добавляли к раствору 1-(4-фторфенилкарбамоил)циклопропанкарбоновой кислоты (22,8 кг) в смеси ТГФ (96,1 кг) и N,N-диметилформамида (ДМФА; 0,23 кг) с такой скоростью, чтобы температура смеси не превышала 25 °С. Полученный раствор использовали на следующей стадии без дополнительной обработки.

Альтернативное получение 1-(4-

фторфенилкарбамоил)циклопропанкарбонилхлорида

[00270] В реактор загружали 1-(4-фторфенилкарбамоил)циклопропанкарбоновую кислоту (35 кг), 344 г ДМФА и 175 кг ТГФ. Реакционную смесь доводили до 12-17 °С, а затем к реакционной смеси добавляли 19,9 кг оксалилхлорида в течение 1 часа. Реакционную смесь оставляли перемешиваться при 12-17 °С на 3-8 часов. Полученный раствор использовали на следующей стадии без дополнительной обработки.

Получение [4-(6,7-диметоксихинолин-4-илокси)фенил]амид-(4-фторфенил)амида циклопропан-1,1-дикарбоновой кислоты

[00271] Раствор из предыдущей стадии, содержащий 1-(4-фторфенилкарбамоил)циклопропанкарбонилхлорид, добавляли к смеси соединения 4-(6,7-диметоксихинолин-4-илокси)фениламина (23,5 кг) и карбоната калия (31,9 кг) в ТГФ (245,7 кг) и воде (116 л) с такой скоростью, чтобы температура смеси не превышала 30 °С. По завершении реакции (около 20 минут) добавляли воду (653 л). Смесь перемешивали при 20-25 °С в течение около 10 часов, в результате чего продукт выпал в осадок. Продукт выделяли фильтрацией, промывали предварительно полученным раствором ТГФ (68,6 кг) и воды (256 кг) и сушили сначала на фильтре в атмосфере азота при около 25 °С, а затем при около 45 °С под вакуумом с получением указанного в заголовке соединения (41,0 кг, 38,1 кг, расчет на основании потерь при высушивании).

Альтернативное получение [4-(6,7-диметоксихинолин-4-илокси)фенил]амид-(4-фторфенил)амида циклопропан-1,1-дикарбоновой кислоты

[00272] В реактор загружали 4-(6,7-диметоксихинолин-4-илокси)фениламин (35,7 кг, 1 эквивалент), затем 412,9 кг ТГФ. К реакционной смеси добавляли раствор 48,3 K_2CO_3 в 169 кг воды. Раствор хлорангидрида кислоты, описанный выше в альтернативном способе получения 1-(4-фторфенилкарбамоил)циклопропанкарбонилхлорида, переносили в реактор, содержащий 4-(6,7-диметоксихинолин-4-илокси)фениламин, поддерживая температуру 20-30 °С в течение не менее двух часов. Реакционную смесь перемешивали при 20-25 °С в течение не менее трех часов. Затем температуру реакционной смеси доводили до 30-25 °С и перемешивали смесь. Перемешивание прекращали и оставляли разделяться фазы смеси. Нижнюю водную фазу удаляли и отбрасывали. К оставшейся верхней органической фазе добавляли 804 кг воды. Реакционную смесь оставляли перемешиваться при 15-25 °С в течение не менее 16 часов.

[00273] Продукт выпадал в осадок. Продукт отфильтровывали и промывали смесью 179 кг воды и 157,9 кг ТГФ двумя порциями. Неочищенный продукт сушили под вакуумом в течение по меньшей мере двух часов. Затем высушенный продукт растворяли в 285,1 кг ТГФ. Полученную суспензию переносили в реакционный сосуд и перемешивали до получения превращения суспензии в прозрачный (растворенный) раствор, который нагревали до 30-35 °С в течение около 30 минут. Затем к раствору добавляли 456 кг воды, а также 20 кг этанола SDAG-1 (этанол, денатурированный метанолом в течение двух часов). Смесь перемешивали при 15-25 °С в течение по меньшей мере 16 часов. Продукт отфильтровывали и промывали смесью 143 кг воды и 126,7 ТГФ двумя порциями. Продукт сушили при максимальной температуре 40 °С.

[00274] В альтернативном способе температуру реакции при образовании хлорангидрида кислоты доводили до 10-15 °С. Температуру перекристаллизации меняли с 15-25 °С на 45-50 °С в течение 1 часа, а затем охлаждали до 15-25 °С в течение 2 часов.

Получение [4-(6,7-диметоксихинолин-4-илокси)фенил]амид-(4-фторфенил)амида циклопропан-1,1-дикарбоновой кислоты, малатной соли

[00275] [4-(6,7-диметоксихинолин-4-илокси)фенил]амид-(4-фторфенил)амид циклопропан-1,1-дикарбоновой кислоты (1-5; 13,3 кг), L-яблочную кислоту (4,96 кг), метилэтилкетон (МЭК; 188,6 кг) и воду (37,3 кг) загружали в реактор и нагревали смесь до кипения с обратным холодильником (около 74 °С) в течение около 2 часов. Температуру реактора понижали до 50-55 °С и отфильтровывали содержимое реактора. Указанные последовательные стадии, описанные выше, повторяли еще два раза, исходя из таких же количеств исходного вещества (13,3 кг), L-яблочной кислоты (4,96 кг), МЭК (198,6 кг) и воды (37,2 кг). Объединенный фильтрат азеотропно сушили при атмосферном давлении,

используя МЭК (1133,2 кг) (остаточный объем около 711 л; KF $\leq$ 0,5 % масс./масс.) при около 74 °С. Температуру содержимого реактора понижали до 20-25 °С и выдерживали в течение около 4 часов с получением твердого осадка, который отфильтровывали, промывали МЭК (448 кг) и сушили под вакуумом при 50 °С с получением указанного в заголовке соединения (45,5 кг).

Альтернативное получение [4-(6,7-диметоксифинолин-4-илокси)фенил]амид-(4-фторфенил)амида циклопропан-1,1-дикарбоновой кислоты, (L) малатной соли

[00276] [4-(6,7-диметоксифинолин-4-илокси)фенил]амид-(4-фторфенил)амид циклопропан-1,1-дикарбоновой кислоты (47,9 кг), L-яблочную кислоту (17,2), 658,2 кг метилэтилкетона и 129,1 кг воды (37,3 кг) загружали в реактор и нагревали смесь до 50-55 °С в течение около 1-3 часов, а затем при 55-60 °С в течение еще 4-5 часов. Смесь осветляли фильтрацией через картридж 1 мкм. Температуру реактора доводили до 20-25 °С и перегоняли под вакуумом с давлением вакуума 150-200 мм рт.ст. с максимальной температурой рубашки 55 °С до объема 558-731 л.

[00277] Вакуумную перегонку проводили еще два раза с загрузкой 380 кг и 380,2 кг метилэтилкетона, соответственно. После третьей дистилляции объем партии довели до 18 об./масс. [4-(6,7-диметоксифинолин-4-илокси)фенил]амид-(4-фторфенил)-амида циклопропан-1,1-дикарбоновой кислоты, загрузив 159,9 кг метилэтилкетона с получением общего объема 880 л. Проводили дополнительную вакуумную дистилляцию, добавив 245,7 метилэтилкетона. Реакционную смесь оставляли при умеренном перемешивании при 20-25 °С на по меньшей мере 24 часа. Продукт отфильтровывали и промывали 415,1 кг метилэтилкетона тремя порциями. Продукт сушили под вакуумом с температурой рубашки, установленной на 45 °С.

[00278] В альтернативном способе порядок добавления изменяли, так что раствор 17,7 кг L-яблочной кислоты, растворенной в 129,9 кг воды, добавляли к [4-(6,7-диметоксифинолин-4-илокси)фенил]амид-(4-фторфенил)-амиду циклопропан-1,1-дикарбоновой кислоты (48,7 кг) в метилэтилкетоне (673,3 кг).

Биологический пример

Рост клеток HCC-78 и NCI-H2228

[00279] Клетки HCC-78 и NCI-H2228 приобретали у компаний DSMZ и ATCC, соответственно, в виде замороженного биологического образца, оттаивали в колбе T-75 (Nunc) и выращивали до 80-90 % слияния для слипшихся клеток или до достижения плотности $1 - 2 \times 10^6$ клеток/мл для клеточной суспензии.

[00280] NCI-H2228, клеточную линию аденокарциномы легкого НМРЛ человека (ATCC, CRL 5935), несущую активирующие слияния EML4-ALK, высевали с плотностью $3,5 \times 10^4$ клеток/лунку и $2,5 \times 10^4$ клеток/лунку на 48 часов и 72 часа, соответственно, в 0,1 мл RPMI 1640 (ATCC 30-2001), 10 % ФБС, 1 % пенициллина-стрептомицина на черные 96-луночные планшеты (Costar, 3904).

[00281] HCC-78, клеточную линию аденокарциномы легкого НМРЛ человека (DSMZ, ACC 563), несущую активирующие слияния SLC34A2-ROS1 и фосфор-Met, высевали с плотностью $2,5 \times 10^4$ клеток/лунку и 2×10^4 клеток/лунку на 48 часов и 72 часа, соответственно, в 0,1 мл RPMI 1640 (ATCC 30-2001), 10 % ФБС (инактивированная нагреванием, Cellgro), 1 % пенициллина-стрептомицина на черные 96-луночные планшеты (Costar, 3904).

[00282] Клетки выращивали при 37 °C в увлажненной атмосфере с 5 % CO₂ в течение 16 часов. ДМСО или серийные разбавления соединения 1 в свежей среде, не содержащей сыворотки, или в среде, содержащей сыворотку, добавляли к клеткам и инкубировали в течение 48 часов или 72 часов при 37 °C в увлажненной атмосфере с 5 % CO₂ с последующим добавлением метящего раствора 5'-бром-2'-дезоксинуридина (BrdU) (Roche) на 2-4 часа. Клеточные суспензии переносили на фильтровальные планшеты (Corning, 3504), а затем проводили анализ. Клетки анализировали на пролиферацию, контролируя внедрение BrdU. Реагенты из набора для иммуноферментного твердофазного анализа клеточной пролиферации, BrdU (хемилюминесценция) (Roche Biosciences, 11 669 915 001), использовали по инструкциям производителя. После внедрения метки BrdU клетки фиксировали раствором FixDenat. Добавляли конъюгат анти-BrdU пероксидазы (POD) и промывали планшеты 1x PBS. Добавляли раствор субстрата и измеряли люминесценцию на планшет-ридере Victor Wallac V (Perkin Elmer). Процентное ингибирование пролиферации рассчитывали сравнением пролиферации клеток, обработанных соединением 1, с образцами, обработанными ДМСО. Значения процентного ингибирования при 5-8 концентрациях соединения 1 использовали для расчета значений IC₅₀.

Биологический пример

Ингибирование фосфорилирования ROS1

[00283] Клетки HCC-78, клеточную линию аденокарциномы легкого НМРЛ человека (DSMZ, ACC 563), несущую активирующее слияние SLC34A2-ROS1 и фосфор-Met, высевали с плотностью 3×10^5 клеток/лунку на 6-луночные планшеты (Nuncclon, 152795) в RPMI 1640 (ATCC, 30-2001), содержащей 10 % ФБС (инактивированная нагреванием,

Cellgro) и 1 % пенициллина-стрептомицина (Cellgro). ДМСО или серийные разбавления соединения 1 в свежей среде с 10 % ФБС в конечной концентрации 0,3 % ДМСО (носителя) добавляли к клеткам и инкубировали в течение 3 часов. После обработки клетки собирали и промывали холодным PBS и сразу лизировали в 0,15 мл холодного лизисного буфера (50 mM Tris HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 % NP 40, 0,1 % SDS, 0,5 % дезоксихолата натрия, 1 mM ЭДТК, 50 mM NaF, 1 mM пиррофосфата натрия, 1 mM Na₃VO₄, 2 mM PMSF, 10 мкг/мл апротинина, 5 мкг/мл лейпептина и 5 мкг/мл пепстатина А). Лизаты собирали и измеряли концентрации белка по методу BCA (Pierce). Лизаты собирали и измеряли концентрации белка по методу BCA (Pierce). Лизаты смешивали с буфером для образцов NuPage LDS (Invitrogen NP0007) и восстанавливающим агентом (Invitrogen NP0004), затем нагревали при 70 °C в течение 10 минут. 20 мкг белка загружали на гель NuPage 10 % Bis Tris (Invitrogen, NP0302). Белки переносили на нитроцеллюлозные мембраны (Invitrogen, LC2001), блокировали в течение 1 часа в блокирующем буфере Odyssey (Li-Cor, 927 40000) и инкубировали при 4 °C в течение ночи с анти-ROS1 мышинным моноклональным антителом (1:1000) (Cell Signaling Technology, 3266) и анти-фосфо-ROS1 (Y2274) кроличьим антителом (1:1000) (Cell Signaling Technology, 3077), разбавленным в блокирующем буфере Odyssey, содержащем 0,1 % Tween 20. Мембраны четыре раза по 10 минут промывали буфером TBS T (50 mM Tris HCl, pH 7,2; 150 mM NaCl; 0,1 % Tween 20) и проводили блоттинг с вторичными антителами, козым анти-мышинным IRDye680 (Li-Cor, 926 32220) и козым анти-кроличьим IRDye800 (Li-Cor, 926 32211), в блокирующем буфере Odyssey, содержащем 0,1 % Tween 20 и 0,01 % SDS, в течение 60 минут при комнатной температуре. Мембраны промывали четыре раза по 10 минут буфером TBS-T и дважды промывали PBS. Мембраны сканировали с помощью сканера Odyssey (Li-Cor) и количественно определяли интенсивность сигнала каждой полосы с помощью ImageQuant (Molecular Devices). Значения IC₅₀ рассчитывали на основании сигнала, полученного в обработанном соединением образце, по сравнению с сигналом в контрольном образце с носителем (ДМСО).

[00284] Ингибирование активности киназы, опосредованной SLC34A2-ROS1, в клетках HCC-78 HMPJ, в которые вводили однократные повышающиеся дозы соединения 1 или 3-[(1R)-1-(2,6-дихлор-3-фторфенил)этокси]-5-(1-пиперидин-4-илпиразол-4-ил)пиридин-2-амин (кризотиниб; XALKORI®), показано на фиг. 1. На фиг. 1 наглядно показана мощная ингибирующая активность соединения 1 против химерной киназы ROS1, которая эффективнее сравнительного контрольного образца, 3-[(1R)-1-(2,6-дихлор-3-

фторфенил)этокси]-5-(1-пиперидин-4-илпиразол-4-ил)пиридин-2-амин (кризотиниб) в концентрациях, испытанных *in vitro*.

Биологический пример

ROS1-зависимая пролиферация клеток HCC-78 НМРЛ

[00285] Значения IC_{50} рассчитывали для соединения 1 и сравнительного контрольного образца, 3-[(1*R*)-1-(2,6-дихлор-3-фторфенил)этокси]-5-(1-пиперидин-4-илпиразол-4-ил)пиридин-2-амин (кризотиниб) после инкубации активных агентов с клетками HCC-78 НМРЛ в течение 48 или 72 часов в различных концентрациях. Количественную оценку пролиферации клеток HCC-78 НМРЛ проводили с помощью твердофазного иммуноферментного анализа BrdU (хемилюминесценция, Roche Biosciences, Cat. № 11 669 915 001) по рекомендациям производителя. Определение значений IC_{50} (А-Е) (концентрация при 50 % ингибирования) проводили так, как описано выше, и определяли путем вычислений с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

[00286] Таблица 3. ROS1-зависимая пролиферация клеток HCC-78 НМРЛ в присутствии соединения 1 согласно настоящему изобретению и 3-[(1*R*)-1-(2,6-дихлор-3-фторфенил)этокси]-5-(1-пиперидин-4-илпиразол-4-ил)пиридин-2-амин (кризотиниб).

	NCI-H2228		HCC-78	
Тип ткани	Легкие			
Патология	Аденокарцинома НМРЛ			
Информация о генотипе	Слияние EML4-ALK TP53 Q331* CDKN2A M1 *157 del, ?fs: RB1 E204fs*10		Слияние SLS34A2-ROS1	
Название соединения	Пролиферация 48 часов IC ₅₀ (нМ)	Пролиферация 72 часа IC ₅₀ (нМ)	Пролиферация 48 часов IC ₅₀ (нМ)	Пролиферация 72 часа IC ₅₀ (нМ)
Соединение 1	D	E	A	A
3-[(1 <i>R</i>)-1-(2,6-дихлор-3-фторфенил)этокси]-5-(1-пиперидин-4-илпиразол-4-ил)пиридин-2-амин	C	C	B	A

(кризотиниб)				
--------------	--	--	--	--

Представленные данные IC_{50} : E- 5000 – 10000 нМ; D- 1000-5000 нМ; C- 500-1000 нМ; B- 100-500 нМ; A- 10-100 нМ.

Другие варианты реализации изобретения

[00287] Вышеизложенное описание было подробно изложено посредством иллюстрации и примера с целью ясности и понимания. Данное изобретение было описано со ссылкой на различные конкретные и предпочтительные варианты реализации и способы. Однако следует понимать, что могут быть сделаны многочисленные изменения и модификации без отступления от сущности и объема изобретения. Специалисту у данной области техники понятно, что в пределах объема прилагаемой формулы изобретения могут быть сделаны изменения и модификации. Поэтому следует понимать, что приведенное выше описание предназначено для иллюстрации, но не ограничения.

[00288] Следовательно, объем настоящего изобретения следует определять не на основании приведенного выше описания, а вместо этого его следует определять на основании следующей прилагаемой формулы изобретения вместе со всеми эквивалентами, к которым такая формула изобретения имеет отношение.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Exelixis Inc.
 Aftab, Dana T
 Yu, Peiwen

<120> Способ лечения аденокарциномы легкого

<130> 224990/EX14-003C-PC/370960

<150> US 61/984599
 <151> 2014-04-25

<160> 15

<170> PatentIn версии 3.5

<210> 1
 <211> 2347
 <212> PPT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(2347)
 <223> Белок ROS1 человека, номер доступа UniProt P08922

<400> 1

Met Lys Asn Ile Tyr Cys Leu Ile Pro Lys Leu Val Asn Phe Ala Thr
 1 5 10 15

Leu Gly Cys Leu Trp Ile Ser Val Val Gln Cys Thr Val Leu Asn Ser
 20 25 30

Cys Leu Lys Ser Cys Val Thr Asn Leu Gly Gln Gln Leu Asp Leu Gly
 35 40 45

Thr Pro His Asn Leu Ser Glu Pro Cys Ile Gln Gly Cys His Phe Trp
 50 55 60

Asn Ser Val Asp Gln Lys Asn Cys Ala Leu Lys Cys Arg Glu Ser Cys
 65 70 75 80

Glu Val Gly Cys Ser Ser Ala Glu Gly Ala Tyr Glu Glu Glu Val Leu
 85 90 95

Glu Asn Ala Asp Leu Pro Thr Ala Pro Phe Ala Ser Ser Ile Gly Ser
 100 105 110

His Asn Met Thr Leu Arg Trp Lys Ser Ala Asn Phe Ser Gly Val Lys
 115 120 125

Tyr Ile Ile Gln Trp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Gly Ser Trp Thr Tyr
 130 135 140

Thr	Lys	Thr	Val	Ser	Arg	Pro	Ser	Tyr	Val	Val	Lys	Pro	Leu	His	Pro	
145					150					155					160	
Phe	Thr	Glu	Tyr	Ile	Phe	Arg	Val	Val	Trp	Ile	Phe	Thr	Ala	Gln	Leu	
				165					170					175		
Gln	Leu	Tyr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Ser	Tyr	Arg	Thr	His	Pro	His	Gly	
			180					185					190			
Val	Pro	Glu	Thr	Ala	Pro	Leu	Ile	Arg	Asn	Ile	Glu	Ser	Ser	Ser	Pro	
		195					200					205				
Asp	Thr	Val	Glu	Val	Ser	Trp	Asp	Pro	Pro	Gln	Phe	Pro	Gly	Gly	Pro	
	210					215					220					
Ile	Leu	Gly	Tyr	Asn	Leu	Arg	Leu	Ile	Ser	Lys	Asn	Gln	Lys	Leu	Asp	
225					230					235					240	
Ala	Gly	Thr	Gln	Arg	Thr	Ser	Phe	Gln	Phe	Tyr	Ser	Thr	Leu	Pro	Asn	
				245					250					255		
Thr	Ile	Tyr	Arg	Phe	Ser	Ile	Ala	Ala	Val	Asn	Glu	Val	Gly	Glu	Gly	
			260					265					270			
Pro	Glu	Ala	Glu	Ser	Ser	Ile	Thr	Thr	Ser	Ser	Ser	Ala	Val	Gln	Gln	
		275					280					285				
Glu	Glu	Gln	Trp	Leu	Phe	Leu	Ser	Arg	Lys	Thr	Ser	Leu	Arg	Lys	Arg	
	290					295					300					
Ser	Leu	Lys	His	Leu	Val	Asp	Glu	Ala	His	Cys	Leu	Arg	Leu	Asp	Ala	
305					310					315					320	
Ile	Tyr	His	Asn	Ile	Thr	Gly	Ile	Ser	Val	Asp	Val	His	Gln	Gln	Ile	
				325					330					335		
Val	Tyr	Phe	Ser	Glu	Gly	Thr	Leu	Ile	Trp	Ala	Lys	Lys	Ala	Ala	Asn	
			340					345					350			
Met	Ser	Asp	Val	Ser	Asp	Leu	Arg	Ile	Phe	Tyr	Arg	Gly	Ser	Gly	Leu	
		355					360					365				
Ile	Ser	Ser	Ile	Ser	Ile	Asp	Trp	Leu	Tyr	Gln	Arg	Met	Tyr	Phe	Ile	
	370					375					380					
Met	Asp	Glu	Leu	Val	Cys	Val	Cys	Asp	Leu	Glu	Asn	Cys	Ser	Asn	Ile	
385					390					395					400	

Glu Glu Ile Thr Pro Pro Ser Ile Ser Ala Pro Gln Lys Ile Val Ala
405 410 415

Asp Ser Tyr Asn Gly Tyr Val Phe Tyr Leu Leu Arg Asp Gly Ile Tyr
420 425 430

Arg Ala Asp Leu Pro Val Pro Ser Gly Arg Cys Ala Glu Ala Val Arg
435 440 445

Ile Val Glu Ser Cys Thr Leu Lys Asp Phe Ala Ile Lys Pro Gln Ala
450 455 460

Lys Arg Ile Ile Tyr Phe Asn Asp Thr Ala Gln Val Phe Met Ser Thr
465 470 475 480

Phe Leu Asp Gly Ser Ala Ser His Leu Ile Leu Pro Arg Ile Pro Phe
485 490 495

Ala Asp Val Lys Ser Phe Ala Cys Glu Asn Asn Asp Phe Leu Val Thr
500 505 510

Asp Gly Lys Val Ile Phe Gln Gln Asp Ala Leu Ser Phe Asn Glu Phe
515 520 525

Ile Val Gly Cys Asp Leu Ser His Ile Glu Glu Phe Gly Phe Gly Asn
530 535 540

Leu Val Ile Phe Gly Ser Ser Ser Gln Leu His Pro Leu Pro Gly Arg
545 550 555 560

Pro Gln Glu Leu Ser Val Leu Phe Gly Ser His Gln Ala Leu Val Gln
565 570 575

Trp Lys Pro Pro Ala Leu Ala Ile Gly Ala Asn Val Ile Leu Ile Ser
580 585 590

Asp Ile Ile Glu Leu Phe Glu Leu Gly Pro Ser Ala Trp Gln Asn Trp
595 600 605

Thr Tyr Glu Val Lys Val Ser Thr Gln Asp Pro Pro Glu Val Thr His
610 615 620

Ile Phe Leu Asn Ile Ser Gly Thr Met Leu Asn Val Pro Glu Leu Gln
625 630 635 640

Ser Ala Met Lys Tyr Lys Val Ser Val Arg Ala Ser Ser Pro Lys Arg
645 650 655

Pro	Gly	Pro	Trp	Ser	Glu	Pro	Ser	Val	Gly	Thr	Thr	Leu	Val	Pro	Ala	660	665	670	
Ser	Glu	Pro	Pro	Phe	Ile	Met	Ala	Val	Lys	Glu	Asp	Gly	Leu	Trp	Ser	675	680	685	
Lys	Pro	Leu	Asn	Ser	Phe	Gly	Pro	Gly	Glu	Phe	Leu	Ser	Ser	Asp	Ile	690	695	700	
Gly	Asn	Val	Ser	Asp	Met	Asp	Trp	Tyr	Asn	Asn	Ser	Leu	Tyr	Tyr	Ser	705	710	715	720
Asp	Thr	Lys	Gly	Asp	Val	Phe	Val	Trp	Leu	Leu	Asn	Gly	Thr	Asp	Ile	725	730	735	
Ser	Glu	Asn	Tyr	His	Leu	Pro	Ser	Ile	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	Leu	Ala	740	745	750	
Phe	Glu	Trp	Leu	Gly	His	Phe	Leu	Tyr	Trp	Ala	Gly	Lys	Thr	Tyr	Val	755	760	765	
Ile	Gln	Arg	Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gly	His	Thr	Asp	Ile	Val	Thr	His	770	775	780	
Val	Lys	Leu	Leu	Val	Asn	Asp	Met	Val	Val	Asp	Ser	Val	Gly	Gly	Tyr	785	790	795	800
Leu	Tyr	Trp	Thr	Thr	Leu	Tyr	Ser	Val	Glu	Ser	Thr	Arg	Leu	Asn	Gly	805	810	815	
Glu	Ser	Ser	Leu	Val	Leu	Gln	Thr	Gln	Pro	Trp	Phe	Ser	Gly	Lys	Lys	820	825	830	
Val	Ile	Ala	Leu	Thr	Leu	Asp	Leu	Ser	Asp	Gly	Leu	Leu	Tyr	Trp	Leu	835	840	845	
Val	Gln	Asp	Ser	Gln	Cys	Ile	His	Leu	Tyr	Thr	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	850	855	860	
Gln	Ser	Thr	Gly	Asp	Thr	Thr	Ile	Thr	Glu	Phe	Ala	Ala	Trp	Ser	Thr	865	870	875	880
Ser	Glu	Ile	Ser	Gln	Asn	Ala	Leu	Met	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Arg	Leu	Phe	885	890	895	
Trp	Ile	Asn	Gly	Phe	Arg	Ile	Ile	Thr	Thr	Gln	Glu	Ile	Gly	Gln	Lys	900	905	910	

Thr Ser Val Ser Val Leu Glu Pro Ala Arg Phe Asn Gln Phe Thr Ile
915 920 925

Ile Gln Thr Ser Leu Lys Pro Leu Pro Gly Asn Phe Ser Phe Thr Pro
930 935 940

Lys Val Ile Pro Asp Ser Val Gln Glu Ser Ser Phe Arg Ile Glu Gly
945 950 955 960

Asn Ala Ser Ser Phe Gln Ile Leu Trp Asn Gly Pro Pro Ala Val Asp
965 970 975

Trp Gly Val Val Phe Tyr Ser Val Glu Phe Ser Ala His Ser Lys Phe
980 985 990

Leu Ala Ser Glu Gln His Ser Leu Pro Val Phe Thr Val Glu Gly Leu
995 1000 1005

Glu Pro Tyr Ala Leu Phe Asn Leu Ser Val Thr Pro Tyr Thr Tyr
1010 1015 1020

Trp Gly Lys Gly Pro Lys Thr Ser Leu Ser Leu Arg Ala Pro Glu
1025 1030 1035

Thr Val Pro Ser Ala Pro Glu Asn Pro Arg Ile Phe Ile Leu Pro
1040 1045 1050

Ser Gly Lys Cys Cys Asn Lys Asn Glu Val Val Val Glu Phe Arg
1055 1060 1065

Trp Asn Lys Pro Lys His Glu Asn Gly Val Leu Thr Lys Phe Glu
1070 1075 1080

Ile Phe Tyr Asn Ile Ser Asn Gln Ser Ile Thr Asn Lys Thr Cys
1085 1090 1095

Glu Asp Trp Ile Ala Val Asn Val Thr Pro Ser Val Met Ser Phe
1100 1105 1110

Gln Leu Glu Gly Met Ser Pro Arg Cys Phe Ile Ala Phe Gln Val
1115 1120 1125

Arg Ala Phe Thr Ser Lys Gly Pro Gly Pro Tyr Ala Asp Val Val
1130 1135 1140

Lys Ser Thr Thr Ser Glu Ile Asn Pro Phe Pro His Leu Ile Thr
1145 1150 1155

Leu	Leu	Gly	Asn	Lys	Ile	Val	Phe	Leu	Asp	Met	Asp	Gln	Asn	Gln
	1160					1165					1170			
Val	Val	Trp	Thr	Phe	Ser	Ala	Glu	Arg	Val	Ile	Ser	Ala	Val	Cys
	1175					1180					1185			
Tyr	Thr	Ala	Asp	Asn	Glu	Met	Gly	Tyr	Tyr	Ala	Glu	Gly	Asp	Ser
	1190					1195					1200			
Leu	Phe	Leu	Leu	His	Leu	His	Asn	Arg	Ser	Ser	Ser	Glu	Leu	Phe
	1205					1210					1215			
Gln	Asp	Ser	Leu	Val	Phe	Asp	Ile	Thr	Val	Ile	Thr	Ile	Asp	Trp
	1220					1225					1230			
Ile	Ser	Arg	His	Leu	Tyr	Phe	Ala	Leu	Lys	Glu	Ser	Gln	Asn	Gly
	1235					1240					1245			
Met	Gln	Val	Phe	Asp	Val	Asp	Leu	Glu	His	Lys	Val	Lys	Tyr	Pro
	1250					1255					1260			
Arg	Glu	Val	Lys	Ile	His	Asn	Arg	Asn	Ser	Thr	Ile	Ile	Ser	Phe
	1265					1270					1275			
Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Leu	Ser	Arg	Leu	Tyr	Trp	Thr	Glu	Val	Ser
	1280					1285					1290			
Asn	Phe	Gly	Tyr	Gln	Met	Phe	Tyr	Tyr	Ser	Ile	Ile	Ser	His	Thr
	1295					1300					1305			
Leu	His	Arg	Ile	Leu	Gln	Pro	Thr	Ala	Thr	Asn	Gln	Gln	Asn	Lys
	1310					1315					1320			
Arg	Asn	Gln	Cys	Ser	Cys	Asn	Val	Thr	Glu	Phe	Glu	Leu	Ser	Gly
	1325					1330					1335			
Ala	Met	Ala	Ile	Asp	Thr	Ser	Asn	Leu	Glu	Lys	Pro	Leu	Ile	Tyr
	1340					1345					1350			
Phe	Ala	Lys	Ala	Gln	Glu	Ile	Trp	Ala	Met	Asp	Leu	Glu	Gly	Cys
	1355					1360					1365			
Gln	Cys	Trp	Arg	Val	Ile	Thr	Val	Pro	Ala	Met	Leu	Ala	Gly	Lys
	1370					1375					1380			
Thr	Leu	Val	Ser	Leu	Thr	Val	Asp	Gly	Asp	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ile
	1385					1390					1395			

Ile	Thr	Ala	Lys	Asp	Ser	Thr	Gln	Ile	Tyr	Gln	Ala	Lys	Lys	Gly
1400						1405					1410			
Asn	Gly	Ala	Ile	Val	Ser	Gln	Val	Lys	Ala	Leu	Arg	Ser	Arg	His
1415						1420					1425			
Ile	Leu	Ala	Tyr	Ser	Ser	Val	Met	Gln	Pro	Phe	Pro	Asp	Lys	Ala
1430						1435					1440			
Phe	Leu	Ser	Leu	Ala	Ser	Asp	Thr	Val	Glu	Pro	Thr	Ile	Leu	Asn
1445						1450					1455			
Ala	Thr	Asn	Thr	Ser	Leu	Thr	Ile	Arg	Leu	Pro	Leu	Ala	Lys	Thr
1460						1465					1470			
Asn	Leu	Thr	Trp	Tyr	Gly	Ile	Thr	Ser	Pro	Thr	Pro	Thr	Tyr	Leu
1475						1480					1485			
Val	Tyr	Tyr	Ala	Glu	Val	Asn	Asp	Arg	Lys	Asn	Ser	Ser	Asp	Leu
1490						1495					1500			
Lys	Tyr	Arg	Ile	Leu	Glu	Phe	Gln	Asp	Ser	Ile	Ala	Leu	Ile	Glu
1505						1510					1515			
Asp	Leu	Gln	Pro	Phe	Ser	Thr	Tyr	Met	Ile	Gln	Ile	Ala	Val	Lys
1520						1525					1530			
Asn	Tyr	Tyr	Ser	Asp	Pro	Leu	Glu	His	Leu	Pro	Pro	Gly	Lys	Glu
1535						1540					1545			
Ile	Trp	Gly	Lys	Thr	Lys	Asn	Gly	Val	Pro	Glu	Ala	Val	Gln	Leu
1550						1555					1560			
Ile	Asn	Thr	Thr	Val	Arg	Ser	Asp	Thr	Ser	Leu	Ile	Ile	Ser	Trp
1565						1570					1575			
Arg	Glu	Ser	His	Lys	Pro	Asn	Gly	Pro	Lys	Glu	Ser	Val	Arg	Tyr
1580						1585					1590			
Gln	Leu	Ala	Ile	Ser	His	Leu	Ala	Leu	Ile	Pro	Glu	Thr	Pro	Leu
1595						1600					1605			
Arg	Gln	Ser	Glu	Phe	Pro	Asn	Gly	Arg	Leu	Thr	Leu	Leu	Val	Thr
1610						1615					1620			
Arg	Leu	Ser	Gly	Gly	Asn	Ile	Tyr	Val	Leu	Lys	Val	Leu	Ala	Cys
1625						1630					1635			

His	Ser	Glu	Glu	Met	Trp	Cys	Thr	Glu	Ser	His	Pro	Val	Thr	Val
1640						1645					1650			
Glu	Met	Phe	Asn	Thr	Pro	Glu	Lys	Pro	Tyr	Ser	Leu	Val	Pro	Glu
1655						1660					1665			
Asn	Thr	Ser	Leu	Gln	Phe	Asn	Trp	Lys	Ala	Pro	Leu	Asn	Val	Asn
1670						1675					1680			
Leu	Ile	Arg	Phe	Trp	Val	Glu	Leu	Gln	Lys	Trp	Lys	Tyr	Asn	Glu
1685						1690					1695			
Phe	Tyr	His	Val	Lys	Thr	Ser	Cys	Ser	Gln	Gly	Pro	Ala	Tyr	Val
1700						1705					1710			
Cys	Asn	Ile	Thr	Asn	Leu	Gln	Pro	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Asn	Val	Arg
1715						1720					1725			
Val	Val	Val	Val	Tyr	Lys	Thr	Gly	Glu	Asn	Ser	Thr	Ser	Leu	Pro
1730						1735					1740			
Glu	Ser	Phe	Lys	Thr	Lys	Ala	Gly	Val	Pro	Asn	Lys	Pro	Gly	Ile
1745						1750					1755			
Pro	Lys	Leu	Leu	Glu	Gly	Ser	Lys	Asn	Ser	Ile	Gln	Trp	Glu	Lys
1760						1765					1770			
Ala	Glu	Asp	Asn	Gly	Cys	Arg	Ile	Thr	Tyr	Tyr	Ile	Leu	Glu	Ile
1775						1780					1785			
Arg	Lys	Ser	Thr	Ser	Asn	Asn	Leu	Gln	Asn	Gln	Asn	Leu	Arg	Trp
1790						1795					1800			
Lys	Met	Thr	Phe	Asn	Gly	Ser	Cys	Ser	Ser	Val	Cys	Thr	Trp	Lys
1805						1810					1815			
Ser	Lys	Asn	Leu	Lys	Gly	Ile	Phe	Gln	Phe	Arg	Val	Val	Ala	Ala
1820						1825					1830			
Asn	Asn	Leu	Gly	Phe	Gly	Glu	Tyr	Ser	Gly	Ile	Ser	Glu	Asn	Ile
1835						1840					1845			
Ile	Leu	Val	Gly	Asp	Asp	Phe	Trp	Ile	Pro	Glu	Thr	Ser	Phe	Ile
1850						1855					1860			
Leu	Thr	Ile	Ile	Val	Gly	Ile	Phe	Leu	Val	Val	Thr	Ile	Pro	Leu
1865						1870					1875			

Thr	Phe	Val	Trp	His	Arg	Arg	Leu	Lys	Asn	Gln	Lys	Ser	Ala	Lys
	1880					1885					1890			
Glu	Gly	Val	Thr	Val	Leu	Ile	Asn	Glu	Asp	Lys	Glu	Leu	Ala	Glu
	1895					1900					1905			
Leu	Arg	Gly	Leu	Ala	Ala	Gly	Val	Gly	Leu	Ala	Asn	Ala	Cys	Tyr
	1910					1915					1920			
Ala	Ile	His	Thr	Leu	Pro	Thr	Gln	Glu	Glu	Ile	Glu	Asn	Leu	Pro
	1925					1930					1935			
Ala	Phe	Pro	Arg	Glu	Lys	Leu	Thr	Leu	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Ser
	1940					1945					1950			
Gly	Ala	Phe	Gly	Glu	Val	Tyr	Glu	Gly	Thr	Ala	Val	Asp	Ile	Leu
	1955					1960					1965			
Gly	Val	Gly	Ser	Gly	Glu	Ile	Lys	Val	Ala	Val	Lys	Thr	Leu	Lys
	1970					1975					1980			
Lys	Gly	Ser	Thr	Asp	Gln	Glu	Lys	Ile	Glu	Phe	Leu	Lys	Glu	Ala
	1985					1990					1995			
His	Leu	Met	Ser	Lys	Phe	Asn	His	Pro	Asn	Ile	Leu	Lys	Gln	Leu
	2000					2005					2010			
Gly	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Glu	Pro	Gln	Tyr	Ile	Ile	Leu	Glu	Leu
	2015					2020					2025			
Met	Glu	Gly	Gly	Asp	Leu	Leu	Thr	Tyr	Leu	Arg	Lys	Ala	Arg	Met
	2030					2035					2040			
Ala	Thr	Phe	Tyr	Gly	Pro	Leu	Leu	Thr	Leu	Val	Asp	Leu	Val	Asp
	2045					2050					2055			
Leu	Cys	Val	Asp	Ile	Ser	Lys	Gly	Cys	Val	Tyr	Leu	Glu	Arg	Met
	2060					2065					2070			
His	Phe	Ile	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Cys	Leu	Val	Ser
	2075					2080					2085			
Val	Lys	Asp	Tyr	Thr	Ser	Pro	Arg	Ile	Val	Lys	Ile	Gly	Asp	Phe
	2090					2095					2100			
Gly	Leu	Ala	Arg	Asp	Ile	Tyr	Lys	Asn	Asp	Tyr	Tyr	Arg	Lys	Arg
	2105					2110					2115			

[illegible]

<210> 2
<211> 278
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(278)
<223> Киназный домен ROS1 человека

<400> 2

Leu Thr Leu Arg Leu Leu Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Glu Val Tyr
1 5 10 15

Glu Gly Thr Ala Val Asp Ile Leu Gly Val Gly Ser Gly Glu Ile Lys
20 25 30

Val Ala Val Lys Thr Leu Lys Lys Gly Ser Thr Asp Gln Glu Lys Ile
35 40 45

Glu Phe Leu Lys Glu Ala His Leu Met Ser Lys Phe Asn His Pro Asn
50 55 60

Ile Leu Lys Gln Leu Gly Val Cys Leu Leu Asn Glu Pro Gln Tyr Ile
65 70 75 80

Ile Leu Glu Leu Met Glu Gly Gly Asp Leu Leu Thr Tyr Leu Arg Lys
85 90 95

Ala Arg Met Ala Thr Phe Tyr Gly Pro Leu Leu Thr Leu Val Asp Leu
100 105 110

Val Asp Leu Cys Val Asp Ile Ser Lys Gly Cys Val Tyr Leu Glu Arg
115 120 125

Met His Phe Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Leu Val Ser
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Thr Ser Pro Arg Ile Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly
145 150 155 160

Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asn Asp Tyr Tyr Arg Lys Arg Gly Glu
165 170 175

Gly Leu Leu Pro Val Arg Trp Met Ala Pro Glu Ser Leu Met Asp Gly
180 185 190

Ile Phe Thr Thr Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Ile Leu Ile Trp

195

200

205

Glu Ile Leu Thr Leu Gly His Gln Pro Tyr Pro Ala His Ser Asn Leu
 210 215 220

Asp Val Leu Asn Tyr Val Gln Thr Gly Gly Arg Leu Glu Pro Pro Arg
 225 230 235 240

Asn Cys Pro Asp Asp Leu Trp Asn Leu Met Thr Gln Cys Trp Ala Gln
 245 250 255

Glu Pro Asp Gln Arg Pro Thr Phe His Arg Ile Gln Asp Gln Leu Gln
 260 265 270

Leu Phe Arg Asn Phe Phe
 275

<210> 3
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> SLC34A2, экзон 4, прямая

<400> 3
 tcggatttct ctactttttc gtg 23

<210> 4
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CD74, экзон 6, прямая

<400> 4
 ctctgttttg aaatgagcag g 21

<210> 5
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ROS1, экзон 32, обратная

<400> 5
 ggaatgcctg gtttatttgg 20

<210> 6
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ROS1, экзон 34, обратная

 <400> 6
 tgaaacttgt ttctggtatc caa 23

<210> 7
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ROS1 InvPCR F1

 <400> 7
 gtctggcata gaagattaаа g 21

<210> 8
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ROS1 InvPCR F2

 <400> 8
 ааасгаагас аааgagttgg 20

<210> 9
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ROS1 InvPCR R1

 <400> 9
 gtcagtggga ttgтаасаас 20

<210> 10
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ROS1 InvPCR R2

 <400> 10
 ааacttgttt ctggtatcc 19

<210> 11
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

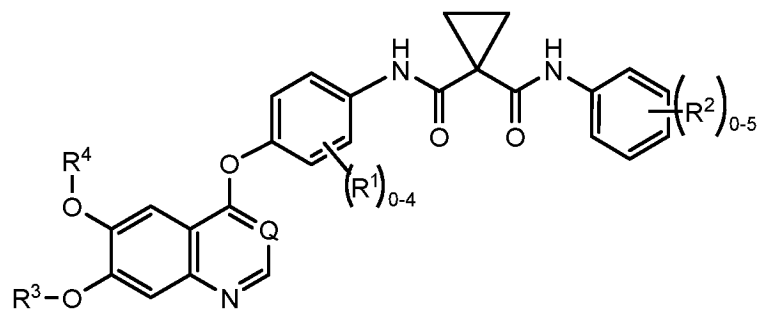
<220>
 <223> ROS1 Break Rev1

 <400> 11

cagctcagcc aactcttt	18
<210> 12	
<211> 33	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> ROS1 E43R1	
<400> 12	
tctattttccc aaacaacgct attaatsaga ccc	33
<210> 13	
<211> 23	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> ROS1 E34R	
<400> 13	
tgaaacttgt ttctggtatc саа	23
<210> 14	
<211> 23	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> CD74 E5F	
<400> 14	
cctgagacac cttaagaaca cca	23
<210> 15	
<211> 23	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> SLC34A2 E4F	
<400> 15	
tcggatttct ctactttttc gtg	23

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения аденокарциномы легкого, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, соединения Формулы I:

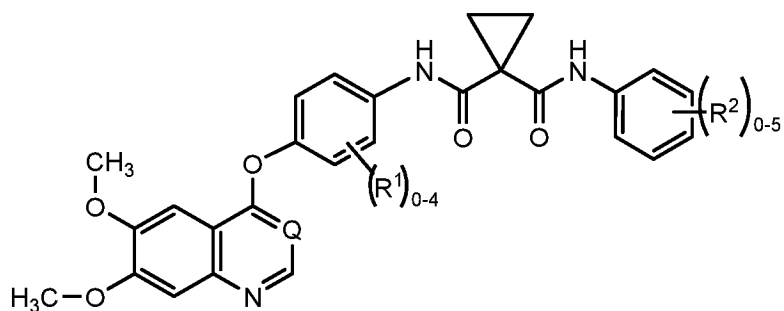


I

или его фармацевтически приемлемой соли, где:

- R¹ представляет собой галоген;
- R² представляет собой галоген;
- R³ представляет собой (C₁-C₆)алкил;
- R⁴ представляет собой (C₁-C₆)алкил; и
- Q представляет собой CH или N.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что аденокарцинома легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого.
3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что аденокарцинома легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого, позитивный по слиянию SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 или FIG-ROS1.
4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что соединение Формулы I представляет собой соединение Формулы Ia



Формула I(a),

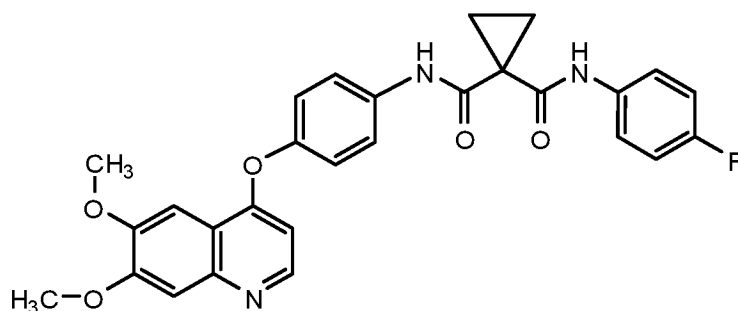
или его фармацевтически приемлемую соль, где:

R^1 представляет собой галоген;

R^2 представляет собой галоген; и

Q представляет собой CH или N.

5. Способ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что соединение Формулы I представляет собой соединение 1:



соединение 1

или его фармацевтически приемлемую соль.

6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что соединение 1 представляет собой N-(4-{[6,7-бис(метилокси)хинолин-4-ил]окси}фенил)-N'-(4-фторфенил)циклопропан-1,1-дикарбоксамид или его фармацевтически приемлемую соль.

7. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что соединение Формулы (I), Формулы I(a) и соединение 1 представляет собой (L)- или (D)-малатную соль.

8. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что соединение Формулы (I) представлено в кристаллической форме N-1 или форме N-2 (L)-малатной соли и/или (D)-малатной соли.

9. Способ по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что соединение Формулы I, I(a) или соединение 1, или его фармацевтически приемлемую соль вводят в виде фармацевтической композиции, дополнительно содержащей фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество или разбавитель.

10. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемую соль вводят после другой формы лечения.
11. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения цисплатином и/или гемцитабином.
12. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения карбоплатином.
13. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения карбоплатином и/или гемцитабином.
14. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что соединение Формулы I вводят после лечения цисплатином и/или карбоплатином.
15. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения доцетакселем.
16. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения кризотинибом.
17. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения кризотинибом и/или гемцитабином.
18. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения кризотинибом и/или гемцитабином, и/или доцетакселем.
19. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемую соль вводят после лечения цисплатином и/или гемцитабином, и/или доцетакселем.

20. Способ лечения немелкоклеточного рака легкого, позитивного по слиянию ROS1, у пациента, нуждающегося в таком лечении, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли.
21. Способ ингибирования или реверсирования развития патологического клеточного роста у млекопитающего, включающий введение соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли, причем патологический клеточный рост представляет собой рак, опосредованный киназой ROS1.
22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что рак представляет собой аденокарциному легкого.
23. Способ по п. 21, отличающийся тем, что аденокарцинома легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого.
24. Способ по п. 21, отличающийся тем, что аденокарцинома легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого, позитивный по слиянию SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 или FIG-ROS1.
25. Способ по п. 24, отличающийся тем, что соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят в виде фармацевтической композиции, содержащей соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.
26. Способ по п. 24, отличающийся тем, что соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят в виде фармацевтической композиции, содержащей соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, причем фармацевтическую композицию вводят ежедневно в течение более чем 3 месяцев.
27. Способ по п. 24, отличающийся тем, что соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят в виде фармацевтической композиции, содержащей соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один фармацевтически

приемлемый носитель; причем фармацевтическую композицию вводят в дозе 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95 мг/сутки.

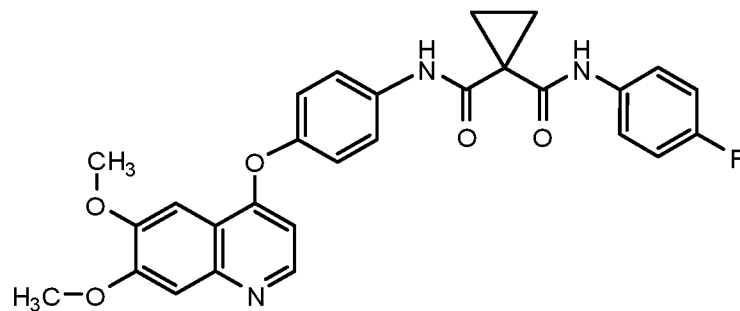
28. Способ по п. 24, отличающийся тем, что обнаружение немелкоклеточного рака легкого, позитивного по слиянию SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 или FIG-ROS1, осуществляют с применением анализа FISH (флуоресцентной *in situ* гибридизации), CISH (хромогенной *in situ* гибридизации) или SISH (усиленной серебром *in situ* гибридизации).

29. Способ по п. 24, отличающийся тем, что обнаружение немелкоклеточного рака легкого, позитивного по слиянию SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 или FIG-ROS1, осуществляют с применением любой формы геномной ПЦР, прямого секвенирования, ПЦР-секвенирования, ОТ-ПЦР или аналогичного анализа.

30. Способ по п. 24, отличающийся тем, что обнаружение немелкоклеточного рака легкого, позитивного по слиянию SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 или FIG-ROS1, осуществляют с применением антитела, которое специфически связывается с химерным полипептидом SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 или FIG-ROS1 или его фрагментом.

31. Способ диагностики и лечения пациента, в котором пациент имеет опухоль НМРЛ (немелкоклеточного рака легкого), и указанная опухоль идентифицирована как НМРЛ, позитивная по слиянию SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 или FIG-ROS1, и указанное лечение включает введение терапевтически эффективного количества соединения Формулы I или его фармацевтически приемлемой соли и по меньшей мере одного фармацевтически приемлемого носителя.

32. Способ лечения аденокарциномы легкого, которая представляет собой немелкоклеточный рак легкого, позитивный по слиянию SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 или FIG-ROS1, у пациента, нуждающегося в таком лечении, включающий введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества соединения 1:

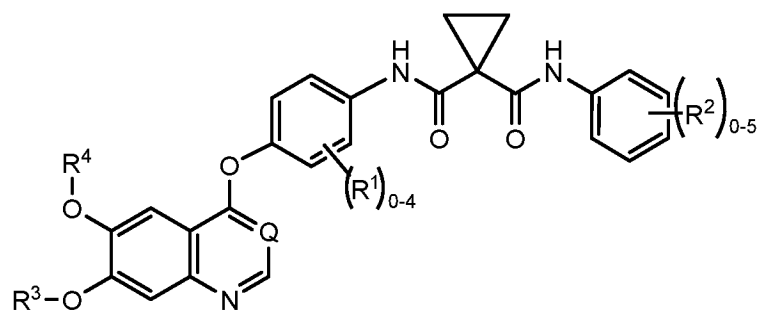


соединение 1

или его фармацевтически приемлемой соли.

33. Способ по любому из пп. 1-32, отличающийся тем, что эффективное количество соединения Формулы I, Ia или соединения 1 обеспечивает по меньшей мере один терапевтический эффект, выбранный из группы, состоящей из уменьшения размера опухоли, уменьшения метастазирования, полной ремиссии, частичной ремиссии, стабилизации заболевания, увеличения общей частоты ответов или полного патологического ответа.

34. Способ ингибирования активности химерной киназы ROS1 в раковой клетке, включающий приведение в контакт указанной клетки с эффективным количеством соединения Формулы I:



I

или его фармацевтически приемлемой соли, где:

R^1 представляет собой галоген;

R^2 представляет собой галоген;

R^3 представляет собой (C_1-C_6) алкил;

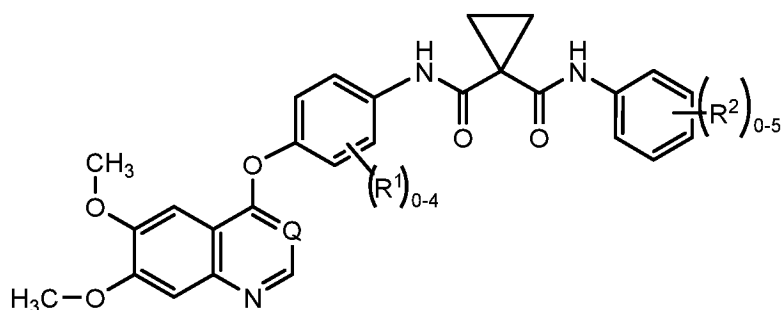
R^4 представляет собой (C_1-C_6) алкил; и

Q представляет собой CH или N.

35. Способ по п. 34, отличающийся тем, что раковая клетка представляет собой клетку аденокарциномы немелкоклеточного рака легкого.

36. Способ по п. 34, отличающийся тем, что раковая клетка представляет собой клетку аденокарциномы немелкоклеточного рака легкого, позитивного по слиянию SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 или FIG-ROS1.

37. Способ по любому из пп. 34-36, отличающийся тем, что соединение Формулы I представляет собой соединение Формулы Ia



Формула I(a),

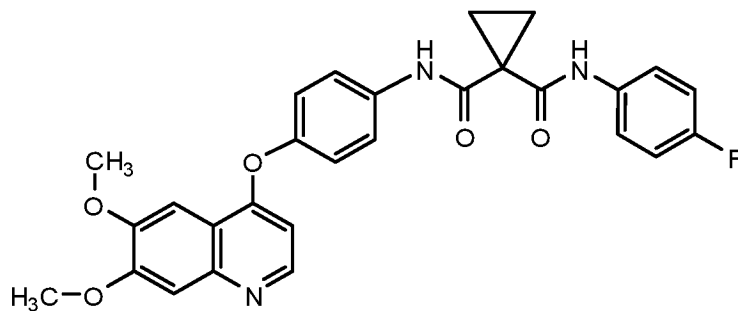
или его фармацевтически приемлемую соль, где:

R^1 представляет собой галоген;

R^2 представляет собой галоген; и

Q представляет собой CH или N.

38. Способ по любому из пп. 34-37, отличающийся тем, что соединение Формулы I представляет собой соединение 1:



соединение 1

или его фармацевтически приемлемую соль.

39. Способ по п. 38, отличающийся тем, что соединение 1 представляет собой N-(4-{[6,7-бис(метилокси)хинолин-4-ил]окси}фенил)-N'-(4-фторфенил)циклопропан-1,1-дикарбоксамид или его фармацевтически приемлемую соль.

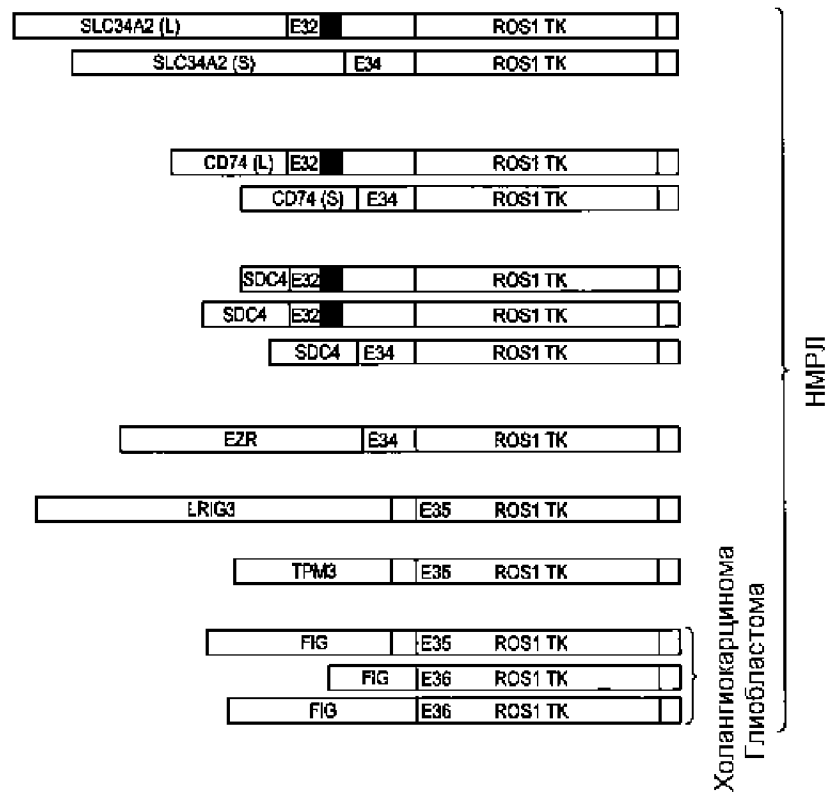
40. Способ по любому из пп. 34-39, отличающийся тем, что соединение Формулы (I), Формулы I(a) и соединение I представляет собой (L)- или (D)-малатную соль.

41. Способ по любому из пп. 34-40, отличающийся тем, что соединение Формулы (I) представлено в кристаллической форме N-1 или форме N-2 (L)-малатной соли и/или (D)-малатной соли.

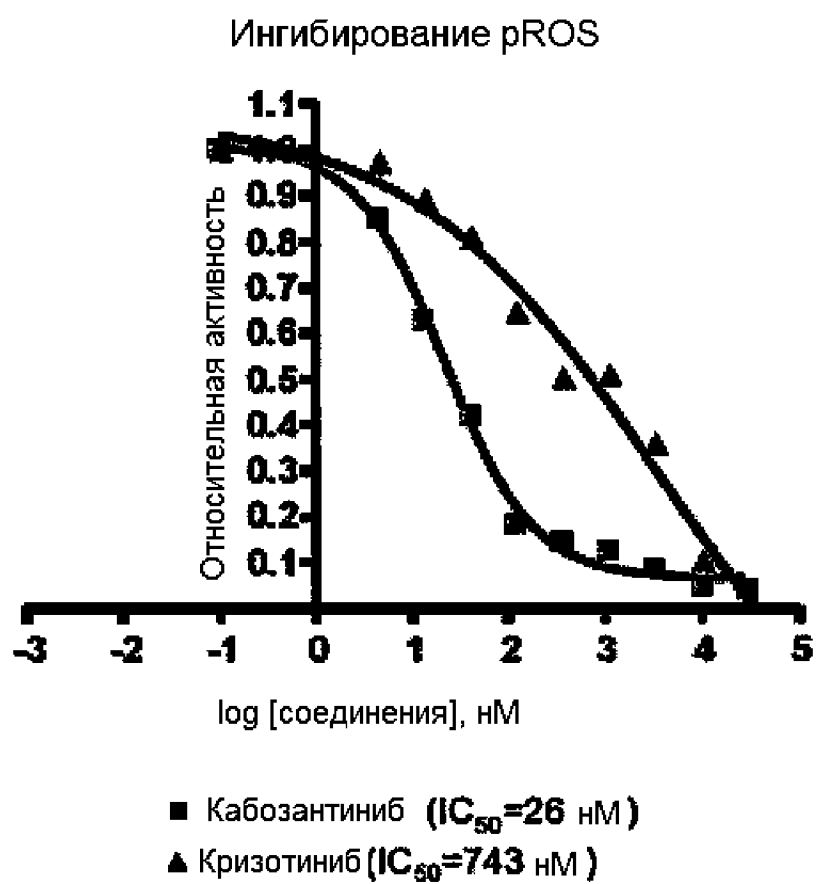
42. Способ по любому из пп. 34-41, отличающийся тем, что соединение Формулы I, I(a) или соединение 1, или его фармацевтически приемлемую соль вводят в раковую клетку в виде фармацевтической композиции, дополнительно содержащей фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество или разбавитель.

По доверенности

Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

MKNIYCLIPK	LVNFATLGCL	WISVVQCTVL	NSCLKSCVTN	LGQQLDLGRP	HNLSEPCIQG	CHFWSVDQK
10	20	30	40	50	60	70
NCALKCRESC	EVGCSSAEGA	YEEEVLENAD	LPTAPFASSI	GSHNMTLRWK	SANFSGVKYI	IQWKYAQLLG
80	90	100	110	120	130	140
SWTYTKTVSR	PSYVVKPLHP	FTEYIFRVVW	IFTAQLQLYS	PPSPSYRTHP	HGVPETAPLI	RNISSSSPDT
150	160	170	180	190	200	210
VEVSWDPPQF	PGGPILGYNL	RLISKNQKLD	AGTQRTSFQF	YSTLPNTIYR	FSIAAVNEVG	EGPEAESSIT
220	230	240	250	260	270	280
TSSSAVQQEE	QWLFLSRKTS	LRKRSLKHLV	DEAHCLRLDA	IYHNITGISV	DVHQQIVYFS	EGTLIWAKKA
290	300	310	320	330	340	350
ANMSDVSDLR	IFYRGSGLIS	SISIDWLYQR	MYFIMDELVC	VCDLENCUNI	EEITPPSISA	PQKIVADSYN
360	370	380	390	400	410	420
GYVFYLLRDG	IYRADLPVPS	GRCAEAVRIV	ESCTLKDFAI	KPQAKRIIYF	NDTAQVFMST	FLDGSASHLI
430	440	450	460	470	480	490
LPRIPFADVK	SFACENNDLF	VTDGKVIQQ	DALSFNEFIV	GCDLSHIEEF	GFGNLVIFGS	SSQLHPLPGR
500	510	520	530	540	550	560
PQELSVLFGS	HQALVQWKPP	ALAIGANVIL	ISDIIELFEL	GPSAQWNWY	EVKYSTQDPP	EVTHIFLNLIS
570	580	590	600	610	620	630
GTMLNVPELQ	SAMKYKVSVR	ASSPKRPGPW	SEPSVGTTLV	PASEPPFIMA	VKEDGLWSKP	LNSFGPGFEL
640	650	660	670	680	690	700
SSDIGNVSDM	DWYNNSLYYS	DTKGDVFWL	LNGTDISENY	HLPSIAGAGA	LAFEWLGHFL	YWAGKTYVIQ
710	720	730	740	750	760	770
RQSVLTGHTD	IVTHVKLLVN	DMVDSVGGY	LYWTTLYSVE	STRLNGESSL	VLQTQPFWSG	KKVIALTLDL
780	790	800	810	820	830	840
SDGLLYWLIVQ	DSQCIHLYTA	VLRGQSTGDT	TITEFAAWST	SEISQNALMY	YSGRLFWING	FRIITTQEIG
850	860	870	880	890	900	910
QKTSVSVLEP	ARFNQFTIIQ	TSCLKPLPGNF	SFTPKVIPDS	VQESSFRIEG	NASSFQILWN	GPPAVDWGVV
920	930	940	950	960	970	980
FYSVEFSAHS	KFLASEQHS	PVFTVEGLEP	YALFNLSVTP	YTYWGKGPKT	SLSLRAPETV	PSAPENPRIF
990	1000	1010	1020	1030	1040	1050
ILPSGKCCNK	NEVVVEFRWN	KPKHENGVL	KFEIFYNLSN	QSITNKTCE	WIAVNVTPSV	MSFQLEGMS
1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120
RCFIAFQVRA	FTSKGPGPYA	DVVKSTTSEI	NPFPHLITLL	GNKIVFLDMD	QNQVWTFESA	ERVISAVCYT
1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190
ADNEMGYAAE	GDSLFLHLHL	NRSSSELFQD	SLVFDITVIT	IDWISRHLFY	ALKESQNGMQ	VFDVDLEHKV
1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260
KYPREVKIHN	RNSTIISFSV	YPLLSRLYWT	EVSNFGYQMF	YYSIISHTLH	RILQPTATNQ	QNKRNCSCN
1270	1280	1290	1300	1310	1320	1330
VTEFELSGAM	AIDTSNLEKP	LIYFAKAQEI	WAMDLEGQC	WRVITVPAML	AGKTLVSLTV	DGDLIYWIIT
1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
AKDSTQIYQA	KKGNAGIVSQ	VKALRSRHIL	AYSSVMQFPF	DKAFLSLASD	TVEPTILNAT	NTSLTIRLPL
1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470
AKTNLTWYGI	TSPTPTYLVI	YAEVNDRKNS	SDLKYRILEF	QDSIALIEDL	QPFSTYMIQI	AVKNYYSDDL
1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540
EHLPPGKEIW	GKTKNGVPEA	VQLINTTVRS	DTSLIISWRE	SHKPNGPKES	VRYQLAISHL	ALIPETPLRQ
1550	1560	1570	1580	1590	1600	1610
SEFPNGRLTL	LVTRLSGGNI	YVLKVLACHS	EEMWCTESH	VTVEMFNTPE	KPYSLVPENT	SLQFNWKAPL
1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680
NVNLIREWVE	LQKWYNEFY	HVKTSCSQGP	AYVCNITNLQ	PYTSYNVRVV	VVYKTGENST	SLPESFKTKA
1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750
GVPNKGPPIK	LLEGSKNSIQ	WEKAEDNGCR	ITYYILEIRK	STSNLQNLQN	LRWKMTFNGS	CSSVCTWKS
1760	1770	1780	1790	1800	1810	1820
NLKGIFQFRV	VAANNLGFE	YSGISENII	VGDDFWIPET	SFILTIIVGI	FLVVTIPLTF	VWHRLKNQK
1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890
SAKEGVTVLI	NEDKELAE	GLAAGVGLAN	ACYAIHTLPT	QEEIENLPAF	PREKLTIRLL	LGSGAFGEVY
1900	1910	1920	1930	1940	1950	1960
EGTAVDILGV	GSGEIKVAVK	TLKKGSTDQE	KIEFLKEAHL	MSKFNHPNII	KQLGVCLINE	PQYIILELME
1970	1980	1990	2000	2010	2020	2030
GGDLLTYLRK	ARMATFYGPL	LTLDLVDLC	VDISKGCYVL	ERMHFIHRDL	AARNCLVSVK	DYTSFRIVKI
2040	2050	2060	2070	2080	2090	2100
GDFGLARDIY	KNDYYRKRGE	GLLPVRWMA	ESLMDGIFTT	QSDVWSFGIL	IWEILTGLHQ	PYPAHSNLDV
2110	2120	2130	2140	2150	2160	2170
LNIVQVGGRL	EPPRNCDDDL	WNLMTCQWAQ	EPDQRPTFHR	IQDQLQLFRN	FFLNSIYKSR	DEANNSGVIN
2180	2190	2200	2210	2220	2230	2240
ESFEGEDGDV	ICLNSDDIMP	VALMETKNRE	GLNYMVLATE	CGQGEEKSEG	PLGSQESESC	GLRKEEKEPH
2250	2260	2270	2280	2290	2300	2310
ADKDFCQEKQ	VAYCPSGKPE	GLNYACLTHS	GYGDGSD			
2320	2330	2340	2347			

– Человеческий белок ROS1, номер доступа UniProt P08922: SEQ ID NO: 1

Фиг. 4**Киназный домен ROS1, SEQ ID NO: 2**

Leu Thr Leu Arg Leu Leu Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Glu Val Tyr Glu Gly
Thr Ala Val Asp Ile Leu Gly Val Gly Ser Gly Glu Ile Lys Val Ala Val Lys
Thr Leu Lys Lys Gly Ser Thr Asp Gln Glu Lys Ile Glu Phe Leu Lys Glu Ala
His Leu Met Ser Lys Phe Asn His Pro Asn Ile Leu Lys Gln Leu Gly Val Cys
Leu Leu Asn Glu Pro Gln Tyr Ile Ile Leu Glu Leu Met Glu Gly Gly Asp Leu
Leu Thr Tyr Leu Arg Lys Ala Arg Met Ala Thr Phe Tyr Gly Pro Leu Leu Thr
Leu Val Asp Leu Val Asp Leu Cys Val Asp Ile Ser Lys Gly Cys Val Tyr Leu
Glu Arg Met His Phe Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Leu Val Ser
Val Lys Asp Tyr Thr Ser Pro Arg Ile Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala
Arg Asp Ile Tyr Lys Asn Asp Tyr Tyr Arg Lys Arg Gly Glu Gly Leu Leu Pro
Val Arg Trp Met Ala Pro Glu Ser Leu Met Asp Gly Ile Phe Thr Thr Gln Ser
Asp Val Trp Ser Phe Gly Ile Leu Ile Trp Glu Ile Leu Thr Leu Gly His Gln
Pro Tyr Pro Ala His Ser Asn Leu Asp Val Leu Asn Tyr Val Gln Thr Gly Gly
Arg Leu Glu Pro Pro Arg Asn Cys Pro Asp Asp Leu Trp Asn Leu Met Thr Gln
Cys Trp Ala Gln Glu Pro Asp Gln Arg Pro Thr Phe His Arg Ile Gln Asp Gln
Leu Gln Leu Phe Arg Asn Phe Phe