

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035223**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.05.18

(21) Номер заявки
201692150

(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 НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО

(31) **61/984,599**

(32) **2014.04.25**

(33) **US**

(43) **2017.02.28**

(86) **PCT/US2015/027800**

(87) **WO 2015/164869 2015.10.29**

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

(72) Изобретатель:
Афтаб Дана Т., Юй Пэйвэнь (US)

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

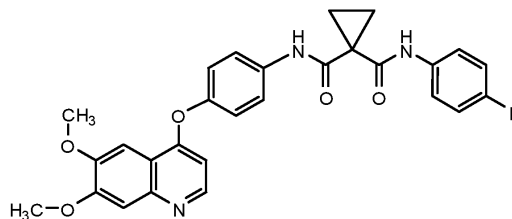
(56) **WO-A1-2014/039971**
TAKASHI KOHNO ET AL: "RET fusion gene: Translation to personalized lung cancer therapy", *CANCER SCIENCE*, vol. 104, no. 11, 1 November 2013 (2013-11-01), pages 1396-1400, XP055195151, ISSN: 1347-9032, DOI: 10.1111/cas.12275 page 1400

A. DRILON et. al: "Response to Cabozantinib in Patients with RET Fusion-Positive Lung Adenocarcinomas", *CANCER DISCOVERY*, vol. 3, no. 6, 26 March 2013 (2013-03-26), pages 630-635, XP055195155, ISSN: 2159-8274, DOI: 10.1158/2159-8290.CD-13-0035 page 4

R. KATAYAMA ET AL: "Cabozantinib Overcomes Crizotinib Resistance in ROS1 Fusion-Positive Cancer", *CLINICAL CANCER RESEARCH*, vol. 21, no. 1, 28 October 2014 (2014-10-28), pages 166-174, XP055195242, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1385 table 1

Anonymous: "Cabozantinib in Patients With RET Fusion-Positive Advanced Non-Small Cell Lung Cancer and Those With Other Genotypes: ROS1 or NTRK Fusions or Increased MET or AXL Activity - Tabular View - ClinicalTrials.gov", 1 May 2015 (2015-05-01), XP055195262, Retrieved from the Internet: URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/reCORD/NCT01639508> [retrieved on 2015-06-11] the whole document

(57) Настоящее изобретение относится к применению соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли для лечения и предупреждения немелкоклеточного рака легкого, позитивного по слиянию SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 или FIG-ROS1, и для ингибирования или реверсирования развития рака, опосредованного киназой ROS1, где рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого, позитивный по слиянию SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 или FIG-ROS1. Кроме того, описано применение фармацевтической композиции, содержащей соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль, и способ ингибирования или реверсирования развития рака, опосредованного киназой ROS1.



соединение 1

B1

035223

035223

B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к лечению и предупреждению рака, опосредованного киназой ROS1, в частности немелкоклеточного рака легкого, с применением ингибитора рецепторных тирозинкиназ.

Уровень техники

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, Bergethon 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 5B) и онкогена RET представляет собой драйверную мутацию у 1-2% пациентов с НМРЛ и терапевтическую мишень.

Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, Yasuda K,

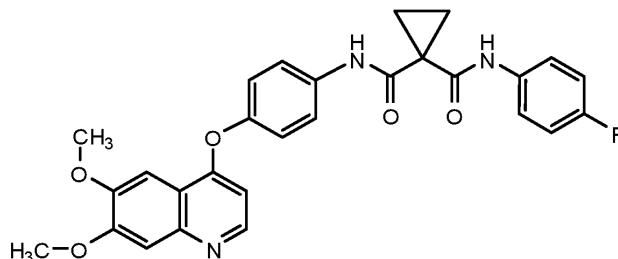
Hiramoto M, Nanno T, Sakamoto H, Tsuta K, Furuta K, Shimada Y, Iwakawa R, Ogiwara H, Oike T, Enari M, Schetter AJ, Okayama H, Haugen A, Skaug V, Chiku S, Yamanaka I, Arai Y, Watanabe S, Sekine I, Ogawa S, Harris CC, Tsuda H, Yoshida T, Yokota J, Shibata T. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nat 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 НМРЛ

и разработка методов лечения каждого геномного подмножества пациентов.

Сущность изобретения

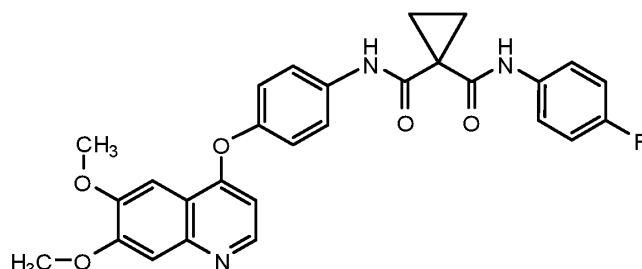
Настоящее изобретение относится к применению соединения 1



или его фармацевтически приемлемой соли для лечения и предупреждения немелкоклеточного рака легкого, позитивного по слиянию SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 или FIG-ROS1.

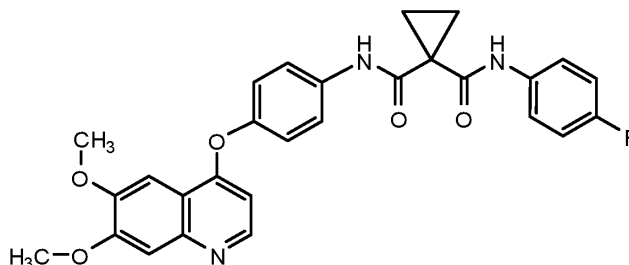
В частном аспекте настоящего изобретения фармацевтически приемлемая соль соединения 1 представляет собой (L)- или (D)-малатную соль соединения 1.

В ещё одном аспекте настоящее изобретение относится к применению фармацевтической композиции, содержащей соединение 1



или его фармацевтически приемлемую соль и дополнительно содержащую фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество или разбавитель, для лечения немелкоклеточного рака легкого, позитивного по слиянию SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 или FIG-ROS1, у пациента.

В ещё одном аспекте настоящее изобретение относится к применению соединения 1



или его фармацевтически приемлемой соли для ингибирования или реверсирования развития рака, опосредованного киназой ROS1, у млекопитающего, где рак, опосредованный киназой ROS1, представляет собой немелкоклеточный рак легкого, позитивный по слиянию SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 или FIG-ROS1.

В ещё одном аспекте настоящее изобретение относится к способу ингибирования или реверсирования развития рака, опосредованного киназой ROS1, у млекопитающего, где рак, опосредованный киназой ROS1, представляет собой немелкоклеточный рак легкого, позитивный по слиянию SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 или FIG-ROS1, где способ включает введение млекопитающему указанной выше фармацевтической композиции ежедневно в течение более чем 3 месяцев.

В предпочтительном аспекте настоящего изобретения соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят в дозе 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95 мг/в сутки.

Соединение 1 известно как N-(4-{[6,7-бис(метилокси)хинолин-4-ил]окси}фенил)-N'-(4-фторфенил)циклопропан-1,1-дикарбоксамида 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 медулярного рака щитовидной железы (МТЦ). В декабре 2013 года Европейский Комитет по лекарственным препаратам для человека (CHMP) вынес положительное решение по заявке на регистрацию (МАЗ), 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). 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 (XL 184), 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 (XL 184), 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).

Краткое описание графических материалов

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 TK, 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 транс мембранный домен, сохранный в ROS1.

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-[(1R)-1-(2,6-дихлор-3-фторфенил)этокси]-5-(1-пиперидин-4-илпиразол-4-ил)пиридин-2-амин (кризотиниб; XALKO-RI®).

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

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

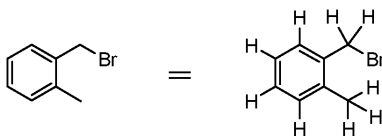
Следующие сокращения и термины имеют в настоящем описании указанные значения.

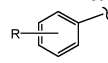
Сокращение	Значение
Ac	Ацетил
ш	Широкий
°C	Градусы Цельсия
цикло-	Цикло
CBZ	Карбобензоксид = бензилоксикарбонил
д	Дублет

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

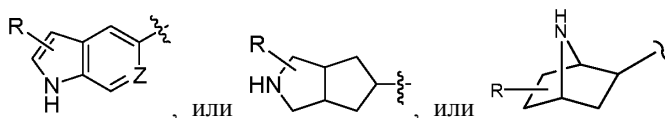
Символ "-" означает одинарную связь, "=" означает двойную связь.

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.

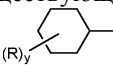


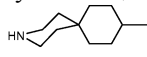
Если группа "R" изображена в кольцевой системе как "плавающая", как, например, в формуле , то, если не указано иное, заместитель "R" может занимать любой атом кольцевой системы, подразумеваемая замещение изображенного, подразумеваемого или явно определенного водорода у одного из кольцевых атомов, при условии образования устойчивой структуры.

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, подразумеваемая 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 системы. Если группа "R" изображена как существующая в кольцевой системе, содержащей насыщенные атомы углерода, как, на-

пример, в формуле , причем в этом примере "у" может быть равным более одного, подразумеваемая, 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 .

"Галоген" или "гало" относится к фтору, хлору, бром или йоду.

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 aberrантной 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). Известны 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.

ROS1 "дикого типа" означает полноразмерную киназу ROS1 (т.е. для человеческой ROS1 полипептид длиной 2347 аминокислот (SEQ ID NO1) 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.

Аберрантно 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 HMPJI (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). В данном контексте термин "слияние ROS1" относится к части полипеп-

тида 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. 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. 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.

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.

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.

"SLC34A2" может относиться к натрийзависимому белку-переносчику фосфата 2B, 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.

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 MPMK 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.

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. "

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 аберрантной 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.

"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. "Химерный белок или ген FIG-ROS1" относится к соматическим генным слияниям партнеров FIG и ROS1. В некоторых вариантах реализации внутривхромосомная 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 внутрирабочного слияния с конститутивно активным и функциональным киназным 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.

"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.

"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, 17th 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.

Примеры фармацевтически приемлемых солей присоединения кислот включают соли, образован-

ные 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-гидроксibenzoил)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.

"ROS1" или "белок ROS1" представляет собой трансмембранную рецепторную тирозинкиназу и дополнительно описан в настоящем документе. "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.

"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 синдрома, 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.

"Выход" для каждой реакции, описанной в настоящем документе, выражен в процентах от теоретического выхода.

Варианты реализации изобретения

Соединение I, описанное в настоящем документе, включает фармацевтически приемлемые соли.

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

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

В других вариантах реализации соединение 1 представляет собой малатную соль.

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

В другом варианте реализации малатная соль представлена в кристаллической форме N-1 или в форме N-2 (b)-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.

В другом варианте реализации настоящее изобретение относится к способу реверсирования или ингибирования НМРЛ, включающему введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли в любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе.

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 1 или его фармацевтически приемлемой соли в любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе.

Ингредиент	(% масс./масс. с.)
Соединение 1	31,68
Микрокристаллическая 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

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
Микрокристаллическая 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

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

Любые составы таблеток, представленные выше, могут быть подобраны в соответствии с необходимой дозой соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли. Таким образом, количество каж-

дого 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.

Введение

Введение соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли в чистой форме или в подходящей фармацевтической композиции может быть осуществлено любым приемлемым способом введения или с помощью средств, предназначенных для подобных целей. Так, введение может быть, например, осуществлено перорально, назально, парентерально (внутривенно, внутримышечно или подкожно), местно, трансдермально, внутривагинально, интравезикально, интрацестернально 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. 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. Адъюванты включают консервирующие, увлажняющие, суспендирующие, подслащающие, 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.

При необходимости фармацевтическая композиция соединения формулы I также может содержать незначительные количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, рН-буферные агенты, антиоксиданты и т.п., такие как, например, лимонная кислота, сорбитан-монолаурат, триэтаноламинолеат, бутилированный гидрокситолуол и т.д.

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.

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.

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. Твердые лекарственные формы для перорального введения включают капсулы, таблетки, пилюли, порошки и гранулы. В таких твердых лекарственных формах активное соединение смешано по меньшей мере с одним инертным стандартным вспомогательным веществом (или носителем), таким как цитрат натрия или фосфат дикальция, или с (а) 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, таки-

ми 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.

Твердые лекарственные формы, описанные выше, могут быть получены с покрытиями и оболочками, такими как энтеросолубильные покрытия и другие хорошо известные из уровня техники. Они могут содержать замутняющие средства, а также могут иметь такой состав, чтобы высвобождать 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.

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, тетрагидрофурурилового спирта, полиэтиленгликолей и сложных эфиров жирных кислот и сорбита; или смесей указанных веществ и т.п., с получением раствора или суспензии.

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

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.

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. 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.

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 I, или его фармацевтически приемлемой соли, а остальное составляют подходящие фармацевтические вспомогательные вещества. Существующие способы получения таких лекарственных форм известны или понятны специалистам в данной области техники; см., например, Remington, Pharmaceutical Sciences, 18-е 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. Соединения согласно настоящему описанию или их фармацевтически приемлемые соли 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 I 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 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. В других вариантах реализации соединения I 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.

ROS1 и партнеры по слиянию SLC34A2, CD74 и FIG

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.

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 aberrантной экспрессии, приводящей к раку. Описание полно-размерной 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.

Таблица 1. Аминокислотные остатки и домены белка ROS1 в SEQ ID NO: 1
Сигнальный пептид 1-27 Внеклеточный домен 28-1859 Трансмембранный 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

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-го или 32-го, или 34-го экзона по последний экзон (например, 32-й или 34-й экзон) или его фрагментом гена ROS1. С-концевой домен белка ROS1 может содержать последовательно по меньшей мере около 100 аминокислот от стартового положения 31-го или 32-го 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-го экзона (длинная форма) или 34-го 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. В одном иллюстративном варианте реализации человеческий ген SLC34A2, кодирующий человеческий белок SLC34A2 (мРНК NM_001177998), локализован в 4 хромосоме человека (4p15.2), 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-й экзон, или с первого экзона по 4-й 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-го положения (то есть по меньшей мере аминокислотная последовательность с 1-го по 250-е 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-го аминокислотного положения белка SLC34A2.

В одном иллюстративном варианте реализации слияние SLC34A2-ROS1 представляет собой хромо-

сомную 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 соединение 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.

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 известны многочисленные слияния. Примеры таких слияний включают 2-й и/или 4-й экзон гена SLC34A2 и 32-й (длинный, L) и/или 34-й 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. 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-й 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-го положения (то есть по меньшей мере аминокислотная последовательность с 1-го по 250-е 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-го аминокислотного положения белка CD74.

В химерном белке слияние или область слияния может находиться между различными экзонами гена CD74 и гена ROS1. Специалистам в данной области техники известны многочисленные слияния. Примеры таких слияний CD74-ROS1 включают 6-й экзон гена CD74, слитый с 32-м или 34-м 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.

Химерный белок FIG-ROS1 образуется в результате внутрихромосомной делеции в человеческой хромосоме 6, гибридизующей 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-го положения (то есть по меньшей мере аминокислотная последовательность с 1-го по 500-е 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-го аминокислотного положения белка FIG.

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-й или 8-й экзон гена FIG, гибридизованный с 35-м или 36-м 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.

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.

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-го экзона белка ROS1, и в сторону С-конца белка ROS1.

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. 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 HMPЛ, связанного со слиянием ROS1.

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 HMPЛ; пациент, страдающий HMPЛ, связанным со слиянием ROS1; и/или пациент, страдающий HMPЛ, связанным со слиянием SLC34A2-ROS1.

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.

Наличие химерного белка может быть обнаружено с помощью общего анализа, в котором измеряют взаимодействие между химерным белком и материалом (например, антителом или аптамером), специфическим связывающимся с химерным белком. Общий анализ может представлять собой иммунохроматографию, иммуногистохимическое окрашивание, иммуноферментный твердофазный анализ (ELISA), ра-

диоиммунологический анализ (RIA), иммуноферментный анализ (ИФА), флуоресцентный иммунологический анализ (FIA), люминесцентный иммунологический анализ (LIA), вестерн-блоттинг, сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS) и т.п.

Кроме того, наличие химерного гена или мРНК может быть обнаружено с помощью общего анализа, такого как ПНР, 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.

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 1А, меченного первым флуоресцентным веществом, и зонда 1В, меченного вторым флуоресцентным веществом; зонд 1А комплементарен первой области, которая представляет собой 5'-область в вышеупомянутом первом хромосомном сайте, зонд 1В 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 2А, меченного первым флуоресцентным веществом, и зонда 2В, меченного вторым флуоресцентным веществом; зонд 2А комплементарен первой области, которая представляет собой 5'-область в вышеуказанном втором хромосомном сайте, зонд 2В 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 2А и вышеуказанного зонда 1В; и (4) четвертый набор зонда, состоящий из зонда 4А, который комплементарен хромосомному сайту, содержащему ген ROS1 (третий хромосомный сайт), и зонда 4В, который комплементарен хромосомному сайту, содержащему ген SLC34A2 (четвертый хромосомный сайт).

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.

В некоторых вариантах реализации анализ FISH может коррелировать с другими физическими технологиями хромосомного картирования и данными генетической карты. Технология FISH общеизвестна (см., например, патенты 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.

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.

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 ИHC 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 эпитопе в киназном домене ROS1). Такие анализы известны в данной области техники (см., например, патент США № 7468252).

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.

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.

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.

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 средство.

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 SLC34A2 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 SLC34A2 (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 2А и вышеуказанного зонда 1В; и четвертый набор зондов, состоящий из зонда 4А, который комплементарен хромосомному сайту, содержащему ген ROS1 (третий хромосомный сайт), и зонда 4В, который комплементарен хромосомному сайту, содержащему ген SLC32A2 (четвертый хромосомный сайт). 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. 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).

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. 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.

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.

Предусмотрены относительно длинные зонды (от примерно 200 килобаз (зонд 1А) до примерно 1370 килобаз (зонд 4В). 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%.

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.

Решение относительно вышеуказанного явления предпочтительно и обычно принимают на основа-

нии 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.

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.

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. 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, тонкоигльной 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).

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

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. 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.

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. 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 по-

линуклеотида, кодирующего белок SLC34A2, и полинуклеотида, кодирующего белок ROS1.

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.

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.

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).

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).

(a1) Комбинация полинуклеотида, который гибридизуется с кодирующей областью части или полного спирального домена экзона 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").

(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").

(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").

(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").

Область (целевая последовательность оснований), с которой гибридизуется полинуклеотид по пункту (a1), используемый 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. Полинуклеотид, указанный выше в пункте (а) 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.

Полинуклеотид, указанный выше в пунктах (а) или (б), 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.

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.

Мечение полинуклеотида может быть осуществлено с помощью известной технологии. Например, основание подложки, меченное флуоресцентным красителем или подобным образом с помощью нуклеотидной 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 (а) или (б), и вышеупомянутого биологического образца, могут варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как длина релевантного полинуклеотида, однако одним из примеров жестких условий гибридизации является 0,2×SSC, 65°C, а примером нежестких условий гибридизации является 2,0×SSC, 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 5×SSC, 0,5% SDS, 1,0 мМ ЭДТК (pH 8,0); гибридизацию при 50-60°C, 5×SSC, в течение ночи; с последующим двукратным промыванием при 65°C в течение 20 мин каждым из растворов 2×, 0,5× и 0,2×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.

Примеры способов обнаружения геномной ДНК, которая кодирует химерный полипептид SLC34A2-ROS1, с применением полинуклеотида, указанного выше в пункте (а) или (б), 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 (а) или (б), с мембраной, на которой транскрибирован экстракт нуклеиновой кислоты, полученный из вышеупомянутого биологического образца. При использовании полинуклеотида (а) 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.

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 (б). В указанных способах матрицу полинуклеотидов по пункту (б) фиксируют на подложке и релевантную геномную ДНК обнаруживают приведением в контакт биологического образца с полинуклеотидами в матрице. При ПНР или секвенировании полинуклеотиды по пункту (с), 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,

(с) 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.

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.

"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, состоящих 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. 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, конструирование 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.

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).

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, упомянутой 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.

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, упомянутой 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. В иллюстративном варианте реализации молекула нуклеиновой кислоты 5TIG-3'ROS1 содержит достаточную последовательность FIG и достаточную последовательность ROS1, так что кодируемое слияние 5TIG-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 5TIG-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.

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.

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. 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.

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.

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.

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 внутримочное 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.

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.

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 мРНК SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 или FIG-ROS1. 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.

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 внутримочному слиянию экзона 4 или 13 SLC34A2 с экзоном 32, 34 или 35 ROS1 (например, последовательность в пределах транслокации на 6 хромосоме).

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 расположен-

ную 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 TCGGATTTCTCTACTTTTCGTG (SEQ ID NO:3); CD74 экзон 6, обратная последовательность CTCCTGTTTGAAATGAGCAGG (SEQ ID NO:4); ROS1 экзон 32, обратная последовательность GGAATGCCTGGTTTATTTGG (SEQ ID NO:5); ROS1 экзон 34, обратная последовательность TGAAACTTGTCTCTGGTATCCAA (SEQ ID NO: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).

Фрагмент нуклеиновой кислоты может быть обнаруживаемым образом помечен, например, радиоактивной меткой, флуоресцентной меткой, биолюминесцентной меткой, хемилюминесцентной меткой, ферментной меткой, меткой связывающей пары, или может содержать аффинную метку; или меткой, или идентификатором (например, адаптером, штрихкодом или другим идентификатором последовательности). 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 HMPJL, SCLC, SCC или их комбинацию, и аденокарциному или меланому.

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. 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. 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.

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 использована с целью подтверждения и прямого специфического лечения положительного к слиянию ROS1 рака HMPJL и аденокарциномы легкого с применением соединений согласно настоящему изобретению. Другие конструкторы могут быть использованы для прямого специфического лечения рака, позитивного по слиянию ROS1, например HMPJL 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.

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).

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.

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

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. 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 соединения 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.

Как описано выше, любой из полинуклеотидов, указанных ниже в пунктах (а)-(с), имеющих длину цепи по меньшей мере 15 оснований, может быть преимущественно использован для обнаружения наличия или отсутствия химерного полинуклеотида SLC34A2-ROS1, или CD74-ROS1, или FIG-ROS1;

(а) 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;

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

(с) 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;

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.

В полинуклеотидах (а)-(с) 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).

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.

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.

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

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), NAS-BA (амплификация на основе последовательности нуклеиновой кислоты), ICAN (изотермическая иницируемая химерным праймером амплификация нуклеиновой кислоты), метод LAMP (петлевая изотермическая амплификация), метод ТМА (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.

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 ПНР, 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 ПНР, 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.

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 ПНР может быть также сконструирована мультиплексная ПНР 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.

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.

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.

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.

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 солубилизированной 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.

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. 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.

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).

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

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

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

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.

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.

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.

Иллюстративные праймеры ROS1, SLC34A2 или CD74, способные к обнаружению химерных полинуклеотидов ROS1, представлены в табл.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	AAACTTGTCTTCTGGTATCC (SEQ ID NO: 10)
<i>ROS1</i> Break Rev1	CAGCTCAGCCAACTCTTT (SEQ ID NO: 11)
<i>ROS1</i> E43R1	TCTATTTCCTCAACAACGCTATTAATCAGACCC (SEQ ID NO: 12)
<i>ROS1</i> E34R	TGAAACTTGTCTTCTGGTATCCAA (SEQ ID NO: 13)
<i>CD74</i> E5F	CCTGAGACACCTTAAGAACACCA (SEQ ID NO: 14)
<i>SLC34A2</i> E4F	TCGGATTCTCTACTTTTTCGTG (SEQ ID NO: 15)

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. 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.

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.

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.

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 1 или его фармацевтически приемлемую соль.

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 1 или его фармацевтически приемлемую соль.

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

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 мiPHK, кшPHK, микроPHK и аптамера, которые способны специфически связываться с химерным геном или геном, кодирующим ROS1.

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 1 или его фармацевтически приемлемой солью.

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 соединением 1.

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 активност-

сти 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.

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 соединения 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. 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 подвергнут фиксации в формалине, фиксации в спирте, замораживанию или заливке в парафин.

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.

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-оксibenзойная кислота, хлорбутанол и т.д.

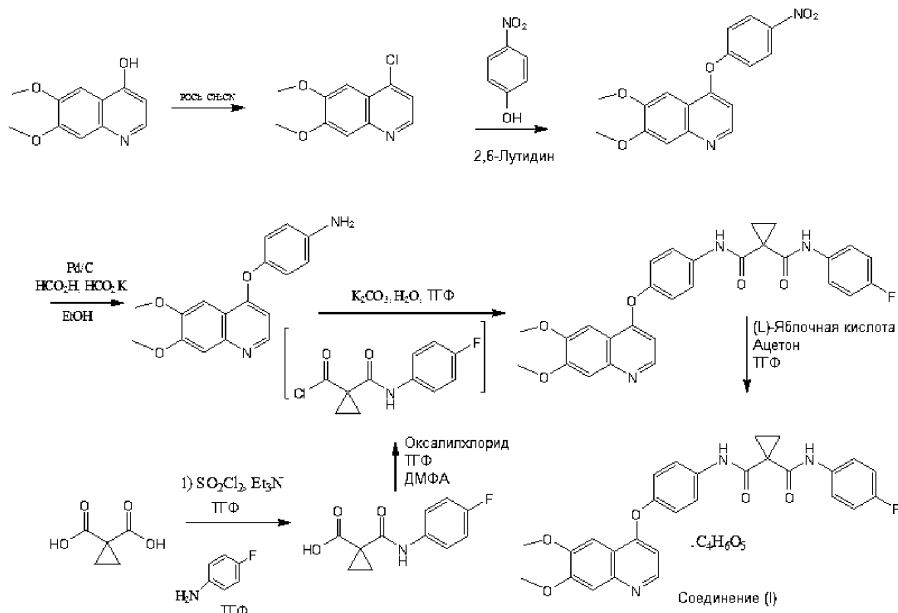
Кроме того, помимо препарата, который содержит полинуклеотиды и антитела, препараты, такие как субстрат, положительный контроль (например, химерные полинуклеотиды SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 или FIG-ROS1, химерные полипептиды SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 или FIG-ROS1, или клетки, имеющие их, и т.д.) и отрицательный контроль, необходимые для обнаружения метки, прикрепленной к полинуклеотиду 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.

Способы обнаружения, описанные в настоящем документе, особенно подходят при обнаружении химерного белка, который состоит по существу из N-концевого домена партнера по слиянию и С-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 С-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 С-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 С-концевого домена белка ROS1, кодирующего киназный домен. Указанный способ может быть использован для диагностики рака легкого, в частности мелкоклеточного 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 гибризован 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 подлечит лечению ингибитором ROS1, таким как соединение формулы 1 или его фармацевтически приемлемая соль.

Получение соединения 1

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

Схема 1



Получение 4-хлор-6,7-диметоксихинолина

В реактор последовательно загружали 6,7-диметоксихинолин-4-ол (10,0 кг) и ацетонитрил (64,0 л). Полученную смесь нагревали до около 65°C и добавляли оксихлорид фосфора (POCl_3 , 50,0 кг). После добавления POCl_3 температуру реакционной смеси повышали до около 80°C. Реакцию считали завершённой (около 9,0 ч), когда осталось менее 2% исходного вещества (встроенный анализ высокоэффективной жидкостной хроматографии [ВЭЖХ]). Реакционную смесь охлаждали до около 10°C, 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°C 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°C, и за это время продукт кристаллизовался. Твёрдое вещество выделяли центрифугированием, промывали н-гептаном (20,0 кг) и сушили при около 40°C с получением указанного в заголовке соединения (8,0 кг).

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

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°C. По завершении реакции (осталось менее 5% исходного вещества, по результатам определения с помощью встроенного ВЭЖХ анализа, около 20 ч) содержимое реактора оставили остывать до около 25°C. Добавляли метанол (26,0 кг), затем карбонат калия (3,0 кг), растворённый в воде (50,0 кг). Содержимое реактора перемешивали в течение около 2 ч. Полученный твёрдый осадок фильтровали, промывали водой (67,0 кг) и сушили при 25°C в течение около 12 ч с получением указанного в заголовке соединения (4,0 кг).

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

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 углеводе (содержание влаги 50%, 0,4 кг) в тетрагидрофуране (ТГФ, 40,0 кг), которую нагревали до около 60°C. Добавление проводили так, чтобы температура реакционной смеси оставалась на уровне около 60°C. По завершении реакции по результатам определения с помощью встроенного ВЭЖХ анализа (осталось менее 2% исходного вещества, обычно 15 ч), содержимое реактора отфильтровали. Фильтрат концентрировали вакуумной перегонкой при около 35°C 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°C с получением указанного в заголовке соединения (3,0 кг; площадь под кривой (AUC) 97 процентов).

Получение 1-(4-фторфенилкарбамоил)циклопропанкарбоновой кислоты

Триэтиламин (8,0 кг) добавляли к охлажденному (около 4°C) раствору имеющейся в продаже цик-

лопропан-1,1-дикарбоновой кислоты (21, 10,0 кг) в ТГФ (63,0 кг) с такой скоростью, чтобы температура смеси не превышала 10°C. Раствор перемешивали в течение около 30 мин, а затем добавляли тионилхлорид (9,0 кг), поддерживая температуру смеси ниже 10°C. По завершении добавления добавляли раствор 4-фторанилина (9,0 кг) в ТГФ (25,0 кг) с такой скоростью, чтобы температура смеси не превышала 10°C. Смесь перемешивали в течение около 4 ч, 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°C под вакуумом с получением указанного в заголовке соединения (10,0 кг).

Получение 1-(4-фторфенилкарбамоил)циклопропанкарбонилхлорида

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°C. 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-дикарбоксамида

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°C. По завершении реакции (обычно 10 мин) добавляли воду (74,0 кг). Смесь перемешивали при 15-30°C в течение около 10 ч, 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°C под вакуумом в течение около 12 ч с получением указанного в заголовке соединения (свободное основание, 5,0 кг). ¹H ЯМР (400 МГц, d-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+N= 502.

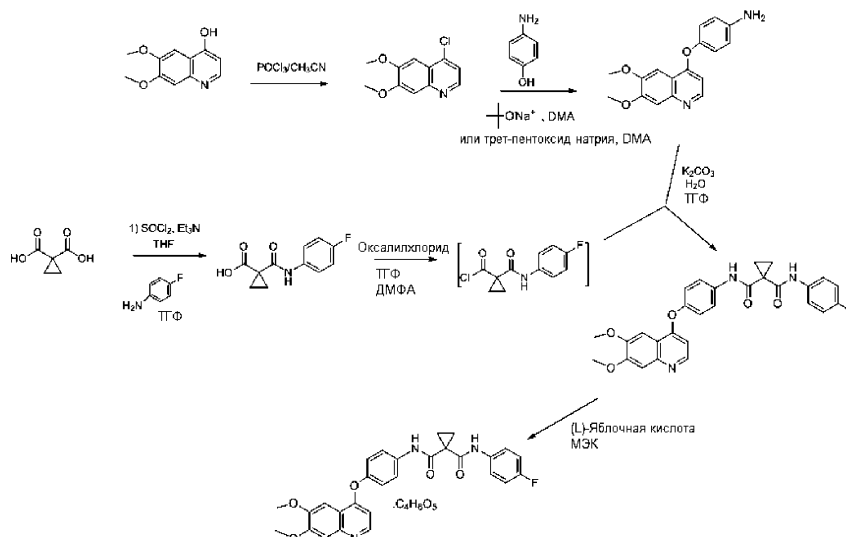
Получение N-(4-{[6,7-бис(метилокси)хинолин-4-ил]окси}фенил)-N'-(4-фторфенил)циклопропан-1,1-дикарбоксамида, (L)-малатной соли

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 кг) в этаноле, поддерживая температуру смеси около 25°C. Затем добавляли углерод (0,5 кг) и кремний-тиол (0,1 кг) и полученную смесь нагревали до около 78°C, при которой добавляли воду (6,0 кг). Затем реакционную смесь фильтровали с последующим добавлением изопропанола (38,0 кг) и оставляли остывать до около 25°C. Продукт выделяли фильтрацией и промывали изопропанолом (20,0 кг), и сушили при около 65°C 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-дикарбоксамида и его (b)-малатной соли

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-дикарбоксамида и его (L)-малатной соли, представлен на Схеме 2, как описано в PCT/US2012/024591, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Схема 2



Получение 4-хлор-6,7-диметоксихинолина

В реактор последовательно загружали 6,7-диметоксихинолин-4-ол (47,0 кг) и ацетонитрил (318,8 кг). Полученную смесь нагревали до около 60°C и добавляли оксихлорид фосфора (POCl_3 , 130,6 кг). После добавления POCl_3 температуру реакционной смеси повышали до около 77°C. Реакцию считали завершённой (около 13 ч), когда осталось менее 3% исходного вещества (встроенный анализ высокоэффективной жидкостной хроматографии [ВЭЖХ]). Реакционную смесь охлаждали до около 2-7°C, 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°C и разделяли фазы. Органическую фазу фильтровали через слой AW Hyflo 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°C, и выдерживали в течение 2, 5 ч с получением твердого осадка, который затем отфильтровывали и промывали н-гептаном (92,0 кг) и сушили на фильтре при около 25°C в атмосфере азота с получением указанного в заголовке соединения. (35,6 кг).

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

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°C. Затем смесь нагревали до 100-105°C в течение около 13 ч. По завершении реакции, по результатам определения с помощью встроенного ВЭЖХ анализа (осталось менее 2% исходного вещества), содержимое реактора охлаждали при 15-20°C и загружали воду (предварительно охлажденную, 2-7°C, 587 л) с такой скоростью, чтобы поддерживать температуру 15-30°C. 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°C на фильтре с получением неочищенного 4-(6,7-диметоксиэинолин-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°C) в смеси тетрагидрофурана (ТГФ, 211,4 кг) и DMA (108,8 кг) в течение около 1 ч, а затем охлаждали до 0-5°C и выдерживали в течение около 1 ч, после чего отфильтровывали твердое вещество, промывали ТГФ (147,6 кг) и сушили на фильтре под вакуумом при около 25°C с получением 4-(6,7-диметоксихинолин-4-илокси)фениламина (34,0 кг).

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

4-Хлор-6,7-диметоксихинолин (34,8 кг) и 4-аминофенол (30,8 кг), трет-пентоксид натрия (1,8 эквивалента, 88,7 кг, 35 мас.% в ТГФ) загружали в реактор, затем добавляли N,N-диметилацетамид (DMA, 293,3 кг). Затем полученную смесь нагревали до 105-115°C в течение около 9 ч. По завершении реакции по результатам определения с помощью встроенного ВЭЖХ анализа (осталось менее 2% исходного вещества) содержимое реактора охлаждали при 15-25°C и добавляли воду (315 кг) в течение 2 ч, поддерживая температуру 20-30°C. Затем реакционную смесь перемешивали в течение еще 1 ч при 20-25°C. 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 ч. Анализ потерь при высушивании показал менее 1% мас./мас.

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

Получение 1-(4-фторфенилкарбамоил)циклопропанкарбоновой кислоты

Триэтиламин (19,5 кг) добавляли к охлажденному (около 5°C) раствору циклопропан-1,1-дикарбоновой кислоты (24,7 кг) в ТГФ (89,6 кг) с такой скоростью, чтобы температура смеси не превышала 5°C. Раствор перемешивали в течение около 1,3 ч, а затем добавляли тионилхлорид (23,1 кг), поддерживая температуру смеси ниже 10°C. По завершении добавления раствор перемешивали в течение около 4 ч, поддерживая температуру ниже 10°C. Затем добавляли раствор 4-фторанилина (18,0 кг) в ТГФ (33,1 кг) с такой скоростью, чтобы температура смеси не превышала 10°C. Смесь перемешивали в течение около 10 ч, после чего считали реакцию завершённой. Затем реакционную смесь разбавляли изопропилацетатом (218,1 кг). Полученный раствор последовательно промывали водным раствором гидроксид натрия (10,4 кг, 50%, 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°C, 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-фторфе-

нилкарбамоил)циклопропанкарбоновую кислоту растворяли в метаноле (139,7 кг) при около 25°C, 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°C в атмосфере азота с получением указанного в заголовке соединения (25,4 кг).

Получение 1-(4-фторфенилкарбамоил)циклопропанкарбонилхлорида

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°C. Полученный раствор использовали на следующей стадии без дополнительной обработки.

Альтернативное получение 1-(4-фторфенилкарбамоил)циклопропанкарбонилхлорида

В реактор загружали 1-(4-фторфенилкарбамоил)циклопропанкарбоновую кислоту (35 кг), 344 г ДМФА и 175 кг ТГФ. Реакционную смесь доводили до 12-17°C, а затем к реакционной смеси добавляли 19,9 кг оксалилхлорида в течение 1 ч. Реакционную смесь оставляли перемешиваться при 12-17°C на 3-8 ч. 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

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°C. По завершении реакции (около 20 мин) добавляли воду (653 л). Смесь перемешивали при 20-25°C в течение около 10 ч, 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°C, а затем при около 45°C 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

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 K₂CO₃ 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°C в течение не менее 2 ч. Реакционную смесь перемешивали при 20-25°C в течение не менее 3 ч. Затем температуру реакционной смеси доводили до 30-25°C 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°C в течение не менее 16 ч.

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 2 ч. 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°C в течение около 30 мин. Затем к раствору добавляли 456 кг воды, а также 20 кг этанола SDAG-1 (этанол, денатурированный метанолом в течение 2 ч). Смесь перемешивали при 15-25°C в течение по меньшей мере 16 ч. Продукт отфильтровывали и промывали смесью 143 кг воды и 126,7 ТГФ двумя порциями. Продукт сушили при максимальной температуре 40°C. В альтернативном способе температуру реакции при образовании хлорангидрида кислоты доводили до 10-15°C. Температуру перекристаллизации меняли с 15-25°C на 45-50°C в течение 1 ч, а затем охлаждали до 15-25°C в течение 2 ч.

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

[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°C) в течение около 2 ч. Температуру реактора понижали до 50-55°C 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 ≤ 0,5% мас./мас.) при около 74°C. Температуру содержимого реактора понижали до 20-25°C и выдерживали в течение около 4 ч с получением твердого осадка, который отфильтровывали, промывали МЭК (448 кг) и сушили под вакуумом при 50°C с получением указанного в заголовке соединения (45,5 кг).

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

[4-(6,7-Диметоксихинолин-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°C в течение около 1-3 ч, а затем при 55-60°C в течение еще 4-5 ч. Смесь осветляли фильтрацией через картридж 1 мкм. Температуру реактора доводили до 20-25°C и перегоняли под вакуумом с давлением вакуума 150-200 мм рт.ст. с максимальной температурой рубашки 55°C до объема 558-731 л.

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./мас. [4-(6,7-диметоксихинолин-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°C на по меньшей мере 24 ч. Продукт отфильтровывали и промывали 415,1 кг метилэтилкетона тремя порциями. Продукт сушили под вакуумом с температурой рубашки, установленной на 45°C.

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-диметоксихинолин-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

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 слившихся клеток или до достижения плотности $1-2 \times 10^6$ клеток/мл для клеточной суспензии.

NCI-H2228, клеточную линию аденокарциномы легкого HMPЛ 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 и 72 ч, соответственно, в 0,1 мл RPMI 1640 (ATCC 30-2001), 10% ФБС, 1% пенициллина-стрептомицина на черные 96-луночные планшеты (Costar, 3904).

HCC-78, клеточную линию аденокарциномы легкого HMPЛ 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 и 72 ч, 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).

Клетки выращивали при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ в течение 16 ч. 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 или 72 ч при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ с последующим добавлением метящего раствора 5'-бром-2'-дезоксидуридина (BrdU) (Roche) на 2-4 ч. 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 1×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

Клетки HCC-78, клеточную линию аденокарциномы легкого HMPЛ человека (DSMZ, ACC 563), несущую активирующее слияние SLC34A2-ROS1 и фосфор-Met, высевали с плотностью 3×10^5 клеток/лунку на 6-луночные планшеты (Nunc, 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 ч. 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 аprotинина, 5 мкг/мл лейпептина и 5 мкг/мл пепстатина А). 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 мин. 20 мкг Белка загружали на гель NuPage 10% Bis Tris (Invitrogen, NP0302). Белки переносили на нитроцеллюлозные мембраны (Invitrogen, LC2001),

блокировали в течение 1 ч 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 мин 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 мин при комнатной температуре. Мембраны промывали четыре раза по 10 мин 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 соединении образце, по сравнению с сигналом в контрольном образце с носителем (ДМСО).

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 HMPJ

Значения IC₅₀ рассчитывали для соединения 1 и сравнительного контрольного образца, 3-[(1R)-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 HMPJ в течение 48 или 72 ч в различных концентрациях. Количественную оценку пролиферации клеток HCC-78 HMPJ проводили с помощью твердофазного иммуноферментного анализа BrdU (хемилюминесценция, Roche Biosciences, Cat. № 11 669915001) по рекомендациям производителя. Определение значений IC₅₀ (A-E) (концентрация при 50% ингибировании) проводили так, как описано выше, и определяли путем вычислений с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

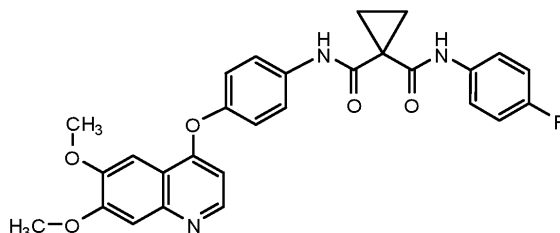
Таблица 3. ROS1-зависимая пролиферация клеток HCC-78 HMPJ в присутствии соединения 1 согласно настоящему изобретению и 3-[(1R)-1-(2,6-дихлор-3-фторфенил)этокси]-5-(1-пиперидин-4-илпиразол-4-ил)пиридин-2-амин (кризотиниб).

	NCI-H2228		HCC-78	
Тип ткани	Легкие			
Патология	Аденокарцинома HMPJ			
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-[(1R)-1-(2,6-дихлор-3-фторфенил)этокси]-5-(1-пиперидин-4-илпиразол-4-ил)пиридин-2-амин (кризотиниб)	C	C	B	A

Представленные данные IC₅₀: E - 5000-10000 нМ; D - 1000-5000 нМ; C - 500-1000 нМ; B - 100-500 нМ; A - 10-100 нМ.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение соединения 1

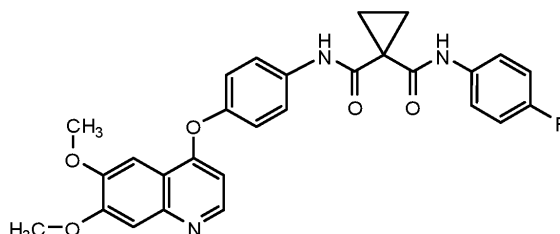


соединение 1

или его фармацевтически приемлемой соли для лечения и предупреждения немелкоклеточного рака легкого, позитивного по слиянию SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 или FIG-ROS1.

2. Применение по п.1, где фармацевтически приемлемая соль соединения 1 представляет собой (L)- или (D)-малатную соль соединения 1.

3. Применение фармацевтической композиции, содержащей соединение 1

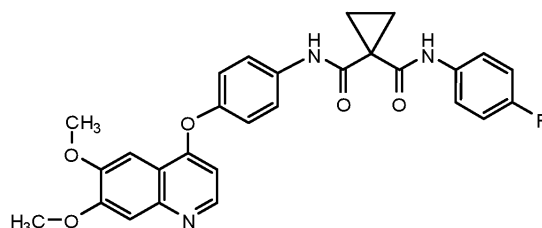


соединение 1

или его фармацевтически приемлемую соль и дополнительно содержащую фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество или разбавитель, для лечения немелкоклеточного рака легкого, позитивного по слиянию SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 или FIG-ROS1, у млекопитающего.

4. Применение по п.3, где фармацевтически приемлемая соль соединения 1 представляет собой (L)- или (D)-малатную соль соединения 1.

5. Применение соединения 1

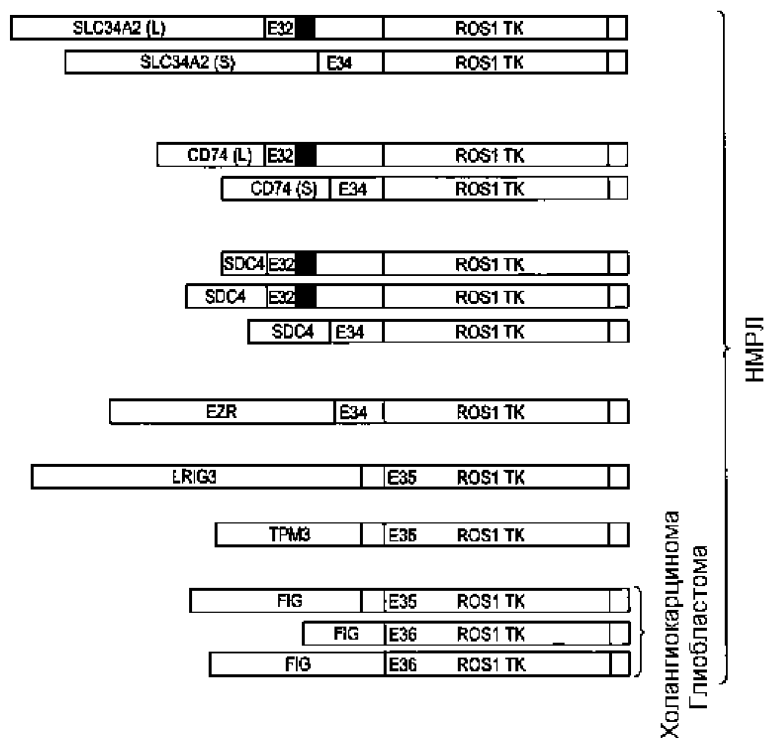


соединение 1

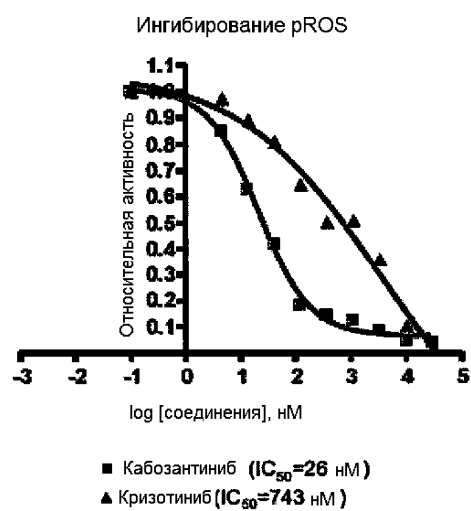
или его фармацевтически приемлемой соли для ингибирования или реверсирования развития рака, опосредованного киназой ROS1, у млекопитающего, где рак, опосредованный киназой ROS1, представляет собой немелкоклеточный рак легкого, позитивный по слиянию SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 или FIG-ROS1.

6. Способ ингибирования или реверсирования развития рака, опосредованного киназой ROS1, у млекопитающего, где рак, опосредованный киназой ROS1, представляет собой немелкоклеточный рак легкого, позитивный по слиянию SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 или FIG-ROS1, где способ включает введение млекопитающему фармацевтической композиции, охарактеризованной в п.3, ежедневно в течение более чем 3 месяцев.

7. Способ по п.6, где соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят в дозе 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95 мг/сутки.



Фиг. 1



Фиг. 2

MKNYCLIPK	LVNFATLGCL	WISVVQCTVL	NSCLKSCVTN	LGQQLDLGT	HNLSEPCIQG	CHFVNSVDQK
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	LRKRSCLKLV	DEAHCLRLDA	IYHNITGISV	DVHQQIVYFS	EGTLIWAKKA
290	300	310	320	330	340	350
ANMSDVSDLR	IFYRGSGLIS	SISIDWLYQR	MYFIMDELVC	VDLENCSNI	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	GPSAWQNWY	EVKVSTQDPP	EVTHIFLNIS
570	580	590	600	610	620	630
GTMLNVPELQ	SAMKYKVSVR	ASSPKRPGPW	SEPSVGTTLV	PASEPPFIMA	VKEDGLWSKP	LNSFGPGEFL
640	650	660	670	680	690	700
SSDIGNVSDM	DWYNNSLYYS	DTKGDVFWWL	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
SDGLLYWLQ	DSQCIHLTYA	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	KFLASEQHSL	PVFTVEGLEP	YALFNLSVTP	YTYWGKGPKT	SLSLRAPETV	PSAPENPRIF
990	1000	1010	1020	1030	1040	1050
ILPSGKCCNK	NEVVVEFRWN	KPKHENGVL	KFEIFYNIN	QSITNKTCD	WIAVNVTPSV	MSFQLEGMS
1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120
RCFIAFQVRA	FTSKGPGPYA	DVVKSTTSEI	NPFPHLITLL	GNKIVFLDMD	QNQVWVTFSA	ERVISAVCYT
1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190
ADNEMGYAYE	GDSLFLHLH	NRSSSELFQD	SLVFDITVIT	IDWISRHLFY	ALKESQNGMQ	VFDVDLEHKV
1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260
KYPREVKIHN	RNSTIISFSV	YPLLSRLYWT	EVSNEGYQMF	YYSIISHTLH	RILQPTATNQ	QNKRNCQCSN
1270	1280	1290	1300	1310	1320	1330
VTEFELSGAM	AIDTSNLEKP	LIYFAKAQEI	WAMDLEGCCQ	WRVITVPAML	AGKTLVSLTV	DGDLIYWIT
1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
AKDSTQIYQA	KKGNGAIVSQ	VKALRSRHIL	AYSSVMQFPF	DKAFLSLASD	TVEPTILNAT	NTSLTIRLPL
1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470
AKTNLTWYGI	TSPTPTYLVY	YAEVNDRKNS	SDLKYRILEF	QDSIALIEDL	QPFFSTYMIQI	AVKNYYSDPL
1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540
EHLPPGKEIW	GKTKNGVPEA	VQLINTTVRS	DTSLIISWRE	SHKPNGPKES	VRYQLAISHL	ALIPETPLRQ
1550	1560	1570	1580	1590	1600	1610
SEFPNGRLPL	LVTRLGGNI	YVLKVLACHS	EEMWCTESH	VTVEMFNTPE	KPYSLVPENT	SLQFNWKA
1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680
NVNLIREWVE	LQKWYNEFY	HVKTSQSGP	AYVCNITNLQ	PYTSYNVRVV	VVYKTGENST	SLPESFKTKA
1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750
GVNKPGLPK	LLEGSKNSIQ	WEKAEDNGCR	ITYYILEIRK	STSNNLQNQN	LRWKMTFNGS	CSSVCTWKS
1760	1770	1780	1790	1800	1810	1820
NLKGIFQFRV	VAANNLGFGE	YSGISENIIL	VGDDFWIPET	SFILTIIVGI	FLVVTIPLTF	VWHRRLKNQK
1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890
SAKEGVTVLI	NEDKELAEIR	GLAAGVGLAN	ACYAIHTLPT	QEEIENLPAF	PREKLTIRLL	LGSGAFGEVY
1900	1910	1920	1930	1940	1950	1960
EGTAVDILGV	GSGEIKVAVK	TLKKGSTDQE	KIEFLKEAHL	MSKFNHPNIL	KQLGVCLLNE	PQYIILELME
1970	1980	1990	2000	2010	2020	2030
GGDLLTYLRK	ARMATFYGPL	LTLVDLVDLC	VDISKGCVYL	ERMHFIHRDL	AARNCLVSVK	DYTSPRIVKI
2040	2050	2060	2070	2080	2090	2100
GDFGLARDIY	KNDYYRKRGE	GLLPVRWMA	ESLMDGIFTT	QSDVWSFGIL	IWEILTLGHQ	PYPAHSNLDV
2110	2120	2130	2140	2150	2160	2170
LNYYQTGGRL	EPFPRNCDDL	WNLMTCWAQ	EPDQRPTFHR	IQDQLQLFRN	FFLNSIYKSR	DEANNSGVIN
2180	2190	2200	2210	2220	2230	2240
ESFEGEDGDV	ICLNSDDIMP	VALMETKNRE	GLNYMVLATE	CGQGEEKSEG	PLGSQSEESC	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. 3

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

Фиг. 4

