



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **121655** (13) **C2**

(51) МПК (2020.01)

A61K 31/337 (2006.01)

A61K 31/47 (2006.01)

A61K 31/517 (2006.01)

A61K 31/7068 (2006.01)

A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2016 11881**

(22) Дата подання заявки: **27.04.2015**

(24) Дата, з якої є чинними
права на винахід: **10.07.2020**

(31) Номер попередньої
заявки відповідно до
Паризької конвенції: **61/984,599**

(32) Дата подання
попередньої заявки
відповідно до
Паризької конвенції: **25.04.2014**

(33) Код держави-учасниці
Паризької конвенції,
до якої подано
попередню заявку: **US**

(41) Публікація відомостей
про заявку: **27.03.2017, Бюл.№ 6**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.07.2020, Бюл.№ 13**

(86) Номер та дата
подання міжнародної
заявки, поданої
відповідно до
Договору РСТ **PCT/US2015/027800,
27.04.2015**

(72) Винахідник(и):
**Афтеб Дена Т. (US),
Юй Пейвень (US)**

(73) Власник(и):
ЕКСЕЛІКСІС, ІНК.,
1851 Harbor Bay Parkway Alameda, California
94502, United States of America (US)

(74) Представник:
**Бочаров Максим Анатолійович, реєстр.
№367**

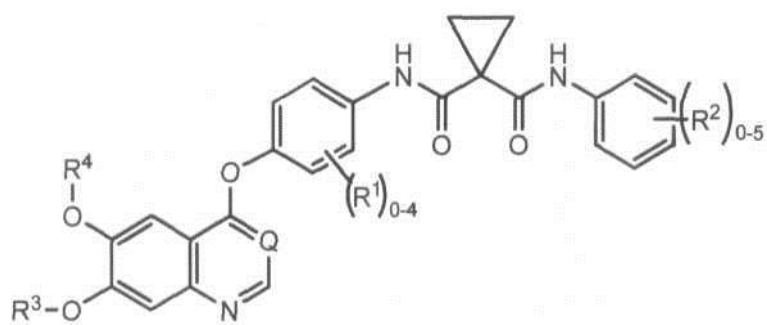
(56) Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:
WO2014039971, A1, 13.03.2014
TAKASHI KOHNO ET AL, "RET fusion gene:
Translation to personalized lung cancer
therapy", CANCER SCIENCE, (20131101),
vol. 104, no. 11, doi:10.1111/cas.12275, ISSN
1347-9032, pages 1396 - 1400, XP055195151
[X] 1,2,4-10,33 * page 1400 * [I] 3,11-32,34-42
A. DRILON ET AL, "Response to Cabozantinib
in Patients with RET Fusion-Positive Lung
Adenocarcinomas", CANCER DISCOVERY,
(20130326), vol. 3, no. 6, doi:10.1158/2159-
8290.CD-13-0035, ISSN 2159-8274, pages
630 - 635, XP055195155 [X] 1,2,4-10,33 *
page 4 * [I] 3,11-32,34-42
R. KATAYAMA ET AL, "Cabozantinib
Overcomes Crizotinib Resistance in ROS1
Fusion-Positive Cancer", CLINICAL CANCER
RESEARCH, (20141028), vol. 21, no. 1,
doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1385, ISSN
1078-0432, pages 166 - 174, XP055195242
[XP] 1-42 * table 1 *

(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ АДЕНОКАРЦИНОМИ ЛЕГЕНЬ

(57) Реферат:

Цей винахід належить до лікування раку у пацієнта, зокрема у пацієнта з аденокарциномою легень і, більш конкретно, у пацієнта з недрібноклітинним раком легень, позитивним по злиттю SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 або FIG-ROS1, за допомогою інгібітору MET, VEGFR2 і ROS1, який являє собою сполуку Формули I

UA 121655 C2



Формула I

або її фармацевтично прийнятну сіль.

СПОСІБ ЛІКУВАННЯ АДЕНОКАРЦИНОМИ ЛЕГЕНЬ

Перехресне посилання на споріднені заявки

[0001] Ця заявка РСТ заявляє пріоритет за попередньою заявкою на патент США з серійним № 61/984599, яка подана 25 квітня 2014 року, повний зміст якої включено у цей документ за допомогою посилання.

Перелік послідовностей

[0002] Ця заявка містить посилання в повному обсязі на перелік послідовностей у вигляді файлу під назвою "EX14-003C-PC_2015_04_20_SEQUENCE_LISTING_ST25.txt", створеного 27 квітня 2015 року о 12:54, розміром 26 кБ, і поданого в електронному вигляді разом з нею.

Галузь техніки

[0003] Цей винахід відноситься до виявлення, діагностики та лікування раку, зокрема, аденокарциноми легень, із застосуванням інгібітора рецепторних тирозинкіназ.

Рівень техніки

[0004] Рак легень є основною причиною смертності внаслідок раку у всьому світі. Недавні розробки в області таргетної терапії призвели до зміни стандартного методу лікування недрібноклітинного раку легень (НДРЛ). 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. Jun 2010 24; 362(25):2380-8. Тирозинкіназні інгібітори (TKI) рецепторів епідермального фактору росту (EGFR), гефитиніб та ерлотиніб, а також TKI кінази анапластичної лімфоми (ALK), кризотиніб, продемонстрували клінічну активність у пацієнтів з НДРЛ з мутаціями EGFR або перебудовою генів 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 (НДРЛ) harboring ROS1 gene rearrangement. J Clin Oncol. 2012 30 (доп.; реф. 7508). Нещодавно описано, що злиття гена KIF5B (родини кінезинів 5B) та онкогена RET являє собою драйверну мутацію у 1-2 % пацієнтів з НДРЛ і терапевтичну мішень. Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, Sakamoto H, Tsuta K, Furuta K, Shimada Y, Iwakawa R, Ogiwara H, Oike T, Enari M, Schetter AJ, Okayama H, Haugen A, Skaug V, Chiku S, Yamanaka I, Arai Y, Watanabe S, Sekine I, Ogawa S, Harris CC, Tsuda H, Yoshida T, Yokota J, Shibata T. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. Nat Med. 2012 Feb 12; 18(3):375-7. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, Asaka R, Hamanaka W, Ninomiya H, Uehara H, Lim Choi Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Mano H, Ishikawa Y. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. Nat Med. 2012 Feb 12; 18(3):378-81. Lipson D, Capelletti M, Yelensky R, Otto G, Parker A, Jarosz M, Curran JA, Balasubramanian S, Bloom T, Brennan KW, Donahue A, Downing SR, Frampton GM, Garcia L, Juhn F, Mitchell KC, White E, White J, Zwirko Z, Peretz T, Nechushtan H, Soussan-Gutman L, Kim J, Sasaki H, Kim HR, Park SI, Ercan D, Sheehan CE, Ross JS, Cronin MT, Jänne PA, Stephens PJ. Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. Nat Med. 2012 Feb 12; 18(3):382-4. Таким чином, все більш важливою стає ідентифікація ключових драйверних генів в НДРЛ та розробка методів лікування кожного геномного набору пацієнтів.

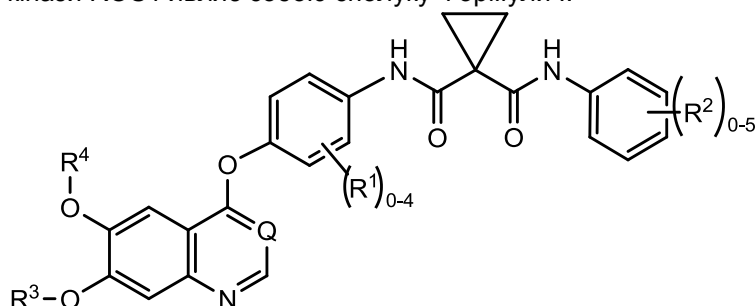
Суть винаходу

[0005] Вказаним винаходом, що відноситься до способу лікування аденокарциноми легень із застосуванням інгібітора активності тирозинкінази, зокрема, активності кінази ROS1, задовольняються вказані та інші потреби. Вказаний спосіб включає введення терапевтично ефективною кількістю сполуки або її фармацевтично прийнятної солі, що модулює кіназу ROS1 та/або химерний білок ROS1, пацієнту, який потребує в такому лікуванні. В одному з варіантів реалізації аденокарцинома легень являє собою недрібноклітинний рак легень (НДРЛ). Більш конкретно, аденокарцинома легень найчастіше являє собою позитивний по злиттю SLC34A2-ROS1 НДРЛ, позитивний до злиття CD74-ROS1 НДРЛ, позитивний по злиттю FIG-ROS1 НДРЛ (наприклад, CD74-ROS1, FIG-ROS1, FIG-ROS1(L), FIG-ROS1(S) і FIG-ROS1(VL)) та НДРЛ, які

несуть інші відомі химерні білки ROS1. У людей кіназа ROS1 кодується геном ROS1 на 6 хромосомі (6q22).

[0006] В одному аспекті цей винахід відноситься до способу лікування НДРЛ у пацієнта, який потребує в такому лікуванні, що включає введення пацієнту терапевтично ефективної кількості сполуки або її фармацевтично прийнятої солі, яка одночасно модулює ROS1 та/або химерний білок ROS1.

[0007] В одному варіанті реалізації вказаного та інших аспектів інгібітор кінази ROS1 або інгібітор химерної кінази ROS1 являє собою сполуку Формули I:



I

або її фармацевтично прийнятну сіль, де:

R¹ являє собою галоген;

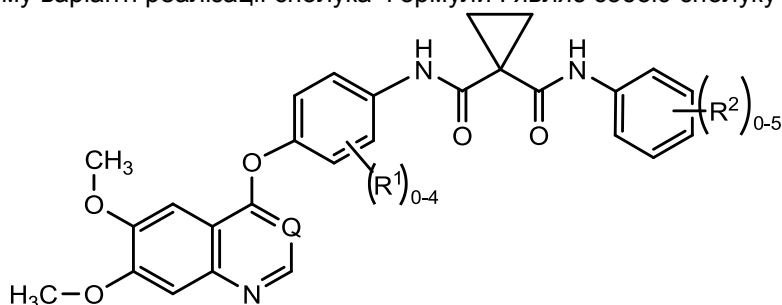
R² являє собою галоген;

R³ являє собою (C₁-C₆)алкіл;

R⁴ являє собою (C₁-C₆)алкіл; та

Q являє собою CH або N.

[0008] В іншому варіанті реалізації сполука Формули I являє собою сполуку Формули Ia



Формула Ia

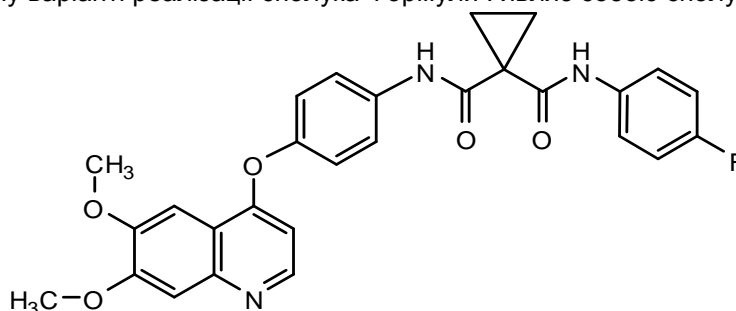
або її фармацевтично прийнятну сіль, де:

R¹ являє собою галоген;

R² являє собою галоген; та

Q являє собою CH або N.

[0009] В іншому варіанті реалізації сполука Формули I являє собою сполуку 1:



сполука 1

[0010] або її фармацевтично прийнятну сіль. Сполука 1 відома як N-(4-[(6,7-біс(метилокси)хінолін-4-іл)окси]феніл)-N'-(4-фторфеніл)циклопропан-1,1-дикарбоксамід та під назвою кабозантиніб. 29 листопада 2012 року S-малатну сіль (тобто L-малатну сіль) N-{4-[(6,7-диметоксихінолін-4-іл)окси]феніл}-N'-(4-фторфеніл)циклопропан-1,1-дикарбоксаміду (також відому як кабозантиніб або COMETRIQ®) було схвалено Управлінням по нагляду за якістю харчових продуктів і лікарських засобів США для лікування прогресуючого метастатичного медулярного раку щитоподібної залози (РЩЗ). У грудні 2013 року Європейський Комітет з

лікарських препаратів для людини (CHMP) виніс позитивне рішення за маркетинговою авторизаційною заявкою на реєстрацію (MAA), представленою в Європейське агентство лікарських засобів, або ЕМА, щодо пропонованого показання для використання COMETRIQ, при прогресуючому, нерезектабельному, місцево-поширеному або метастатичному РЩЗ. В теперішній час кабозантиніб оцінюють в широкій програмі досліджень, зокрема у безперервних базових клінічних дослідженнях фази 3 при метастатичному нирково-клітинному раку (НКР) і поширеному гепатоцелюлярному раку (ГЦР).

[0011] Сполука 1 являє собою ефективний інгібітор c-MET, RET і VEGFR2. Yakes FM, Chen J, Tan J, Yamaguchi K, Shi Y, Yu P, Qian F, Chu F, Bentzien F, Cancilla B, Orf J, You A, Laird AD, Engst S, Lee L, Lesch J, Chou YC, Joly AH. Cabozantinib (XL184), a novel MET and VEGFR2 inhibitor, simultaneously suppresses metastasis, angiogenesis, and tumor growth. *Mol Cancer Ther.* 2011 Dec; 10(12):2298-308; Bentzien, F., Zuzow, M., Heald, N., Gibson, A., Shi, Y., Goon, L., Yu, P., Engst, S., Zhang, W., Huang, S., Zhao, L., Vysotskaia, V., Chu, F., Bautista, R., Cancilla, B., Lamb, P., Joly, A. та Yakes, M. In vitro and in vivo activity of cabozantinib (XL184), an inhibitor of RET, MET, and VEGFR2, in a model of medullary thyroid cancer. *Thyroid*, 2013 (23) 1569-1577. У доклінічних випробуваннях інгібування активності кінази, опосередковане сполукою 1, забезпечувало швидку і стійку регресію судинної системи пухлини, зниження інвазивності і метастазів пухлини, а також збільшення тривалості виживання. 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 (публікація в електронному вигляді 02/24/2012).

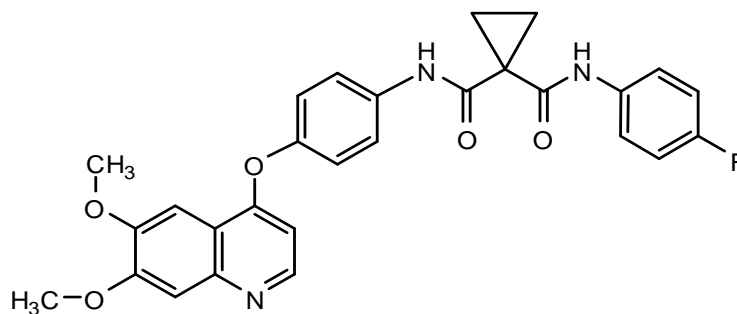
[0012] В іншому варіанті реалізації, сполуку Формули I, Ia, сполуку 1 або її фармацевтично прийнятну сіль вводять у вигляді фармацевтичної композиції, що містить фармацевтично прийнятну добавку, розчинник або допоміжну речовину.

[0013] В одному з варіантів реалізації сполуку Формули I, Ia або сполуку 1, або її фармацевтично прийнятну сіль вводять у вигляді фармацевтичної композиції, що містить фармацевтично прийнятну добавку, розчинник або допоміжну речовину, для інгібування онкогенних химерних кіназ, що зачіпають тирозинкіназу рецептора-сироти ROS1, що утворюється в результаті хромосомних перебудов, які призводять до конститутивної активації активності кінази ROS1. Вказані химерні кінази ROS1 являють собою мішень для інгібування із застосуванням Формули сполуки I, Ia або сполуки 1, або її фармацевтично прийнятною солі. Вказані сполуки можуть бути введені у вигляді фармацевтичної композиції, що містить фармацевтично прийнятну добавку, розчинник або допоміжну речовину для лікування аденокарциноми легень, наприклад, недрібноклітинної карциноми легень, що несе одну або більше онкогенних химерних кіназ ROS1.

[0014] В іншому аспекті цього винаходу представлений спосіб інгібування активності кінази ROS1 та/або химерної кінази ROS1 в одній або більше клітинних лініях недрібноклітинного раку легень або НДРЛ, який включає введення терапевтично ефективного кількості фармацевтичної композиції, що містить сполуку Формули I або малатну сіль сполуки Формули I, або іншу фармацевтично прийнятну сіль сполуки Формули I, у вказані клітинні лінії недрібноклітинного раку легень або НДРЛ, які несуть кіназу ROS1 та/або химерний поліпептид ROS1.

[0015] В іншому аспекті цього винаходу представлений спосіб виявлення, діагностики та лікування позитивного по злиттю ROS1 НДРЛ, наприклад, позитивного по злиттю SLC34A2-ROS1 НДРЛ, та інших відомих позитивних по злиттю ROS1 НДРЛ, включаючи химерні білки ROS1 CD74-ROS1, FIG-ROS1, FIG-ROS1(L), FIG-ROS1(S) і FIG-ROS1(VL), а також інші химерні білки ROS1, які кодуються у людей геном ROS1 на 6 хромосомі (див.: Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, Massion PP, Siwak-Tapp C, Gonzalez A, Fang R, Mark EJ, Batten JM, Chen H, Wilner KD, Kwak EL, Clark JW, Carbone DP, Ji H, Engelman JA, Mino-Kenudson M, Pao W, Iafrate AJ. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol.* Mar 2012 10; 30(8):863-70), який включає введення терапевтично ефективного кількості фармацевтичної композиції, що містить сполуку Формули I або малатну сіль сполуки Формули I, або іншу фармацевтично прийнятну сіль сполуки Формули I, пацієнту, який потребує в такому лікуванні. У конкретному варіанті реалізації сполука Формули I являє собою сполуку 1 або малатну сіль сполуки 1, зокрема, S-малатну сіль сполуки 1.

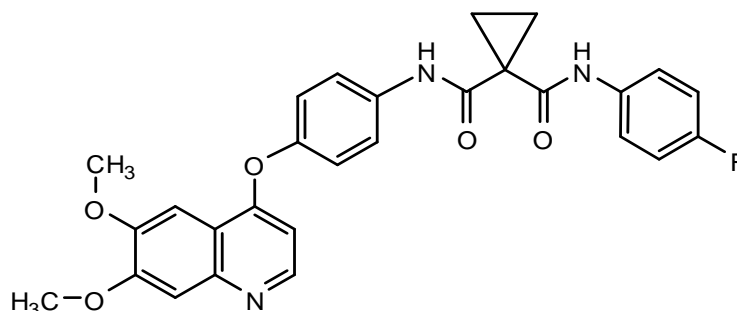
[0016] В іншому аспекті цього винаходу представлений спосіб лікування аденокарциноми легень, яка являє собою позитивний по злиттю SLC34A2-ROS1 недрібноклітинний рак легень, у пацієнта, який потребує в такому лікуванні, що включає введення пацієнту ефективного кількості сполуки 1:



Сполука 1

або її фармацевтично прийнятну сіль.

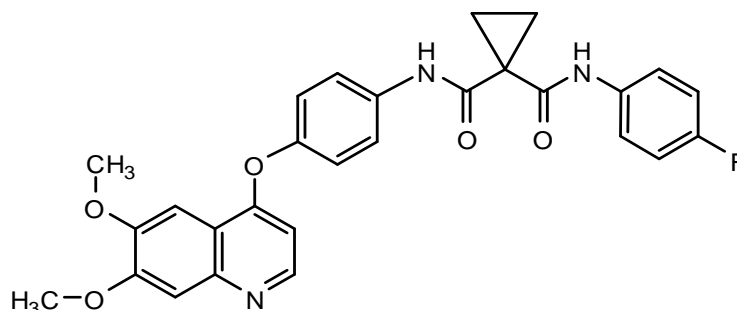
- 5 [0017] В іншому аспекті цього винаходу представлений спосіб лікування аденокарциноми легень, яка являє собою позитивний по злиттю CD74-ROS1 недрібноклітинний рак легень, у пацієнта, який потребує в такому лікуванні, що включає введення пацієнту ефективної кількості сполуки 1:



Сполука 1

або її фармацевтично прийнятну сіль.

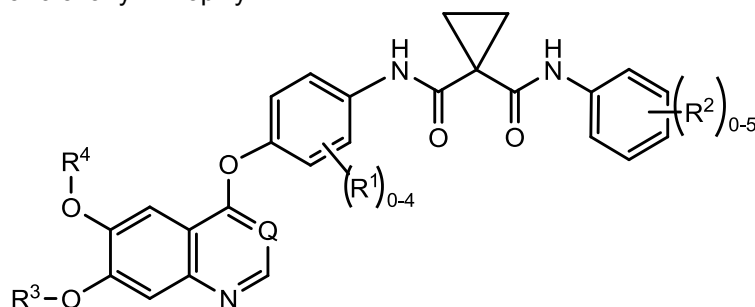
- 10 [0018] В іншому аспекті цього винаходу представлений спосіб лікування аденокарциноми легень, яка являє собою позитивний по злиттю FIG-ROS1 недрібноклітинний рак легень, у пацієнта, який потребує в такому лікуванні, що включає введення пацієнту ефективної кількості сполуки 1:



Сполука 1

або її фармацевтично прийнятну сіль.

- 15 [0019] В іншому аспекті цього винаходу представлений спосіб інгібування активності химерної кінази ROS1 у клітині НДРЛ, який включає приведення в контакт вказаної клітини з ефективною кількістю сполуки Формули I:



I

або її фармацевтично прийнятну сіль, де:

R¹ являє собою галоген;

R^2 являє собою галоген;
 R^3 являє собою (C₁-C₆)алкіл;
 R^4 являє собою (C₁-C₆)алкіл; та
Q являє собою CH або N.

5 Стилий опис графічних матеріалів

[0020] На фіг. 1 представлена графічна ілюстрація химерних білків ROS1, які, як відомо, існують у зразках пухлини недрібноклітинної карциноми легень (НДРЛ). Перебудова ROS1 при НДРЛ, гліобластомі та холангіокарциномі. CD74(L)/(S), кластер диференціювання 74, довгі/короткі ізоформи; EZR, езрин; FIG, злитий у гліобластомі; LRIG3, багаті лейцином повтори та імунoglobulinopodobні домени 3; ROS1 TK, домен тирозинкінази ROS1 з партнерами по злиттю; SDC4, синдекан-4; SLC34A2(L)/(S), родина транспортеру розчинених речовин 34 (фосфат натрію), 2 член, довгі/короткі ізоформи; SDC4, синдекан-4; TPM3, тропоміозин 3. Номери екзонів E32, E34, E35 або E36 вказують положення розриву ROS1. Червоний прямокутник означає трансмембранний домен, збережений у ROS1.

15 [0021] На фіг. 2 показано інгібування фосфорилування злиття SLC34A2-ROS1 in vitro в клітинах HCC-78 НДРЛ, в які вводили одноразові зростаючі дози сполуки 1 або 3-[(1R)-1-(2,6-дихлор-3-фторфеніл)етокси]-5-(1-піперидин-4-ілпіразол-4-іл)піридин-2-аміну (кризотиніб; XALKORI®).

[0022] На фіг. 3 представлена амінокислотна послідовність ілюстративного білка ROS1 людини, вказана в цьому документі як SEQ ID NO: 1.

20 [0023] На фіг. 4 представлена ілюстративна амінокислотна послідовність домену кінази ROS1 людини, вказана в цьому документі як SEQ ID NO: 2.

Детальний опис винаходу

Скорочення та визначення

[0024] Наступні скорочення та терміни мають у цьому описі вказані значення.

Скорочення	Значення
Ас	Ацетил
ш	Широкий
°C	Градуси Цельсія
цикло-	Цикло
CBZ	Карбобензоксид = бензилоксикарбоніл
д	Дублет
дд	Дублет дублетів
дт	Дублет триплетів
ДХМ	Дихлорметан
DME	1,2-диметоксиетан
ДМФА	N, N-Диметилформамід
ДМСО	диметилсульфоксид
ЕІ	Іонізація електронним ударом
г	грам(-и)
год. або година	година(-и)
ВЕРХ	Рідина хроматографія високого тиску
л	літр(-и)
М	Молярний або молярність
м	Мультиплет
мг	Міліграм(-и)
МГц	Мегагерц (частота)
Хв.	Хвилина(-и)
мл	мілілітр(-и)
мкл	мікролітр(-и)
мкМ	Мікромоль(-і) або мікромолярний
мМ	Мілімолярний
ммоль	Мілімоль(-і)
мол.	Моль(-і)
МС	Мас-спектральний аналіз
н.	Нормальний або нормальність

Детальний опис винаходу

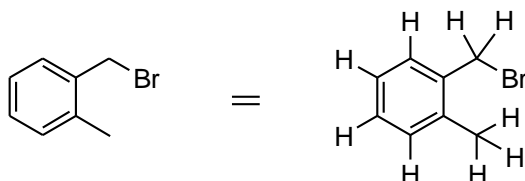
Скорочення та визначення

[0024] Наступні скорочення та терміни мають у цьому описі вказані значення.

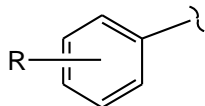
Скорочення	Значення
нМ	Наномольярний
ЯМР	Спектроскопія ядерного магнітного резонансу
к	Квартет
кімн. т-ра	Кімнатна температура
с	Синглет
т або тр	Триплет
ТФК	Трифтороцтова кислота
ТГФ	Тетрагідрофуран
ТШХ	Тонкошарова хроматографія

[0025] Символ «-» означає одинарний зв'язок, «=» означає подвійний зв'язок.

[0026] При зображенні або описанні хімічних структур, якщо однозначно не вказано інше, всі атоми вуглецю вважаються такими, що мають водневі замісники для відповідності валентності, яка дорівнює чотирьом. Наприклад, у структурі в лівій частині схематичного зображення, представленого нижче, присутні дев'ять атомів водню. Ці дев'ять атомів водню зображені в правій структурі. Іноді певний атом у структурі описаний текстовою формулою як той, що має в якості замісників атом або атоми водню (явно вказаний водень), наприклад, -CH₂CH₂-. Фахівцям у цій області техніки зрозуміло, що вищевказаний описовий прийом загальноприйнятий в області хімії для забезпечення короткого й простого опису складних в іншому випадку структур.

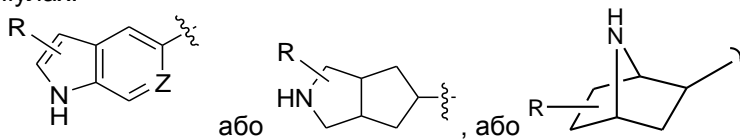


[0027] Якщо група "R" зображена в кільцевій системі як "плаваюча", як, наприклад, у формулі:

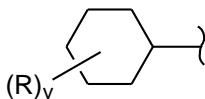


то, якщо не вказано інше, замісник "R" може займати будь-який атом кільцевої системи, маючи на увазі заміщення зображеного, уявного або явно визначеного водню у одного з кільцевих атомів, за умови утворення стійкої структури.

[0028] Якщо група "R" зображена плаваючою в конденсованій кільцевій системі, як, наприклад, в формулах:

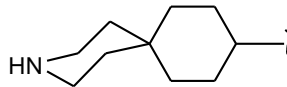


то, якщо не вказано інше, замісник "R" може займати будь-який атом конденсованої кільцевої системи, маючи на увазі заміщення зображеного атома водню (наприклад, -NH - в наведеній вище формулі), неявного атома водню (наприклад, як у поданій вище формулі, де атоми водню не показані, але мають на увазі присутніми), або явно певного атома водню (наприклад, якщо в наведеній вище формулі "Z" дорівнює =CH-) у одного з кільцевих атомів, за умови утворення стійкої структури. У наведеному прикладі група "R" може перебувати в 5-членному або 6-членному кільці конденсованої кільцевої системи. Якщо група "R" зображена як існуюча в кільцевій системі, що містить насичені атоми вуглецю, як, наприклад, у формулі:



причому в цьому прикладі "y" може бути рівним більшим за один, маючи на увазі, що кожен з них заміщає зображений, уявний або явно певний водень в кільці; то, якщо не вказано інше, за

умови стійкості структури, що утворюється, два "R" можуть перебувати в одного атомі вуглецю. Простим прикладом є випадок, коли R являє собою метилову групу; у вуглецю зображеного кільця ("кільцевого" вуглецю) може існувати гемінальний диметил. В іншому прикладі, два R у одного атома вуглецю, включаючи цей атом вуглецю, можуть утворювати кільце, створюючи, таким чином, спіроциклічну кільцеву ("спіроциклічну" групу) структуру, з кільцем, зображеним, наприклад, у формулі:



[0029] "Галоген" або "гало" відноситься до фтору, хлору, бромю або йоду.

[0030] У цьому контексті білок або поліпептид "ROS1" включає білок кінази ROS1 ссавця, наприклад, ROS1 людини (який кодується геном ROS1), який являє собою рецепторну тирозинкіназу довжиною 2347 амінокислот, схильну до аберантної експресії, що приводить до раку. Опис повнорозмірної кінази ROS1 людини (з амінокислотною послідовністю білка ROS1 людини) представлено в UniProt з номером доступу P08922. Крім того, існує безліч відомих природних варіантів ROS1 (див., наприклад, Greenman et al., Nature 446: 153-158, 2007). Відомі нуклеотидні та амінокислотні послідовності повнорозмірної ROS1 мишей (див., наприклад, UniProt з номером доступу Q78DX7). За допомогою звичайного експериментування досвідчений біолог може легко визначити відповідні послідовності в гомологах ROS1 ссавців, що не є людськими.

[0031] ROS1 "дикого типу" означає повнорозмірну кіназу ROS1 (тобто для людської ROS1 поліпептид довжиною 2347 амінокислот (SEQ ID NO:1) або поліпептид довжиною 2320 амінокислот (зріла послідовність) після видалення послідовності сигнального пептиду) у здорової (або нормальної) тканини (наприклад, неракової тканини) нормального індивіда (тобто нормального індивіда, який не страждає від раку). Кіназа ROS1 (повнорозмірна або усічена) не експресується в нормальній легеневій тканині людини. Однак за допомогою способів, описаних нижче, автори цього винаходу несподівано виявили специфічне інгібування кінази ROS1 у клітинах раку легень із застосуванням сполук, описаних у цьому документі. Така експресія в атипійній клітині (у цьому випадку раковій клітині), якщо в типовій клітині не спостерігають експресії (наприклад, у нераковій клітині легень), є аберантною.

[0032] Кіназа ROS1, яка аберантно експресується у формі злиття з іншим білком, наприклад, SLC34A2, CD74 або FIG, описана в гліобластомі (див. 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), раку печінки (див., наприклад, публікація PCT № WO2010/093928) та раку жовчного протоку (див. Gu et al., PLOS one 2011 Jan 6;6(1):e15640. doi: 10.1371/journal.pone.0015640), а також в аденокарциномі НДПЛ (див. Kurtis D. Davies et al. Identifying and Targeting ROS1 Gene Fusions in Non-Small Cell Lung Cancer, Clin Cancer Res. 2012 September 1; 18(17): 4570-4579).

[0033] У цьому контексті термін "злиття ROS1" відноситься до частини поліпептиду ROS1, що містить кіназний домен білка ROS1 (або полінуклеотид, який кодує його), конденсованої з цілим або частиною іншого поліпептиду (або полінуклеотиду, який кодує його), де назва другого поліпептиду або полінуклеотиду вказана в назві злиття. (Термін "злиття" означає просто цілий або частину поліпептиду або полінуклеотиду з першого гена, конденсованого з цілим або частиною поліпептиду або полінуклеотиду з другого гена). Наприклад, злиття SLC34A2-ROS1 являє собою злиття між частиною поліпептиду SLC34A2 (або полінуклеотиду, який кодує його) і частиною поліпептиду ROS1 (або полінуклеотиду, який кодує його), що містить кіназний домен ROS1. Злиття ROS1 часто виникає внаслідок хромосомної транслокації або інверсії. Існує безліч відомих злиттів ROS1, які являють собою злиття ROS1 згідно з цим винаходом, і включають, без обмежень, химерні білки SLC34A2-ROS1, члени яких включають SLC34A2-ROS1(VS), SLC34A2-ROS1(S), SLC34A2-ROS1(L) (див. публікацію патента США № 20100143918), CD74-ROS1 (див. публікацію патента США № 20100221737) та химерні білки FIG-ROS1, члени яких включають FIG-ROS1(S), FIG-ROS1(L) і FIG-ROS1(XL) (див. публікацію PCT № WO2010/093928), опис яких включено в цей документ у повному обсязі. Позначення (L), (S), (VS), (VL) (XS) або (XL) після поліпептиду ROS1 або злиття ROS1 відноситься, у цілому, до довгого, короткого, дуже короткого, дуже довгого, надкороткого та наддовгого поліпептиду або полінуклеотиду ROS1, відповідно.

[0034] Всі відомі химерні білки ROS1 містять повний домен кінази повнорозмірної ROS1. Таким чином, у цьому контексті "поліпептид з активністю кінази ROS1" (або "поліпептид, який має активність кінази ROS1") означає білок (або поліпептид), який містить повний домен кінази або повнорозмірний білок ROS1 та, отже, зберігає активність кінази ROS1. Необмежуючі приклади білків з активністю кінази ROS1 включають, без обмежень, повнорозмірний білок ROS1, химерні білки SLC34A2-ROS1, члени яких включають SLC34A2-ROS1(VS), SLC34A2-

ROS1(S), SLC34A2-ROS1(L) (див. публікацію патента США № 20100143918), CD74-ROS1 (див. публікацію патента США № 20100221737) і химерні білки FIG-ROS1, члени яких включають FIG-ROS1(S), FIG-ROS1(L) і FIG-ROS1(XL) (див. публікацію PCT № WO2010/093928), і будь-які усічені або мутантні форми кінази ROS1, які зберігають домен кінази повнорозмірного білка кінази ROS1. Ілюстративний домен кінази ROS1 представлений в SEQ ID NO: 2, "поліпептид з активністю кінази ROS1" являє собою поліпептид, амінокислотна послідовність якого містить SEQ ID NO: 2, або її частину з активністю кінази.

[0035] В цьому контексті "поліпептид" (або "амінокислотна послідовність" або "білок") відноситься до полімеру, утвореному в результаті зв'язування в певному порядку, переважно, а-амінокислот, D-, L-амінокислот та їх комбінацій. Зв'язок між одним амінокислотним залишком і наступним залишком називають амідним зв'язком або пептидним зв'язком. Необмежуючі приклади поліпептидів включають послідовності олігопептидів, пептидів, поліпептидів або білків та їх фрагментів або частин, а також природні або синтетичні молекули. Поліпептиди включають також дериватизовані молекули, такі як глікопротеїни та ліпопротеїни, а також низькомолекулярні поліпептиди. "Амінокислотна послідовність" та подібні терміни, такі як "поліпептид" або "білок" не призначені для обмеження вказаної амінокислотної послідовності до повної, нативної амінокислотної послідовності, зв'язаної із згаданою молекулою білка.

[0036] У цій області техніки розуміють, що деякі амінокислотні послідовності поліпептиду згідно з цим винаходом можуть бути змінені без істотної зміни структури або функції мутантного білка. Якщо такі відмінності в послідовності є передбаченими, то слід пам'ятати, що існують критичні області білка, які визначають активність (наприклад, кіназний домен ROS1). В цілому, можуть бути замінені залишки, які утворюють третинну структуру, за умови використання залишків, які виконують аналогічну функцію. В інших випадках тип залишку може бути абсолютно неважливий, якщо зміна відбувається в некритичній області білка.

[0037] Так, поліпептид з активністю ROS1 згідно з цим винаходом додатково включає варіанти повнорозмірного білка ROS1 або різні химерні поліпептиди ROS1, описані в цьому документі, які демонструють істотну активність кінази ROS1. Деякі необмежуючі консервативні заміщення включають заміну одного на інше, серед аліфатичних амінокислот Ala, Val, Leu та Ile; заміну гідроксильних залишків Ser і Thr; заміну кислотних залишків Asp і Glu; заміну амідних залишків Asn і Gln; заміну основних залишків Lys і Arg; і заміну ароматичних залишків Phe і Tyr. Додаткові приклади консервативних замінь амінокислот, які відомі фахівцям у цій області техніки, являють собою: ароматичні: фенілаланін, триптофан, тирозин (наприклад, залишок триптофану замінений фенілаланіном); гідрофобні: лейцин, валін, ізолейцин; полярні: глютамін аспарагін; основні: аргінін, лізин гістидин; кислотні: аспарагінова кислота глютамінова кислота; невеликі: аланін, треонін, серин, метіонін, гліцин. Як докладно описано вище, додаткове керівництво, згідно з яким амінокислотні заміни ймовірно будуть фенотипічно мовчазними (тобто малоїмовірно будуть чинити істотний несприятливий ефект на функцію), представлено в публікації Bowie et al., Science 247, supra.

[0038] "SLC34A2" може відноситися до натрійзалежного білка-переносника фосфату 2B, який кодується білком гена людини SLC34A2 або геном SLC34A2. Людський білок SLC34A2 (ізоформа A, яка має номер доступу NCBI NP_001171469) являє собою білок довжиною 689 амінокислот. SLC34A2 описано далі в цьому документі.

[0039] CD74 також називають гамма-ланцюгом антигену гістосумісності HLA класу II, також відомий як інваріантний ланцюг, асоційований з антигенами HLA-DR, або CD74 (кластер диференціювання 74), і являє собою білок, який у людей кодується геном CD74. Ілюстративний людський білок CD74 має номер доступу NCBI NP_001020329 і номер доступу MPMK NM_001025158. CD74 має 160 амінокислот і кодується геном CD74, розташованим в 5 хромосомі (5q32). CD74 має 9 екзонів. CD74 описано далі в цьому документі.

[0040] Білок FIG (злитий у гліобластомі) називають також "асоційованим з комплексом Гольджи PDZ, який містить суперспіральний мотив" або білком "GOPC", і він кодується геном, розташованим в хромосомі 6 в положенні 6q21. Вказаний білок у людини має 462 амінокислоти. FIG має 3 ізоформи, що утворюються в результаті альтернативного сплайсингу. Ілюстративний людський білок FIG, згаданий у цьому винаході, має ідентифікатор UniProtKB Q9HD26-1.

[0041] "Химерний білок або ген SLC34A2-ROS1" відноситься до соматичних генних злиттів партнерів SLC34A2 і ROS1. У деяких варіантах реалізації химерний білок SLC34A2-ROS1 містить N-кінцевий домен партнера по злиттю, такого як SLC34A2, і C-кінцевий кіназний домен білка ROS1. N-кінцевий домен партнера по злиттю може бути розташований на N-кінці химерного білка, а C-кінцевий кіназний домен білка ROS1 може бути розташований на C-кінці химерного білка. Партнер по злиттю може являти собою N-кінцевий домен білка SLC34A2, розташований на N-кінці химерного білка. В такому випадку химерний білок може бути

представлений як білок SLC34A2-ROS1, який містить N-кінцевий домен білка SLC34A2 на N-кінці та C-кінцевий кіназний домен білка ROS1 на C-кінці. В іншому варіанті реалізації представлений химерний ген, що кодує химерний білок, причому ген, що кодує N-кінцевий домен партнера по злиттю, розташований на 5'-кінці, а ген, що кодує C-кінцевий кіназний домен білка ROS1, розташований на 3'-кінці. У деяких варіантах реалізації частини білка SLC34A2 злиті в рамці з частинами білка ROS1, що містять функціональний кіназний домен, в результаті абераційної хромосомної транслокації, що призводить до хромосомної перебудови ROS1 з SLC34A2. У деяких варіантах реалізації химерний білок SLC34A2-ROS1 може містити злиття SLC34A2 екзон 4-ROS1 екзон 32. У деяких варіантах реалізації химерний білок SLC34A2-ROS1 може містити злиття SLC34A2 екзон 4-ROS1 екзон 34. Химерний білок або ген SLC34A2-ROS1, має функціональний кіназний домен ROS1, у відповідності з цим винаходом, може містити інші точкові розриви, що зачіпають двох партнерів по транслокації SLC34A2 і ROS1. Ілюстративні химерні білки SLC34A2-ROS1 представлені в каталозі соматичних мутацій при раку COSMIC, в базі даних версії 68, на сторінці cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic, повний зміст якої включений у цей документ за допомогою посилання.

[0042] "Химерний білок або ген CD74-ROS1" відноситься до соматичних генних злиттів партнерів CD74 і ROS1. Ілюстративні химерні білки CD74-ROS1 представлені в каталозі соматичних мутацій при раку COSMIC, в базі даних версії 68, на сторінці cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic, повний зміст якої включене в цей документ за допомогою посилання.

[0043] "Химерний білок або ген FIG-ROS1" відноситься до соматичних генних злиттів партнерів FIG і ROS1. У деяких варіантах реалізації внутрішньохромосомна гомозиготна делеція 240 тис. основ в 6 хромосомі людини, у положенні 6q21, відповідає за утворення локусу FIG-ROS1. У деяких варіантах реалізації транскрипт FIG-ROS1 кодується 7 екзонами FIG і 9 екзонами, отриманими з ROS1. У деяких варіантах реалізації ген FIG-ROS1 кодує білок внутрішньорамочного злиття з конститутивно активним і функціональним кіназним доменом ROS1. Ілюстративні химерні білки FIG-ROS1 представлені в каталозі соматичних мутацій при раку COSMIC, в базі даних версії 68, на сторінці cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic, повний зміст якої включене в цей документ за допомогою посилання.

[0044] "Пацієнт", для цілей цього винаходу, включає людей і інших тварин, зокрема ссавців, та інші організми. Отже, представлені способи застосовні як для лікування людей, так і для ветеринарних застосувань. В іншому варіанті реалізації пацієнт являє собою ссавця, а в іншому варіанті реалізації пацієнт являє собою людину.

[0045] "Фармацевтично прийнятна сіль" сполуки означає сіль, яка є фармацевтично прийнятною і яка має необхідну фармакологічну активність вихідної сполуки. Розуміється, що фармацевтично прийнятні солі є нетоксичними. Додаткова інформація про відповідні фармацевтично прийнятні солі представлена в публікації Remington, Pharmaceutical Sciences, 17th pub., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1985, зміст якої включено в цей документ за допомогою посилання, або в публікації S. M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts," J. Pharm. Sci., 1977; 66:1-19, і зміст обох публікацій включено в цей документ за допомогою посилання.

[0046] Приклади фармацевтично прийнятних солей приєднання кислот включають солі, утворені з неорганічними кислотами, такими як кислота хлористоводнева, бромистоводородна кислота, сірчана кислота, азотна кислота, фосфорна кислота і т. п.; а також з органічними кислотами, такими як оцтова кислота, трифтороцтова кислота пропіонова кислота, гексанова кислота, циклопентанпропіонова кислота, гліколева кислота, піровиноградна кислота, молочна кислота, щавлева кислота, малеїнова кислота, маленова кислота, бурштинова кислота, фумарова кислота, винна кислота, яблучна кислота, лимонна кислота, бензойна кислота, корична кислота, 3-(4-гідроксибензоїл)бензойна кислота, мигдальна кислота, метансульфонова кислота, етансульфонова кислота, 1,2-етандисульфонова кислота, 2-гідроксietансульфонова кислота, бензолсульфонова кислота, 4-хлоробензолсульфонова кислота, 2-нафталінсульфонова кислота, 4-толуолсульфонова кислота, камфорсульфонова кислота, глюкогептонова кислота, 4,4'-метиленбіс-(3-гідрокси-2-ен-1-карбонова кислота), 3-фенілпропіонова кислота, триметилоцтова кислота, тре-бутилоцтова кислота, лаурилсірчана кислота, глюконова кислота, глутамінова кислота, гідроксинафтойна кислота, саліцилова кислота, стеаринова кислота, муконова кислота, п-толуолсульфонова кислота та саліцилова кислота, тощо

[0047] "Проліки" відноситься до сполук, які перетворюються (зазвичай швидко) *in vivo* з утворенням вихідної сполуки представлених вище формул, наприклад, за допомогою гідролізу в

крові. Загальні приклади включають, але не обмежуються ними, складноефірні та амідні форми сполуки, що має активну форму, яка містить групу карбонової кислоти. Приклади фармацевтично прийнятних складних ефірів сполук цього винаходу включають, але не обмежуються ними, алкілові ефіри (наприклад, що містять від близько одного до шести атомів вуглецю), де алкільна група має пряму або розгалужену будова. Прийнятні естери включають також циклоалкільні естери та арилалкільні естери, такі як, але не обмежуючись ним, бензил. Приклади фармацевтично прийнятних амідів сполук цього винаходу включають, але не обмежуються ними, первинні амідні та вторинні і третинні алкільні амідні (наприклад, що містять від близько одного до шести атомів вуглецю). Амідні та естери сполук цього винаходу можуть бути отримані за стандартними способами. Повний огляд проліків представлений у публікації Т. Higuchi и V. Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems," Volume 14 A.C.S. Symposium Series, та у Bioreversible Carriers in Drug Design, ed. Edward B. Roche, American Association and Pharmaceutical Pergamon Press, 1987, які включені в цей документ за допомогою посилання для усіх цілей.

[0048] "ROS1" або "білок ROS1" являє собою трансмембранну рецепторну тирозинкіназу і додатково описано в цьому документі.

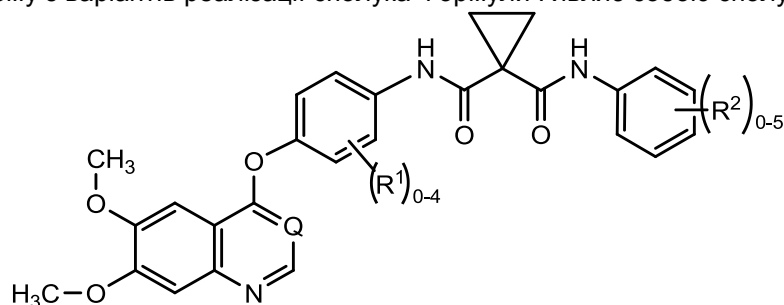
[0049] "Терапевтично ефективна кількість" означає кількість сполуки згідно з цим винаходом, яка при введенні пацієнту полегшує симптом захворювання. Терапевтично ефективна кількість включає кількість сполуки, що використовується окремо або в комбінації з іншими активними інгредієнтами, яка є ефективною для модулювання c-Met і/або VEGFR2, або ефективною для лікування або попередження раку. Кількість сполуки у відповідності з цим винаходом, яка становить "терапевтично ефективну кількість", змінюється залежно від сполуки, хворобливого стану та його тяжкості, віку пацієнта, що підлягає лікуванню, і т.п. Терапевтично ефективна кількість може бути визначена фахівцем у цій області техніки, із застосуванням його знань і цього опису.

[0050] "Лікувати" або "лікування" захворювання, розладу або синдрому в цьому контексті включає (i) попередження виникнення захворювання, розладу або синдрому у людини, тобто запобігання розвитку клінічних симптомів захворювання, розладу або синдрому у тварини, який може бути підданий чи схильний до захворювання, розладу або синдрому, але ще не відчуває чи не проявляє симптомів захворювання, розладу або синдрому; (ii) реверсування або уповільнення захворювання, розладу або синдрому, тобто зупинку його розвитку; і (iii) полегшення захворювання, розладу або синдрому, тобто ініціацію регресії захворювання, розладу або синдрому. Як відомо у цій області техніки, може бути необхідна поправка на системну доставку замість локалізованої доставки, вік, масу тіла, загальний стан здоров'я, стать, харчування, час введення, взаємодію ліків і тяжкість стану, і вона може бути встановлена звичайним експериментуванням.

[0051] "Вихід" для кожної реакції, описані в цьому документі, виражений у відсотках від теоретичного виходу.

Варіанти реалізації винаходу

[0052] В одному з варіантів реалізації сполука Формули I являє собою сполуку Формули Ia:



Формула Ia

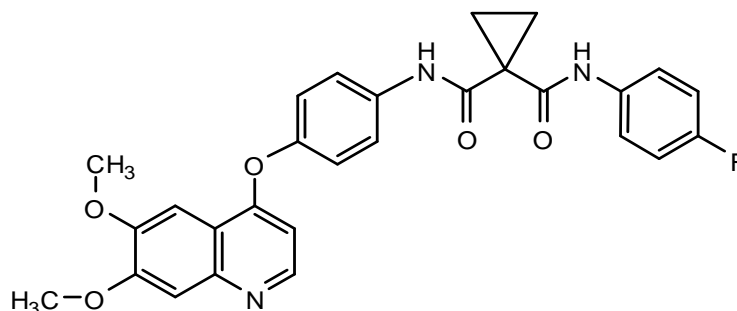
або її фармацевтично прийнятну сіль, де:

R¹ являє собою галоген;

R² являє собою галоген; та

Q являє собою CH або N.

[0053] В іншому варіанті реалізації сполука Формули I являє собою сполуку 1:



Сполука 1

або його фармацевтично прийнятну сіль. Як вказано раніше, сполука 1 згадана в цьому документі як N-(4-{{6,7-біс(метилокси)хінолін-4-іл}окси}феніл)-N'-(4-фторфеніл)циклопропан-1,1-дихарбоксамід. УВО 2005/030140, включеному в цей документ за допомогою посилання в повному обсязі, описана сполука 1 і описаний спосіб її одержання (ВО 2005/030140, приклад 12, 37, 38 і 48), а також описана терапевтична активність вказаної сполуки для інгібування, регулювання та/або модулювання передачі сигналів кіназ (ВО 2005/030140, Аналізи, таблиця 4, рядок 289). Приклад 48 представлений в параграфі [0353] ВО 2005/030140.

[0054] В інших варіантах реалізації сполуку Формули I, Іа або сполуку 1, або її фармацевтично прийнятну сіль вводять у вигляді фармацевтичної композиції, причому фармацевтична композиція додатково містить фармацевтично прийнятний носій, допоміжну речовину або розріджувач. У конкретному варіанті реалізації сполука Формули I являє собою сполуку 1.

[0055] Сполука Формули I, Формули Іа і сполука I, описані в цьому документі, включають вказані сполуки, а також їх окремі ізомери і суміші. В кожному випадку сполука Формули I включає фармацевтично прийнятні солі, гідрати і/або сольвати вказаних сполук і будь-які окремі ізомери або суміш ізомерів.

[0056] В інших варіантах реалізації сполука Формули I, Іа або сполука 1 може являти собою (L)-малатну сіль. Малатна сіль сполуки Формули I і сполуки 1 описана в РСТ/US2010/021194 та USSN 61/325095, повний зміст яких включено в цей документ за допомогою посилання.

[0057] В інших варіантах реалізації сполука Формули I являє собою (D)-малатну сіль, яка згадана також як R-малатна сіль.

[0058] В інших варіантах реалізації сполука Формули Іа являє собою малатну сіль.

[0059] В інших варіантах реалізації сполука Формули Іа являє собою (L)-малатну сіль, яка згадана також як S-малатна сіль.

[0060] В інших варіантах реалізації сполука 1 являє собою (D)-малатну сіль, яка згадана також як S-малатна сіль.

[0061] В інших варіантах реалізації сполука 1 являє собою малатну сіль.

[0062] В інших варіантах реалізації сполука 1 являє собою (L)-малатну сіль, яка згадана також як S-малатна сіль.

[0063] В іншому варіанті реалізації малатна сіль представлена в кристалічній формі N-1 або у формі N-2 (L)-малатної солі та/або (D)-малатної солі сполуки 1, як описано в заявці на патент США з серійним № 61/325095. Див. ВО 2008/083319, повний зміст якої включено в цей документ за допомогою посилання, де описані властивості кристалічних енантіомерів, включаючи кристалічні форми N-1 і/або N-2 малатної солі сполуки 1. Способи отримання і опису таких форм докладно описані в РСТ/US10/021194, повний зміст якої включено в цей документ за допомогою посилання.

[0064] В іншому варіанті реалізації цей винахід відноситься до способу реверсування або інгібування НДРЛ, що включає введення пацієнту, який потребує в такому лікуванні, терапевтично ефективної кількості сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі в будь-якому з варіантів реалізації, описаних у цьому документі. У конкретному варіанті реалізації сполука Формули I являє собою сполуку 1 або її фармацевтично прийнятну сіль.

[0065] В іншому варіанті реалізації цей винахід відноситься до способу реверсування або інгібування позитивного по злиттю SLC34A2-ROS1 НДРЛ, що включає введення пацієнту, який потребує в такому лікуванні, терапевтично ефективної кількості сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі в будь-якому з варіантів реалізації, описаних у цьому документі. У конкретному варіанті реалізації сполука Формули I являє собою сполуку 1 або її фармацевтично прийнятну сіль.

[0066] В іншому варіанті реалізації цей винахід відноситься до способу реверсування або інгібування позитивного по злиттю CD74-ROS1 НДРЛ, що включає введення пацієнту, який

потребує в такому лікуванні, терапевтично ефективної кількості сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі в будь-якому з варіантів реалізації, описаних у цьому документі. У конкретному варіанті реалізації сполука Формули I являє собою сполуку 1 або її фармацевтично прийнятну сіль.

5 [0067] В іншому варіанті реалізації цей винахід відноситься до способу реверсування або інгібування позитивного по злиттю FIG-ROS1 НДРЛ, що включає введення пацієнту, який потребує в такому лікуванні, терапевтично ефективної кількості сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі в будь-якому з варіантів реалізації, описаних у цьому документі. У конкретному варіанті реалізації сполука Формули I являє собою сполуку 1 або її фармацевтично прийнятну сіль.

10 [0068] В іншому варіанті реалізації сполуку Формули I або її фармацевтично прийнятну сіль вводять до, одночасно або після одного або більше з інших способів лікування. В іншому варіанті реалізації сполуку Формули I або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після одного або більше зі способів лікування. "Лікування" означає будь-який з варіантів лікування, доступних для досвідченого фахівця, включаючи хірургічне втручання, хіміотерапевтичні агенти, гормональні терапії, антитіла, імунотерапії, терапію з радіоактивним йодом та опромінення. Зокрема, "лікування" означає інший хіміотерапевтичний агент або антитіло.

[0069] Так, в іншому варіанті реалізації сполуку Формули I або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування цисплатином та/або гемцитабіном.

20 [0070] В іншому варіанті реалізації сполуку Формули I або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування цисплатином доцетакселем.

[0071] В іншому варіанті реалізації сполуку Формули I або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування антитілом HER-2. В іншому варіанті реалізації антитіло HER-2 являє собою трастузумаб.

25 [0072] В іншому варіанті реалізації сполуку Формули I або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування цисплатином та/або гемцитабіном, та/або доцетакселем.

[0073] В іншому варіанті реалізації сполуку Формули I, Ia або сполуку 1, або його фармацевтично прийнятну сіль вводять перорально один раз на добу у вигляді таблетки або капсули. У цих та інших варіантах реалізації сполука Формули I або її фармацевтично прийнятна сіль являє собою сполуку 1 або її фармацевтично прийнятну сіль.

30 [0074] В іншому варіанті реалізації сполуку 1 вводять перорально у формі вільної основи або її малатної солі у вигляді капсули або таблетки.

[0075] В іншому варіанті реалізації сполуку 1 вводять перорально один раз на добу у формі вільної основи або її малатної солі у вигляді капсули або таблетки, що містить до 100 мг сполуки 1.

35 [0076] В іншому варіанті реалізації сполуку 1 вводять перорально один раз на добу у формі вільної основи або її малатної солі у вигляді капсули або таблетки, що містить 100 мг сполуки 1.

[0077] В іншому варіанті реалізації сполуку 1 вводять перорально один раз на добу у формі вільної основи або її малатної солі у вигляді капсули або таблетки, що містить 95 мг сполуки 1.

40 [0078] В іншому варіанті реалізації сполуку 1 вводять перорально один раз на добу у формі вільної основи або її малатної солі у вигляді капсули або таблетки, що містить 90 мг сполуки 1.

[0079] В іншому варіанті реалізації сполуку 1 вводять перорально один раз на добу у формі вільної основи або її малатної солі у вигляді капсули або таблетки, що містить 85 мг сполуки 1.

45 [0080] В іншому варіанті реалізації сполуку 1 вводять перорально один раз на добу у формі вільної основи або її малатної солі у вигляді капсули або таблетки, що містить 80 мг сполуки 1.

[0081] В іншому варіанті реалізації сполуку 1 вводять перорально один раз на добу у формі вільної основи або її малатної солі у вигляді капсули або таблетки, що містить 75 мг сполуки 1.

[0082] В іншому варіанті реалізації сполуку 1 вводять перорально один раз на добу у формі вільної основи або її малатної солі у вигляді капсули або таблетки, що містить 70 мг сполуки 1.

50 [0083] В іншому варіанті реалізації сполуку 1 вводять перорально один раз на добу у формі вільної основи або її малатної солі у вигляді капсули або таблетки, що містить 65 мг сполуки 1.

[0084] В іншому варіанті реалізації сполуку 1 вводять перорально один раз на добу у формі вільної основи або її малатної солі у вигляді капсули або таблетки, що містить 60 мг сполуки 1.

55 [0085] В іншому варіанті реалізації сполуку 1 вводять перорально один раз на добу у формі вільної основи або її малатної солі у вигляді капсули або таблетки, що містить 55 мг сполуки 1.

[0086] В іншому варіанті реалізації сполуку 1 вводять перорально один раз на добу у формі вільної основи або її малатної солі у вигляді капсули або таблетки, що містить 50 мг сполуки 1.

[0087] В іншому варіанті реалізації сполуку 1 вводять перорально один раз на добу у формі вільної основи або її малатної солі у вигляді капсули або таблетки, що містить 45 мг сполуки 1.

60 [0088] В іншому варіанті реалізації сполуку 1 вводять перорально один раз на добу у формі

вільної основи або її малатної солі у вигляді капсули або таблетки, що містить 40 мг сполуки 1.

[0089] В іншому варіанті реалізації сполуку 1 вводять перорально один раз на добу у формі вільної основи або її малатної солі у вигляді капсули або таблетки, що містить 35 мг сполуки 1.

5 [0090] В іншому варіанті реалізації сполуку 1 вводять перорально один раз на добу у формі вільної основи або її малатної солі у вигляді капсули або таблетки, що містить 30 мг сполуки 1.

[0091] В іншому варіанті реалізації сполуку 1 вводять перорально один раз на добу у формі вільної основи або її малатної солі у вигляді капсули або таблетки, що містить 25 мг сполуки 1.

[0092] В іншому варіанті реалізації сполуку 1 вводять перорально один раз на добу у формі вільної основи або її малатної солі у вигляді капсули або таблетки, що містить 20 мг сполуки 1.

10 [0093] В іншому варіанті реалізації сполуку 1 вводять перорально один раз на добу у формі вільної основи або її малатної солі у вигляді капсули або таблетки, що містить 15 мг сполуки 1.

[0094] В іншому варіанті реалізації сполуку 1 вводять перорально один раз на добу у формі вільної основи або її малатної солі у вигляді капсули або таблетки, що містить 10 мг сполуки 1.

15 [0095] В іншому варіанті реалізації сполуку 1 вводять перорально один раз на добу у формі вільної основи або її малатної солі у вигляді капсули або таблетки, що містить 5 мг сполуки 1.

[0096] В іншому варіанті реалізації сполуку 1 вводять у формі вільної основи або малатної солі перорально один раз на добу у вигляді таблетки, як показано в нижченаведеній таблиці.

Інгредієнт	(% мас./мас.)
Сполука 1	31,68
Мікрокристалічна целюлоза	38,85
Безводна лактоза	19,42
Гідроксипропілцелюлоза	3,00
Кроскармелоза натрію	3,00
Загальний вміст внутрішньогранулярних компонентів	95,95
Діоксид кремнію, колоїдний	0,30
Кроскармелоза натрію	3,00
Стеарат магнію	0,75
Всього	100,00

20 [0097] В іншому варіанті реалізації сполуку 1 вводять перорально у формі вільної основи або малатної солі один раз на добу у вигляді таблетки, як показано в нижченаведеній таблиці.

Інгредієнт	(% мас./мас.)
Сполука 1	25,0-33,3
Мікрокристалічна целюлоза	в достатній кількості
Гідроксипропілцелюлоза	3
Полоксамер	0-3
Кроскармелоза натрію	6,0
Колоїдний діоксид кремнію	0,5
Стеарат магнію	0,5-1,0
Всього	100

25 [0098] В іншому варіанті реалізації сполуку 1 вводять перорально у формі вільної основи або малатної солі один раз на добу у вигляді таблетки, як показано в нижченаведеній таблиці.

Інгредієнт	Теоретична кількість (мг/разова доза)
Сполука 1	100,0
Мікрокристалічна целюлоза PH-102	155,4
Лактоза 60М, безводна	77,7
Гідроксипропілцелюлоза, EXF	12,0
Кроскармелоза натрію	24
Колоїдний діоксид кремнію	1,2
Стеарат магнію (не бичачий)	3,0
Опадрай жовтий	16,0
Всього	416

[0099] Будь-які складі таблеток, представлені вище, можуть бути підібрані у відповідності з

необхідною дозою сполуки 1 або її фармацевтично прийнятної солі. Таким чином, кількість кожного з інгредієнтів складу можна пропорційно регулювати для отримання таблетованого складу, що містить різні кількості сполуки 1, як це передбачено в попередніх абзацах. В іншому варіанті реалізації складу можуть містити 20, 40, 60 або 80 мг сполуки 1 або її фармацевтично прийнятної солі.

[00100] В деяких варіантах реалізації цього винаходу представлений спосіб інгібування або реверсування прогресу патологічного клітинного росту у ссавця, що включає введення сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі, причому патологічний клітинний ріст являє собою рак, опосередкований химерним білком ROS1, наприклад, химерним білком SLC34A2-ROS1, химерним білком CD74-ROS1, химерним білком FIG-ROS1, химерним білком FIG-ROS1(L), химерним білком FIG-ROS1(S) і химерним білком FIG-ROS1(VL), а також іншими химерними білками ROS1, які містять функціональний С-кінцевий кіназний домен ROS1 та кодованими у геном людини ROS1 в 6 хромосомі (6q22). В одному з варіантів реалізації рак являє собою аденокарциному легень. В іншому варіанті реалізації аденокарцинома легень являє собою недрібноклітинний рак легень. В іншому варіанті реалізації аденокарцинома легень являє собою позитивний по злиттю SLC34A2-ROS1 недрібноклітинний рак легень. В іншому варіанті реалізації аденокарцинома легень являє собою позитивний по злиттю CD74-ROS1 недрібноклітинний рак легень. В іншому варіанті реалізації аденокарцинома легень являє собою позитивний по злиттю FIG-ROS1 недрібноклітинний рак легень. В іншому варіанті реалізації аденокарцинома легень являє собою позитивний по злиттю ROS1 недрібноклітинний рак легень. В іншому варіанті реалізації сполуку Формули I або її фармацевтично прийнятну сіль вводили у вигляді фармацевтичної композиції, що містить сполуку Формули I або її фармацевтично прийнятну сіль і щонайменше один фармацевтично прийнятний носій. В іншому варіанті реалізації сполуку Формули I вводять після іншої форми лікування. В іншому варіанті реалізації сполуку Формули I або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування цисплатином та/або гемцитабином. В іншому варіанті реалізації сполуку Формули I або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування карбоплатином та/або гемцитабіном. В іншому варіанті реалізації сполуку Формули I вводять після лікування кризотинібом. В іншому варіанті реалізації сполуку Формули I або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування кризотинібом та/або гемцитабіном. В іншому варіанті реалізації сполуку Формули I або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування доцетакселем. В іншому варіанті реалізації сполуку Формули I вводять після лікування карбоплатином. В іншому варіанті реалізації сполуку Формули I або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування цисплатином та/або гемцитабіном, та/або доцетакселем. В іншому варіанті реалізації сполуку Формули I або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування карбоплатином та/або гемцитабіном, та/або доцетакселем. В іншому варіанті реалізації сполуку Формули I або його фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування кризотинібом та/або гемцитабіном, та/або доцетакселем.

[00101] В деяких варіантах реалізації цього винаходу представлений спосіб інгібування або реверсування прогресу патологічного клітинного росту у ссавця, що включає введення сполуки Формули Ia або її фармацевтично прийнятної солі, причому патологічний клітинний ріст являє собою рак, опосередкований химерним білком ROS1, наприклад, химерним білком SLC34A2-ROS1, химерним білком CD74-ROS1, химерним білком FIG-ROS1, химерним білком FIG-ROS1(L), химерним білком FIG-ROS1(S) і химерним білком FIG-ROS1(VL), а також іншими химерними білками ROS1, які містять функціональний С-кінцевий кіназний домен ROS1 та кодованими у геном людини ROS1 в 6 хромосомі (6q22). В одному з варіантів реалізації рак являє собою аденокарциному легень. В іншому варіанті реалізації аденокарцинома легень являє собою недрібноклітинний рак легень. В іншому варіанті реалізації аденокарцинома легень являє собою позитивний по злиттю SLC34A2-ROS1 недрібноклітинний рак легень. В іншому варіанті реалізації аденокарцинома легень являє собою позитивний по злиттю CD74-ROS1 недрібноклітинний рак легень. В іншому варіанті реалізації аденокарцинома легень являє собою позитивний по злиттю FIG-ROS1 недрібноклітинний рак легень. В іншому варіанті реалізації аденокарцинома легень являє собою позитивний по злиттю ROS1 недрібноклітинний рак легень. В іншому варіанті реалізації сполуку Формули Ia або її фармацевтично прийнятну сіль вводять у вигляді фармацевтичної композиції, що містить сполуку Формули Ia або її фармацевтично прийнятну сіль і щонайменше один фармацевтично прийнятний носій. В іншому варіанті реалізації сполуку Формули Ia вводять після іншої форми лікування. В іншому варіанті реалізації сполуку Формули Ia або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування цисплатином та/або гемцитабином. В іншому варіанті реалізації сполуку Формули Ia або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування доцетакселем. В іншому варіанті реалізації сполуку Формули Ia або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування карбоплатином та/або гемцитабіном, та/або доцетакселем. В іншому варіанті реалізації сполуку Формули Ia або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування кризотинібом та/або гемцитабіном, та/або доцетакселем.

реалізації сполуку Формули Ia або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування цисплатином та/або гемцитабіном, та/або доцетакселем. В іншому варіанті реалізації сполуку Формули Ia або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування карбоплатином та/або гемцитабіном. В іншому варіанті реалізації сполуку Формули Ia вводять після лікування кризотинібом. В іншому варіанті реалізації сполуку Формули Ia або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування кризотинібом та/або гемцитабіном. В іншому варіанті реалізації сполуку Формули Ia або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування доцетакселем. В іншому варіанті реалізації сполуку Формули Ia вводять після лікування карбоплатином. В іншому варіанті реалізації сполуку Формули Ia або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування цисплатином та/або гемцитабіном, та/або доцетакселем. В іншому варіанті реалізації сполуку Формули Ia або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування карбоплатином та/або гемцитабіном, та/або доцетакселем. В іншому варіанті реалізації сполуку Формули Ia або його фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування кризотинібом та/або гемцитабіном, та/або доцетакселем.

[00102] В інших варіантах реалізації цього винаходу представлений спосіб інгібування або реверсування прогресу патологічного клітинного росту у ссавця, що включає введення сполуки 1 або її фармацевтично прийнятної солі, причому патологічний клітинний ріст являє собою рак, опосередкований химерним білком ROS1, наприклад, химерним білком SLC34A2-ROS1, химерним білком CD74-ROS1, химерним білком FIG-ROS1, химерним білком FIG-ROS1(L), химерним білком FIG-ROS1(S) і химерним білком FIG-ROS1(VL), а також іншими химерними білками ROS1, які містять функціональний С-кінцевий кіназний домен ROS1 та кодованими у геном людини ROS1 в 6 хромосомі (6q22). В одному з варіантів реалізації рак являє собою аденокарциному легень. В іншому варіанті реалізації аденокарцинома легень являє собою недрібноклітинний рак легень. В іншому варіанті реалізації аденокарцинома легень являє собою позитивний по злиттю SLC34A2-ROS1 недрібноклітинний рак легень. В іншому варіанті реалізації аденокарцинома легень являє собою позитивний по злиттю CD74-ROS1 недрібноклітинний рак легень. В іншому варіанті реалізації аденокарцинома легень являє собою позитивний по злиттю FIG-ROS1 недрібноклітинний рак легень. В іншому варіанті реалізації аденокарцинома легень являє собою позитивний по злиттю ROS1 недрібноклітинний рак легень. В іншому варіанті реалізації сполуку 1 або її фармацевтично прийнятну сіль вводять у вигляді фармацевтичної композиції, що містить сполуку 1 або її фармацевтично прийнятну сіль і щонайменше один фармацевтично прийнятний носій. В іншому варіанті реалізації сполуку 1 вводять після іншої форми лікування. В іншому варіанті реалізації сполуку 1 або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування цисплатином та/або гемцитабіном. В іншому варіанті реалізації сполуку 1 або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування доцетакселем. В іншому варіанті реалізації сполуку 1 або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування цисплатином та/або гемцитабіном, та/або доцетакселем. В іншому варіанті реалізації сполуку 1 або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування карбоплатином та/або гемцитабіном. В іншому варіанті реалізації сполуку 1 або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування кризотинібом. В іншому варіанті реалізації сполуку 1 або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування кризотинібом та/або гемцитабіном. В іншому варіанті реалізації сполуку 1 або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування доцетакселем. В іншому варіанті реалізації сполуку 1 або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування карбоплатином. В іншому варіанті реалізації сполуку 1 або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування цисплатином та/або гемцитабіном, та/або доцетакселем. В іншому варіанті реалізації сполуку 1 або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування карбоплатином та/або гемцитабіном, та/або доцетакселем. В іншому варіанті реалізації сполуку 1 або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування кризотинібом та/або гемцитабіном, та/або доцетакселем. В іншому варіанті реалізації сполуку 1 або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування кризотинібом та/або карбоплатином.

[00103] В іншому варіанті реалізації цього винаходу представлений спосіб попередження, лікування, інгібування або реверсування прогресу патологічного клітинного росту у ссавця, що включає введення сполуки 1 або її фармацевтично прийнятною солі, причому патологічний клітинний ріст являє собою рак, опосередкований химерним білком ROS1, наприклад, химерним білком SLC34A2-ROS1, химерним білком CD74-ROS1, химерним білком злиття FIG-ROS1, химерним білком FIG-ROS1(L), химерним білком FIG-ROS1(S), химерним білком FIG-ROS1(VL) або іншими химерними білками ROS1, при цьому рак раніше лікували із застосуванням терапевтичної схеми введення кризотиніба та/або карбоплатину, і рак є резистентним до

кризотинібу та/або карбоплатину. У деяких варіантах реалізації рак, резистентний до кризотинібу та/або карбоплатину, несе один або більше химерних білків ROS1, вибраних з: химерного білка SLC34A2-ROS1, химерного білка CD74-ROS1, химерного білка FIG-ROS1, химерного білка FIG-ROS1(L), химерного білка FIG-ROS1(S) і химерного білка FIG-ROS1(VL), та/або містить мутації в кіназному домені ROS1 химерного білка SLC34A2-ROS1, химерного білка CD74-ROS1, химерного білка FIG-ROS1, химерного білка FIG-ROS1(L), химерного білка FIG-ROS1(S) або химерного білка FIG-ROS1(VL). В одному з варіантів реалізації рак, резистентний до кризотинібу та/або карбоплатину, являє собою рак, що має мутацію в кіназному домені ROS1 химерного білка CD74-ROS1. У спорідненому варіанті реалізації рак являє собою кризотиніб-рефрактерну, позитивну по злиттю CD74-ROS1 аденокарциному легень, наприклад, кризотиніб-рефрактерний, позитивний по злиттю CD74-ROS1 НДРЛ, несе мутацію в кіназному домені ROS1. В іншому варіанті реалізації кризотиніб - та/або карбоплатин-резистентний рак являє собою рак, наприклад, кризотиніб-резистентну аденокарциному легень, наприклад, кризотиніб-резистентний НДРЛ, несе мутацію, обрану з E1990G, G2032R, L2026M, L1951R, M2128V, K2003I та їх комбінацій, у кіназному домені ROS1 химерного білка CD74-ROS1.

[00104] В іншому варіанті реалізації цього винаходу представлений спосіб попередження, лікування, інгібування або реверсування прогресу патологічного клітинного росту у ссавця, що включає введення сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятною солі, причому патологічний клітинний ріст являє собою рак, опосередкований химерним білком ROS1, наприклад, химерним білком SLC34A2-ROS1, химерним білком CD74-ROS1, химерним білком FIG-ROS1, химерним білком FIG-ROS1(L), химерним білком FIG-ROS1(S), химерним білком FIG-ROS1(VL) або іншими химерними білками ROS1, при цьому рак раніше лікували із застосуванням терапевтичної схеми введення кризотиніба та/або карбоплатину, і рак є резистентним до кризотинібу та/або карбоплатину. У деяких варіантах реалізації рак, резистентний до кризотинібу та/або карбоплатину, несе один або більше химерних білків ROS1, вибраних з: химерного білка SLC34A2-ROS1, химерного білка CD74-ROS1, химерного білка FIG-ROS1, химерного білка FIG-ROS1(L), химерного білка FIG-ROS1(S) і химерного білка FIG-ROS1(VL), та/або містить мутації в кіназному домені ROS1 химерного білка SLC34A2-ROS1, химерного білка CD74-ROS1, химерного білка FIG-ROS1, химерного білка FIG-ROS1(L), химерного білка FIG-ROS1(S) або химерного білка FIG-ROS1(VL). В одному з варіантів реалізації рак, резистентний до кризотинібу та/або карбоплатину, являє собою рак, що має мутацію в кіназному домені ROS1 химерного білка CD74-ROS1. У спорідненому варіанті реалізації рак являє собою кризотиніб-рефрактерну, позитивну по злиттю CD74-ROS1 аденокарциному легень, наприклад, кризотиніб-рефрактерний, позитивний по злиттю CD74-ROS1 НДРЛ, несе мутацію в кіназному домені ROS1. В іншому варіанті реалізації кризотиніб - та/або карбоплатин-резистентний рак являє собою рак, наприклад, кризотиніб-резистентну аденокарциному легень, наприклад, кризотиніб-резистентний НДРЛ, несе мутацію, обрану з E1990G, G2032R, L2026M, L1951R, M2128V, K2003I та їх комбінацій, у кіназному домені ROS1 химерного білка CD74-ROS1. В різних варіантах реалізації, описаних вище, спосіб попередження, лікування, інгібування або реверсування прогресу патологічного клітинного росту у ссавця включає введення сполуки Формули I або сполуки Формули Ia, або сполуки 1, або її фармацевтично прийнятною солі, в ілюстративній терапевтично ефективній дозі від близько 0,01 мг/кг до близько 100 мг/кг або від близько 0,1 мг/кг до близько 75 мг/кг, або від близько 0,1 мг/кг до близько 50 мг/кг, або від близько 0,1 мг/кг до близько 40 мг/кг, або від близько 0,1 мг/кг до близько 30 мг/кг, або від близько 0,1 мг/кг до близько 20 мг/кг, або від близько 0,1 мг/кг до близько 15 мг/кг, або від близько 0,1 мг/кг до близько 10 мг/кг, або від близько 0,1 мг/кг до близько 5 мг/кг, або від близько 0,1 мг/кг до близько 1 мг/кг пацієнту, який потребує цього, причому патологічний клітинний ріст являє собою рак, опосередкований химерним білком ROS1, наприклад, химерним білком SLC34A2-ROS1, химерним білком CD74-ROS1, химерним білком FIG-ROS1, химерним білком FIG-ROS1(L), химерним білком FIG-ROS1(S), химерним білком FIG-ROS1(VL) або іншим химерним білком ROS1; або рак, що несе одну або більше мутацій в химерному білку ROS1, наприклад, мутації в кіназному домені ROS1 химерному білку SLC34A2-ROS1, химерному білку CD74-ROS1, химерному білку FIG-ROS1, химерному білку FIG-ROS1(L), химерному білку FIG-ROS1(S), химерному білку FIG-ROS1(VL) або в інших химерних білках ROS1, включаючи, в деяких варіантах реалізації, рак, який раніше лікували із застосуванням терапевтичної схеми введення кризотинібу та/або карбоплатину, і рак є резистентним до кризотинібу та/або карбоплатину, наприклад, кризотиніб-резистентний рак, наприклад, кризотиніб-резистентна аденокарцинома легень, наприклад, кризотиніб-резистентний НДРЛ.

Введення

[00105] Введення сполуки Формули I, Формули Ia або сполуки 1, або її фармацевтично прийнятною солі в чистій формі або відповідної фармацевтичної композиції може бути здійснене будь-яким прийнятним способом введення або засобами, призначеними для подібних цілей. Так, введення може бути, наприклад, здійснено перорально, назально, парентерально (внутрішньовенно, внутрішньом'язово або підшкірно), місцево, трансдермально, внутрішньовагінально, інтравезикально, інтрацистернально або ректально у формі твердих, напівтвердих, ліофілізованих порошків або в рідких лікарських формах, таких як, наприклад, таблетки, супозиторії, пігулки, м'які еластичні і тверді желатинові форми (які можуть бути у вигляді капсул або таблеток), порошки, розчини, суспензії або аерозолі, або т. п., зокрема, у поодиноких лікарських формах, підходять для простого введення точних доз.

[00106] Композиції містять стандартний фармацевтичний носій або допоміжну речовину і сполуку Формули I в якості активного агента, а також, крім цього, можуть містити носії та ад'юванти і т.д.

[00107] Ад'юванти включають консервуючі, зволожуючі, суспендуючі, підсолоджуючі, смакові, ароматизуючі, емульгуючі добавки та добавки для дозування. Запобігання дії мікроорганізмів може бути забезпечено за допомогою різних антибактеріальних і протигрибкових засобів, наприклад, парабенів, хлорбутанолу, фенолу, сорбінової кислоти і т.п. Необхідним також може бути включення ізотонічних засобів, наприклад, цукрів, хлориду натрію і т.п. Пролонгована абсорбція ін'єкційної фармацевтичної форми може бути забезпечена застосуванням агентів, що уповільнюють абсорбцію, наприклад, моностеарата алюмінію і желатину.

[00108] При необхідності фармацевтична композиція сполуки Формули I також може містити незначні кількості допоміжних речовин, таких як змочувальні або емульгуючі агенти, рН-буферні агенти, антиоксиданти і т.п., такі як, наприклад, лимонна кислота, сорбітанмонолаурат, триетаноламінолеат, бутильований гідрокситолуол і т.д.

[00109] Вибір композиції залежить від різних факторів, таких як спосіб введення ліків (наприклад, для перорального введення композиції запроваджують у формі таблеток, пігулок або капсул) і біодоступність лікарської речовини. Нещодавно були розроблені фармацевтичні композиції спеціально для ліків, що демонструють недостатню біодоступність, на підставі того принципу, що біодоступність може бути збільшена за допомогою збільшення площі поверхні, тобто зменшення розміру частинок. Наприклад, у патенті США № 4107288 описана фармацевтична композиція, що містить частинки розміром від 10 до 1000 нм, в якій активний матеріал нанесений на поперечно-зшити матрицю з макромолекул. У патенті США № 5145684 описано одержання фармацевтичної композиції, в якій лікарський речовина нанесена на наночастинки (середній розмір частинок 400 нм) в присутності модифікатора поверхні, а потім дисперговані у рідкому середовищі з отриманням фармацевтичної композиції, яка демонструє помітно високу біодоступність.

[00110] Композиції, прийнятні для парентеральної ін'єкції, можуть містити фізіологічно прийнятні, стерильні водні або неводні розчини, дисперсії, суспензії або емульсії й стерильні порошки для розведення з отриманням стерильних ін'єкційних розчинів або дисперсій. Приклади відповідних водних і неводних носіїв, розріджувачів, розчинників або рідких носіїв включають воду, етанол, поліоли (пропіленгліколь, поліетиленгліколь, гліцерин тощо), відповідні їх суміші, рослинні олії (оливкова олія) і органічні естери, придатні для ін'єкцій, такі як етилолеат. Належна плинність може бути забезпечена, наприклад, за допомогою застосування покриття, такого як лецитин, підтримання необхідного розміру часток у разі дисперсій та застосування поверхнево-активних речовин.

[00111] Один з конкретних способів введення являє собою пероральний, із застосуванням зручного добового режиму дозування, який може бути підібраний у відповідності зі ступенем тяжкості стану захворювання, що підлягає лікуванню.

[00112] Тверді лікарські форми для перорального введення включають капсули, таблетки, порошки і гранули. У таких твердих лікарських формах активна сполука змішана з щонайменше одною інертною стандартною допоміжною речовиною (або носієм), таким як цитрат натрію або фосфат дикальція, або з (а) наповнювачами або сухими розчинниками, такими як, наприклад, крохмаль, лактоза, сахароза, глюкоза, маніт і кремнієва кислота, (b) сполучними агентами, такими як, наприклад, похідні целюлози, крохмаль, альгірати, желатин, полівінілпіролідон, сахароза та гуміарабік, (c) зволожувачами, такими як, наприклад, гліцерин, (d) агентами для поліпшення розпаду таблеток, такими як, наприклад, агар-агар, карбонат кальцію, картопляний або тапіоковий крохмаль, альгінова кислота, натрію кроскармелоза, складні силікати та карбонат натрію, (e) уповільнювачами розчинення, такими як, наприклад, парафін, (f) прискорювачами абсорбції, такими як, наприклад, четвертинні амонієві сполуки, (g) змочувальними агентами, такими як, наприклад, цетиловий спирт і гліцеринмоностеарат,

стеарат магнію і т.п., (h) адсорбентами, такими як, наприклад, каолін та бентоніт, та (i) змащувальні речовинами, такими як, наприклад, тальк, стеарат кальцію, магнію стеарат, тверді поліетиленгліколі, лаурилсульфат натрію, або їх сумішами. У разі капсул, таблеток та пігулок лікарські форми можуть містити буферні агенти.

[00113] Тверді лікарські форми, описані вище, можуть бути отримані з покриттями та оболонками, такими як ентросоліюбильні покриття та інші добре відомі з рівня техніки. Вони можуть містити замутнюючі засоби, а також можуть мати такий склад, щоб вивільняти активну сполуку або сполуки в певному відділі кишечника з затримкою. Приклади інкапсулюючих композицій, які можуть бути використані, являють собою полімерні речовини і віск. При необхідності активні сполуки також можуть перебувати в мікроінкапсульованій формі з одною або більше з вищевказаних допоміжних речовин.

[00114] Рідкі лікарські форми для перорального введення включають фармацевтично прийнятні емульсії, розчини, суспензії, сиропи та еліксири. Такі лікарські форми отримують, наприклад, розчиненням, диспергуванням і т.д. сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі і необов'язкових фармацевтичних ад'ювантів у носії, такому, як, наприклад, вода, сольовий розчин, водна декстроза, гліцерин, етанол тощо; солюбілізуючих агентів і емульгаторів, таких як, наприклад, етиловий спирт, ізопропіловий спирт, етилкарбонат, етилацетат, бензиловий спирт, бензилбензоат, пропіленгліколь, 1,3-бутиленгліколь, диметилформамід; масел, зокрема, бавовняного масла, арахісового масла, олії проростків кукурудзи, оливкової олії, рицинової олії і кунжутної олії, гліцерину, тетрагідрофурфурилового спирту, поліетиленгліколів та естерів жирних кислот і сорбіту; або сумішей вказаних речовин і т. п., з одержанням розчину або суспензії.

[00115] Суспензії, крім активних сполук, що можуть містити суспендуючі агенти, як наприклад, етоксифовані ізостеарилові спирти, поліоксиетиленсорбіт і складні ефіри сорбіту, мікрокристалічну целюлозу, метагідроксид алюмінію, бентоніт, агар-агар і трагакант, або суміші таких речовин і т. п.

[00116] Композиції для ректального введення являють собою, наприклад, супозиторії, які можуть бути отримані змішуванням сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі, наприклад, з відповідними неподразнюючими допоміжними речовинами або носіями, такими як масло какао, поліетиленгліколь або віск для супозиторіїв, які є твердими за звичайних температур, але рідкими при температурі тіла і, отже, плавляться у відповідній порожнині тіла і вивільняють в ній активний компонент.

[00117] Лікарські форми для місцевого застосування сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі включають мазі, порошки, аерозолі та інгаляційні форми. Активний компонент змішують в стерильних умовах з фізіологічно прийнятним носієм і будь-якими необхідними консервантами, буферами або витискаючими газами. Офтальмологічні композиції, очні мазі, порошки і розчини також входять в обсяг цього опису.

[00118] Гази під тиском можуть бути використані для диспергування сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі у формі аерозолі. Інертні газы, придатні для вказаної мети, являють собою азот, діоксид вуглецю і т.д.

[00119] У цілому, в залежності від передбачуваного способу введення фармацевтично активні композиції містять від близько 1 % до близько 99 % по масі сполук(-и) Формули I або її фармацевтично прийнятної солі і від 99 % до 1 % по масі відповідного фармацевтичної допоміжної речовини. В одному прикладі композиція містить близько 5 % до близько 75 % по масі сполук(-и) Формули I, Формули Ia або сполуки 1, або її фармацевтично прийнятної солі, а решту становлять відповідні фармацевтичні допоміжні речовини.

[00120] Існуючі способи отримання таких лікарських форм відомі або зрозумілі фахівцям у цій галузі техніки; див., наприклад, Remington, Pharmaceutical Sciences, 18oe изд., (Mack Publishing Company, Істон, штат Пенсільванія, 1990). Композиція, що підлягає введенню в будь-якому випадку містить терапевтично ефективну кількість сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі для лікування стану хвороби у відповідності з ідеєю цього опису.

[00121] Сполуки згідно з цим описом або їх фармацевтично прийнятні солі, або сольвати вводять в терапевтично ефективній кількості, яка варіюється в залежності від безлічі факторів, включаючи активність конкретної використовуваної сполуки, метаболічну стабільність і тривалість дії сполуки, вік, масу тіла, загальний стан здоров'я, стать, раціон, спосіб та час введення, швидкість екскреції, комбінацію ліків, тяжкість конкретного патологічного стану і реципієнта, що проходить лікування. Сполука Формули I, Формули Ia або сполука 1, або її фармацевтично прийнятна сіль може бути введена пацієнту в дозі від близько 0,1 до 1000 мг на добу. Для нормальної дорослої людини з масою тіла близько 70 кг прикладом дози може

служити доза від близько 0,01 до близько 100 мг на кілограм маси тіла на добу. Однак конкретна доза, що використовується може варіювати. Наприклад, доза може залежати від безлічі факторів, включаючи вимоги пацієнта, тяжкість стану, що підлягає лікуванню, і фармакологічну активність сполуки, що використовується. Визначення оптимальних доз для конкретного пацієнта добре відомо фахівцям у цій галузі техніки.

[00122] В інших варіантах реалізації сполука Формули I, Формули Ia або сполука 1, або її фармацевтично прийнятна сіль може бути введена пацієнту одночасно з іншими засобами лікування раку. Такі засоби лікування включають інші протиракові хіміотерапевтичні агенти, гормонозамісну терапію, радіаційну терапію або імунотерапію, серед інших. Вибір іншої терапії залежить від безлічі факторів, включаючи метаболічну стабільність і тривалість дії сполуки, вік, масу тіла, загальний стан здоров'я, стать, раціон, спосіб та час введення, швидкість екскреції, комбінацію ліків, тяжкість конкретного патологічного стану у реципієнта, що проходить лікування.

[00123] В іншому аспекті цього винаходу представлений спосіб виявлення, діагностики та лікування захворювання, пов'язаного зі злиттями ROS1, таких як позитивний по злиттю SLC34A2-ROS1 НДРЛ, позитивний по злиттю CD74-ROS1 НДРЛ і позитивний по злиттю FIG-ROS1 НДРЛ, крім інших позитивних по злиттю ROS1 НДРЛ. У цьому документі більш детально описані способи виявлення та діагностики таких розладів. Лікування вказаних розладів може бути покращено за допомогою введення терапевтично ефективного кількості фармацевтичної композиції, що містить сполуку Формули I або малатну сіль сполуки Формули I, або іншу фармацевтично прийнятну сіль сполуки Формули I, зокрема, в конкретному варіанті реалізації, сполука Формули I, що являє собою сполуку 1 або малатну сіль сполуки 1, пацієнту, у якого ідентифікована або діагностовано захворювання, пов'язане із злиттям ROS1, таке як позитивний по злиттю SLC34A2-ROS1 НДРЛ, позитивний по злиттю CD74-ROS1 НДРЛ і позитивний по злиттю FIG-ROS1 НДРЛ.

[00124] В іншому аспекті сполуку Формули I або її фармацевтично прийнятну сіль вводять пацієнту для попередження або лікування раку легень. У деяких з таких варіантів реалізації вказаний спосіб включає введення пацієнту, який потребує цього, композиції, що містить щонайменше один інгібітор химерного білка ROS1, щонайменше один інгібітор химерного гена ROS1, що кодує химерний білок, щонайменше один інгібітор гена, що кодує ROS1, або їх комбінації в якості активного інгредієнта.

ROS1 і партнери по злиттю SLC34A2, CD74 і FIG

[00125] Білок ROS1, білок SLC34A2, білок CD74 і білок FIG, злиття SLC34A2-ROS1 або злиття CD74-ROS1; або злиття FIG-ROS1, або іноді просто звані "химерний білок і нуклеїнові кислоти ROS1", включаючи способи виявлення, діагностики, набори для виявлення та діагностики, способи скринінгу, способи лікування та попередження, а також різні терапевтичні способи лікування пацієнтів з раком легень, способи вимірювання ефективності лікування та інші фармацевтичні інгредієнти можуть бути використані в комбінації з різними способами лікування, описаними нижче.

[00126] Білок ROS1 являє собою "сирітську" трансмембранну рецепторну тирозинкіназу. Білок кінази ROS1 людини (який кодується геном ROS1) являє собою рецепторну тирозинкіназу довжиною 2347 амінокислот, яка схильна до аберантної експресії, що приводить до раку. Опис повнорозмірної кінази ROS1 людини (з амінокислотною послідовністю білка ROS1 людини) представлено в UniProt з номером доступу P08922 (Е. С. - 2.7.10.1). Як показано в таблиці 1, сигнальний пептид, позаклітинні, трансмембранні і кіназні домени ROS1 виявлені в наступних амінокислотних залишки в SEQ ID NO: 1

[00127] Таблиця 1 Амінокислотні залишки і домени білка ROS1 в SEQ ID NO: 1 Сигнальний пептид 1-27 Позаклітинний домен 28-1859 Трансмаембранний домен 1860-1882 Кіназний домен 1945-2222

Білок

Таблиця 1

Домен	Амінокислотні залишки в SEQ ID NO: 1
Сигнальний пептид	1-27
Позаклітинний домен	28-1859
Трансмембранний домен	1860-1882
Кіназний домен	1945-2222

[00128] Білок ROS1 людини може кодуватися людським геном ROS1, розташованим в 6 хромосомі людини. С-кінцевий домен білка ROS1 може містити амінокислотну послідовність, кодовану полінуклеотидом з 31^{го} 32^{го}, або 34^{го} екзона до останнього екзону (наприклад, 32^й 34^й екзон) або його фрагментом гена ROS1. С-кінцевий домен білка ROS1 може містити послідовно щонайменше близько 100 амінокислот від стартового положення 31^{го} 32^{го} екзона. Наприклад, С-кінцевий домен білка ROS1 може містити послідовно від близько 100 до близько 700 амінокислот, послідовно від близько 200 до близько 600 амінокислот або послідовно від близько 250 до близько 500 амінокислот, або послідовно від близько 270 до близько 425 амінокислот, або послідовно від близько 270 до близько 450 амінокислот, або послідовно від близько 475 до близько 625 амінокислот від стартового положення 32го екзона (довга форма) або 34^{го} екзона (коротка форма) в бік С-кінця білка ROS1¹. Передбачуваний точковий розрив білка ROS1 відбувається у 1750 або 1852-1853 амінокислоти для химерних білків SLC34A2-ROS1 і химерних білків CD74-ROS1, та у 1880-1881 амінокислоти для химерних білків FIG-ROS1.

[00129] В одному ілюстративному варіанті реалізації людський ген SLC34A2, що кодує людський білок SLC34A2 (мПНК NM_001177998), локалізован у 4 хромосомі людини (4p15.2) і містить 13 екзонів, та має близько 690 амінокислот у довжину. Білок, який кодується вказаним геном, являє собою рН-чутливий натрійзалежний транспортер фосфату. Дефекти в вказаному гені є причиною альвеолярного мікролітіазу легень. Для цього гена встановлені три транскриптивні варіанти, що кодують дві різні ізоформи. Білок SLC34A2 може бути отриманий з організму ссавця, такого як людина. N-кінцевий домен химерного білка SLC34A2-ROS1 може містити амінокислотну послідовність, кодовану полінуклеотидом з першого екзона по 12-й екзон, або з першого екзона по четвертий екзон, або з першого екзона по другий екзон гена SLC34A2. Останні екзони, що спостерігаються в структурі гена SLC34A2 мають передбачувані точкові розриви в положеннях 429 і 2076. N-кінцевий домен химерного білка SLC34A2-ROS1 може містити послідовно щонайменше близько 30-250 амінокислот з 1^{го} положення (тобто щонайменше амінокислотна послідовність з 1^{го} по 250^е положення, або її фрагменти) білка SLC34A2. N-кінцевий домен химерного білка SLC34A2-ROS1 може містити послідовно від близько 30 до 250 амінокислот, послідовно від близько 30 до 225 амінокислот, послідовно від 40 до 200 амінокислот або послідовно від близько 40 до 175 амінокислот з 1^{го} амінокислотного положення білка SLC34A2.

[00130] В одному ілюстративному варіанті реалізації злиття SLC34A2-ROS1 являє собою хромосомну транслокацію між людськими хромосомами 6 і 4, яка гібридизує 3'-область ROS1 з 5'-областю SLC34A2. Химерний білок виявляють і підтверджують за допомогою різних способів, відомих фахівцям у цій галузі техніки або описаних у цьому документі. У деяких варіантах реалізації сполуку Формули I або її фармацевтично прийнятну сіль потім вводять пацієнту, який цього потребує, для запобігання або лікування раку легень. У деяких варіантах реалізації пацієнту, який потребує в цьому, вводять композицію, що містить щонайменше один інгібітор злиття SLC34A2-ROS1, щонайменше один інгібітор химерного гена SLC34A2-ROS1, що кодує химерний білок, щонайменше один інгібітор гена, що кодує ROS1, або їх комбінацію, в якості активного інгредієнта.

[00131] У химерному білку SLC34A2-ROS1 злиття або область злиття може бути розташована між різними екзонами гена SLC34A2 і гена ROS1. Фахівцям у цій галузі техніки відомі численні злиття. Приклади таких злиттів включають 2^й та/або 4^й екзон гена SLC34A2 та 32^й (довгий, L) та/або 34^й екзон (короткий, S) гена ROS1, який називають точкою злиття або точковим розривом. Відомі інші злиття або точкові розриви ROS1 і SLC34A2, і вони представлені в каталозі соматичних мутацій при раку COSMIC, в базі даних версії 68, на сторінці cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/. Термін "область злиття" може ставитися до фрагменту полінуклеотиду (близько 10-30 нуклеотидів) або до фрагменту поліпептиду (близько 5-30 амінокислот) навколо точки злиття.

[00132] Злиття CD74-ROS1 являє собою хромосомну транслокацію з участю ROS1 між людськими хромосомами 5 і 6, яка гібридизує 3'-область ROS1 з 5'-областю CD74. Химерний білок виявляють і підтверджують за допомогою різних способів, відомих фахівцям у цій галузі техніки або описаних у цьому документі. N-кінцевий домен химерного білка CD74-ROS1 може містити амінокислотну послідовність, кодовану полінуклеотидом з першого екзона по 12-й екзон, або з першого екзона по четвертий екзон, або з першого екзона по другий екзон гена CD74. N-кінцевий домен химерного білка CD74-ROS1 може містити послідовно щонайменше близько 30-250 амінокислот з 1го положення (тобто щонайменше амінокислотна послідовність з 1^{го} по 250^е положення, або її фрагменти) білка CD74. N-кінцевий домен химерного білка CD74-ROS1 може містити послідовно від близько 30 до 250 амінокислот, послідовно від близько 30 до 225

амінокислот, послідовно від 40 до 200 амінокислот або послідовно від близько 40 до 210 амінокислот з 1го амінокислотного положення білка CD74.

[00133] У химерному білку CD74-ROS1 злиття або область злиття може знаходитися між різними екзонами гена CD74 і гена ROS1. Фахівцям у цій галузі техніки відомі численні злиття. Приклади таких злиттів CD74-ROS1 включають 6-й екзон гена CD74, злитий з 32-им або 34-им екзоном гена ROS1, який називають точкою злиття або точковим розривом. Інші злиття або точкові розриви ROS1 і CD74 відомі і представлені в каталозі соматичних мутацій при раку COSMIC, в базі даних версії 68, на сторінці cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/. Термін "область злиття" може відноситися до фрагменту полінуклеотиду (близько 10-30 нуклеотидів) або до фрагменту поліпептиду (близько 5-30 амінокислот) навколо точки злиття.

[00134] Химерний білок FIG-ROS1 утворюється в результаті внутрішньохромосомної делеції в людській хромосомі 6, яка гібридизує 5'-область FIG (також відомого як GOPC) з 3'-областю ROS1. Злиття FIG-ROS1 ідентифіковані в зразках, отриманих від пацієнтів з холангіокарциномою та раком яєчників, з частотою 8,7 % і 0,5 %, відповідно. Химерний білок FIG-ROS1 може бути виявлений та підтверджений за допомогою різних способів, відомих фахівцям у цій галузі техніки або описаних у цьому документі. N-кінцевий домен химерного білка FIG-ROS1 може містити послідовно щонайменше близько 150-500 амінокислот з 1^{го} положення (тобто щонайменше амінокислотна послідовність з 1^{го} по 500^е положення, або її фрагменти) білка FIG. N-кінцевий домен химерного білка FIG-ROS1 може містити послідовно від близько 150 до близько 500 амінокислот, послідовно від близько 200 до близько 450 амінокислот, послідовно від близько 220 до 425 амінокислот або послідовно від близько 220 до близько 420 амінокислот, або їх фрагменти з 1го амінокислотного положення білка FIG.

[00135] У химерному білку FIG-ROS1 злиття або область злиття може знаходитися між різними екзонами гена FIG і гена ROS1. Фахівцям у цій галузі техніки відомі деякі злиття FIG-ROS1. Приклади таких злиттів включають 4^й або 8^й екзон гена FIG, гібридизований з 35-м або 36-м екзоном білка ROS1, який називають точкою злиття або точковим розривом. Відомі інші злиття або точкові розриви ROS1 і FIG, і вони представлені в каталозі соматичних мутацій при раку COSMIC, в базі даних версії 68, на сторінці cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/. Термін "область злиття" може відноситися до фрагменту полінуклеотиду (близько 10-30 нуклеотидів) або до фрагменту поліпептиду (близько 5-30 амінокислот) навколо точки злиття.

[00136] Інші партнери злиття ROS1 можуть включати TPM3, SDC4, EZR і LRIG3, крім злиттів SLC34A2, CD74 і FIG, докладно описаних у цьому документі. (Див. фіг. 1 в цьому документі і, наприклад, 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. September 2012 1; 18(17): 4570-4579, зміст вказаних описів, щодо химерних білків ROS1, включено у цей документ у повному обсязі.

[00137] В одному з варіантів реалізації химерний білок ROS1 згідно з цим винаходом містить C-кінцевий домен людського білка ROS1 (наприклад, людського ROS1, представленого в SEQ ID NO. 1), що забезпечує функціональний кіназний домен, який складається по суті з близько 50-300 амінокислот, розташованих послідовно, починаючи з амінокислоти, що відповідає стартовому положенню 32^{го} екзона білка ROS1, і в бік C - кінця білка ROS1.

[00138] У цьому контексті номер екзона відповідає номеру екзона, присвоєному Національним центром біотехнологічної інформації (NCBI), очолюваним Національним інститутом охорони здоров'я, Бетесда, штат Меріленд, США. У деяких ілюстративних варіантах реалізації химерний білок SLC34A2-ROS1 може мати будь-яку амінокислотну послідовність, визначену таким центром NCBI. Нуклеотидні послідовності молекул ДНК і амінокислотні послідовності білків, що кодуються молекулами ДНК, можуть бути визначені за допомогою автоматичного секвенатора ДНК або автоматичного секвенатора пептидів. (Нуклеотидні або амінокислотні) послідовності, визначені такими автоматичними засобами секвенування, можуть містити приватну похибку порівняно з реальними послідовностями. В цілому, послідовності, визначені автоматичним секвенуванням, можуть мати ідентичність послідовностей щонайменше близько 90 %, щонайменше 20 близько 95 %, щонайменше близько 99 % або щонайменше близько 99,9 % порівняно з реальними послідовностями. Отже, химерний білок, химерний ген або химерна область може мати амінокислотну послідовність або нуклеотидну послідовність, що має ідентичність щонайменше близько 90 %, щонайменше близько 95 %, щонайменше близько 99 % або щонайменше близько 99,9 % у порівнянні з послідовностями,

ідентифікованими центром NCBI.

[00139] Для спрощення наступний опис відноситься до химерного білка ROS1 SLC34A2-ROS1, але він також може відноситися до інших химерних білків ROS1, описаних у цьому документі. Ілюстративний химерний білок SLC34A2-ROS1 у деяких варіантах реалізації може складатися з 80-200 N-кінцевих амінокислотних залишків білка SLC34A2 і щонайменше 300 C-кінцевих залишків ROS1, переважно 300-500 C-кінцевих амінокислотних залишків. Химерний ген має домен протеїнтирозинкінази разом з гелікальними доменами. Не обмежуючись будь-якої теорії, вважають, що третинна конформація химерного білка SLC34A2-ROS1 включає гомодимеризацію, яка активує онкогенний домен протеїнтирозинкінази за допомогою автофосфорилування. У підсумку, химерний ген SLC34A2-ROS1 може бути в значній мірі експресован, а потім димерізований після трансляції, обумовленої SLC34A2. Потім димерізований протеїнтирозинкіназний домен ROS1 може бути патологічно стимульований, що полегшує стимуляцію онкогенного каскаду, наприклад, як у випадку раку легень НДРЛ, пов'язаного зі злиттям ROS1.

[00140] Після виявлення злиття воно стає відомим як химерний ген SLC34A2-ROS1, що кодує химерний білок SLC34A2-ROS1. У цьому документі описан спосіб забезпечення інформації для діагностики раку легень, що включає стадію виявлення злиття у випробуваному зразку, отриманому від суб'єкта. При діагностиці проводять порівняння химерного гена, що кодує химерний білок; і надекспресію ROS1 в порівнянні зі стандартним зразком, отриманим від особи, яка не страждає на рак, де при виборі і виявленні у випробуваному зразку щонайменше одного елемента суб'єкта ідентифікують як того, що належить до однієї або усіх наступних груп: пацієнт, який страждає на рак; пацієнт, який страждає на рак легень; пацієнт, який страждає раком легень НДРЛ; пацієнт, який страждає НДРЛ, пов'язаним зі злиттям ROS1; та/або пацієнт, який страждає НДРЛ, пов'язаним зі злиттям SLC34A2-ROS1.

[00141] Делеція, інверсія або транслокація у 6 хромосомі може бути виявлена за допомогою полінуклеотиду (зонда), здатного до гібридизації (комплементарного зв'язування) з областю делеції, інверсії або транслокації в 6 хромосомі людини, і/або праймерної пари, здатної до виявлення делеції, інверсії або транслокації у 6 хромосомі людини, наприклад, здатної утворювати полінуклеотидний фрагмент, що має 100-200 послідовних нуклеотидів, які містять область інверсії в 6 хромосомі людини. Химерний білок, химерний ген і химерна область описаю в цьому документі. В ілюстративному варіанті реалізації химерний білок також може бути виявлений за допомогою виявлення наявності химерного білка або химерного гена, або мПНК, відповідної химерному гену, наприклад, за допомогою ROS1-специфічних або специфічних по злиттю ROS1 антитіл, відомих у цій області техніки і описаних у цьому документі.

[00142] Наявність химерного білка може бути виявлена за допомогою загального аналізу, в якому вимірюють взаємодію між химерним білком і матеріалом (наприклад, антитілом або аптамером), який специфічно зв'язується химерним білком. Загальний аналіз може являти собою імунохроматографію, імуногістохімічне фарбування, твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA), радіоімунологічний аналіз (RIA), імуноферментний аналіз (ІФА), флуоресцентний імунологічний аналіз (FIA), люмінесцентний імунологічний аналіз (LIA), вестерн-блоттинг, сортування флуоресцентно-активованих клітин (FACS) і т. п.

[00143] Крім того, наявність химерного гена або мПНК може бути виявлена за допомогою загального аналізу, такого як ПЛП, FISH (флуоресцентна гібридизація in situ) і т.п., за допомогою полінуклеотиду, здатного до гібридизації (комплементарного зв'язування) з химерним геном або мПНК. FISH більш докладно описана нижче. Химерний ген може бути виявлений і/або підтверджений за допомогою методів інтеграції загального транскриптомного (ПНК) та/або загального геномного секвенування ДНК за допомогою технологій масового паралельного секвенування. Полінуклеотид, здатний до гібридизації з химерним геном або мПНК, може являти собою міПНК, олігонуклеотид, зонд ДНК або праймер ДНК, який може виявляти химерний ген або мПНК шляхом безпосередньої гібридизації зі злитим або усіченим геном або транскриптом у зразку, що випробовується.

[00144] У додаткових варіантах реалізації в способах згідно цього винаходу використовують флуоресцентну гібридизацію in situ (FISH) (як описано в Verma et al. Human Chromosomes: A Manual Of Basic Techniques, Pergamon Press, Нью-Йорк, штат Нью-Йорк (1988)). Аналіз FISH може бути здійснен за допомогою одного або більше наборів зондів, нижче представлені варіанти реалізації: (1) перший набір зонда, який являє собою перший набір зонда, націлений на хромосомний сайт, який містить ген ROS1 (перший хромосомний сайт); він складається з зонда 1А, міченого першою флуоресцентною речовиною, і зонда 1В, міченого другою флуоресцентною речовиною; зонд 1А є комплементарним першій області, яка являє собою 5'-

область у вищезгаданому першому хромосомному сайті, зонд 1В є комплементарним другій області, яка знаходиться на відстані від вищезгаданої першої області і являє собою 3'-область у вищезгаданому першому хромосомному сайті, і точковий розрив у гені ROS1, якщо химерний ген SLC34A2-ROS1 утворений в результаті транслокації між генами SLC34A2 і ROS1, розташований на 3'-кінці вищевказаної першої області, між вищевказаними першою і другою областями, або на 5'-кінці вищевказаної другої області; (2) другий набір зонда, який являє собою другий набір зонда, націлений на хромосомний сайт, який містить ген SLC34A2 (другий хромосомний сайт); він складається з зонда 2А, міченого першою флуоресцентною речовиною, і зонда 2В, міченого другою флуоресцентною речовиною; зонд 2А є комплементарним першій області, яка являє собою 5'-область у вищевказаному другому хромосомному сайті, зонд 2В є комплементарним другій області, яка знаходиться на відстані від вищевказаної першої області і являє собою 3'-область у вищевказаному другому хромосомному сайті, і точковий розрив у гені SLC34A2, якщо химерний ген SLC34A2-ROS1 утворений в результаті транслокації між генами SLC34A2 і ROS1, розташований на 3'-кінці вищевказаної першої області, між вищевказаною першою і другою областями або на 5'-кінці вищевказаної другої області; (3) третій набір зонда, що складається з вищевказаного зонда 2А і вищевказаного зонда 1В; і (4) четвертий набір зонда, що складається з зонда 4А, який є комплементарним хромосомному сайту, містить ген ROS1 (третій хромосомний сайт), і зонда 4В, який є комплементарним хромосомному сайту, що містить ген SLC34A2 (четвертий хромосомний сайт).

[00145] Довжина вищевказаного першого хромосомного сайту може становити 0,5-2,0 мегабаз. Довжина вищевказаного другого хромосомного сайту може становити 0,5-2,0 мегабаз. Довжина вищевказаного третього хромосомного сайту може становити 0,5-2,0 мегабаз. Довжина вищевказаного четвертого хромосомного сайту може становити 0,5-2,0 мегабаз.

[00146] У деяких варіантах реалізації аналіз FISH може корелювати з іншими фізичними технологіями хромосомного картування і даними генетичної карти. Технологія FISH загальновідома (див., наприклад, патент США № 5756696; 5447841; 5776688; і 5663319). Приклади даних генетичної карти представлені в публікації Genome Issue of Science, 1994 (265: 1981f). Кореляція між локалізацією гена, що кодує білок ROS1 та/або, у разі химерних поліпептидів ROS1, гена, що кодує партнера по злиттю химерного білка ROS1 (наприклад, гена FIG, гена SLC34A2 або гена CD74), і фізичною хромосомною картою і конкретним захворюванням або схильністю до конкретного захворювання може полегшувати визначення меж області ДНК, пов'язаної з конкретним генетичним захворюванням. Нуклеотидні послідовності відповідно до цього винаходу можуть бути використані для виявлення різниці в генних послідовностях між нормальними індивідуумами, індивідуумами-носіями або ураженими індивідуумами.

[00147] In situ гібридизація хромосомних препаратів і технології фізичного картування, такі як аналіз груп зчеплення за допомогою встановлених хромосомних маркерів, можуть бути використані для розширення генетичних карт. Найчастіше розташування гена в хромосомі іншого ссавця вигляду, такого як миші, може виявляти асоційовані маркери навіть якщо номер або плече конкретної людської хромосоми невідомі. Нові послідовності можуть бути віднесені до хромосомних плеч або їх частин за допомогою фізичного картування. Це забезпечує цінну інформацію для дослідників, які виробляють пошук генів захворювань за допомогою позиційного клонування або інших технологій відкриття генів. Після грубої локалізації захворювання або синдрому за генетичним зв'язком з певною геномною областю, наприклад, від АТ до 11q22-23 (Gatti et al., Nature 336: 577-580 (1988)), будь-які послідовності, картовані на вказаній області, можуть являти собою асоційовані або регуляторні гени для додаткового дослідження. Нуклеотидні послідовності, що кодують злиття ROS1 відповідно до цього винаходу, або їх частини, також можуть бути використані для виявлення відмінностей у хромосомній локалізації внаслідок транслокації, інверсії і т.д., між нормальними індивідуумами, індивідуумами-носіями або ураженими індивідуумами.

[00148] Слід розуміти, що всі способи (наприклад, ПЛР та FISH), які виявляють полінуклеотиди, що кодують поліпептид з активністю кінази ROS1 (наприклад, повнорозмірний ROS1 або химерні полінуклеотиди ROS1, такі як SLC34A2-ROS1, або CD74-ROS1, або FIG-ROS1(S)), можуть бути об'єднані з іншими способами, які виявляють поліпептиди з активністю кінази ROS1 або полінуклеотиди, що кодують поліпептид з активністю кінази ROS1. Наприклад, виявлення химерного білка FIG-ROS1 у генетичному матеріалі біологічного зразка (наприклад, FIG-ROS1 циркулюючий в крові пухлинної клітини) може бути продовжено аналізом вестерн-блот або імуногістохімічним (IHC) аналізом білків зразка для визначення того, чи дійсно полінуклеотид FIG-ROS1 експресується в біологічному зразку як химерний білок FIG-ROS1. Вказані аналізи вестерн-блот або IHC можуть бути здійснені із застосуванням антитіла, яке

специфічно зв'язується з поліпептидом, що кодується виявленим полінуклеотидом FIG-ROS1, або вказані аналізи можуть бути здійснені із застосуванням антитіл, які специфічно зв'язуються з повнорозмірним FIG (наприклад, зв'язуються з N-кінцем білка) або з повнорозмірним ROS1 (наприклад, зв'язуються з епітопом у кіназному домені ROS1). Такі аналізи відомі в цій області техніки (див., наприклад, патент США № 7468252).

[00149] В іншому прикладі технологія CISH компанії Dako забезпечує можливість хроматогенної *in situ* гібридизації з імуногістохімією на одному тканинному зрізі. Див. Elliot et al., Br J Biomed Sci 2008; 65(4): 167-171, 2008, де представлено порівняння CISH і FISH.

[00150] В іншому аспекті цього винаходу представлений спосіб діагностики пацієнта з раком легень або з підозрою на рак легень, обумовлений кіназою ROS1. Вказаний спосіб включає приведення в контакт біологічного зразка вказаного раку легень або передбачуваного раку легень (причому біологічний зразок містить щонайменше одну молекулу нуклеїнової кислоти) з зондом, який гібридується в жорстких умовах з молекулою нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид з активністю кінази ROS1, такий як повнорозмірний полінуклеотид ROS1 або химерний полінуклеотид ROS1 (наприклад, химерний полінуклеотид FIG-ROS1, химерний полінуклеотид SLC34A2-ROS1 або химерний полінуклеотид CD74-ROS1), при цьому гібридизація вказаного зонда із щонайменше однією молекулою нуклеїнової кислоти в вказаному біологічному зразку забезпечує ідентифікацію вказаного пацієнта як того, що має рак легень або підозрюваний рак легень, обумовлений кіназою ROS1.

[00151] В іншому аспекті цього винаходу представлений спосіб діагностики пацієнта який страждає на рак легень або імовірно страждає на рак легень, обумовлений кіназою ROS1. Вказаний спосіб включає приведення в контакт біологічного зразка вказаного раку легень або передбачуваного раку легень (причому вказаний біологічний зразок містить щонайменше один поліпептид) з реагентом, який специфічно зв'язується з поліпептидом з активністю кінази ROS1 (наприклад, химерний поліпептид FIG-ROS1, химерний поліпептид SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1), при цьому специфічне зв'язування вказаного реагенту з щонайменше одним химерним поліпептидом у вказаному біологічному зразку забезпечує ідентифікацію вказаного пацієнта як того, який має рак легень або підозрюваний рак легень, обумовлений кіназою ROS1.

[00152] У різних варіантах реалізації ідентифікація раку легень або передбачуваного раку легень, обумовленого кіназою ROS1, забезпечує визначення того, що пацієнт, який має рак легень або підозрюваний рак легень, ймовірно відповідає на ROS1-інгібуючий терапевтичний засіб.

[00153] Набір для виявлення транслокацій між генами SLC34A2 і ROS1 може містити один або більше наборів зондів. (1) Перший набір зондів містить зонд 1A, мічений першою флуоресцентною сполукою, і зонд 1B, мічений другою флуоресцентною сполукою; зонд 1A є комплементарним першій області, яка являє собою 5'-область у вищевказаному першому хромосомному сайті, зонд 1B є комплементарним другій області, яка знаходиться на деякій відстані від вищевказаної першої області і являє собою 3'-область у вищевказаному першому хромосомному сайті, і точковий розрив в гені ROS1, якщо химерний ген SLC34A2-ROS1 утворений в результаті транслокації між генами SLC32A2 і ROS1, розташований в 3'-хвості вищевказаної першої області, між вищевказаною першою і другою областями, або в 5'-хвості вищевказаної другої області; (2) другий набір зондів, який являє собою другий набір зондів, націлений на хромосомний сайт, який містить ген SLC32A2 (другий хромосомний сайт); складається з зонда 2A, міченого першою флуоресцентною сполукою, і зонда 2B, міченого другою флуоресцентною сполукою; зонд 2A є комплементарним першій області, яка являє собою 5'-область у вищевказаному другому хромосомному сайті, зонд 2B є комплементарним другій області, яка знаходиться на деякій відстані від вищевказаної першої області і являє собою 3'-область у вищевказаному другому хромосомному сайті, і точковий розрив в гені SLC32A2, якщо химерний ген SLC34A2-ROS1 утворений в результаті транслокації між генами SLC32A2 і ROS1, розташований в 3'-хвості вищевказаної першої області, між вищевказаною першою і другою областями, або в 5'-хвості вищевказаної другої області; (3) третій набір зондів, що складається з вищевказаного зонда 2A і вищевказаного зонда 1B; і четвертий набір зондів, що складається з зонда 4A, який є комплементарним хромосомному сайту, що містить ген ROS1 (третій хромосомний сайт), і зонда 4B, який є комплементарним хромосомному сайту, що містить ген SLC32A2 (четвертий хромосомний сайт).

[00154] Набір, придатний для ідентифікації пацієнтів, схильних до транслокації SLC34A2-ROS1, містить один або більше елементів, вибраних з групи, що містить пояснення щодо застосування зондів, контрастного барвника ДНК, буфера для застосування при гібридизації, інкапсулюючого агента і контрольного слайда. Набір забезпечує можливість зручної та ефективного реалізації способу згідно з цим винаходом. Набір може містити, в якості необхідних

елементів (незамінних інгредієнтів), вищевказаний перший набір зондів, другий набір зондів, третій набір зондів або четвертий набір зондів. У набір також можуть бути включені два або більше типів наборів зондів. Наприклад, набір може містити перший набір зондів і третій набір зондів. Оскільки докладний опис кожного набору зондів описано вище, їх повторне опис не наводиться.

[00155] Виявлення наявності або відсутності химерного полінуклеотида SLC34A2-ROS1 може бути здійснено безпосередньо з застосуванням геномної ДНК, яка кодує вищевказаний химерний поліпептид, або транскрипту з вказаної геномної ДНК, а також може бути здійснено опосередковано із застосуванням продукту трансляції із вказаного транскрипту (вищевказаного химерного поліпептиду).

[00156] Оскільки геномна ДНК, яка кодує химерний поліпептид, утворена в результаті інверсії між областю розміром 117,61-117,75 мегабаз 6 хромосоми, (6q22), то явище згідно з цим винаходом може бути виявлено як "виявлення наявності або відсутності химерного полінуклеотиду SLC34A2-ROS1". При виявленні такої інверсії, наприклад, може бути виявлено розщеплення між 5'-боковою областю, розташованою проти ходу транскрипції від кодуючої області кіназного домену гена ROS1, 3'-боковою областю, розташованою по ходу транскрипції від вказаної кодуючої області гена ROS1, або може бути виявлено розщеплення між областю, яка кодує частини або повні спіральні домени і 5'-боковою областю, розташованою проти ходу транскрипції від вказаної кодуючої області гена SLC32A2, 3'-боковою областю, розташованою по ходу транскрипції від вказаної кодуючої області спіральних доменів гена SLC34A2.

[00157] Технології, відомі досвідченим фахівцям, можуть бути використані для "виявлення наявності або відсутності химерного полінуклеотиду SLC34A2-ROS1" відповідно до цього винаходу. Якщо об'єктом є "геномна ДНК, яка кодує вищезгаданий химерний поліпептид", тоді може бути використана, наприклад, *in situ* гібридизація (ISH) із застосуванням флуоресценції або подібне, геномна ПЛР, пряме секвенування, Саузерн-блоттінг або мікроматричний аналіз генома. Якщо об'єктом є "транскрипт з вищезгаданої геномної ДНК", то може бути використана, наприклад, ЗТ-ПЛР, пряме секвенування, нозерн-блоттінг, дот-блоттінг або мікроматричний аналіз кДНК.

[00158] Набір згідно з цим винаходом також може містити інші елементи. Приклади вказаних інших елементів являють собою технічні умови щодо застосування зондів, контрастний барвник ДНК, таких як DAPI, буфер для гібридизації, промивний буфер, розчинники, заливочне середовище, контрольні слайди, реакційні посудини та інше обладнання. Також можуть бути включені специфікації для діагностичних цілей. Крім того, можуть бути включені також специфікації тощо, які вказують способи налаштування виявлення (позитивної ідентифікації) транслокації SLC34A2-ROS1 у зразках хромосом, отриманих від онкологічних пацієнтів, у вказаних пацієнтів із застосуванням інгібітора кінази ROS1. Крім того, може бути включений також план визначення курсу лікування і пояснення вказаного плану.

[00159] Передбачені відносно довгі зонди (від приблизно 200 кілобаз (зонд 1A) до приблизно 1370 кілобаз (зонд 4B)). Таким чином, комплементация між зондами і цільовими послідовностями необов'язково повинна бути строго обмежуючою, до тієї міри, в якій досягається специфічна гібридизація, передбачувана у цьому винаході. Приклад подібності між цільовими послідовностями становить щонайменше 90 %, переважно щонайменше 95 %, і більш переважно щонайменше 98 %.

[00160] У разі застосування першого набору зондів і другого набору зондів, у хромосомних зразках, в яких має місце транслокація між геном SLC34A2 і геном ROS1, поділяють і виявляють окремо два флуоресцентних сигнали; в хромосомних зразках, в яких не відбувається транслокація, два флуоресцентних сигнали зазвичай спостерігають як такі, що відбуваються один за іншим, або спостерігають сигнал (жовтий), який являє собою комбінацію двох флуоресцентних сигналів. Таким чином, наявність або відсутність транслокації між геном SLC34A2 і геном ROS1 відображено в характері флуоресцентного сигналу. Отже, транслокація між геном SLC34A2 і геном ROS1 може бути визначена за характером флуоресцентного сигналу.

[00161] Рішення щодо вищевказаного явища переважно і зазвичай приймають на підставі порівняння результату з контролем (контрольним зразком). У цьому контексті контроль являє собою хромосомний зразок, отриманий від пацієнта з недрібноклітинним раком легень, або хромосомний зразок, отриманий від пацієнта, який демонструє передпухлинний стан. Крім того, в якості контролю можуть бути використані хромосомні зразки, отримані від пацієнта з передпухлинним станом, хромосомні зразки, отримані від пацієнтів, що не мають раку, або хромосомні зразки, взяті у нормальних здорових суб'єктів. В якості контролю також можуть бути використані хромосомні зразки, отримані з клітин штамів.

[00162] Якщо химерний ген являє собою химерний ген SLC34A2-ROS1, що кодує химерний білок SLC34A2-ROS1, то химерний ген SLC34A2-ROS1 (або будь-який інший химерний ген ROS1, наприклад, CD74-ROS1 і FIG-ROS1) може бути виявлений за допомогою полінуклеотиду (зонда), здатного до гібридизації (комплементарного зв'язування) з химерною областю та/або
 5 праймерною парою, здатною до утворення фрагмента полінуклеотиду, який має 100-200 послідовних нуклеотидів, що містить химерну область. Крім того, в одному ілюстративному варіанті реалізації химерний білок SLC34A2-ROS1 може бути виявлений за допомогою антитіла або аптамеру який специфічно зв'язується з химерною областю химерного білка SLC34A2-ROS1.

10 [00163] Крім того, виявлення може бути здійснено за допомогою аналізу злиття, який являє собою комбінацію методу хромогенної *in situ* гібридизації (CISH) і методу *in situ* гібридизації зі сріблом (SISH). "Точка злиття" у тексті цього опису ставиться до точки, в якій частина, утворена з відповідних генів SLC34A2, гібридизована з частиною, утвореною з гена ROS1.

15 [00164] Термін "здатна до гібридизації з химерною областю (або областю інверсії)" може відноситися до наявності комплементарної послідовності або послідовності, що має ідентичність послідовностей щонайменше 90 % з послідовністю химерної області (або області інверсії). В іншому варіанті реалізації представлена композиція для діагностики раку, що містить один або більше елементів, вибраних з групи, що складається з полінуклеотиду, здатного до
 20 гібридизації з химерною областю, праймерної пари, здатної до утворення полінуклеотидного фрагмента, що містить 100-200 послідовних нуклеотидів, які містять химерну область. Також полінуклеотид, здатний до гібридизації з областю інверсії в 6 хромосомі людини, праймерна пара, здатна до утворення полінуклеотидного фрагмента, що містить 100-200 послідовних нуклеотидів, які містять область інверсії 6 хромосоми людини, і антитіло або аптамер, які зв'язується з химерною областю. В іншому варіанті реалізації представлено застосування
 25 химерного білка та/або химерного гена для діагностики раку. Пацієнт може являти собою будь-якого ссавця, наприклад, примата, такого як людина або мавпа, гризуна, такого як миша або пацюк, зокрема, людини. Випробуваний зразок, що підходить для застосування в будь-яких згаданих аналізах, може являти собою клітину (наприклад, клітину легень); тканину (наприклад, легеневу тканину; рідину організму (наприклад, кров); циркулюючу пухлинну ДНК, циркулюючі
 30 пухлинні клітини. Зразки можуть бути зібрані будь-яким способом, відомим фахівцям у цій області техніки, включаючи отримання в результаті хірургічної біопсії пухлини, кор-біопсії пухлини, тонкоголкової аспірації пухлини, плеврального ексудату та інших відомих способів виділення клітин і тканин з організму пацієнта. Наприклад, на циркулюючих пухлинних клітинах може бути проведений аналіз FISH (описаний в цьому документі).

35 [00165] Пацієнт може проходити лікування або мати заплановане лікування інгібітором кінази. Випробуваний зразок може містити клітину, отриману з ракової клітини людини або її екстракту.

40 [00166] В іншому варіанті реалізації представлений химерний ген, що кодує химерний білок, причому ген, що кодує N-кінцевий домен партнера по злиттю, розташований на 5'-кінці, а ген, що кодує C-кінцевий домен білка ROS1, розташований на 3'-кінці. В одному ілюстративному варіанті реалізації, якщо химерний білок являє собою білок SLC34A2-ROS1, химерний ген може бути представлений як ген SLC34A2-ROS1, причому ген, що кодує N-кінцевий домен SLC34A2, розташований на 5'-кінці, а ген, що кодує C-кінцевий домен білка ROS1, розташований на 3'-кінці.

45 [00167] В іншому варіанті реалізації представлений експресійний вектор, що містить химерний ген і необов'язково транскрипційні елементи (наприклад, промотор і т.п.), функціонально зв'язані з химерним геном. В іншому варіанті реалізації представлена клітина-трансформант, трансформована експресійним вектором.

50 [00168] Біологічні зразки, отримані під час лікування або діагностики (біопсійні зразки і т.д.) найчастіше фіксують у формаліні, і в цьому випадку застосування *in situ* гібридизації є переважним, оскільки геном ДНК, який є об'єктом виявлення, стабільний при фіксації у формаліні і оскільки чутливість виявлення є високою.

55 [00169] При *in situ* гібридизації геномна ДНК, яка кодує химерний поліпептид SLC34A2-ROS1 в біологічному зразку, може бути виявлена гібридизацією полінуклеотиду за пунктом (а) або (b), описаного нижче, який має ланцюг довжиною щонайменше 15 нуклеотидних основ:

(а) полінуклеотид, який являє собою щонайменше один зонд, обраний із групи, що складається з зондів, які гібридизуються з полінуклеотидом, який кодує білок SLC34A2, і зондів, які гібридизуються з полінуклеотидом, який кодує білок ROS1

60 (b) полінуклеотид, який являє собою зонд, який гібридизується з сайтом злиття полінуклеотиду, що кодує білок SLC34A2, і полінуклеотиду, що кодує білок ROS1.

[00170] При *in situ* гібридизації геномна ДНК, яка кодує химерний поліпептид CD74-ROS1 в біологічному зразку може бути виявлена гібридизацією полінуклеотиду за пунктом (а) або (b), описаного нижче, який має ланцюг довжиною щонайменше 15 основ:

(а) полінуклеотид, який являє собою щонайменше один зонд, обраний із групи, що складається з зондів, які гібридизуються з полінуклеотидом, який кодує білок CD74, і зондів, які гібридизуються з полінуклеотидом, який кодує білок ROS1

(b) полінуклеотид, який являє собою зонд, який гібридизується з сайтом злиття полінуклеотиду, що кодує білок CD74, і полінуклеотиду, що кодує білок ROS1.

[00171] При *in situ* гібридизації геномна ДНК, яка кодує химерний поліпептид FIG-ROS1 в біологічному зразку може бути виявлена гібридизацією полінуклеотиду за пунктом (а) або (b), описаного нижче, який має ланцюг довжиною щонайменше 15 основ:

(а) полінуклеотид, який являє собою щонайменше один зонд, обраний із групи, що складається з зондів, які гібридизуються з полінуклеотидом, який кодує білок FIG, і зондів, які гібридизуються з полінуклеотидом, який кодує білок ROS1

(b) полінуклеотид, який являє собою зонд, який гібридизується з сайтом злиття полінуклеотиду, що кодує білок FIG, і полінуклеотиду, що кодує білок ROS1.

[00172] Однак послідовність ДНК гена може мутувати в природних умовах (тобто не штучним чином). Відповідно, такі природні варіанти також можуть бути об'єктом цього винаходу (аналогічним чином тут і далі).

[00173] Полінуклеотид, вказаний в пункті (а) цього винаходу, може бути будь-яким, за умови, що він може виявляти наявність геномної ДНК, яка кодує вищезгаданий химерний білок ROS1 в біологічному зразку, за допомогою гібридизації з полінуклеотидом, який кодує партнера по зв'язуванню ROS1, тобто білок SLC34A2, CD74 або FIG, або з полінуклеотидом, який кодує білок ROS1, які є цільовими послідовностями основ вказаного полінуклеотиду. Переважно, він являє собою полінуклеотид, вказаний нижче в пунктах (a1)-(a4).

[00174] (a1) Комбінація полінуклеотиду, який гібридизується з областю, що кодує частини або повний спіральний домен екзонів 1-2 і 5'-боковою областю, розташованою проти ходу транскрипції від вказаної кодуючої області гена SLC34A2 (тут і далі згаданого також як "5' SLC34A2 зонд 1"), і полінуклеотиду, який гібридизується з областю, що кодує кіназний домен та 3'-боковою областю, розташованою по ходу транскрипції від вказаної кодуючої області гена ROS1 (тут і далі згаданого також як "3' ROS1 зонд 1").

[00175] (a2) Комбінація полінуклеотиду, який гібридизується з 5'-боковою областю, розташованою проти ходу транскрипції від вказаної кодуючої області кіназного домену гена ROS1 (тут і далі згаданого також як "5' ROS1 зонд 1"), і полінуклеотиду, який гібридизується з областю, що кодує кіназний домен та 3'-боковою областю, розташованою по ходу транскрипції вказаної кодуючої області гена ROS1 (тут і далі згаданого також як "3' ROS1 зонд 1").

[00176] (a3) Комбінація полінуклеотиду, який гібридизується з областю, яка кодує фібронектин III типу 9 і 5'-боковою областю, розташованою проти ходу транскрипції вказаної від вказаної області гена ROS1 (тут і далі згаданого також як "5' ROS1 зонд 2"), і полінуклеотиду, який гібридизується з областю, яка кодує трансмембранний домен та 3'-боковою областю, розташованою по ходу транскрипції від вказаної кодуючої області гена ROS1 (тут і далі згаданого також як "3' ROS1 зонд 2").

[00177] (a4) Комбінація полінуклеотиду, який гібридизується з областю, що кодує частини або повний спіральний домен і 5'-боковою областю, розташованою проти ходу транскрипції від вказаної кодуючої області гена SLC34A2 (тут і далі згаданого також як "5' SLC34A2 зонд 1"), і полінуклеотиду, який гібридизується з областю, що кодує суперспіральний домен та 3'-боковою областю, розташованою по ходу транскрипції від вказаної кодуючої області гена SLC34A2 (тут і далі згаданого також як "3' SLC34A2 зонд 1").

[00178] Область (цільова послідовність основ), з якої гібридизується полінуклеотид за пунктом (a1), що використовується в *in situ* гібридизації, переважно являє собою область в межах 1000000 основ від сайту злиття гена SLC34A2 і гена ROS1, що обумовлено міркуваннями специфічності до цільової послідовності основ і чутливості виявлення, а область, з якої гібридизується полінуклеотиди по пунктах (a2)-(a4), що використовуються в *in situ* гібридизації, переважно являють собою область в межах 1000000 основ від точкового розриву в гені SLC34A2 або гені ROS1, з тих же причин.

[00179] Полінуклеотид, вказаний вище в пункті (а) або (b), що використовується в *in situ* гібридизації, переважно являє собою колекцію, складену з безлічі типів поліпептидів, яка може охоплювати всі вищезгадані цільові послідовності основ, що обумовлено міркуваннями специфічності до цільової послідовності основ і чутливості виявлення. У цьому випадку довжина полінуклеотидів, які утворюють колекцію, становить щонайменше 15 основ і переважно від 100

до 1000 основ.

[00180] Полінуклеотид, вказаний вище в пунктах (а) або (b), що використовується в *in situ* гібридизації, переважно є міченим флуоресцентним барвником або подібним чином для виявлення. Приклади таких флуоресцентних барвників включають DEAC, FITC, R6G, TexRed і Су5, але не обмежуються ними. Крім флуоресцентного барвника, вищезгаданий полінуклеотид може також бути міченим барвником (хромогеном), таким як DAB, або сріблом і подібним чином, заснованим на ферментативному осадженні металу.

[00181] При *in situ* гібридизації, при використанні 5' SLC34A2 зонда 1 і 3' ROS1 зонда 1, або при використанні 5' ROS1 зонда 1 і 3' ROS1 зонда 1, або при використанні 5' ROS1 зонда 2 і 3' ROS1 зонда 2, або при використанні 5' SLC34A2 зонда 1 і 3' SLC34A2 зонда 1, бажано, щоб вказані зонди були міченими взаємнопротилежними барвниками. При проведенні *in situ* гібридизації з застосуванням комбінації зондів, мічених описаним чином різними барвниками, якщо сигнал, створюваний міткою 5' SLC34A2 зонда 1 (наприклад, флуоресцентний), і сигнал, створюваний міткою 3' ROS1 зонда 1, перекриваються, може бути встановлено, що виявлена геномна ДНК, що кодує химерний поліпептид SLC34A2-ROS1. З іншого боку, якщо сигнал, створений міткою 5' ROS1 зонда 1, і сигнал, створений міткою 3' ROS1 зонда 1, розщеплюються, або сигнал, створений міткою 5' ROS1 зонда 2, і сигнал, створений міткою 3' ROS1 зонда 2, розщеплюються, або сигнал, створений міткою 5' SLC34A2 зонда 1, і сигнал, створений міткою 3' SLC34A2 зонда 1, розщеплюються, може бути встановлено, що виявлена геномна ДНК, що кодує химерний поліпептид SLC34A2-ROS1.

[00182] Мічення полінуклеотиду може бути здійснено за допомогою відомої технології. Наприклад, основа підкладки, мічене флуоресцентним барвником або подібним чином за допомогою нік-трансляції або випадкового праймування, може бути впроваджено в полінуклеотид з отриманням міченого полінуклеотиду. При *in situ* гібридизації умови, що використовуються для гібридизації полінуклеотиду, вказаного вище у пункті (а) чи (b), і вищезгаданого біологічного зразка, можуть змінюватись в залежності від різних факторів, таких як довжина релевантного полінуклеотиду, однак одним із прикладів жорстких умов гібридизації є 0,2 xSSC, 65 °C, а прикладом нежорстких умов гібридизації є 2,0 xSSC, 50 °C. Слід зазначити, що умови гібридизації з таким самим ступенем суворості, як вищевказані умови, можуть бути досягнуті фахівцями в цій області техніки за допомогою відповідного вибору різних умов, таких як концентрація солі (ступінь розведення SSC) і температура, а також концентрація поверхнево-активної речовини (NP-40 і т. д.), концентрація формаміду і pH. Наприклад, для загальних умов гібридизації для проведення скринінгу, забезпечують полінуклеотидні композиції, здатні до гібридизації в помірних-дуже жорстких умовах з полінуклеотидною послідовністю, наведеною в цьому документі, або її частиною, або її комплементарною послідовністю. Технології гібридизації є загальновідомими в галузі молекулярної біології. Для ілюстративних цілей, відповідні помірно жорсткі умови для випробування гібридизації полінуклеотиду згідно з цим винаходом з іншими полінуклеотидами включають попереднє промивання в розчині 5X SSC, 0,5 % SDS, 1,0 mM ЕДТК (pH 8,0); гібридизацію при 50 °C-60 °C, 5X SSC, протягом ночі; з подальшим дворазовим промиванням при 65 °C протягом 20 хвилин кожним з розчинів 2X, 0,5 X, 0,2 X SSC, що містять 0,1 % SDS. Фахівцям у цій галузі техніки зрозуміло, що жорсткість гібридизації можна легко регулювати, наприклад, зміною змісту солі в розчині гібридизації та/або температури, при якій проводять гібридизацію. Наприклад, в іншому варіанті реалізації відповідні жорсткі умови гібридизації включають умови, описані вище, за винятком підвищення температури гібридизації, наприклад, до 60-65 °C або 65-70 °C.

[00183] Приклади способів виявлення геномної ДНК, яка кодує химерний поліпептид SLC34A2-ROS1, із застосуванням полінуклеотиду, вказаного вище у пункті (а) або (b), відмінні від вищевказаних способів *in situ* гібридизації, являють собою Саузерн-блоттінг, нозерн-блоттінг і дот-блоттінг. У вказаних способах вищезгаданий химерний ген виявляють за допомогою гібридизації в помірних-дуже жорстких умовах поліпептиду, вказаного вище у пункті (а) або (b), з мембраною, на якій транскрибован екстракт нуклеїнової кислоти, отриманий з вищевказаного біологічного зразка. При використанні полінуклеотида (а) може бути встановлено, що виявлена геномна ДНК, яка кодує химерний поліпептид SLC34A2-ROS1, якщо поліпептид, який гібридизується з полінуклеотидом, який кодує білок SLC34A2, і поліпептид, який гібридизується з полінуклеотидом, який кодує білок ROS1, розпізнають одну і ту ж смугу, що проявилася на мембрані.

[00184] Мікроматричний аналіз генома і мікроматричний аналіз ДНК являють собою додаткові способи виявлення геномної ДНК, яка кодує химерний поліпептид SLC34A2-ROS1, із застосуванням описаного вище полінуклеотиду за пунктом (b). У вказаних способах матрицю полінуклеотидів з пунктом (b) фіксують на підкладці, і релевантну геномну ДНК виявляють

приведенням в контакт біологічного зразка з полінуклеотидами в матриці. При ПЛР або секвенуванні полінуклеотида за пунктом (с), описаного нижче, можуть бути використані для специфічної ампліфікації частини або повного химерного полінуклеотиду SLC34A2-ROS1, із застосуванням ДНК (геномної ДНК, кДНК) або РНК, отриманої з біологічного зразка у вигляді матриці. (с) Полінуклеотид, який являє собою пару праймерів, призначених для утворення скндвічевої структури з сайту злиття полінуклеотиду, що кодує білок SLC34A2, і полінуклеотиду, що кодує білок ROS1. "Полінуклеотид, який являє собою пару праймерів" являє собою набір праймерів, з яких один праймер гібридується з полінуклеотидом, що кодує білок SLC34A2, а інший праймер гібридується з полінуклеотидом, що кодує білок ROS1, у послідовності основ, такий як вищезгаданий химерний полінуклеотид, який служить мішенню. Довжина вказаних полінуклеотидів зазвичай становить від 15 до 100 основ і переважно від 17 до 30 основ.

[00185] 3 точки зору точності і чутливості виявлення методом ПЛР, полінуклеотид, вказаний в пункті (с) відповідно до цього винаходу, переважно являє собою послідовність, комплементарну послідовності основ вищевказаного химерного полінуклеотиду в межах 5000 основ від сайту злиття полінуклеотиду, що кодує білок SLC34A2, і полінуклеотиду, що кодує білок ROS1.

[00186] "Полінуклеотид, який являє собою пару праймерів" може бути відповідним чином спроектований за допомогою відомих технологій, заснованих на послідовності основ химерного полінуклеотиду SLC34A2-ROS1, який слугує мішенню. Переважні приклади "полінуклеотиду, який являє собою пару праймерів", являють собою набори праймерів, що складається з одного праймера, вибраного з групи, що складається з SLC34A2-ROS1-F1, SLC34A2-int15-F1, SLC34A2-int15-F2, SLC34A2-ex16-F1, SLC34A2-ex23-F1, SLC34A2-ex24-F1, SLC34A2-F-orf2438 і SLC34A2-int15-F3.5, і одного праймера, вибраного з групи, що складається з SLC34A2-ROS1-R1, ROS1-int11-R3, ROS1-int7-R1, ROS1-int11-R0.5, ROS1-int11-R1, ROS1-int7-R2 і ROS1-R-orf2364. Більш переважно, він являє собою SLC34A2-ROS1-F1 і SLC34A2-ROS1-R1, SLC34A2-int15-F1 і SLC34A2-ROS1-R1, SLC34A2-int15-F2 і ROS1-int11-R3, SLC34A2-ex16-F1 і SLC34A2-ROS1-R1, SLC34A2-ex23-F1 і SLC34A2-ROS1-R1, або праймер SLC34A2-ex24-F1 і праймер ROS1-int7-R1.

[00187] У деяких варіантах реалізації цього винаходу представлені способи: ідентифікації, оцінки або виявлення злиття SLC34A2-ROS1; способи ідентифікації, визначення, оцінки та/або лікування суб'єкта, який страждає від раку, наприклад, раку, який має злиття SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 або FIG-ROS1; виділення молекул нуклеїнових кислот SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 або FIG-ROS1, конструктів нуклеїнових кислот, клітин-хазяїв, що містять вказані молекули нуклеїнових кислот; очищених поліпептидів SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 або FIG-ROS1 і зв'язуючих агентів; реагентів виявлення (наприклад, зондів, праймерів, антитіл, наборів, здатних, наприклад, до специфічного виявлення нуклеїнових кислот або білків SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 або FIG-ROS1); аналізів скринінгу для ідентифікації молекул, які взаємодіють, наприклад, інгібують злиття 5'SLC34A2-3'ROS1, 5'CD74-3'ROS1 або 5'FIG-3'ROS1, наприклад, нових інгібіторів кінази; а також аналізи та набори для визначення, ідентифікації, оцінки та/або лікування суб'єкта, який страждає від раку, наприклад, раку, який має одне або більше злиттів SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 або FIG-ROS1. Композиції і способи, які описані в цьому документі, можуть бути використані, наприклад, для ідентифікації нових інгібіторів SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 або FIG-ROS1; для визначення, ідентифікації або вибору суб'єкта, наприклад, пацієнта, що страждає від раку; і для лікування або попередження раку.

[00188] Молекули нуклеїнових кислот SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 і FIG-ROS1. В одному аспекті цей винахід відноситься до молекули нуклеїнової кислоти (наприклад, виділеної або очищеної), яка містить фрагмент гена SLC34A2, або CD74, або FIG і фрагмент протоонкогена ROS1. В одному варіанті реалізації молекула нуклеїнової кислоти містить злиття, наприклад, внутрішньорабоче злиття щонайменше одного екзона SLC34A2, CD74 або FIG і екзона ROS1 (наприклад, одного або більше екзонів, які кодують домен тирозинкінази ROS1 або його фрагмент).

[00189] В ілюстративному варіанті реалізації молекула нуклеїнової кислоти 5'SLC34A2-3'ROS1 містить достатню послідовність SLC34A2 і достатню послідовність ROS1, так що кодоване злиття 5'SLC34A2-3'ROS1 має конститутивну активність кінази, наприклад, має підвищену активність, наприклад, активність кінази, порівняно з ROS1 дикого типу, наприклад, у клітині раку, згаданого в цьому документі. В одному з варіантів реалізації злиття, кодоване 5'SLC34A2-3'ROS1 містить щонайменше 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 або 11 екзонів з SLC34A2 і щонайменше 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12 або 13 екзонів ROS1. В одному з варіантів реалізації кодований химерний поліпептид 5'SLC34A2-3'ROS1 містить спіральний домен або його функціональний фрагмент і домен тирозинкінази ROS1 або його функціональний фрагмент.

[00190] В ілюстративному варіанті реалізації молекула нуклеїнової кислоти 5'CD74-3'ROS1 містить достатню послідовність CD74 і достатню послідовність ROS1, так що кодоване злиття 5'CD74-3'ROS1 має конститутивну активність кінази, наприклад, має підвищену активність, наприклад, активність кінази, порівняно з ROS1 дикого типу, наприклад, у клітині раку, згаданого в цьому документі. В одному з варіантів реалізації кодоване злиття 5'CD74-3'ROS1 містить щонайменше 1, 2, 3, 4, 5, 6 екзонів з CD74 і щонайменше 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12 або 13 екзонів ROS1. В одному з варіантів реалізації кодований химерний поліпептид 5'CD74-3'ROS1 містить спіральний; сигнально-якірний домен для II типу мембранного білка або його функціональний фрагмент, і домен тирозинкінази ROS1 або його функціональний фрагмент.

[00191] В ілюстративному варіанті реалізації молекула нуклеїнової кислоти 5'FIG-3'ROS1 містить достатню послідовність ROS1 і достатню послідовність FIG, так що кодоване злиття 5'FIG-3'ROS1 має конститутивну активність кінази, наприклад, має підвищену активність, наприклад, активність кінази, порівняно з ROS1 дикого типу, наприклад, у клітині раку, згаданого в цьому документі. В одному з варіантів реалізації кодоване злиття 5'FIG-3'ROS1 містить щонайменше 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 або 8 екзонів з FIG і щонайменше 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12 або 13 екзонів ROS1. В одному з варіантів реалізації кодований химерний поліпептид 5'FIG-3'ROS1 містить суперспіральний домен або його функціональний фрагмент і домен тирозинкінази ROS1 або його функціональний фрагмент.

[00192] В одному з варіантів реалізації молекула химерної нуклеїнової кислоти SLC34A2-ROS1 містить нуклеотидну послідовність, яка має внутрішньорамочне злиття ексона 2 і/або 4 SLC34A2 з екзоном 32 та/або 34, та/або 35 ROS1. В іншому варіанті реалізації молекула нуклеїнової кислоти містить нуклеотидну послідовність, яка містить точковий розрив. Наприклад, злиття SLC34A2-ROS1 може містити внутрішньорамочне злиття щонайменше ексона 4 SLC34A2 або його фрагмента (наприклад, екзонів 1-4 SLC34A2 або його фрагмента) з щонайменше екзоном 32 та/або 34 ROS1 або його фрагментом (наприклад, екзони 30-43 ROS1 або його фрагменти). В деяких варіантах реалізації злиття SLC34A2-ROS1 знаходиться в конфігурації від 5'-SLC34A2 до 3'-ROS1. В одному з варіантів реалізації молекула нуклеїнової кислоти містить нуклеотидну послідовність екзонів 1-4 гена SLC34A2 або його фрагмента. В іншому варіанті реалізації молекула нуклеїнової кислоти містить нуклеотидну послідовність екзонів 30-43, наприклад, 32 та/або 34, та/або 35 гена ROS1 або його фрагмента, або послідовність, по суті ідентичну їй.

[00193] В одному з варіантів реалізації молекула химерної нуклеїнової кислоти CD74-ROS1 містить нуклеотидну послідовність, яка має внутрішньорамочне злиття екзонів 1-6 CD74 з екзоном 32 та/або 34 ROS1. В іншому варіанті реалізації молекула нуклеїнової кислоти містить нуклеотидну послідовність, яка містить точковий розрив. Наприклад, злиття CD74-ROS1 може містити внутрішньорамочне злиття щонайменше ексона 6 CD74 або його фрагмента (наприклад, екзонів 1-6 CD74 або його фрагмента) з щонайменше екзоном 32 та/або 34, та/або 35 ROS1 або його фрагментом (наприклад, екзони 30-43 ROS1 або його фрагменти). У деяких варіантах реалізації злиття CD74-ROS1 знаходиться в конфігурації від 5'-CD74 до 3'-ROS1. В одному з варіантів реалізації молекула нуклеїнової кислоти містить нуклеотидну послідовність екзонів 1-6 гена CD74 або його фрагмента. В іншому варіанті реалізації молекула нуклеїнової кислоти містить нуклеотидну послідовність екзонів 30-43, наприклад, 32 та/або 34, та/або 35 гена ROS1 або його фрагмента, або послідовність, по суті ідентичну їй.

[00194] В одному з варіантів реалізації молекула химерної нуклеїнової кислоти FIG-ROS1 містить нуклеотидну послідовність, яка має внутрішньорамочне злиття екзонів 1-8, наприклад, 1-4 або 1-8 FIG з екзоном 32 та/або 34, та/або 35 ROS1. В іншому варіанті реалізації молекула нуклеїнової кислоти містить нуклеотидну послідовність, яка містить точковий розрив. Наприклад, злиття FIG-ROS1 може містити внутрішньорамочне злиття щонайменше ексона 4 та/або ексона 8 FIG або його фрагмента (наприклад, екзонів 1-4 або 1-8 FIG або його фрагмента) з щонайменше екзоном 32 та/або 34, та/або 35 ROS1 або його фрагмента (наприклад, екзони 30-43 ROS1 або його фрагменти). У деяких варіантах реалізації злиття FIG-ROS1 знаходиться в конфігурації від 5'-CD74 до 3'-ROS1. В одному з варіантів реалізації молекула нуклеїнової кислоти містить нуклеотидну послідовність екзонів 1-6 гена CD74 або його фрагмента. В іншому варіанті реалізації молекула нуклеїнової кислоти містить нуклеотидну послідовність екзонів 30-43, наприклад, 32 та/або 34, та/або 35 гена ROS1 або його фрагмента, або послідовність, по суті ідентичну їй.

[00195] В інших варіантах реалізації молекула химерної нуклеїнової кислоти SLC34A2-ROS1 містить нуклеотидну послідовність, що кодує химерний поліпептид SLC34A2-ROS1, який містить фрагмент гена SLC34A2 і фрагмент протоонкогена ROS1. В одному з варіантів реалізації нуклеотидна послідовність кодує химерний поліпептид SLC34A2-ROS1, який містить спіральний

домен або його функціональний фрагмент і домен тирозинкінази ROS1 або його функціональний фрагмент.

[00196] В іншому варіанті реалізації молекула химерної нуклеїнової кислоти CD74-ROS1 містить злиття CD74-ROS1, яке містить зчленування злиття між транскриптом ROS1 і транскриптом CD74. В іншому варіанті реалізації молекула нуклеїнової кислоти містить злиття, наприклад, внутрішньорабоче злиття, щонайменше екзона 32, або 34 або 35 ROS1 або його фрагмента (наприклад, екзони 30-43 ROS1 або його фрагменти) і щонайменше екзона 1 або його фрагмента (наприклад, екзони 1-6 CD74 або його фрагменти). У деяких варіантах реалізації злиття CD74-ROS1 знаходиться в конфігурації від 5'-CD74 до 3'-ROS1. В одному з варіантів реалізації молекула нуклеїнової кислоти містить нуклеотиди, відповідні екзонам 30-43 гена ROS1, наприклад, екзонам 32, 34 або 35 або його фрагменту, або послідовність, по суті ідентичну їм.

[00197] В іншому варіанті реалізації молекула химерної нуклеїнової кислоти FIG-ROS1 містить злиття FIG-ROS1, яке містить зчленування злиття між транскриптом ROS1 і транскриптом FIG. В іншому варіанті реалізації молекула нуклеїнової кислоти містить злиття, наприклад, внутрішньорабоче злиття, щонайменше екзона 32, або 34 або 35 ROS1 або його фрагмента (наприклад, екзони 30-43 ROS1 або його фрагмента) і щонайменше екзона 4 або 8, або його фрагмента (наприклад, екзони 1-8 FIG або його фрагменти). У деяких варіантах реалізації злиття FIG-ROS1 знаходиться в конфігурації від 5'-FIG до 3'-ROS1. В одному з варіантів реалізації молекула нуклеїнової кислоти містить нуклеотиди, відповідні екзонам 30-43 гена ROS1, наприклад, екзонам 32, 34 або 35 або його фрагменту, або послідовність, по суті ідентичну їм.

[00198] У спорідненому аспекті даний винахід відноситься до конструктів нуклеїнової кислоти, які містять молекули химерних нуклеїнових кислот SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 і FIG-ROS1, описані в цьому документі. У деяких варіантах реалізації молекули нуклеїнових кислот функціонально зв'язані з нативною або гетерологічною регуляторною послідовністю. Включені також вектори і клітини-хазяї, які містять молекули нуклеїнової кислоти SLC34A2-ROS1, описані в цьому документі, наприклад, вектори і клітини-хазяї, придатні для отримання молекул нуклеїнових кислот і поліпептидів, описаних у цьому документі.

[00199] В іншому аспекті цей винахід відноситься до молекул нуклеїнових кислот, які знижують або інгібують експресію нуклеїнової кислоти, що кодує злиття SLC34A2-ROS1, як описано в цьому документі. Приклади таких молекул нуклеїнових кислот включають, наприклад, антисмислові молекули, рибозими, PTKi, потрійні спіральні молекули, які гібридизуються з нуклеїновою кислотою, що кодує SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 і FIG-ROS1 або транскрипційну регуляторну область SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 і FIG-ROS1, і блокують або знижують експресію мРНК SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 або FIG-ROS1.

[00200] Цей винахід відноситься також до молекули нуклеїнової кислоти, наприклад, до фрагмента нуклеїнової кислоти, придатного в якості зонда, праймера, затравки або бібліотечного елемента, який містить, фланкує, гібридизується з і підходить для ідентифікації або іншим чином заснований на злиттях ROS1, описаних у цьому документі. У деяких варіантах реалізації зонд, праймер або затравкова молекула являє собою олігонуклеотид, що забезпечує можливість захоплення, виявлення або виділення молекули химерної нуклеїнової кислоти ROS1, описаної в цьому документі. Олігонуклеотид може містити нуклеотидну послідовність, по суті комплементарну фрагменту молекул химерних нуклеїнових кислот ROS1, описаних у цьому документі. Ідентичність послідовностей між фрагментом нуклеїнової кислоти, наприклад, олігонуклеотидом, і цільової послідовністю злиття ROS1 не обов'язково повинна бути точною, за умови, що вказані послідовності досить комплементарні для забезпечення можливості захоплення, виявлення або виділення цільової послідовності. В одному з варіантів реалізації фрагмент нуклеїнової кислоти являє собою зонд або праймер, який містить олігонуклеотид довжиною від близько 5 до 25, наприклад, від 10 до 20 або від 10 до 15 нуклеотидів. В інших варіантах реалізації фрагмент нуклеїнової кислоти являє собою затравку, яка містить олігонуклеотид довжиною від близько 100 до 300 нуклеотидів, від 130 до 230 нуклеотидів, від 150 до 200 нуклеотидів, від 200 до 350, від 350 до 950, від 300 до 600, від 500 до 1000, від 750 до 2000 нуклеотидів, і не обов'язково містить химерні нуклеїнові кислоти ROS1.

[00201] В одному з варіантів реалізації фрагмент нуклеїнової кислоти може бути використаний для ідентифікації або захоплення, наприклад, за допомогою гібридизації, злиття SLC34A2-ROS1 або злиття CD74-ROS1, або злиття FIG-ROS1. В ілюстративному прикладі фрагмент нуклеїнової кислоти може являти собою зонд, праймер для застосування при ідентифікації або захопленні, наприклад, за допомогою гібридизації в помірних-дуже жорстких умовах, злиття SLC34A2-ROS1 або злиття CD74-ROS1, або злиття FIG-ROS1, описаного в

цьому документі. В одному з варіантів реалізації фрагмент нуклеїнової кислоти може бути використаний для ідентифікації або захоплення точкового розриву SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1, або FIG-ROS1. В одному ілюстративному варіанті реалізації фрагмент нуклеїнової килсоти гібридизується з нуклеотидною послідовністю в межах хромосомної перебудови, яка

5 призводить до внутрішньорамочного злиття екзона 4 або 13 SLC34A2 з екзоном 32, 34 або 35 ROS1 (наприклад, послідовність у межах транслокації на 6 хромосомі).

[00202] Зонди або праймери, описані в цьому документі, можуть бути використані, наприклад, для FISH виявлення або ПЛР-ампліфікації, або для підтвердження за допомогою 3Т-ПЛР перебудов ROS1 та ідентифікації партнерів по зв'язуванню. В одному ілюстративному

10 варіанті реалізації, в якому виявлення засноване на ПЛР, ампліфікація зчленувань злиття SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1, або FIG-ROS1 може бути здійснена за допомогою праймера або пари праймерів, наприклад, для ампліфікації послідовності, яка фланкує зчленування злиття SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1, або FIG-ROS1, описані в цьому документі, наприклад,

15 мутації або зчленування хромосомної перебудови, описаної в цьому документі. В одному з варіантів реалізації пара виділених олігонуклеотидних праймерів може ампліфікувати область, що містить або розташована поруч з положенням злиття SLC34A2-ROS1. Наприклад, прямі праймери можуть бути призначені для гібридизації з нуклеотидною послідовністю в межах геномної або мПНК послідовності SLC34A2, CD74 або FIG. В різних варіантах реалізації праймери до ROS1, SLC34A2 і FIG (різні види, включаючи людину) є у продажу у компанії

20 Qiagen (кат. № QF0018545, QF00449078 і QF00278992 Qiagen, Гейтерсберг, штат Меріленд, США). В інших варіантах реалізації підтвердження наявності химерних полінуклеотидів ROS1 може бути проведено на зразках пухлини пацієнта із застосуванням панелі праймерів ПЛР, що містить прямі праймери екзона 4 SLC34A2 і екзона 6 CD74, спарені зі зворотними праймерами екзона 32 і екзона 34 ROS1. ПНК зразка з пухлини може бути витягнута з тканини FFPE за

25 способом Agencourt Formapure (Agencourt Biosciences, Беверлі, штат Массачусетс, США) і зворотнотранскрибована за допомогою набору для синтезу кДНК Superscript III, наявного в продажу у компанії Invitrogen, Карлсбад, Каліфорнія, США. Для визначення точкових розривів SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1 можуть бути використані наступні праймери: SLC34A2 екзон 4, пряма послідовність TCGGATTTCTCTACTTTTCGTG (SEQ ID NO:3); CD74 екзон 6, зворотна

30 послідовність CTCCTGTTTGAAATGAGCAGG (SEQ ID NO:4); ROS1 екзон 32, зворотна послідовність GGAATGCCTGGTTTATTTGG (SEQ ID NO:5); і ROS1 екзон 34, зворотна послідовність TGAAACTTGTCTGGTATCCAA (SEQ ID NO:6). ПЛР-ампліфікації можуть бути здійснені в будь-якому термоциклері ПЛР, наприклад, Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, Гамбург, Німеччина), із застосуванням Taq-полімерази Platinum (Invitrogen) у

35 стандартних умовах з 40 нг кДНК. кДНК прослідковували за допомогою набору BigDye 3.0 kit (Life Technologies, Карлсбад, Каліфорнія).

[00203] Фрагмент нуклеїнової кислоти може бути видимий чином позначений, наприклад, радіоактивною міткою, флуоресцентною міткою, біолюмінесцентною міткою, хемолюмінесцентною міткою, ферментною міткою, міткою, яка зв'язує пари або може містити афінну мітку; або міткою, або ідентифікатором (наприклад, адаптором, штрихкодом або іншим ідентифікатором послідовності).

[00204] В іншому ілюстративному варіанті реалізації спосіб визначення наявності злиття SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1, або FIG-ROS1 включає: безпосереднє одержання інформації про наявність молекули химерної нуклеїнової кислоти або поліпептиду SLC34A2-ROS1 або

45 CD74-ROS1, або FIG-ROS1 в зразку, отриманому від суб'єкта. Зразок може являти собою зразок, що складається з рідини, клітин, тканин, наприклад, пухлинної тканини, він може містити зразок нуклеїнової кислоти, зразок білка, біопсію пухлини або циркулюючу пухлинну клітину або нуклеїнову кислоту, він може бути вибраний з раку легень, включаючи НДПЛ, SCLC, SCC або їх комбінацію, і аденокарценому або меланому.

[00205] Спосіб виявлення злиття SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1, або FIG-ROS1 в молекулі нуклеїнової кислоти за допомогою будь-якого з наступних способів: аналіз гібридизації нуклеїнової кислоти, аналізи на основі ампліфікації, аналіз ПЛР-ПДРФ, 3Т-ПЛР, секвенування, скринінговий аналіз, FISH, спектральне каріотипування або MFISH, порівняльна геномна гібридизація), in situ гібридизація, SSP, BEPX або мас-спектрометричні генотипування.

[00206] Описаний спосіб виявлення химерного поліпептиду або білка SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1, або FIG-ROS1, що включає приведення в контакт зразка білка з реагентом, який специфічно зв'язується з химерним поліпептидом SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1, або FIG-ROS1; і виявлення утворення комплексу химерного поліпептиду SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1, або FIG-ROS1 вказаного реагенту. Способи виявлення поліпептиду включають

60 застосування реагенту, міченого виявленою групою, для полегшення виявлення зв'язаного і

незв'язаного реагенту, причому реагент являє собою молекулу антитіла, при цьому рівень або активність злиття SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1, або FIG-ROS1 підвищена, де злиття SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1, або FIG-ROS1 виявляють до початку, під час або після лікування суб'єкта, при цьому злиття SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1, або FIG-ROS1 виявляють у певному інтервалі, наприклад, у першій точці часу і щонайменше в одній подальшій точці часу.

[00207] Включені також реакції на лікування, зокрема в яких використано сприйнятливий до виявлення наявності злиття SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1, або FIG-ROS1 один або більше з наступних елементів: (1) поділ групи пацієнтів; (2) ідентифікація або вибір суб'єкта який ймовірно або мало ймовірно відповідає на лікування; (3) вибір варіанта лікування; та/або (4) прогнозування часової динаміки захворювання у суб'єкта.

[00208] Виділена або очищена молекула нуклеїнової кислоти, яка кодує злиття SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1, або FIG-ROS1 або його фрагмент, що містить точковий розрив, може бути використаний з метою підтвердження і прямого специфічного лікування позитивного по злиттю ROS1 раку НДРЛ і аденокарциноми легень із застосуванням сполук згідно з цим винаходом. Інші конструкти можуть бути використані для прямого специфічного лікування раку, позитивного по злиттю ROS1, наприклад, НДРЛ з перебудованим ROS1, включаючи: виділену або очищену молекулу химерної нуклеїнової кислоти SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1, або FIG-ROS1, функціонально зв'язану з нативною або гетерологічною регуляторною послідовністю. Виділений або очищений вектор, що містить молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує злиття SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1, або FIG-ROS1, або його точковий фрагмент, що містить точковий розрив. Клітину-хазяїна, що містить вектор. Молекулу нуклеїнової кислоти, яка специфічно знижує або інгібує експресію молекули нуклеїнової кислоти, яка кодує злиття SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1, або FIG-ROS1, яка може бути обрана з антисмислової молекули, рибозима, міПНК або потрійної спіральної молекули. Виділений або очищений химерний поліпептид SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1, або FIG-ROS1, або його фрагмент, що містить точковий розрив. Виділений або очищений химерний поліпептид SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1, або FIG-ROS1, який має активність кінази ROS1 та/або активність димерізації або мультимерізації. Виділену або очищену молекулу антитіла, що специфічно зв'язується з химерним поліпептидом SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1, або FIG-ROS1. Молекулу антитіла, причому вказана молекула антитіла являє собою молекулу моноспецифічного антитіла до химерного поліпептиду SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1, або FIG-ROS1.

[00209] Приклади способу виявлення продукту трансляції химерного поліпептиду SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1, або FIG-ROS1 згідно з цим винаходом являють собою імунофарбування, вестерн-блоттінг, твердофазний імуноферментний аналіз, проточну цитометрію, імунопреципітацію та матричний аналіз антитіл. У вказаних способах використовують антитіло, яке зв'язується з химерним поліпептидом SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1, або FIG-ROS1. Приклади такого антитіла являють собою антитіло, специфічне до поліпептиду, який містить сайт злиття білка SLC34A2 або CD74, або FIG і білок ROS1 (тут і далі також згадується як специфічне до сайту злиття антитіло), антитіло, яке зв'язується з поліпептидом, що складається з області С-кінцевій частині від вищезгаданого сайту злиття білка ROS1 (тут і далі також зветься "ROS1-С кінцеве антитіло") і антитіло, яке зв'язується з поліпептидом, що складається з області на N-кінцевій частині від вищезгаданого сайту злиття білка SLC34A2 або CD74, або FIG (тут і далі також згадується як SLC34A2 або CD74, або FIG-N кінцеве антитіло). У цьому контексті "специфічне до сайту злиття антитіло" означає антитіло, яке специфічно зв'язується з поліпептидом, що містить вищевказаний сайт злиття, але не зв'язується ні з білком SLC34A2 або CD74, або FIG дикого типу (нормального типу), ні з білком ROS1 дикого типу (нормального типу).

[00210] Химерний поліпептид SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1, або FIG-ROS1 може бути виявлений за допомогою вищезгаданого специфічного до сайту злиття антитіла або комбінації вищевказаного ROS1-С термінального антитіла і SLC34A2 або CD74, або FIG-N термінального антитіла. Однак оскільки в нормальних клітинах легень, наприклад, практично не виявляють експресію білка ROS1, то наявність химерного поліпептиду SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1, або FIG-ROS1 в тканині аденокарциноми легень може бути виявлено навіть при використанні тільки ROS1-С термінального антитіла при імунофарбуванні.

[00211] У різних варіантах реалізації застосування імуногістохімічного фарбування (IHC) та вестерн-блот для ідентифікації химерних поліпептидів ROS1 згідно з цим винаходом може бути здійснено із застосуванням фосфо-ROS1, антитіл ROS1, наявних у продажу у компанії Cell Signaling Technology (Денверс, штат Массачусетс, США). В одному з варіантів реалізації

ідентифікація позитивних по злиттю ROS1 ракових клітин, наприклад, клітин раку легень НДРЛ з перебудовою ROS1, може бути здійснена за допомогою кролячого анти-ROS1 моноклонального антитіла D4D6, кат. № 3287 (Cell Signaling Technology, Денверс, штат Массачусетс, США).

[00212] В деяких варіантах реалізації "антитіло, яке зв'язується з химерним поліпептидом SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1, або FIG-ROS1", може бути отримано фахівцем у цій області техніки, що вибрали відповідний відомий спосіб. Приклад таких відомих способів являє собою спосіб, в якому імунну тварину інокулюють вищевказаним поліпептидом, що складається з С-кінцевої частини білка ROS1, химерним поліпептидом SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1, або FIG-ROS1, вищезгаданий пептид складається з N-кінцевої частини білка SLC34A2 або CD74, або FIG і т.д., активуючи тим самим імунну систему тварини, а потім виділяють сироватку (поліклональне антитіло) крові тварини, і використовують способи отримання моноклональних антитіл, такі як метод гібридоми, метод рекомбінантної ДНК і метод фагового дисплею. При використанні антитіла, з яким зв'язується мічена сполука, цільовий білок може бути безпосередньо виявлений за допомогою виявлення вказаної мітки. Мічена сполука не має певного обмеження, за умови, що вона може зв'язуватися з антитілом і може бути виявлена. Приклади включають пероксидазу, β -D-галактозидазу, мікропероксидазу, пероксидазу хрону (HRP), флуоресцеїну ізотіоціанат (FITC), родаміну ізотіоціанат (RITC), лужну фосфатазу, біотин і радіоактивні сполуки. Крім того, крім способів, які забезпечують пряме виявлення цільового білка з застосуванням антитіла, з яким зв'язується мічена сполука, можуть бути використані також способи, які забезпечують непряме виявлення цільового білка із застосуванням білка G, білка A або вторинного антитіла, з яким зв'язується мічене антитіло.

[00213] При виявленні химерного полінуклеотиду або поліпептиду SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1, або FIG-ROS1 у зразку, виділеній з організму суб'єкта вищезгаданими способами, вважають, що ефективність лікування раку із застосуванням інгібіторів тирозинкінази ROS1, такого як сполука Формули I, Ia або сполука 1, або її фармацевтично прийнятної солі, буде найвищим у такого пацієнта, тоді як при відсутності виявлення наявності химерного полінуклеотиду SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1, або FIG-ROS1 вважають, що ефективність лікування раку інгібітором тирозинкінази ROS1 буде низькою у вказаного пацієнта.

[00214] Як описано вище, будь-який з полінуклеотидів, вказаних нижче у пунктах (a)-(c), що має довжину ланцюга щонайменше 15 основ, може бути переважно використаний для виявлення наявності або відсутності химерного полінуклеотиду SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1, або FIG-ROS1;

(a) полінуклеотид, який являє собою щонайменше один зонд, обраний із групи, що складається з зондів, які гібридизуються з полінуклеотидом, який кодує білок SLC34A2 або CD74, або FIG і зондів, які гібридизуються з полінуклеотидом, який кодує білок ROS1

(b) полінуклеотид, який являє собою зонд, що гібридизується з сайтом злиття полінуклеотиду, який кодує білок SLC34A2 або CD74, або FIG, і полінуклеотиду, що кодує білок ROS1;

(c) полінуклеотид, який являє собою пару праймерів, призначених для утворення сендвічевої структури з сайту злиття полінуклеотиду, що кодує білок SLC34A2 або CD74, або FIG, і полінуклеотиду, що кодує білок ROS1;

[00215] Вказані полінуклеотиди мають послідовність основ, комплементарну певній послідовності днк гена-мішені. У цьому контексті "комплементарний" може означати не повністю комплементарний, за умови, що він гібридизується, наприклад, у помірних-дуже жорстких умовах. Наприклад, вказані поліпептиди мають 80 % або більше, переважно 90 % або більше, більш переважно 95 % або більше, і найбільш переважно 100 % гомології з певною послідовністю основ.

[00216] У полінуклеотидах (a)-(c), у частини або повної ДНК або РНК нуклеотиди можуть бути заміщені штучними нуклеїновими кислотами, такими як ПНК (поліамідна нуклеїнова кислота, пептидна нуклеїнова кислота), ЗНК (торгова марка, замкнута нуклеїнова кислота, місткова нуклеїнова кислота), ЕНК (торгова марка, 2'-О, 4'-С-етилени-місткові нуклеїнові кислоти), ГНК (гліцериннуклеїнова кислота) і ТНК (треозонуклеїнова кислота).

[00217] Крім того, як описано вище, антитіло, яке зв'язується з химерним поліпептидом SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1, або FIG-ROS1, переважно використовують при виявленні продукту трансляції химерного полінуклеотиду SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1, або FIG-ROS1. Відповідно, у цьому винаході представлено лікарський засіб для визначення ефективності лікування раку інгібітором тирозинкінази ROS1, що містять вказане антитіло.

[00218] Спосіб виявлення химерного гена згідно з цим винаходом включає стадію виявлення наявності полінуклеотидів згідно з цим описом у зразку, отриманому від випробуваного суб'єкта. В якості зразка, отриманого від випробуваного суб'єкта, використовують речовини, отримані від

випробуваного суб'єкта (зразки, виділені з живого організму), зокрема, збирають будь-які типи рідини організму (переважно кров) альвеолярні і бронхіальні змиви, зразки, які піддавали біопсії та зразки флегми. Переважно використовують біопсійний зразок або зразок флегми з ураженої області легень випробуваного суб'єкта. Із зразка може бути виділена використана геномна ДНК.

Крім того, можуть бути використані її транскрипти (продукти, одержані в результаті транскрипції і трансляції геному; наприклад, мРНК, кДНК і білки). Зокрема, бажано отримувати і використовувати мРНК або кДНК.

[00219] Геномна ДНК може бути виділена відомими методами, і виділення може бути легко здійснено за допомогою наявного в продажу набори для виділення ДНК.

[00220] Стадія виявлення може бути здійснена у відповідності з відомими методами аналізу гена (наприклад, відомими методами, які зазвичай використовують у якості методів виявлення генів, такими як ПЛР, ЛЛР (лігазна ланцюгова реакція), SDA (ампліфікація з заміщенням ланцюгів), NASBA (ампліфікація на основі послідовності нуклеїнової кислоти), ICAN (ізотермічна ампліфікація нуклеїнової кислоти, яка ініціюється химерним праймером), метод LAMP (пітльова ізотермічна ампліфікація), метод TMA (система транскрипційно опосередкованої ампліфікації Gen-Probe), метод *in situ* гібридизації і мікроматричні аналізи. Наприклад, використовують технологію гібридизації, в якій в якості зонда використовують нуклеїнову кислоту, гібридизовану з полінуклеотидом, що підлягають виявленню, використовують технологію генної ампліфікації, в якій в якості праймера використовують ДНК, гібридизовану з полінуклеотидом, що підлягають виявленню, або такі способи.

[00221] Зокрема, виявлення проводять із застосуванням нуклеїнових кислот, отриманих зі зразка, отриманого від випробуваного суб'єкта, наприклад, мРНК і т. п. Кількість мРНК вимірюють методом реакції генної ампліфікації з використанням праймерів, призначених для специфічної ампліфікації послідовності полінуклеотиду, що підлягає виявленню. Праймери, використані в способі виявлення згідно з цим винаходом, або праймери, включені в набір для виявлення, не мають певного обмеження, за умови, що вказані праймери можуть специфічно ампліфікувати послідовність полінуклеотиду, що підлягає виявленню, і сконструйовані на основі послідовності основ полінуклеотиду, що підлягає виявленню. Праймери, які використовуються в методі моніторингу ампліфікації ПЛР, можуть бути спроектовані за допомогою програмного забезпечення для конструювання праймерів (наприклад, Primer Express виробництва компанії PE Biosystems) і т. п. Крім того, оскільки чим більше розмір продукту ПЛР, тим сильніше погіршується ефективність ампліфікації, необхідно конструювати смисловий праймер і антисмисловий праймер так, щоб розмір продуктів ампліфікації, одержаних при ампліфікації мРНК або кДНК, був менше 1 килобаз або менше.

[00222] Більш конкретно, смисловий праймер (5'-праймер) конструюють з частини, що кодує SLC34A2, а антисмисловий праймер (3'-праймер) конструюють з частини, що кодує ROS1. Переважно використовувати праймер, що входить в набір для виявлення згідно з цим винаходом, і більш бажано використовувати найбільш прийнятний праймер, що входить в набір для виявлення. У методі моніторингу ампліфікації ПЛР може бути сконструйована мультиплексна ПЛР для виявлення всіх химерних полінуклеотидів в одній реакційній рідині за допомогою змішування вищевказаних смислових праймерів, які відповідають відповідним генам. За допомогою методу, придатного для кожної технології ампліфікації може бути підтверджений факт наявності або відсутності ампліфікації гена-мішені (всього гена або його певної частини). Наприклад, в методі ПЛР продукти ПЛР аналізують електрофорезом в агарозному гелі і піддають фарбуванню бромідом етидію, тощо, що забезпечує можливість підтвердження отримання чи не отримання ампліфікованих фрагментів, що мають необхідний розмір. Отримання ампліфікованих фрагментів, що мають необхідний розмір, вказує на те, що полінуклеотид, що підлягає виявленню, присутній в зразку, отриманому від випробуваного суб'єкта. Таким чином, може бути виявлено наявність полінуклеотиду, що підлягає виявленню.

[00223] Спосіб виявлення химерного гена згідно з цим винаходом переважно включає стадію виявлення наявності певного полінуклеотиду в зразку, отриманому від випробуваного суб'єкта, за допомогою реакції ампліфікації гена, і стадію виявлення отримання чи не отримання ампліфікованих фрагментів, що мають необхідний розмір.

[00224] Виявлення із застосуванням технології гібридизації проводять із застосуванням, наприклад, нозерн-гібридизації, методу дот-блот, методу мікроматриць ДНК і методу захисту РНК. В якості зондів, використаних для гібридизації, може бути використаний зонд, який містить послідовності, що складаються з 16 основ, відповідно, проти ходу і по ходу транскрипції від точки злиття як центру молекули нуклеїнової кислоти, яка складається з щонайменше 32 послідовних основ, які гібридизуються з полінуклеотидом, що підлягають виявленню, або з його комплементарною спіраллю у помірних-дуже жорстких умовах (переважно в дуже жорстких

умовах), або містить їх комплементарні спіралі.

[00225] Також може бути використана технологія ампліфікації гена, така як ЗТ-ПЛР. У методі ЗТ-ПЛР метод моніторингу ампліфікації ПЛР (ПЛР в реальному часі) здійснюють під час процесу ампліфікації гена, тому наявність полінуклеотиду, що підлягає виявленню, може бути проаналізовано кількісно. Можуть бути використані методи моніторингу ампліфікації ПЛР. ПЛР у реальному часі являє собою відомий метод, і він може бути легко реалізований із застосуванням наявних у продажу і наборів інструментів для вказаного методу.

[00226] Спосіб виявлення химерного білка згідно з деякими варіантами реалізації цього винаходу включає стадію виявлення наявності певного поліпептиду в зразку, отриманому від випробуваного суб'єкта, тобто поліпептиду, кодованого полінуклеотидом, що підлягає виявленню (тут і далі званого поліпептидом, що підлягає виявленню). Така стадія виявлення може бути здійснена методом імунологічного аналізу або методом аналізу ферментної активності, який проводять за допомогою отримання солюбілізованої рідини, отриманої зі зразка, отриманого у випробуваного суб'єкта (наприклад, ракової тканин або клітин, отриманих від випробуваного суб'єкта), і змішування поліпептиду, що підлягає виявленню, що міститься у вказаній рідині, з антитілом анти-SLC34A2 або анти-CD74, або анти-FIG і антитілом анти-ROS1. Переважно, можуть бути використані технології із застосуванням моноклонального антитіла або поліклонального антитіла, специфічного до поліпептиду, що підлягає виявленню, такі як метод ферментативного імуноаналіза, імуоферментний сендвічевий метод подвійних антитіл, метод флуоресцентного імуноаналіза, радіоімунологічний метод і метод вестерн-блот.

[00227] При виявленні полінуклеотиду, що підлягає виявленню, або поліпептидів, що підлягає виявленню, способом виявлення згідно з цим винаходом у зразку, отриманому від випробуваного суб'єкта, випробуваний суб'єкт являє собою суб'єкт (пацієнта), що має рак, позитивний до вказаного нуклеотиду, і підлягає лікуванню із застосуванням інгібіторів ROS1.

[00228] Набір для виявлення згідно з цим винаходом містить щонайменше смисловий і антисмисловий праймери, які сконструйовані для специфічної ампліфікації полінуклеотиду, що підлягає виявленню, у способі виявлення відповідно до цього винаходу. Набір смислового і антисмислового праймера являє собою набір полінуклеотидів, діючих як праймери для ампліфікації полінуклеотиду, що підлягає виявленню.

[00229] В одному з варіантів реалізації набір праймерів відповідно до цього винаходу для виявлення химерного гена містить (1) набір праймерів, який містить смисловий праймер, сконструйований з частини, що кодує SLC34A2 або CD74, або FIG, і антисмисловий праймер, сконструйований з частини, що кодує ROS1, і призначений для виявлення химерного гена SLC34A2 або CD74, або FIG і гена ROS1, причому антисмисловий праймер складається з молекули нуклеїнової кислоти (переважно молекули нуклеїнової кислоти, що складається з щонайменше 16 основ), яка гібридизується з "полінуклеотидом, що підлягають виявленню" у помірних-дуже жорстких умовах (переважно в дуже жорстких умовах), а смисловий праймер складається з молекули нуклеїнової кислоти (переважно молекули нуклеїнової кислоти, яка складається з щонайменше 16 основ), яка гібридизується з комплементарною спіраллю "полінуклеотиду, що підлягає виявленню" в жорстких умовах (переважно в дуже жорстких умовах).

[00230] Такі набори праймерів (2) і (3) включені в набір праймерів як більш конкретні варіанти набору праймерів (1).

[00231] (2) Набір праймерів зі смислового праймера, який складається з олігонуклеотиду, що складається з щонайменше будь-яких 16 послідовних основ.

[00232] (3) Набір праймерів зі смислового праймера, який складається з олігонуклеотиду, що складається з щонайменше будь-яких 16 послідовних основ.

[00233] У вказаних наборах праймерів (1)-(3) інтервал між положеннями, в яких вибирають смисловий праймер і антисмисловий праймер, переважно становить 1 кілобаз або менше, або розмір продукту ампліфікації, ампліфікованого смисловим праймером і антисмисловим праймером, переважно становить 1 кілобаз або менше.

[00234] Крім того, праймер має довжину спіралі, що складає, в цілому, з 15-40 основ, переважно складається з 16-24 основ, більш переважно складається з 18-24 основ і особливо переважно складається з 20-24 основ.

[00235] Набір праймерів може бути використаний для ампліфікації та виявлення полінуклеотиду, що підлягає виявленню. Крім того, незважаючи на відсутність конкретного обмеження, відповідні праймери, включені в набір праймерів згідно з цим винаходом, можуть бути отримані, наприклад, хімічним синтезом.

[00236] Ілюстративні праймери ROS1, SLC34A2 або CD74, здатні до виявлення химерних полінуклеотидів ROS1, представлені в таблиці 2.

Таблиця 2

Ілюстративний набір праймерів для ідентифікації різних химерних білків ROS1 у відповідності з цим винаходом.

Назва праймера	Послідовність праймера (5'-3')
ROS1 InvPCR F1	GTCTGGCATAGAAGATTAAAG (SEQ ID NO: 7)
ROS1 InvPCR F2	AAACGAAGACAAAGAGTTGG (SEQ ID NO: 8)
ROS1 InvPCR R1	GTCAGTGGGATTGTAACAAC (SEQ ID NO: 9)
ROS1 InvPCR R2	AAACTTGTCTTCTGGTATCC (SEQ ID NO: 10)
ROS1 Break Rev1	CAGCTCAGCCAACTCTTT (SEQ ID NO: 11)
ROS1 E43R1	TCTATTTCCCAAACAACGCTATTAATCAGACCC (SEQ ID NO: 12)
ROS1 E34R	TGAAACTTGTCTTCTGGTATCCAA (SEQ ID NO: 13)
CD74 E5F	CCTGAGACACCTTAAGAACACCA (SEQ ID NO: 14)
SLC34A2 E4F	TCGGATTTCTCTACTTTTTCGTG (SEQ ID NO: 15)

[00237] Спосіб відбору протиракового лікарського засобу включає: приведення в контакт досліджуваної сполуки з клітиною, яка експресує химерний білок; і вимірювання рівня експресії химерного білка в клітині, і якщо рівень експресії химерного білка в клітині, обробленої досліджуваною сполукою, знижений у порівнянні з рівнем до обробки досліджуваних сполук або рівнем у необробленій клітині, досліджувану сполуку визначають як потенційну сполуку для протиракового лікарського засобу.

[00238] Спосіб відбору протиракового лікарського засобу може додатково включати стадію вимірювання рівня експресії химерного білка в клітині до обробки досліджуваною сполукою. В цьому випадку досліджувана сполука може бути визначена як потенційна сполука для протиракового лікарського засобу, якщо рівень експресії химерного білка після обробки досліджуваною сполукою є зниженим у порівнянні з рівнем до обробки досліджуваною сполукою в тій самій клітині. В альтернативному варіанті спосіб відбору протиракового лікарського засобу може включати отримання клітин, що експресують химерний білок, і приведення в контакт досліджуваної сполуки з частиною отриманих клітин. В цьому випадку досліджувана сполука може бути визначена як потенційна сполука для протиракового лікарського засобу, якщо рівень експресії химерного білка в клітині, приведеною в контакт з досліджуваною сполукою є зниженим порівняно з рівнем у клітинах, які не були приведені в контакт з досліджуваною сполукою.

[00239] Клітина, яка використовується у відбірковому способі, може являти собою клітину, отриману з ракової клітини, де експресується та/або активується химерний ген або химерний білок, екстракт вказаної клітини або культуру вказаної клітини. Ракова клітина може являти собою клітку солідного раку, зокрема, раку легень, наприклад, недрібноклітинного раку легень, такого як аденокарцинома легень, як описано вище.

[00240] В іншому варіанті реалізації представлений спосіб відбору протиракового лікарського засобу проти раку легень, що включає: обробку клітини, яка експресує химерний білок, досліджуваною сполукою; вимірювання рівня експресії химерного білка в клітині, і якщо рівень експресії химерного білка в клітині, обробленої досліджуваною сполукою, є зниженим у порівнянні з рівнем до обробки досліджуваною сполукою або з рівнем необробленої клітини, то досліджувану сполуку визначають як потенційну сполуку для протиракового лікарського засобу проти раку легень.

[00241] Химерні білки ROS1 (тобто SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 і FIG-ROS1) можуть бути використані в якості маркера для діагностики раку легень або для лікування або попередження, або лікування раку легень. Лікування або попередження раку легень включає стадію введення пацієнту, який потребує цього, терапевтично ефективного кількості щонайменше одного інгібітора проти химерного білка, щонайменше одного інгібітора проти химерного гена, що кодує химерний білок, щонайменше одного інгібітора проти гена, що кодує ROS1, або їх комбінації. Інгібітор може являти собою сполуку Формули I, Ia або сполуку 1, або її фармацевтично прийнятну сіль.

[00242] В іншому варіанті реалізації представлений спосіб попередження та/або лікування раку, що включає введення пацієнту, який потребує цього, фармацевтично (терапевтично)

ефективної кількості щонайменше одного інгібітора проти химерного білка, щонайменше одного інгібітора проти химерного гена, що кодує химерний білок, щонайменше одного інгібітора проти гена, що кодує ROS1, або їх комбінації, кожний з яких може являти собою сполуку Формули 1 та інші конкретні сполуки, описані в цьому документі. Вказаний спосіб може додатково включати стадію ідентифікації пацієнта, що потребує у попередженні та/або лікуванні раку, до стадії введення такого лікування. Лікування або попередження раку легень включає стадію введення пацієнту, який потребує цього, терапевтично ефективного кількості щонайменше одного інгібітора проти химерного білка, щонайменше одного інгібітора проти химерного гена, що кодує химерний білок, щонайменше одного інгібітора проти гена, що кодує ROS1, або їх комбінації. В іншому варіанті реалізації представлено застосування інгібітора проти химерного білка, інгібітора проти химерного гена, що кодує химерний білок, інгібітора проти гена, що кодує ROS1, або їх комбінації для попередження та/або лікування раку. Інгібітор може являти собою сполуку Формули I, Ia або сполуку 1, або її фармацевтично прийнятну сіль.

[00243] У цьому винаході рак може являти собою рак легень, зокрема, дрібноклітинний рак легень (ДРЛ) або недрібноклітинний рак легень (НДРЛ), такий як аденокарцинома легень, плоскоклітинна карцинома легень або крупноклеточная карцинома легень.

[00244] Композиція, в якій інгібітор проти химерного білка ROS1 являє собою щонайменше один елемент, вибраний із групи, що складається з аптамеру, який специфічно зв'язується з химерним білком антитіла, специфічно зв'язується з химерним білком, і інгібітора проти химерного гена або гена, що кодує ROS1, являє собою щонайменше одну, вибрану з групи, яка складається з міРНК, кшРНК, мікроРНК і аптамеру, які здатні специфічно зв'язуватися з химерним геном або геном, який кодує ROS1.

[00245] Будь-який інгібітор кінази ROS1, який інгібує експресію ROS1 та/або активність кінази ROS1 (наприклад, транскрипцію, трансляцію або стабільність), може бути використаний окремо або в комбінації зі сполукою Формули I, Ia або сполукою 1, або її фармацевтично прийнятною сіллю.

[00246] Такий інгібуючий агент може бути ROS1-специфічним або може бути неспецифічним (наприклад, неспецифічні інгібітори кінази, багатоцільові інгібітори). Розроблено кілька інгібіторів кінази ROS1, і в цей час проводиться вивчення їх клінічного застосування. Від активності кінази ROS1 залежать наступні кінази, такі як фосфатидилінозитол-3-кінази (PI3K) і позаклітинні сигнальні кінази 1/2 (ERK) (Wixted JH et al. J Biol Chem 2011), и STAT3 (Hwang JH et al. Mol Endocrinol 2003; 17: 1155-1166). Ліки, що інгібують такі низхідні каскади передачі сигналів, також можуть бути використані в якості альтернативи інгібітору кінази ROS1 або в якості ад'юванта, окремо або в комбінації зі сполуками Формули 1.

[00247] В одному з варіантів суб'єктів, розглядаються як тих, що мають SLC34A2-ROS1 або транслокації CD74-FIG, або делецію FIG-ROS1, також розглядають як тих, що мають мутацію ROS1 сайту за сайтом транслокації. Приклад мутації ROS1 являє собою активує мутацію, яка забезпечує конститутивну активність кінази. Активує мутація ROS1 являє собою випадкову мутацію, яка викликає підвищення активації порівняно з мутацією дикого типу. Наприклад, активуюча мутація ROS1 може призводити до постійної активації ROS1. Може існувати навіть варіант вторинної активуючої мутації ROS1, пов'язаної із застосуванням або обумовленої застосуванням інгібітора ROS1. Мутації, які призводять до підвищення сигнальної активності ROS1, виникають, наприклад, внаслідок точкової мутації кіназного домену, делеції, вставки, дуплікації або інверсії, або комбінації двох або більше з них, що призводить до збільшення сигналу ROS1. Стосовно суб'єктів, визначених як ті, що мають транслокації або делецію злиття ROS1, як описано в цьому документі, і мутацію ROS1, також може бути прийнято рішення про їх лікуванні інгібітором кінази ROS1. Крім того, їх лікування/терапія може бути проведена на підставі такого рішення.

[00248] Як описано вище, ефективність лікування раку інгібітором тирозинкінази ROS1 вважається високою у пацієнта, у якого способом згідно з цим винаходом виявлений химерний полінуклеотид SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1, або FIG-ROS1. З цієї причини лікування раку може бути ефективно здійснено шляхом введення інгібіторів тирозинкінази ROS1, селективної щодо тих онкологічних пацієнтів, які мають химерний ген SLC34A2-ROS1 або CD74-ROS1, або FIG-ROS1 і ген ROS1. Відповідно, у цьому винаході представлений спосіб лікування раку, який включає стадію введення інгібітору тирозинкінази ROS1, який являє собою сполуку Формули I, Ia або сполуку 1, або її фармацевтично прийнятну сіль, пацієнту, у якого встановлена висока ефективність лікування раку таким інгібітором тирозинкінази ROS1 за допомогою вищевказаного способу діагностики, описаного в цьому документі.

[00249] У тексті цього винаходу "зразок" являє собою не тільки біологічний зразок (наприклад, клітини, тканину, орган, рідину (кров, лімфатичну рідину тощо), травний сік, слину,

змив альвеолярного/бронхіального лаважу, сечу, кал), але і включає екстракти нуклеїнових кислот (екстракт геномної ДНК, екстракт мРНК або препарат кДНК, або препарат рРНК, отриманий з екстракту мРНК), або екстракти білків, отримані із вказаних біологічних зразків. Вказаний зразок також може бути схильний до фіксації у формаліні, фіксації в спирті, заморожування або заливці в парафін.

[00250] Крім того, геномна ДНК, мРНК, кДНК або білок можуть бути отримані фахівцем у цій галузі техніки після вибору відповідної технології з урахуванням типу, стану і т. д. зразка.

[00251] Крім вищевказаних речовин (полінуклеотидів, антитіл) у якості активних інгредієнтів, лікарський засіб відповідно до цього винаходу може містити інші фармацевтично прийнятні інгредієнти. Приклади таких інгредієнтів включають буферні агенти, емульгатори, суспендуючі агенти, стабілізатори, консерванти, фізіологічний сольовий розчин і т. д. У якості буферних агентів можуть бути використані фосфати, цитрати, ацетати і т.д. В якості емульгаторів може бути використаний гуміарабік, альгінат натрію, трагакант і т.д. В якості суспендуючих агентів може бути використаний гліцерилмоностеарат, моностеарат алюмінію, метилцелюлоза, карбоксиметилцелюлоза, гідроксиметилцеллюлоза, лаурилсульфат натрію і т. д. В якості стабілізаторів може бути використаний пропіленгліколь, діетилсульфіт, аскорбінова кислота і т.д. В якості консервантів може бути використаний азид натрію, хлорид бензалконію, пара-оксibenзойна кислота, хлорбутанол і т. д.

[00252] Крім того, крім препарату, який містить полінуклеотиди і антитіла, препарати, такі як субстрат, позитивний контроль (наприклад, химерні полінуклеотиди SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 або FIG-ROS1, химерні поліпептиди SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 або FIG-ROS1, або клітини, що мають їх, і т. д.) та негативний контроль, необхідні для виявлення мітки, яка прикріплена до полінуклеотидів і антитіл, а також контрастний забарвлюючий реагент (DAPI і т.д.), який використовується при *in situ* гібридизації або т. п., молекула, необхідна для виявлення антитіла (наприклад, вторинне антитіло, білок G, білок A) і буферний розчин, який використовується для розведення або промивання антитіла, можуть бути об'єднані у вигляді набору для застосування в способі відповідно до цього винаходу. Вказаний набір може містити інструкції щодо застосування набору. У цьому винаході представлений також вищезгаданий набір для застосування в способі відповідно до цього винаходу.

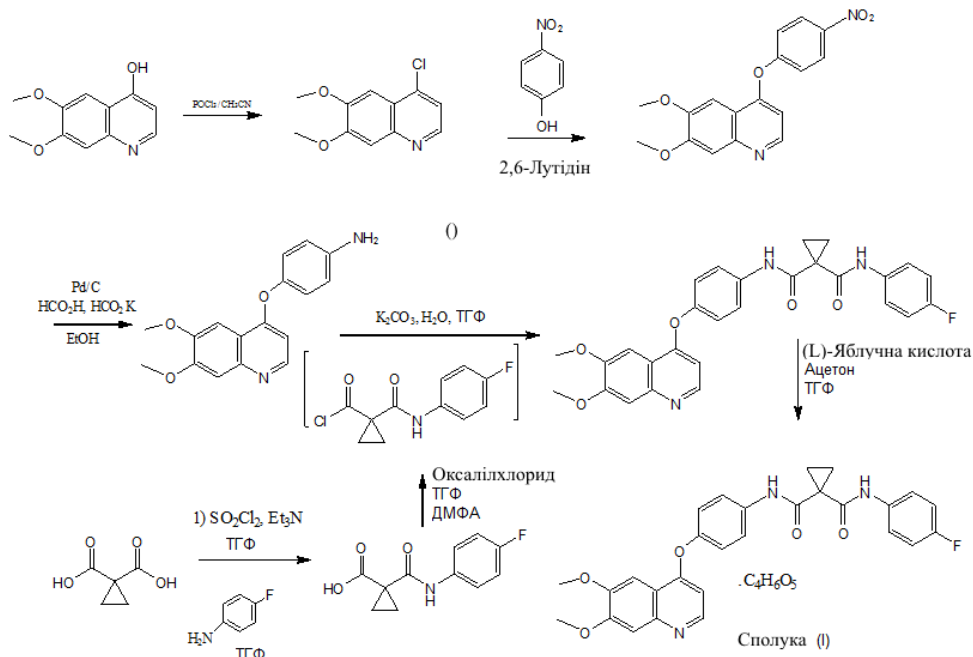
[00253] Способи виявлення, описані в цьому документі, особливо підходять при виявленні химерного білка, який складається по суті з N-кінцевого домену партнера по злиттю і C-кінцевого домену білка ROS1, що кодує кіназний домен. Химерний білок може являти собою химерний білок SLC34A2-ROS1, що складається по суті з N-кінцевого домену білка SLC34A2 або його фрагмента і C-кінцевого домену білка ROS1, що кодує кіназний домен. Химерний білок може являти собою химерний білок CD74-ROS1, що складається по суті з N-кінцевого домену білка CD74 або його фрагмента і C-кінцевого домену білка ROS1, що кодує кіназний домен. Химерний білок може являти собою химерний білок FIG-ROS1, що складається по суті з N-кінцевого домену білка FIG або його фрагмента і C-кінцевого домену білка ROS1, що кодує кіназний домен. Вказаний спосіб може бути використаний для діагностики раку легень, зокрема, недрібноклітинного раку легень, і включає: виявлення щонайменше однієї хромосомної перебудови з участю ROS1, включаючи інверсії, транслокації або делецію в 6 хромосомі; химерного білка, причому білок є гібридизованим з іншим білком; химерного гена, який кодує химерний білок; і надекспресії ROS1 порівняно зі стандартним зразком, отриманим від індивідуума, що не має раку. При виявленні у випробуваному зразку однією з хромосомних перебудов, описаних вище, вибраних з описаної вище групи, індивідум підлягає лікуванню інгібітором ROS1, таким як сполука Формули I, Ia або сполука 1, або її фармацевтично прийнятна сіль.

Отримання Сполуки 1

[00254] Отримання N-(4-{[6,7-біс(метилокси)хінолін-4-іл]окси}феніл)-N'-(4-фторфеніл)циклопропан-1,1-дикарбоксаміду і його (L)-малатної солі.

[00255] Спосіб синтезу, використаний для отримання N-(4-{[6,7-біс(метилокси)хінолін-4-іл]окси}феніл)-N'-(4-фторфеніл)циклопропан-1,1-дикарбоксаміду і його (L)-малатної солі, представлений на Схемі 1:

Схема 1



Отримання 4-хлор-6,7-диметоксихіноліну

[00256] У реактор послідовно завантажували 6,7-диметоксихінолін-4-ол (10,0 кг) і ацетонітрil (64,0 л). Отриману суміш нагрівали до близько 65 °С і додавали оксихлорид фосфору (POCl₃, 50,0 кг). Після додавання POCl₃ температуру реакційної суміші підвищували до 80 °С. Реакцію вважали завершеною (близько 9,0 годин), коли залишилося менше 2 відсотків початкової речовини (вбудований аналіз вискоєфективної рідинної хроматографії [ВЕРХ]). Реакційну суміш охолоджували до близько 10 °С, а потім гасили в холодному розчині дихлорметану (ДХМ, 238,0 кг) 30 % NH₄OH (135,0 кг) і льоду (440,0 кг). Отриману суміш нагрівали до близько 14 °С і розділяли фази. Органічну фазу промивали водою (40,0 кг) і концентрували вакуумною перегонкою для видалення розчинника (близько 190,0 кг). До суміші додавали метил-трет-бутиловий ефір (МТБЕ, 50,0 кг) і суміш охолоджували до близько 10 °С, і за цей час продукт кристалізувався. Тверду речовину виділяли центрифугуванням, промивали н-гептаном (20,0 кг) і сушили при близько 40 °С з отриманням вказаної в заголовку сполуки (8,0 кг).

Отримання 6,7-диметил-4-(4-нітрофенокси)хіноліну

[00257] У реактор послідовно завантажували 4-хлор-6,7-диметоксихінолін (8,0 кг), 4-нітрофенол (7,0 кг), 4-диметиламінопіридин (0,9 кг) і 2,6-лутидин (40,0 кг). Вміст реактора нагрівали до близько 147 °С. По завершенні реакції (залишилося менше 5 відсотків вихідної речовини, за результатами визначення за допомогою вбудованого ВЕРХ аналізу, близько 20 годин) вміст реактора залишили остигати до близько 25 °С. Додавали метанол (26,0 кг), потім карбонат калію (3,0 кг), розчинений у воді (50,0 кг). Вміст реактора перемішували протягом близько 2 годин. Отриманий твердий осад фільтрували, промивали водою (67,0 кг) і сушили при 25 °С протягом близько 12 годин з отриманням вказаної в заголовку сполуки (4,0 кг).

Отримання 4-(6,7-диметоксихінолін-4-ілокси)феніламіну

[00258] Розчин, що містить формиат калію (5,0 кг), мурашину кислоту (3,0 кг) і воду (16,0 кг), додавали до суміші 6,7-диметокси-4-(4-нітрофенокси)хіноліну (4,0 кг), 10-відсоткового паладію на вуглєці (вміст вологи 50 відсотків, 0,4 кг) у тетрагідрофурані (ТГФ, 40,0 кг), яку нагрівали до близько 60 °С. Додавання проводили так, щоб температура реакційної суміші залишалася на рівні близько 60 °С. По завершенні реакції, за результатами визначення за допомогою вбудованого ВЕРХ аналізу (залишилося менше 2 відсотків вихідної речовини, зазвичай 15 годин), вміст реактора відфільтрували. Фільтрат концентрували вакуумною перегонкою при 35 °С до половини початкового об'єму, в результаті чого продукт випав в осад. Продукт виділяли фільтрацією, промивали водою (12,0 кг) і сушили під вакуумом при близько 50 °С з отриманням вказаної в заголовку сполуки (3,0 кг; площа під кривою (AUC) 97 відсотків).

Отримання 1-(4-фторфенілкарбамоїл)циклопропанкарбонової кислоти

[00259] Триетиламін (8,0 кг) додавали до охолодженого (близько 4 °С) розчину циклопропан-1,1-дикарбонової кислоти (є у продажу) (21, 10,0 кг) в ТГФ (63,0 кг) з такою швидкістю, щоб температура суміші не перевищувала 10 °С. Розчин перемішували протягом близько 30 хвилин,

а потім додавали тіонилхлорид (9,0 кг), підтримуючи температуру суміші нижче 10 °С. По завершенні додавання додавали розчин 4-фтораніліну (9,0 кг) в ТГФ (25,0 кг) з такою швидкістю, щоб температура суміші не перевищувала 10 °С. Суміш перемішували протягом близько 4 годин, а потім розбавляли ізопропілацетатом (87,0 кг). Розчин послідовно промивали водним розчином гідроксиду натрію (2,0 кг, розчиненого в 50,0 л води), водою (40,0 л) водним розчином хлориду натрію (10,0 кг, розчиненого в 40,0 л води). Органічний розчин концентрували вакуумною перегонкою, потім додавали гептан, в результаті чого в осад випала тверда речовина. Тверду речовину виділяли центрифугуванням, а потім сушили при близько 35 °С під вакуумом з отриманням вказаної в заголовку сполуки (10,0 кг).

Отримання 1-(4-фторфенілкарбамоїл)циклопропанкарбонілхлориду
[00260] Оксалілхлорид (1,0 кг) додавали до розчину 1-(4-фторфенілкарбамоїл)циклопропанкарбонової кислоти (2,0 кг) в суміші ТГФ (11 кг) і N, N-диметилформамід (ДМФА; 0,02 кг) з такою швидкістю, щоб температура суміші не перевищувала 30 °С. Отриманий розчин використовували на наступній стадії без додаткової обробки.

Отримання N-(4-{[6,7-біс(метилокси)хінолін-4-іл]окси}феніл)-N'-(4-фторфеніл)циклопропан-1,1-дикарбоксаміду

[00261] Розчин з попередньої стадії, що містить 1-(4-фторфенілкарбамоїл)циклопропанкарбонілхлорид, додавали до суміші 4-(6,7-диметоксихінолін-4-ілокси)феніламіну (3,0 кг) і карбонату калію (4,0 кг) в ТГФ (27,0 кг) і воді (13,0 кг) з такою швидкістю, щоб температура суміші не перевищувала 30 °С. По завершенні реакції (зазвичай 10 хвилин) додавали воду (74,0 кг). Суміш перемішували при 15-30 °С протягом близько 10 годин, в результаті чого продукт випав в осад. Продукт виділяли фільтрацією, промивали попередньо отриманим розчином ТГФ (11,0 кг) і води (24,0 кг) і сушили при близько 65 °С під вакуумом протягом близько 12 годин з отриманням вказаної в заголовку сполуки (вільний підстава, 5,0 кг). 1H ЯМР (400 МГц, d6-DMCO): δ 10,2 (з, 1H), 10,05 (з, 1H), 8,4 (з, 1H), 7,8 (м, 2H), 7,65 (м, 2H), 7,5 (з, 1H), 7,35 (з, 1H), 7,25 (м, 2H), 7,15 (м, 2H), 6,4 (з, 1H), 4,0 (д, 6H), 1,5 (з, 4H). PX/MS: M+N=502.

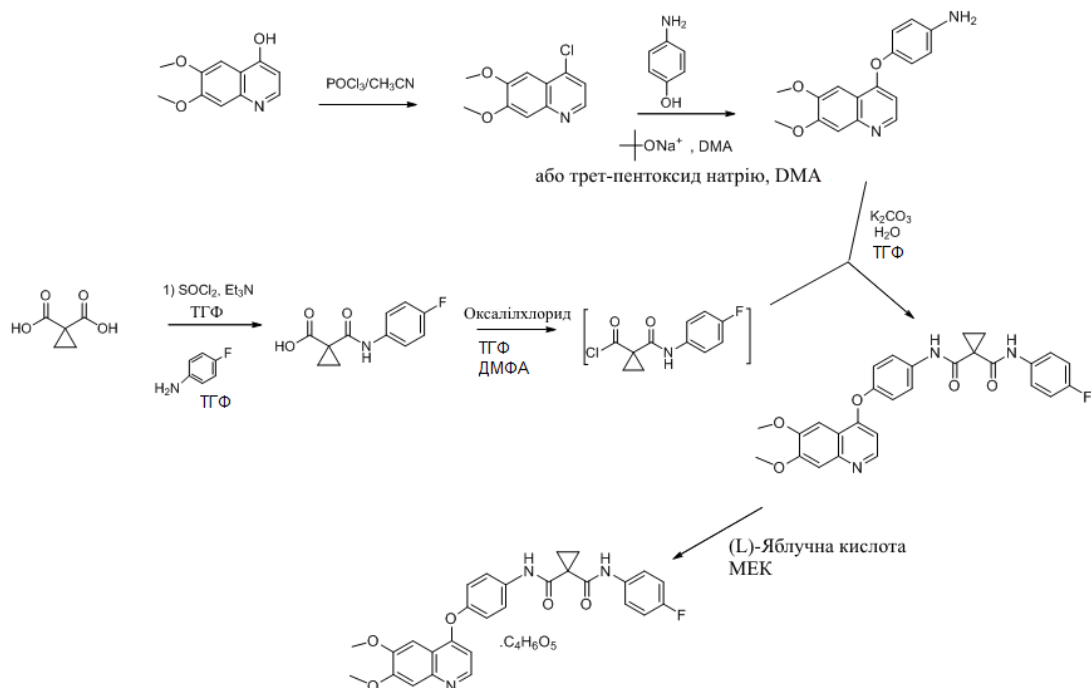
Отримання N-(4-{[6,7-біс(метилокси)хінолін-4-іл]окси}феніл)-N'-(4-фторфеніл)циклопропан-1,1-дикарбоксаміду, (L)-малатної солі

[00262] Розчин L-яблучної кислоти (2,0 кг) у воді (2,0 кг) додавали до розчину [4-(6,7-диметоксихінолін-4-ілокси)феніл]амід-(4-фторфеніл)аміду циклопропан-1,1-дикарбонової кислоти, вільної основи (15, 5,0 кг) в етанолі, підтримуючи температуру суміші близько 25 °С. Потім додавали вуглець (0,5 кг) і кремній-тіол (0,1 кг), і отриману суміш нагрівали до близько 78 °С, при якій додавали воду (6,0 кг). Потім реакційну суміш фільтрували з подальшим додаванням ізопропанолу (38,0 кг) залишали остигати до близько 25 °С. Продукт виділяли фільтрацією і промивали ізопропанолом (20,0 кг), і сушили при близько 65 °С з отриманням вказаної в заголовку сполуки (5,0 кг).

Альтернативне отримання N-(4-{[6,7-біс(метилокси)хінолін-4-іл]окси}феніл)-N'-(4-фторфеніл)циклопропан-1,1-дикарбоксаміду і його (L)-малатної солі.

[00263] Альтернативний спосіб синтезу, який може бути використаний для отримання N-(4-{[6,7-біс(метилокси)хінолін-4-іл]окси}феніл)-N'-(4-фторфеніл)циклопропан-1,1-дикарбоксаміду і його (L)-малатної солі, наведений на Схемі 2, як описано в PCT/US2012/024591, повний зміст якої включено в цей документ за допомогою посилання.

Схема 2



Отримання 4-хлор-6,7-диметоксихіноліну

[00264] У реактор послідовно завантажували 6,7-диметоксигінолін-4-ол (47,0 кг) і ацетонітрил (318,8 кг). Отриману суміш нагрівали до близько 60 °C і додавали оксихлорид фосфору (POCl₃, 130,6 кг). Після додавання POCl₃ температуру реакційної суміші підвищували до близько 77 °C. Реакцію вважали завершеною (близько 13 годин), коли залишилося менше 3 % вихідної речовини (вбудований аналіз високоефективної рідинної хроматографії [ВЕРХ]). Реакційну суміш охолоджували до близько 2-7 °C, а потім гасили в холодному розчині дихлорметану (ДХМ, 482,8 кг), 26-відсоткового NH₄OH (251,3 кг) і води (900 л). Отриману суміш нагрівали до близько 20-25 °C і поділяли фази. Органічну фазу фільтрували через шар AV Nyflo Super-Cel NF (целіт; 5,4 кг) і осад промивали на фільтрі ДХМ (118,9 кг). Об'єднану органічну фазу промивали насиченим сольовим розчином (282,9 кг) і змішували з водою (120 л). Фази поділяли і концентрували органічну фазу вакуумною перегонкою для видалення розчинника (залишковий об'єм близько 95 л). ДХМ (686,5 кг) завантажували в реактор, що містить органічну фазу, і концентрували вакуумною перегонкою для видалення розчинника (залишковий об'єм близько 90 л). Потім завантажували метил-трет-бутиловий ефір (МТБЕ, 226,0 кг) і доводили температуру суміші до значення від -20 до -25 °C і витримували протягом 2, 5 годин з отриманням твердого осаду, який потім відфільтровували і промивали н-гептаном (92,0 кг) і сушили на фільтрі при близько 25 °C в атмосфері азоту з отриманням вказаної в заголовку сполуки. (35,6 кг).

Отримання 4-(6,7-диметоксихінолін-4-ілокси)феніламіну

[00265] 4-Амінофенол (24,4 кг), розчинений в N, N-диметилацетаміді (DMA, 184,3 кг), завантажували в реактор, що містить 4-хлор-6,7-диметоксифінолін (35,3 кг), трет-бутоксид натрію (21,4 кг) і DMA (167,2 кг) при 20-25 °С. Потім суміш нагрівали до 100-105 °С протягом близько 13 годин. По завершенні реакції, за результатами визначення за допомогою вбудованого ВЕРХ аналізу (залишилося менше 2 відсотків вихідної речовини), вміст реактора охолоджували при 15-20 °С і завантажували воду (попередньо охолоджену, 2-7 °С, 587 л) з такою швидкістю, щоб підтримувати температуру 15-30 °С. Отриманий твердий осад фільтрували, промивали сумішшю води (47 л) і DMA (89,1 кг) і, нарешті, водою (214 л). Потім осад на фільтрі сушили при близько 25 °С на фільтрі з отриманням неочищеного 4-(6,7-диметоксиетінолін-4-ілокси)феніламіну (59,4 кг вологого, 41,6 кг сухого, розрахунок на основі втрат при висушуванні). Неочищений 4-(6,7-диметоксифінолін-4-ілокси)феніламін кип'ятили зі зворотним холодильником (близько 75 °С) в суміші тетрагідрофурану (ТГФ, 211,4 кг) і DMA (108,8 кг) протягом близько 1 години, а потім охолоджували до 0-5 °С і витримували протягом близько 1 години, після чого відфільтровували тверду речовину, промивали ТГФ (147,6 кг) і сушили на фільтрі під вакуумом при близько 25 °С з отриманням 4-(6,7-диметоксифінолін-4-ілокси)феніламіну (34,0 кг).

Альтернативне отримання 4-(6,7-диметоксифінолін-4-ілокси)фениламіна

[00266] 4-Хлор-6,7-диметоксихінолін (34,8 кг) і 4-амінофенол (30,8 кг), і трет-пентоксид натрію (1,8 еквівалента, 88,7 кг, 35 мас. відсотків у ТГФ) завантажували в реактор, потім додавали N, N-диметилацетамід (DMA, 293,3 кг). Потім отриману суміш нагрівали до 105-115 °С протягом близько 9 годин. По завершенні реакції, за результатами визначення за допомогою вбудованого ВЕРХ аналізу (залишилося менше 2 відсотків вихідної речовини), вміст реактора охолоджували при 15-25 °С і додавали воду (315 кг) протягом двох годин, підтримуючи температуру 20-30 °С. Потім реакційну суміш перемішували протягом ще однієї години при 20-25 °С. Неочищений продукт збирали фільтрацією і промивали сумішшю 88 кг води і 82,1 кг DMA, потім 175 кг води. Продукт сушили на фільтрі-вологовідокремлювачі протягом 53 годин. Аналіз втрат при висушуванні показав менше 1 відсотка мас./мас.

[00267] В альтернативному способі використовували 1,6 еквівалента трет-пентоксиду натрію і підвищували температуру реакції до 110-120 °С. Крім того, температуру охолодження підвищували до 35-40 °С, і вихідну температуру додавання води доводили до 35-40 °С, з подальшим нагріванням до 45 °С.

Отримання 1-(4-фторфенілкарбамоїл)циклопропанкарбонової кислоти

[00268] Триетиламін (19,5 кг) додавали до охолодженого (близько 5 °С) розчину циклопропан-1,1-дикарбонової кислоти (24,7 кг) в ТГФ (89,6 кг) з такою швидкістю, щоб температура суміші не перевищувала 5 °С. Розчин перемішували протягом близько 1,3 години, а потім додавали тіонілхлорид (23,1 кг), підтримуючи температуру суміші нижче 10 °С. По завершенні додавання розчин перемішували протягом близько 4 годин, підтримуючи температуру нижче 10 °С. Потім додавали розчин 4-фтораніліну (18,0 кг) у ТГФ (33,1 кг) з такою швидкістю, щоб температура суміші не перевищувала 10 °С. Суміш перемішували протягом близько 10 годин, після чого вважали реакцію завершеною. Потім реакційну суміш розбавляли ізопропілацетатом (218,1 кг). Отриманий розчин послідовно промивали водним розчином гідроксиду натрію (10,4 кг, 50 відсотків, розчинені в 119 л води), додатково розведеним водою (415 л), потім водою (100 л) і, нарешті, водним розчином хлориду натрію (20,0 кг, розчинені у 100 л води). Органічний розчин концентрували вакуумною перегонкою (залишковий об'єм 100 л) нижче 40 °С, потім додавали н-гептан (171, 4 кг), в результаті чого в осад випала тверда речовина. Тверду речовину виділяли фільтрацією і промивали н-гептаном (102,4 кг) з отриманням вологої, неочищеної 1-(4-фторфенілкарбамоїл)циклопропанкарбонової кислоти (29,0 кг). Неочищену 1-(4-фторфенілкарбамоїл)циклопропанкарбонову кислоту розчиняли в метанолі (139,7 кг) при близько 25 °С, потім додавали воду (320 л) з отриманням суспензії, яку виділяли фільтрацією, послідовно промивали водою (20 л) і н-гептаном (103,1 кг), а потім сушили на фільтрі при близько 25 °С в атмосфері азоту з отриманням вказаної в заголовку сполуки (25,4 кг).

Отримання 1-(4-фторфенілкарбамоїл)циклопропанкарбонілхлориду

[00269] Оксалілхлорид (12,6 кг) додавали до розчину 1-(4-фторфенілкарбамоїл)циклопропанкарбонової кислоти (22,8 кг) в суміші ТГФ (96,1 кг) і N, N-диметилформаміду (ДМФА; 0,23 кг) з такою швидкістю, щоб температура суміші не перевищувала 25 °С. Отриманий розчин використовували на наступній стадії без додаткової обробки.

Альтернативне отримання 1-(4-фторфенілкарбамоїл)циклопропанкарбонілхлориду

[00270] У реактор завантажували 1-(4-фторфенілкарбамоїл)циклопропанкарбонову кислоту (35 кг), 344 р ДМФА і 175 кг ТГФ. Реакційну суміш доводили до 12-17 °С, а потім до реакційної суміші додавали 19,9 кг оксалілхлориду протягом 1 години. Реакційну суміш залишали перемішуватися при 12-17 °С на 3-8 годин. Одержаний розчин використовували на наступній стадії без додаткової обробки.

Отримання [4-(6,7-диметоксихінолін-4-ілокси)феніл]амід-(4-фторфеніл)аміду циклопропан-1,1-дикарбонової кислоти

[00271] Розчин з попередньої стадії, що містить 1-(4-фторфенілкарбамоїл)циклопропанкарбонілхлорид, додавали до суміші сполуки 4-(6,7-диметоксихінолін-4-ілокси)феніламіну (23,5 кг) і карбонату калію (31,9 кг) у ТГФ (245,7 кг) і воді (116 л) з такою швидкістю, щоб температура суміші не перевищувала 30 °С. По завершенні реакції (близько 20 хвилин) додавали воду (653 л). Суміш перемішували при 20-25 °С протягом близько 10 годин, в результаті чого продукт випав в осад. Продукт виділяли фільтрацією, промивали попередньо отриманим розчином ТГФ (68,6 кг) і води (256 кг) і сушили спочатку на фільтрі в атмосфері азоту при близько 25 °С, а потім при близько 45 °С під вакуумом з отриманням вказаної в заголовку сполуки (41,0 кг, 38,1 кг, розрахунок на підставі втрат при висушуванні).

Альтернативне отримання [4-(6,7-диметоксихінолін-4-ілокси)феніл]амід-(4-фторфеніл)аміду

циклопропан-1,1-дикарбонової кислоти

[00272] У реактор завантажували 4-(6,7-диметоксихінолін-4-ілокси)феніламін (35,7 кг, 1 еквівалент), потім 412,9 кг ТГФ. До реакційної суміші додавали розчин 48,3 K₂CO₃ 169 кг води. Розчин хлорангідридів кислоти, описаний вище в альтернативному способі отримання 1-(4-фторфенілкарбамоїл)циклопропанкарбоніла хлориду, переносили в реактор, що містить 4-(6,7-диметоксихінолін-4-ілокси)феніламін, підтримуючи температуру 20-30 °С протягом не менше двох годин. Реакційну суміш перемішували при 20-25 °С протягом не менше трьох годин. Потім температуру реакційної суміші доводили до 30-25 °С і перемішували суміш. Перемішування припиняли і залишали розділятися фази суміші. Нижню водну фазу видаляли і відкидали. До решти верхній органічній фазі додавали 804 кг води. Реакційну суміш залишали перемішуватися при 15-25 °С протягом не менше 16 годин.

[00273] Продукт випадав в осад. Продукт відфільтровували і промивали сумішшю 179 кг води і 157,9 кг ТГФ двома порціями. Неочищений продукт сушили під вакуумом протягом щонайменше двох годин. Потім висушений продукт розчиняли в 285,1 кг ТГФ. Отриману суспензію переносили в реакційний посудину і перемішували до отримання перетворення суспензії в прозорий (розчинений) розчин, який нагрівали до 30-35 °С протягом близько 30 хвилин. Потім до розчину додавали 456 кг води, а також 20 кг етанолу SDAG-1 (етанол, денатурований метанолом протягом двох годин). Суміш перемішували при 15-25 °С протягом щонайменше 16 годин. Продукт відфільтровували і промивали сумішшю 143 кг води і 126,7 ТГФ двома порціями. Продукт сушили при максимальній температурі 40 °С.

[00274] В альтернативному способі температуру реакції при утворенні хлорангідридів кислоти доводили до 10-15 °С. Температуру перекристалізації міняли з 15-25 °С на 45-50 °С протягом 1 години, а потім охолоджували до 15-25 °С протягом 2 годин.

Отримання [4-(6,7-диметоксихінолін-4-ілокси)феніл]амід-(4-фторфеніл)аміду циклопропан-1,1-дикарбонової кислоти, солі малатної

[00275] [4-(6,7-диметоксихінолін-4-ілокси)феніл]амід-(4-фторфеніл)амід циклопропан-1,1-дикарбонової кислоти (1-5; 13,3 кг), L-яблучну кислоту (4,96 кг), метилетилкетон (МЕК; 188,6 кг) і воду (37,3 кг) завантажували в реактор і суміш нагрівали до кипіння зі зворотним холодильником (близько 74 °С) протягом близько 2 годин. Температуру реактора знижували до 50-55 °С і відфільтровували вміст реактора. Вказані послідовні стадії, описані вище, повторювали ще два рази, виходячи з таких саме кількостей вихідної речовини (13,3 кг), L-яблучної кислоти (4,96 кг), МЕК (198,6 кг) і води (37,2 кг). Об'єднаний фільтрат азеотропно сушили при атмосферному тиску, використовуючи МЕК (1133,2 кг) (залишковий об'єм близько 711 л; KF < 0,5 % мас./мас.) при близько 74 °С. Температуру вмісту реактора знижували до 20-25 °С і витримували протягом близько 4 годин з отриманням твердого осаду, який відфільтровували, промивали МЕК (448 кг) і сушили під вакуумом при 50 °С з отриманням вказаної в заголовку сполуки (45,5 кг).

Альтернативне отримання [4-(6,7-диметоксихінолін-4-ілокси)феніл]амід-(4-фторфеніл)аміду циклопропан-1,1-дикарбонової кислоти, (L) солі малатної

[00276] [4-(6,7-диметоксихінолін-4-ілокси)феніл]амід-(4-фторфеніл)амід циклопропан-1,1-дикарбонової кислоти (47,9 кг), L-яблучну кислоту (17,2), 658,2 кг метилетилкетону та 129,1 кг води (37,3 кг) завантажували в реактор і суміш нагрівали до 50-55 °С протягом 1-3 годин, а потім при 55-60 °С протягом ще 4-5 годин. Суміш висвітляли фільтрацією через картридж 1 мкм. Температуру реактора доводили до 20-25 20-25 °С і переганяли під вакуумом з тиском вакууму 150-200 мм рт.ст. з максимальною температурою рубашки 55°3 до обсягу 558-731 л.

[00277] Вакуумну перегонку проводили ще два рази з завантаженням 380 кг і 380,2 кг метилетилкетону, відповідно. Після третьої дистиляції обсяг партії довели до 18 об./мас. [4-(6,7-диметоксихінолін-4-ілокси)феніл]амід-(4-фторфеніл)-аміду циклопропан-1,1-дикарбонової кислоти, завантаживши 159,9 кг метилетилкетону з отриманням загального обсягу 880 л. Проводили додаткову вакуумну дистиляцію, додавши 245,7 метилетилкетону. Реакційну суміш залишали при помірному перемішуванні при 20-25 °С на щонайменше 24 години. Продукт відфільтровували і промивали 415,1 кг метилетилкетону трьома порціями. Продукт сушили під вакуумом з температурою рубашки, встановленої на 45 °С.

[00278] В альтернативному способі порядок додавання змінювали, тому що розчин 17,7 кг L-яблучної кислоти, розчиненої в 129,9 кг води, додавали до [4-(6,7-диметоксихінолін-4-ілокси)феніл]амід-(4-фторфеніл)-аміду циклопропан-1,1-дикарбонової кислоти (48,7 кг) у метилетилкетоні (673,3 кг).

Біологічний приклад

Зростання клітин HCC-78 і NCI-H2228

[00279] Клітини HCC-78 і NCI-H2228 купували у компаній DSMZ і ATCC, відповідно, у вигляді

замороженого біологічного зразка, відтавали в колбі T-75 (Nunc) і вирощували до 80-90 % злиття для злиплених клітин або до досягнення щільності $1-2 \times 10^6$ клітин/мл клітинної суспензії.

[00280] NCI-H2228, клітинну лінію аденокарциноми легень НДРЛ людини (ATCC, CRL 5935), яка несе активуючі злиття EML4-ALK, висівали з щільністю $3,5 \times 10^4$ клітин/лунку і $2,5 \times 10^4$ клітин/лунку на 48 годині і 72 годині, відповідно, в 0,1 мл RPMI 1640 (ATCC 30-2001), 10 % ФБС, 1 % пеніциліну-стрептоміцину на чорні 96-лункові планшети (Costar, 3904).

[00281] HCC-78, клітинну лінію аденокарциноми легень НДРЛ людини (DSMZ, ACC 563), яка несе активуючі злиття SLC34A2-ROS1 і фосфор-Met, висівали з щільністю $2,5 \times 10^4$ клітин/лунку і 2×10^4 клітин/лунку на 48 годин і 72 години, відповідно, в 0,1 мл RPMI 1640 (ATCC 30-2001), 10 % ФБС (інактивована нагріванням, Cellgro), 1 % пеніциліну-стрептоміцину на чорні 96-лункові планшети (Costar, 3904).

[00282] Клітини вирощували при 37 °C у зволоженій атмосфері з 5 % CO₂ протягом 16 годин. ДМСО або серійні розведення сполуки 1 у свіжому середовищі, що не містить сироватки, або в середовищі, що містить сироватку, додавали до клітин і інкубували протягом 48 годин або 72 годин при 37 °C у зволоженій атмосфері з 5 % CO₂ з подальшим додаванням розчину для мічення 5'-бром-2'-дезоксирідину (BrdU) (Roche) на 2-4 години. Клітинні суспензії переносили на фільтрувальні планшети (Corning, 3504), а потім проводили аналіз. Клітини аналізували на проліферацію, контролюючи впровадження BrdU. Реагенти набору для твердофазного імуоферментного аналізу клітинної проліферації, BrdU (хемілюмінесценція) (Roche Biosciences, 11 669 915 001), використовували за інструкціями виробника. Після впровадження мітки BrdU клітини фіксували розчином FixDenat. Додавали кон'югат анти-BrdU пероксидази (POD) і промивали планшети 1x PBS. Додавали розчин субстрату і вимірювали люмінесценцію на планшет-рідері Victor Wallac V (Perkin Elmer). Процентне інгібування проліферації розраховували порівнянням проліферації клітин, оброблених сполукою 1, із зразками, обробленими ДМСО. Значення процентного інгібування при 5-8 концентраціях сполуки 1 використовували для розрахунку значень IC₅₀.

Біологічний приклад

Інгібування фосфорилування ROS1

[00283] Клітини HCC-78, клітинну лінію аденокарциноми легень НДРЛ людини (DSMZ, ACC 563), яка несе активуючі злиття SLC34A2-ROS1 і фосфор-Met, висівали з щільністю 3×10^5 клітин/лунку на 96-лункові планшети (Nunc, 152795) в RPMI 1640 (ATCC, 30-2001), що містить 10 % ФБС (інактивована нагріванням, Cellgro) і 1 % пеніциліну-стрептоміцину (Cellgro). ДМСО або серійні розведення сполуки 1 у свіжому середовищі з 10 % ФБС кінцевої концентрації 0,3 % ДМСО (носія) додавали до клітин і інкубували протягом 3 годин. Після обробки клітини збирали і промивали холодним PBS і відразу лізирували 0,15 мл холодного лізисного буфера (50 mM Tris HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 % NP 40, 0,1 % SDS, 0,5 % дезоксихолату натрію, 1 mM EDTA, 50 mM NaF, 1 mM пірофосфату натрію, 1 mM Na₃VO₄, 2 mM PMSF, 10 мкг/мл апротиніну, 5 мкг/мл лейпептину і 5 мкг/мл пепстатину A). Лізати збирали і вимірювали концентрації білка за методом BCA (Pierce). Лізати збирали і вимірювали концентрації білка за методом BCA (Pierce). Лізати змішували з буфером для зразків NuPage LDS (Invitrogen NP0007) і відновлючим агентом (Invitrogen NP0004), потім нагрівали при 70 °C протягом 10 хвилин. 20 мкг білка завантажували на гель NuPage 10 % Bis Tris (Invitrogen, NP0302). Білки переносили на нітроцелюлозні мембрани (Invitrogen, LC2001), блокували протягом 1 години в блокувальному буфері Odyssey (Li-Cor, 927 40000) та інкубували при 4 °C протягом ночі з анти-ROS1 мишачим моноклональним антитілом (1:1000) (Cell Signaling Technology, 3266) і анти-фосфоро-ROS1 (Y2274) кролячим антитілом (1:1000) (Cell Signaling Technology, 3077), розведеним у блокувальному буфері Odyssey, що містить 0,1 % Tween 20. Мембрани чотири рази по 10 хвилин промивали буфером TBS T (50 mM Tris HCl, pH 7,2; 150 mM NaCl; 0,1 % Tween 20) і проводили блоттинг з вторинними антитілами, козячим анти-мишачим IRDye680 (Li-Cor, 926 32220) та козячим анти-кролячим IRDye800 (Li-Cor, 926 32211), у блокувальному буфері Odyssey, що містить 0,1 % Tween 20 і 0,01 % SDS, протягом 60 хвилин при кімнатній температурі. Мембрани промивали чотири рази по 10 хвилин буфером TBS-T і двічі промивали PBS. Мембрани сканували за допомогою сканера Odyssey (Li-Cor) і кількісно визначали інтенсивність сигналу кожної смуги за допомогою ImageQuant (Molecular Devices). Значення IC₅₀ розраховували на підставі сигналу, отриманого в обробленому сполукою зразку, у порівнянні з сигналом в контрольному зразку з носієм (ДМСО).

[00284] Інгібування активності кінази, опосередкованої SLC34A2-ROS1, в клітинах HCC-78 НДРЛ, в які вводили одноразові зростаючі дози сполуки 1 або 3-[(1R)-1-(2,6-дихлор-3-фторфеніл)етокси]-5-(1-піперидин-4-ілпіразол-4-іл)піридин-2-аміну (кризотиніб; XALKORI®), показано на фіг. 1. На фіг. наочно показана потужна інгібуюча активність сполуки 1 проти

химерної кінази ROS1, яка ефективніше порівняльного контрольного зразка, 3-[(1R)-1-(2,6-дихлор-3-фторфеніл)етокси]-5-(1-піперидин-4-ілпіразол-4-іл)піридин-2-аміну (кризотиніб) у концентраціях, випробуваних in vitro.

Біологічний приклад

5 ROS1-залежна проліферація клітин HCC-78 НДРЛ

[00285] Значення IC₅₀ розраховували для сполуки 1 та порівняльного контрольного зразка, 3-[(1R)-1-(2,6-дихлор-3-фторфеніл)етокси]-5-(1-піперидин-4-ілпіразол-4-іл)піридин-2-аміну (кризотиніб) після інкубації активних агентів з клітинами HCC-78 НДРЛ протягом 48 або 72 годин в різних концентраціях. Кількісну оцінку проліферації клітин HCC-78 НДРЛ проводили за допомогою твердофазного імуоферментного аналізу BrdU (хемілюмінесценція, Roche Biosciences, Cat. № 11 669 915 001) згідно з рекомендаціями виробника. Визначення значень IC₅₀ (A-E) (концентрація при 50 % інгібуванні) проводили так, як описано вище, і визначали шляхом обчислень за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism.

[00286] Таблиця 3. ROS1-залежна проліферація клітин HCC-78 НДРЛ у присутності сполуки 1 згідно з цим винаходом і 3-[(1R)-1-(2,6-дихлор-3-фторфеніл)етокси]-5-(1-піперидин-4-ілпіразол-4-іл)піридин-2-аміну (кризотиніб).

	NCI-H2228		HCC-78	
Тип тканини	Легені			
Патологія	Аденокарцинома НДРЛ			
Інформація про генотип	Злиття EML4-ALK TP53 Q331* CDKN2A M1 *157 del, ?fs: RB1 E204fs*10		Злиття SLS34A2-ROS1	
Назва сполуки	Проліферація 48 годин IC ₅₀ (нМ)	Проліферація 72 години IC ₅₀ (нМ)	Проліферація 48 годин IC ₅₀ (нМ)	Проліферація 72 години IC ₅₀ (нМ)
Сполука 1	D	E	A	A
3-[(1R)-1-(2,6-дихлор-3-фторфеніл)етокси]-5-(1-піперидин-4-ілпіразол-4-іл)піридин-2-амін (кризотиніб)	C	C	B	A

Представлені дані IC₅₀: E-5000 – 10000 нМ; D-1000-5000 нМ; C-500-1000 нМ; B-100-500 нМ; A-10-100 нМ.

Інші варіанти реалізації винаходу

[00287] Вищевикладений опис було докладно викладено за допомогою ілюстрації та приклади з метою ясності і розуміння. Цей винахід було описано з посиланням на різні конкретні і кращі варіанти реалізації та способи. Однак слід розуміти, що можуть бути зроблені численні зміни і модифікації без відступу від суті та обсягу винаходу. Фахівцю в цій області техніки зрозуміло, що в межах обсягу наведеної формули винаходу можуть бути зроблені зміни і модифікації. Тому слід розуміти, що наведене вище опис призначено для ілюстрації, але не обмеження.

[00288] Отже, обсяг цього винаходу слід визначати не на підставі наведеного вище опису, а замість цього його слід визначати на підставі наступної наведеної формули винаходу разом з усіма еквівалентами, до яких така формула винаходу має відношення.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Exelixis Inc.

Aftab, Dana T

Yu, Peiwen

<120> Спосіб лікування аденокарциноми легень

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

<150> US 61/984599

<151> 2014-04-25

<160> 15

<170> PatentIn версії 3.5

<210> 1

<211> 2347

<212> ПРТ

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(2347)

<223> Білок ROS1 людини, номер доступу UniProt P08922

<400> 1

Met Lys Asn Ile Tyr Cys Leu Ile Pro Lys Leu Val Asn Phe Ala Thr

1 5 10 15

Leu Gly Cys Leu Trp Ile Ser Val Val Gln Cys Thr Val Leu Asn Ser

20 25 30

Cys Leu Lys Ser Cys Val Thr Asn Leu Gly Gln Gln Leu Asp Leu Gly

35 40 45

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

50 55 60

Asn Ser Val Asp Gln Lys Asn Cys Ala Leu Lys Cys Arg Glu Ser Cys

65 70 75 80

Glu Val Gly Cys Ser Ser Ala Glu Gly Ala Tyr Glu Glu Val Leu

85 90 95

Glu Asn Ala Asp Leu Pro Thr Ala Pro Phe Ala Ser Ser Ile Gly Ser

100 105 110

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

115 120 125

Tyr Ile Ile Gln Trp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Gly Ser Trp Thr Tyr

130 135 140

Thr Lys Thr Val Ser Arg Pro Ser Tyr Val Val Lys Pro Leu His Pro

145 150 155 160

Phe Thr Glu Tyr Ile Phe Arg Val Val Trp Ile Phe Thr Ala Gln Leu

165 170 175

Gln Leu Tyr Ser Pro Pro Ser Pro Ser Tyr Arg Thr His Pro His Gly

180 185 190

Val Pro Glu Thr Ala Pro Leu Ile Arg Asn Ile Glu Ser Ser Ser Pro

195 200 205

Asp Thr Val Glu Val Ser Trp Asp Pro Pro Gln Phe Pro Gly Gly Pro

210 215 220

Ile Leu Gly Tyr Asn Leu Arg Leu Ile Ser Lys Asn Gln Lys Leu Asp

225 230 235 240

Ala Gly Thr Gln Arg Thr Ser Phe Gln Phe Tyr Ser Thr Leu Pro Asn

245 250 255

Thr Ile Tyr Arg Phe Ser Ile Ala Ala Val Asn Glu Val Gly Glu Gly

260 265 270

Pro Glu Ala Glu Ser Ser Ile Thr Thr Ser Ser Ser Ala Val Gln Gln

275 280 285

Glu Glu Gln Trp Leu Phe Leu Ser Arg Lys Thr Ser Leu Arg Lys Arg

290 295 300

Ser Leu Lys His Leu Val Asp Glu Ala His Cys Leu Arg Leu Asp Ala

305 310 315 320

Ile Tyr His Asn Ile Thr Gly Ile Ser Val Asp Val His Gln Gln Ile

325 330 335

Val Tyr Phe Ser Glu Gly Thr Leu Ile Trp Ala Lys Lys Ala Ala Asn

340 345 350

Met Ser Asp Val Ser Asp Leu Arg Ile Phe Tyr Arg Gly Ser Gly Leu

355 360 365

Ile Ser Ser Ile Ser Ile Asp Trp Leu Tyr Gln Arg Met Tyr Phe Ile

370 375 380

Met Asp Glu Leu Val Cys Val Cys Asp Leu Glu Asn Cys Ser Asn Ile

385 390 395 400

Glu Glu Ile Thr Pro Pro Ser Ile Ser Ala Pro Gln Lys Ile Val Ala

405 410 415

Asp Ser Tyr Asn Gly Tyr Val Phe Tyr Leu Leu Arg Asp Gly Ile Tyr

420 425 430

Arg Ala Asp Leu Pro Val Pro Ser Gly Arg Cys Ala Glu Ala Val Arg

435 440 445

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

450 455 460

Lys Arg Ile Ile Tyr Phe Asn Asp Thr Ala Gln Val Phe Met Ser Thr

465 470 475 480

Phe Leu Asp Gly Ser Ala Ser His Leu Ile Leu Pro Arg Ile Pro Phe

485 490 495

Ala Asp Val Lys Ser Phe Ala Cys Glu Asn Asn Asp Phe Leu Val Thr

500 505 510

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

515 520 525

Ile Val Gly Cys Asp Leu Ser His Ile Glu Glu Phe Gly Phe Gly Asn

530 535 540

Leu Val Ile Phe Gly Ser Ser Ser Gln Leu His Pro Leu Pro Gly Arg

545 550 555 560

Pro Gln Glu Leu Ser Val Leu Phe Gly Ser His Gln Ala Leu Val Gln

565 570 575

Trp Lys Pro Pro Ala Leu Ala Ile Gly Ala Asn Val Ile Leu Ile Ser

580 585 590

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

595 600 605

Thr Tyr Glu Val Lys Val Ser Thr Gln Asp Pro Pro Glu Val Thr His

610 615 620

Ile Phe Leu Asn Ile Ser Gly Thr Met Leu Asn Val Pro Glu Leu Gln

625 630 635 640

Ser Ala Met Lys Tyr Lys Val Ser Val Arg Ala Ser Ser Pro Lys Arg

645 650 655

Pro Gly Pro Trp Ser Glu Pro Ser Val Gly Thr Thr Leu Val Pro Ala

660 665 670

Ser Glu Pro Pro Phe Ile Met Ala Val Lys Glu Asp Gly Leu Trp Ser

675 680 685

Lys Pro Leu Asn Ser Phe Gly Pro Gly Glu Phe Leu Ser Ser Asp Ile

690 695 700

Gly Asn Val Ser Asp Met Asp Trp Tyr Asn Asn Ser Leu Tyr Tyr Ser

705 710 715 720

Asp Thr Lys Gly Asp Val Phe Val Trp Leu Leu Asn Gly Thr Asp Ile

725 730 735

Ser Glu Asn Tyr His Leu Pro Ser Ile Ala Gly Ala Gly Ala Leu Ala

740 745 750

Phe Glu Trp Leu Gly His Phe Leu Tyr Trp Ala Gly Lys Thr Tyr Val

755 760 765

Ile Gln Arg Gln Ser Val Leu Thr Gly His Thr Asp Ile Val Thr His

770 775 780

Val Lys Leu Leu Val Asn Asp Met Val Val Asp Ser Val Gly Gly Tyr

785 790 795 800

Leu Tyr Trp Thr Thr Leu Tyr Ser Val Glu Ser Thr Arg Leu Asn Gly

805 810 815

Glu Ser Ser Leu Val Leu Gln Thr Gln Pro Trp Phe Ser Gly Lys Lys
820 825 830

Val Ile Ala Leu Thr Leu Asp Leu Ser Asp Gly Leu Leu Tyr Trp Leu
835 840 845

Val Gln Asp Ser Gln Cys Ile His Leu Tyr Thr Ala Val Leu Arg Gly
850 855 860

Gln Ser Thr Gly Asp Thr Thr Ile Thr Glu Phe Ala Ala Trp Ser Thr
865 870 875 880

Ser Glu Ile Ser Gln Asn Ala Leu Met Tyr Tyr Ser Gly Arg Leu Phe
885 890 895

Trp Ile Asn Gly Phe Arg Ile Ile Thr Thr Gln Glu Ile Gly Gln Lys
900 905 910

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

Ile Gln Thr Ser Leu Lys Pro Leu Pro Gly Asn Phe Ser Phe Thr Pro

930 935 940

Lys Val Ile Pro Asp Ser Val Gln Glu Ser Ser Phe Arg Ile Glu Gly

945 950 955 960

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

965 970 975

Trp Gly Val Val Phe Tyr Ser Val Glu Phe Ser Ala His Ser Lys Phe

980 985 990

Leu Ala Ser Glu Gln His Ser Leu Pro Val Phe Thr Val Glu Gly Leu

995 1000 1005

Glu Pro Tyr Ala Leu Phe Asn Leu Ser Val Thr Pro Tyr Thr Tyr

1010 1015 1020

Trp Gly Lys Gly Pro Lys Thr Ser Leu Ser Leu Arg Ala Pro Glu

1025 1030 1035

Thr Val Pro Ser Ala Pro Glu Asn Pro Arg Ile Phe Ile Leu Pro

1040 1045 1050

Ser Gly Lys Cys Cys Asn Lys Asn Glu Val Val Val Glu Phe Arg

1055 1060 1065

Trp Asn Lys Pro Lys His Glu Asn Gly Val Leu Thr Lys Phe Glu

1070 1075 1080

Ile Phe Tyr Asn Ile Ser Asn Gln Ser Ile Thr Asn Lys Thr Cys

1085 1090 1095

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

1100 1105 1110

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

1115 1120 1125

Arg Ala Phe Thr Ser Lys Gly Pro Gly Pro Tyr Ala Asp Val Val

1130 1135 1140

Lys Ser Thr Thr Ser Glu Ile Asn Pro Phe Pro His Leu Ile Thr

1145 1150 1155

Leu Leu Gly Asn Lys Ile Val Phe Leu Asp Met Asp Gln Asn Gln

1160 1165 1170

Val Val Trp Thr Phe Ser Ala Glu Arg Val Ile Ser Ala Val Cys

1175 1180 1185

Tyr Thr Ala Asp Asn Glu Met Gly Tyr Tyr Ala Glu Gly Asp Ser

1190 1195 1200

Leu Phe Leu Leu His Leu His Asn Arg Ser Ser Ser Glu Leu Phe

1205 1210 1215

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

1220 1225 1230

Ile Ser Arg His Leu Tyr Phe Ala Leu Lys Glu Ser Gln Asn Gly

1235 1240 1245

Met Gln Val Phe Asp Val Asp Leu Glu His Lys Val Lys Tyr Pro

1250 1255 1260

Arg Glu Val Lys Ile His Asn Arg Asn Ser Thr Ile Ile Ser Phe

1265 1270 1275

Ser Val Tyr Pro Leu Leu Ser Arg Leu Tyr Trp Thr Glu Val Ser

1280 1285 1290

Asn Phe Gly Tyr Gln Met Phe Tyr Tyr Ser Ile Ile Ser His Thr

1295 1300 1305

Leu His Arg Ile Leu Gln Pro Thr Ala Thr Asn Gln Gln Asn Lys

1310 1315 1320

Arg Asn Gln Cys Ser Cys Asn Val Thr Glu Phe Glu Leu Ser Gly

1325 1330 1335

Ala Met Ala Ile Asp Thr Ser Asn Leu Glu Lys Pro Leu Ile Tyr

1340 1345 1350

Phe Ala Lys Ala Gln Glu Ile Trp Ala Met Asp Leu Glu Gly Cys

1355 1360 1365

Gln Cys Trp Arg Val Ile Thr Val Pro Ala Met Leu Ala Gly Lys

1370 1375 1380

Thr Leu Val Ser Leu Thr Val Asp Gly Asp Leu Ile Tyr Trp Ile

1385 1390 1395

Ile Thr Ala Lys Asp Ser Thr Gln Ile Tyr Gln Ala Lys Lys Gly

1400 1405 1410

Asn Gly Ala Ile Val Ser Gln Val Lys Ala Leu Arg Ser Arg His

1415 1420 1425

Ile Leu Ala Tyr Ser Ser Val Met Gln Pro Phe Pro Asp Lys Ala

1430 1435 1440

Phe Leu Ser Leu Ala Ser Asp Thr Val Glu Pro Thr Ile Leu Asn

1445 1450 1455

Ala Thr Asn Thr Ser Leu Thr Ile Arg Leu Pro Leu Ala Lys Thr

1460 1465 1470

Asn Leu Thr Trp Tyr Gly Ile Thr Ser Pro Thr Pro Thr Tyr Leu

1475 1480 1485

Val Tyr Tyr Ala Glu Val Asn Asp Arg Lys Asn Ser Ser Asp Leu

1490 1495 1500

Lys Tyr Arg Ile Leu Glu Phe Gln Asp Ser Ile Ala Leu Ile Glu

1505 1510 1515

Asp Leu Gln Pro Phe Ser Thr Tyr Met Ile Gln Ile Ala Val Lys

1520 1525 1530

Asn Tyr Tyr Ser Asp Pro Leu Glu His Leu Pro Pro Gly Lys Glu

1535 1540 1545

Ile Trp Gly Lys Thr Lys Asn Gly Val Pro Glu Ala Val Gln Leu

1550 1555 1560

Ile Asn Thr Thr Val Arg Ser Asp Thr Ser Leu Ile Ile Ser Trp

1565 1570 1575

Arg Glu Ser His Lys Pro Asn Gly Pro Lys Glu Ser Val Arg Tyr

1580 1585 1590

Gln Leu Ala Ile Ser His Leu Ala Leu Ile Pro Glu Thr Pro Leu

1595 1600 1605

Arg Gln Ser Glu Phe Pro Asn Gly Arg Leu Thr Leu Leu Val Thr

1610 1615 1620

Arg Leu Ser Gly Gly Asn Ile Tyr Val Leu Lys Val Leu Ala Cys

1625 1630 1635

His Ser Glu Glu Met Trp Cys Thr Glu Ser His Pro Val Thr Val

1640 1645 1650

Glu Met Phe Asn Thr Pro Glu Lys Pro Tyr Ser Leu Val Pro Glu

1655 1660 1665

Asn Thr Ser Leu Gln Phe Asn Trp Lys Ala Pro Leu Asn Val Asn

1670 1675 1680

Leu Ile Arg Phe Trp Val Glu Leu Gln Lys Trp Lys Tyr Asn Glu

1685 1690 1695

Phe Tyr His Val Lys Thr Ser Cys Ser Gln Gly Pro Ala Tyr Val

1700 1705 1710

Cys Asn Ile Thr Asn Leu Gln Pro Tyr Thr Ser Tyr Asn Val Arg

1715 1720 1725

Val Val Val Val Tyr Lys Thr Gly Glu Asn Ser Thr Ser Leu Pro

1730 1735 1740

Glu Ser Phe Lys Thr Lys Ala Gly Val Pro Asn Lys Pro Gly Ile

1745 1750 1755

Pro Lys Leu Leu Glu Gly Ser Lys Asn Ser Ile Gln Trp Glu Lys

1760 1765 1770

Ala Glu Asp Asn Gly Cys Arg Ile Thr Tyr Tyr Ile Leu Glu Ile

1775 1780 1785

Arg Lys Ser Thr Ser Asn Asn Leu Gln Asn Gln Asn Leu Arg Trp

1790 1795 1800

Lys Met Thr Phe Asn Gly Ser Cys Ser Ser Val Cys Thr Trp Lys
 1805 1810 1815

Ser Lys Asn Leu Lys Gly Ile Phe Gln Phe Arg Val Val Ala Ala
 1820 1825 1830

Asn Asn Leu Gly Phe Gly Glu Tyr Ser Gly Ile Ser Glu Asn Ile
 1835 1840 1845

Ile Leu Val Gly Asp Asp Phe Trp Ile Pro Glu Thr Ser Phe Ile
 1850 1855 1860

Leu Thr Ile Ile Val Gly Ile Phe Leu Val Val Thr Ile Pro Leu
 1865 1870 1875

Thr Phe Val Trp His Arg Arg Leu Lys Asn Gln Lys Ser Ala Lys
 1880 1885 1890

Glu Gly Val Thr Val Leu Ile Asn Glu Asp Lys Glu Leu Ala Glu
 1895 1900 1905

Leu Arg Gly Leu Ala Ala Gly Val Gly Leu Ala Asn Ala Cys Tyr
 1910 1915 1920

Ala Ile His Thr Leu Pro Thr Gln Glu Glu Ile Glu Asn Leu Pro
 1925 1930 1935

Ala Phe Pro Arg Glu Lys Leu Thr Leu Arg Leu Leu Leu Gly Ser
 1940 1945 1950

Gly Ala Phe Gly Glu Val Tyr Glu Gly Thr Ala Val Asp Ile Leu
 1955 1960 1965

Gly Val Gly Ser Gly Glu Ile Lys Val Ala Val Lys Thr Leu Lys
 1970 1975 1980

Lys Gly Ser Thr Asp Gln Glu Lys Ile Glu Phe Leu Lys Glu Ala
 1985 1990 1995

His Leu Met Ser Lys Phe Asn His Pro Asn Ile Leu Lys Gln Leu
 2000 2005 2010

Gly Val Cys Leu Leu Asn Glu Pro Gln Tyr Ile Ile Leu Glu Leu

2015 2020 2025

Met Glu Gly Gly Asp Leu Leu Thr Tyr Leu Arg Lys Ala Arg Met

2030 2035 2040

Ala Thr Phe Tyr Gly Pro Leu Leu Thr Leu Val Asp Leu Val Asp

2045 2050 2055

Leu Cys Val Asp Ile Ser Lys Gly Cys Val Tyr Leu Glu Arg Met

2060 2065 2070

His Phe Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Leu Val Ser

2075 2080 2085

Val Lys Asp Tyr Thr Ser Pro Arg Ile Val Lys Ile Gly Asp Phe

2090 2095 2100

Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asn Asp Tyr Tyr Arg Lys Arg

2105 2110 2115

Gly Glu Gly Leu Leu Pro Val Arg Trp Met Ala Pro Glu Ser Leu

2120 2125 2130

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

2135 2140 2145

Ile Leu Ile Trp Glu Ile Leu Thr Leu Gly His Gln Pro Tyr Pro

2150 2155 2160

Ala His Ser Asn Leu Asp Val Leu Asn Tyr Val Gln Thr Gly Gly

2165 2170 2175

Arg Leu Glu Pro Pro Arg Asn Cys Pro Asp Asp Leu Trp Asn Leu

2180 2185 2190

Met Thr Gln Cys Trp Ala Gln Glu Pro Asp Gln Arg Pro Thr Phe

2195 2200 2205

His Arg Ile Gln Asp Gln Leu Gln Leu Phe Arg Asn Phe Phe Leu

2210 2215 2220

Asn Ser Ile Tyr Lys Ser Arg Asp Glu Ala Asn Asn Ser Gly Val

2225 2230 2235

Ile Asn Glu Ser Phe Glu Gly Glu Asp Gly Asp Val Ile Cys Leu

2240 2245 2250

Asn Ser Asp Asp Ile Met Pro Val Ala Leu Met Glu Thr Lys Asn

2255 2260 2265

Arg Glu Gly Leu Asn Tyr Met Val Leu Ala Thr Glu Cys Gly Gln

2270 2275 2280

Gly Glu Glu Lys Ser Glu Gly Pro Leu Gly Ser Gln Glu Ser Glu

2285 2290 2295

Ser Cys Gly Leu Arg Lys Glu Glu Lys Glu Pro His Ala Asp Lys

2300 2305 2310

Asp Phe Cys Gln Glu Lys Gln Val Ala Tyr Cys Pro Ser Gly Lys

2315 2320 2325

Pro Glu Gly Leu Asn Tyr Ala Cys Leu Thr His Ser Gly Tyr Gly

2330 2335 2340

Asp Gly Ser Asp

2345

<210> 2

<211> 278

<212> ПРТ

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(278)

<223> Кіназний домен ROS1 людини

<400> 2

Leu Thr Leu Arg Leu Leu Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Glu Val Tyr

1 5 10 15

Glu Gly Thr Ala Val Asp Ile Leu Gly Val Gly Ser Gly Glu Ile Lys

20 25 30

Val Ala Val Lys Thr Leu Lys Lys Gly Ser Thr Asp Gln Glu Lys Ile

35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asn Asp Tyr Tyr Arg Lys Arg Gly Glu

165 170 175

Gly Leu Leu Pro Val Arg Trp Met Ala Pro Glu Ser Leu Met Asp Gly

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Asp Val Leu Asn Tyr Val Gln Thr Gly Gly Arg Leu Glu Pro Pro Arg

225 230 235 240

Asn Cys Pro Asp Asp Leu Trp Asn Leu Met Thr Gln Cys Trp Ala Gln

245 250 255

Glu Pro Asp Gln Arg Pro Thr Phe His Arg Ile Gln Asp Gln Leu Gln

260 265 270

Leu Phe Arg Asn Phe Phe

275

<210> 3

<211> 23

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> SLC34A2, екзон 4, пряма

<400> 3

tcggatttct ctactttttc gtg

23

<210> 4

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CD74, екзон 6, пряма

<400> 4

ctcctgtttg aaatgagcag g

21

<210> 5

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> ROS1, екзон 32, обратная

<400> 5

ggaatgcctg gtttatttgg

20

<210> 6

<211> 23

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> ROS1, екзон 34, обратная

<400> 6

tgaaacttgt ttctgtatc caa

23

<210> 7

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> ROS1 InvPCR F1

<400> 7

gtctggcata gaagattaa g 21

<210> 8

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> ROS1 InvPCR F2

<400> 8

aaacgaagac aaagagttgg 20

<210> 9

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> ROS1 InvPCR R1

<400> 9

gtcagtggga ttgtaacaac 20

<210> 10

<211> 19

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> ROS1 InvPCR R2

<400> 10

aaacttggtt ctggatatcc 19

<210> 11

<211> 18

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> ROS1 Break Rev1

<400> 11

cagctcagcc aactcttt 18

<210> 12

<211> 33

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> ROS1 E43R1

<400> 12

tctatttccc aaacaacgct attaatcaga ccc 33

<210> 13

<211> 23

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> ROS1 E34R

<400> 13

tgaaacttgt ttctggtatc caa 23

<210> 14

<211> 23

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CD74 E5F

<400> 14

cctgagacac cctaagaaca cca 23

<210> 15

<211> 23

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> SLC34A2 E4F

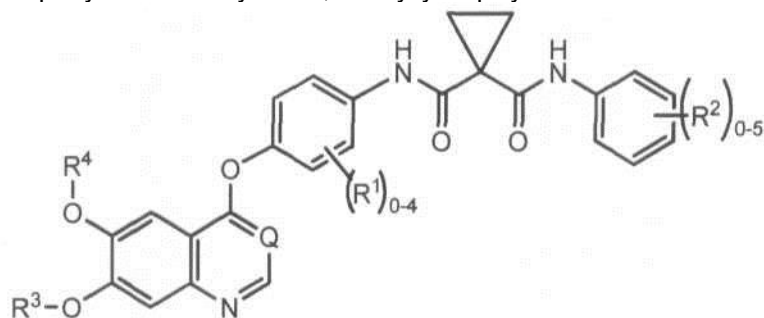
<400> 15

tcggatttct ctactttttc gtg

23

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Спосіб лікування аденокарциноми легень, що включає етап, на якому вводять пацієнту, який потребує такого лікування, сполуку Формули I



Формула I

або її фармацевтично прийнятну сіль, де:

R¹ являє собою галоген;

R² являє собою галоген;

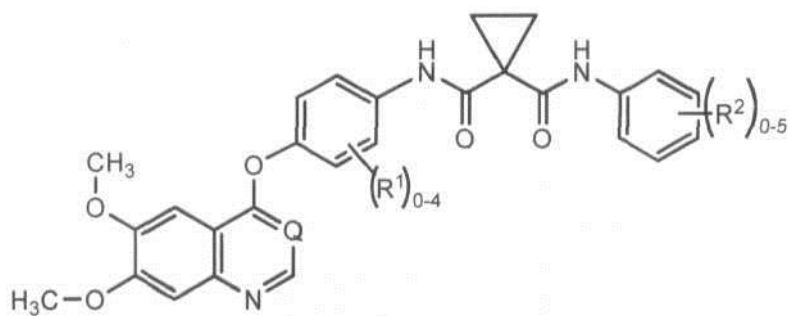
R³ являє собою (C₁-C₆)алкіл;

R⁴ являє собою (C₁-C₆)алкіл; та

Q являє собою CH або N,

де аденокарцинома легені являє собою недрібноклітинний рак легені, позитивний по злиттю SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 або FIG-ROS1.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що сполука Формули I являє собою сполуку Формули Ia



Формула Ia

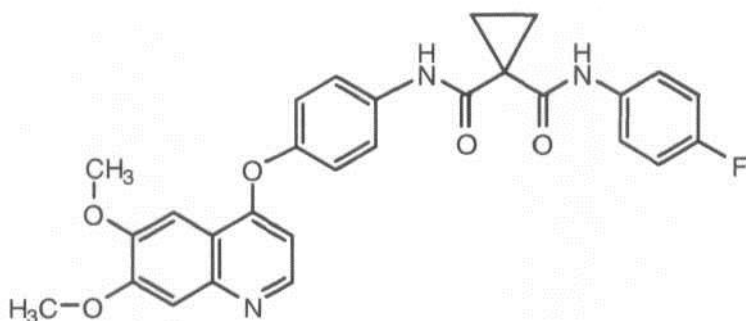
або її фармацевтично прийнятну сіль, де:

R¹ являє собою галоген;

5 R² являє собою галоген; та

Q являє собою CH або N.

3. Спосіб за будь-яким із пп. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що сполука Формули I являє собою сполуку 1



сполука 1

або її фармацевтично прийнятну сіль.

4. Спосіб за п. 3, який **відрізняється** тим, що сполука 1 являє собою N-(4-[[6,7-біс(метилокси)хінолін-4-іл]окси]феніл)-N'-(4-фторфеніл)циклопропан-1,1-дикарбоксамід або його фармацевтично прийнятну сіль.

5. Спосіб за будь-яким із пп. 1-4, який **відрізняється** тим, що сполуки Формули I, Формули Ia і сполука 1 являють собою (L)- або (D)-малатну сіль.

6. Спосіб за будь-яким із пп. 1-5, який **відрізняється** тим, що сполука Формули I представлена в кристалічній формі N-1 або формі N-2 (L)-малатної солі та/або (D)-малатної солі.

7. Спосіб за будь-яким із пп. 1-6, який **відрізняється** тим, що сполуки Формул I, Ia або сполуку 1 або її фармацевтично прийнятну сіль вводять у вигляді фармацевтичної композиції, яка додатково містить фармацевтично прийнятний носій, допоміжну речовину або розріджувач.

8. Спосіб за будь-яким із пп. 1-7, який **відрізняється** тим, що сполуку Формули I або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після іншої форми лікування.

9. Спосіб за будь-яким із пп. 1-7, який **відрізняється** тим, що сполуку Формули I або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування цисплатиною та/або гемцитабіном.

10. Спосіб за будь-яким із пп. 1-7, який **відрізняється** тим, що сполуку Формули I або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування карбоплатиною.

11. Спосіб за будь-яким із пп. 1-7, який **відрізняється** тим, що сполуку Формули I або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування карбоплатиною та/або гемцитабіном.

12. Спосіб за будь-яким із пп. 1-7, який **відрізняється** тим, що сполуку Формули I вводять після лікування цисплатиною та/або карбоплатиною.

13. Спосіб за будь-яким із пп. 1-7, який **відрізняється** тим, що сполуку Формули I або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування доцетакселем.

14. Спосіб за будь-яким із пп. 1-7, який **відрізняється** тим, що сполуку Формули I або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування кризотинібом.

15. Спосіб за будь-яким із пп. 1-7, який **відрізняється** тим, що сполуку Формули I або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування кризотинібом та/або гемцитабіном.

16. Спосіб за будь-яким із пп. 1-7, який **відрізняється** тим, що сполуку Формули I або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування кризотинібом та/або гемцитабіном, та/або доцетакселем.

17. Спосіб за будь-яким із пп. 1-7, який **відрізняється** тим, що сполуку Формули I або її фармацевтично прийнятну сіль вводять після лікування цисплатином та/або гемцитабіном, та/або доцетакселем.

18. Спосіб лікування недрібноклітинного раку легень, позитивного по злиттю ROS1, у пацієнта, який потребує такого лікування, що включає введення терапевтично ефективної кількості сполуки 1 або її фармацевтично прийнятної солі.

19. Спосіб інгібування або реверсування розвитку патологічного клітинного росту у ссавця, який включає етап, в якому вводять сполуку 1 або її фармацевтично прийнятну сіль, причому патологічний клітинний ріст являє собою рак, опосередкований кіназою ROS1.

20. Спосіб за п. 19, який **відрізняється** тим, що рак являє собою аденокарциному легені.

21. Спосіб за п. 19, який **відрізняється** тим, що аденокарцинома легені являє собою недрібноклітинний рак легені.

22. Спосіб за п. 19, який **відрізняється** тим, що аденокарцинома легені являє собою недрібноклітинний рак легень, позитивний по злиттю SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 або FIG-ROS1.

23. Спосіб за п. 22, який **відрізняється** тим, що сполуку 1 або її фармацевтично прийнятну сіль вводять у вигляді фармацевтичної композиції, що містить сполуку 1 або її фармацевтично прийнятну сіль і щонайменше один фармацевтично прийнятний носій.

24. Спосіб за п. 22, який **відрізняється** тим, що сполуку 1 або її фармацевтично прийнятну сіль вводять у вигляді фармацевтичної композиції, що містить сполуку 1 або її фармацевтично прийнятну сіль і щонайменше один фармацевтично прийнятний носій, причому фармацевтичну композицію вводять щоденно протягом більше ніж 3 місяців.

25. Спосіб за п. 22, який **відрізняється** тим, що сполуку 1 або її фармацевтично прийнятну сіль вводять у вигляді фармацевтичної композиції, що містить сполуку 1 або її фармацевтично прийнятну сіль і щонайменше один фармацевтично прийнятний носій; причому фармацевтичну композицію вводять у дозі 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 65, 70, 75, 80, 85, 90 або 95 мг/добу.

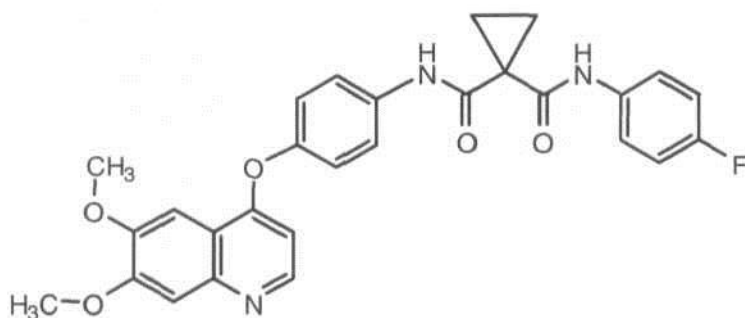
26. Спосіб за п. 22, який **відрізняється** тим, що виявлення недрібноклітинного раку легені, позитивного по злиттю SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 або FIG-ROS1, здійснюють із застосуванням аналізу FISH (флуоресцентної *in situ* гібридизації), CISH (хромогенної *in situ* гібридизації) або SISH (посиленої сріблом *in situ* гібридизації).

27. Спосіб за п. 22, який **відрізняється** тим, що виявлення недрібноклітинного раку легені, позитивного по злиттю SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 або FIG-ROS1, здійснюють із застосуванням будь-якої форми геномної ПЛР, прямого секвенування, ПЛР-секвенування, ЗТ-ПЛР або аналогічного аналізу.

28. Спосіб за п. 22, який **відрізняється** тим, що виявлення недрібноклітинного раку легені, позитивного по злиттю SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 або FIG-ROS1, здійснюють із застосуванням антитіла, яке специфічно зв'язується з химерним поліпептидом SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 або FIG-ROS1 або його фрагментом.

29. Спосіб діагностики і лікування пацієнта, в якому пацієнт має пухлину НДРЛ (недрібноклітинного раку легені), і вказана пухлина ідентифікована як НДРЛ, позитивна по злиттю SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 або FIG-ROS1, і вказане лікування включає введення терапевтично ефективної кількості сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі і щонайменше одного фармацевтично прийнятного носія.

30. Спосіб лікування аденокарциноми легені, яка являє собою недрібноклітинний рак легені, позитивний по злиттю SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 або FIG-ROS1, у пацієнта, який потребує такого лікування, що включає етап, в якому вводять вказаному пацієнту терапевтично ефективну кількість сполуки 1

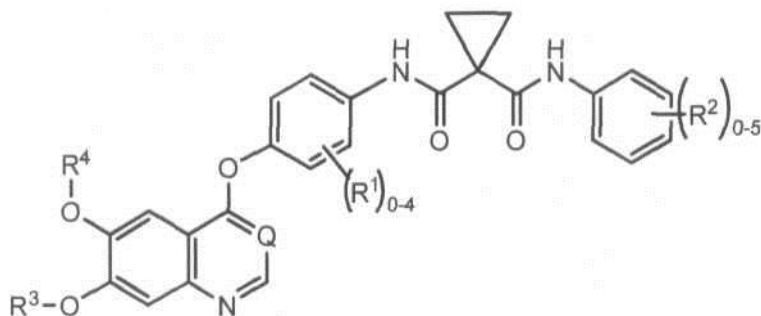


сполука 1

або її фармацевтично прийнятної солі.

31. Спосіб за будь-яким з пп. 1-30, який **відрізняється** тим, що ефективна кількість сполук Формули I, Ia або сполуки 1 забезпечує щонайменше один терапевтичний ефект, вибраний із групи, що складається зі зменшення розміру пухлини, зменшення метастазування, повної ремісії, часткової ремісії, стабілізації захворювання, збільшення загальної частоти відповідей або повної патологічної відповіді.

32. Спосіб інгібування активності химерної кінази ROS1 у раковій клітині, що включає приведення в контакт вказаної клітини з ефективною кількістю сполуки Формули I



Формула I

або її фармацевтично прийнятної солі, де:

R¹ являє собою галоген;

R² являє собою галоген;

R³ являє собою (C₁-C₆)алкіл;

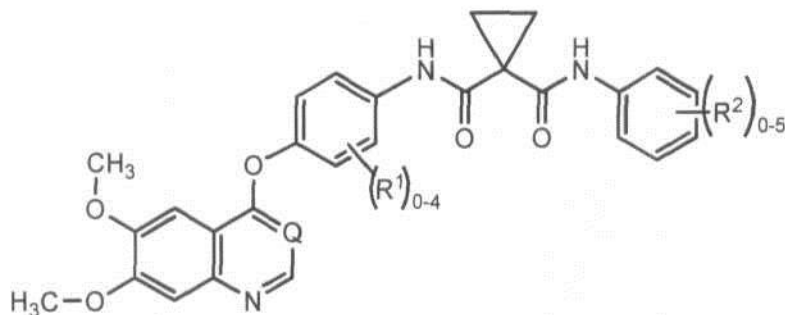
R⁴ являє собою (C₁-C₆)алкіл; та

Q являє собою CH або N.

33. Спосіб за п. 32, який **відрізняється** тим, що ракова клітина являє собою клітину аденокарциноми недрібноклітинного раку легені.

34. Спосіб за п. 32, який **відрізняється** тим, що ракова клітина являє собою клітину аденокарциноми недрібноклітинного раку легені, позитивного по злиттю SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1 або FIG-ROS1.

35. Спосіб за будь-яким із пп. 32-34, який **відрізняється** тим, що сполука Формули I являє собою сполуку Формули Ia



Формула Ia

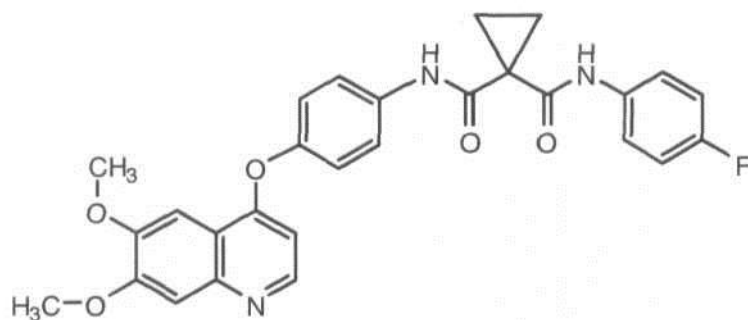
або її фармацевтично прийнятну сіль, де:

R¹ являє собою галоген;

R² являє собою галоген; та

Q являє собою CH або N.

36. Спосіб за будь-яким із пп. 32-35, який **відрізняється** тим, що сполука Формули I являє собою сполуку 1



сполука 1

або її фармацевтично прийнятну сіль.

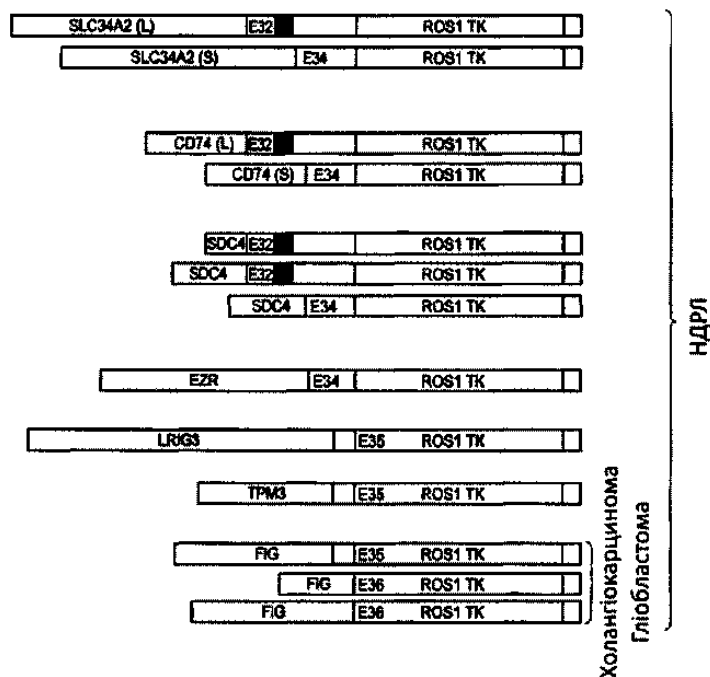
37. Спосіб за п. 36, який **відрізняється** тим, що сполука 1 являє собою N-(4-([6,7-
 5 біс(метилокси)хінолін-4-іл]окси)феніл)-N'-(4-фторфеніл)циклопропан-1,1-дикарбоксамід або
 його фармацевтично прийнятну сіль.

38. Спосіб за будь-яким із пп. 32-37, який **відрізняється** тим, що сполуки Формули I, Формули Ia
 і сполука 1 являють собою (L)- або (D)-малатну сіль.

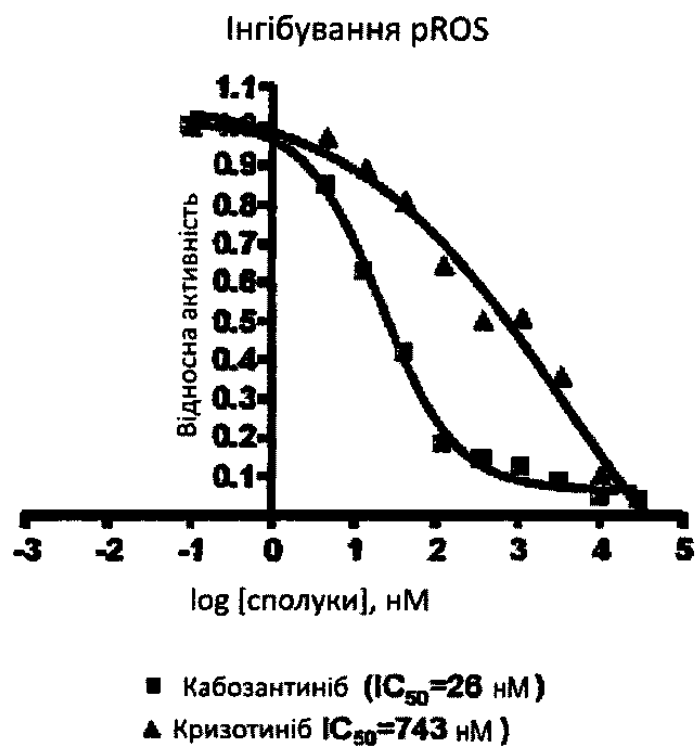
39. Спосіб за будь-яким із пп. 32-38, який **відрізняється** тим, що сполука Формули I
 10 представлена в кристалічній формі N-1 або формі N-2 (L)-малатної солі та/або (D)-малатної
 солі.

40. Спосіб за будь-яким із пп. 32-39, який **відрізняється** тим, що сполуки Формул I, Ia або
 сполуку 1 або її фармацевтично прийнятну сіль вводять у ракову клітину у вигляді
 15 фармацевтичної композиції, яка додатково містить фармацевтично прийнятний носій,
 допоміжну речовину або розріджувач.

Фіг. 1



Фіг. 2



Фір. 3

MKNYCLIPK	LWNFATLGCL	WISVVQCTVL	NSCLKSCVTN	LGQQLDLGTP	HNLSEPCIQ	CHFWSVDQK
10	20	30	40	50	60	70
NCALKCRESC	EVGCSSAEGA	YEEVLENAD	LPTAPFASSI	GSHNMTLRWK	SANFSGVKYI	IQWKYAQLLG
80	90	100	110	120	130	140
SWTYTKTVSR	PSYVVKPLHP	FTEYIFRVVW	IFTAQLQLYS	PPSPSVRTHP	HGVPETAPLI	RNISSSSPDT
150	160	170	180	190	200	210
VEVSWDPPQF	PGGPILGYNL	RLISKNGKLD	AGTQRTSFQF	YSTLPNTIYR	FSIAAVNEVG	EGPEAESSIT
220	230	240	250	260	270	280
TSSSAVQEE	QWLFLSRKTS	LRKRSCLKLV	DEAHCLRLDA	IYHNITGISV	DVHQQIVYFS	EGTLIWAKKA
290	300	310	320	330	340	350
ANMSDVSDLR	IFYRSGGLIS	SISIDWLYQR	MYFIMDELVC	VCDLENCNI	EEITPPSISA	PQKIVADSYN
360	370	380	390	400	410	420
GYVFYLLRDG	IYRADLPVPS	GRCAEAVRIV	ESCTLKDFAI	KPQAKRIIYF	NDTAQVFMST	FLDGSASHLI
430	440	450	460	470	480	490
LPRIPFADVK	SFACENNDPL	VTDGKVIFFQ	DALSFNEFIV	GCDLSHIEEF	GFGNLVIFGS	SSQLHPLPGR
500	510	520	530	540	550	560
PQELSVLFGS	HQALVQWKPP	ALAIGANVIL	ISDIIELEFEL	GPSAWQNWYI	EVKVTQDPP	EVTHIFLNIS
570	580	590	600	610	620	630
GTMLNVPELQ	SAMKYKVSVR	ASSPKRPGPW	SEPSVGTTLV	PASEPPFIMA	VKEDGLWSKP	LNSFGGGEFL
640	650	660	670	680	690	700
SSDIGNVSDM	DWYNSLYYS	DTKGDVFWL	LNGTDISENY	HLPISIAGAGA	LAFEWLGHFL	YWAGKTYVIQ
710	720	730	740	750	760	770
RQSVLTGHTD	IVTHVKLLVN	DMVVDVGGY	LYWTTLYSVE	STRLNGESSL	VLQTPQWFSG	KKVIALTLDL
780	790	800	810	820	830	840
SDGLLYWLQ	DSQCIHLYTA	VLRGQSTGDT	TITEFAAWST	SEISQNALMY	YSGRLFWING	FRIITTOEIG
850	860	870	880	890	900	910
QKTSVSVLEP	ARFNQFTIIQ	TSCLKPLPGNF	SFTPKVIFDS	VQESSFRIBG	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	KFEIFYNINIS	QSITNKTCE	WIAVNVTFVS	MSFQLEGMSF
1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120
RCFIAFQVRA	FTSKGPGPYA	DVVKSTTSEI	NPPFHLITLL	GNKIVFLDMD	QNQVWVTFSA	ERVISAVCYT
1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190
ADNEMGYAAE	GDSLFLHLH	NRSSSELFQD	SLVFDITVIT	IDWISRHLVY	ALKESQNGMQ	VFDVDLEHKV
1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260
KYPREVKIHN	RNSTIISFSV	YPLLSRLYWT	EVSNEFYQMF	YYSIISHTLH	RILQPTATNQ	QNKRNQCSCN
1270	1280	1290	1300	1310	1320	1330
VTEFELSGAM	AIDTSNLEKP	LIYFAKAQEI	WAMDLBGCCQ	WRVITVPAML	AGKTLVSLTV	DGDLLYWIIT
1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
AKDSTQIYQA	KKGNCAIVSQ	VKALRSRHIL	AYSSVMQPF	DKAFLSLASD	TVEPTILNAT	NTSLTIRLPL
1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470
AKTNLWYGI	TSPTPTYLVY	YAEVNDKNS	SDLKYRILEF	QDSIALIEDL	QPFSTYMIQI	AVKNYYSDDL
1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540
EHLPPGKEIW	GKTKNGVPEA	VQLINTTVRS	DTSLIISWRE	SHKPNPKES	VRYQLAISHL	ALIPETPLRQ
1550	1560	1570	1580	1590	1600	1610
SEFPNGRLTL	LVTRLGGNI	YVLKVLACHS	EEMWCTESH	VTVEMFNTPE	KPYSLVPENT	SLQFNWKAPL
1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680
NVNLIRFWVE	LQKWKYNEFY	HVKTSQSCQP	AYVCNITNLQ	PYTSYNVRV	VVYKTGENST	SLPESFKTKA
1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750
GVPNKPPIPK	LLEGSKNSIQ	WEKAEDNGCR	ITYYILEIRK	STSNLQONQN	LRWKMTFNCS	CSSVCTWVSK
1760	1770	1780	1790	1800	1810	1820
NLKGIFQFRV	VAANNLGFGE	YSGISENIIL	VGDDFWIPET	SFILTIIYGI	FLVVITIPLTF	VWHRRLKNQK
1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890
SAKEGVTVLI	NEDKELAEIR	GLAAGVGLAN	ACYAIHTLPT	QEEIENLPAF	PREKLTIRLL	LGSGAPGEVY
1900	1910	1920	1930	1940	1950	1960
EGTAVDILGV	GSGEIKVAVK	TLKKGSTDQE	KIEFLKEAHL	MSKFNHPNII	KQLGVCLLNE	FQYIILELME
1970	1980	1990	2000	2010	2020	2030
GGDLLTYLRK	ARMATFYGPL	LTLVDLVDLC	VDISKGCVYL	ERMHFIHRDL	AARNCLVSVK	DYTSPIRVKI
2040	2050	2060	2070	2080	2090	2100
GDFGLARDIY	KNDYYRRRGE	GLLPVRWMA	ESLMDGIFTT	QSDVWSFGIL	IWEILTGLHQ	PYPASNLDDV
2110	2120	2130	2140	2150	2160	2170
LNYYVQTGGRL	EPNRCNPDLL	WNLMTCQWQA	EPDQRPTFHR	IQDQLQLFRN	FPLNSIYKSR	DEANNSGVIN
2180	2190	2200	2210	2220	2230	2240
ESFEGEDGDV	ICLNSDDIMP	VALMETKNRE	GLNYMVLATE	CGQGEEKSEG	PLGSQSEESC	GLRKEEKEPH
2250	2260	2270	2280	2290	2300	2310
ADKDFCQEKQ	VAYCFSGKPE	GLNYACLTHS	GYGDGSD			
2320	2330	2340	2347			

– Людський білок ROS1, номер доступу UniProt P08922: SEQ ID NO: 1

Фіг. 4

Кіназний 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

Комп'ютерна верстка О. Рябко

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
 вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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