(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114129566 A
(43)申请公布日 2022.03.04

(21)申请号 202111124139.3
(22)申请日 2013.09.09
(30)优先权数据
61/698143 2012.09.07 US
(62)分案原申请数据
201380052164.2 2013.09.09
(71)申请人 埃克塞里艾克西斯公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 D.T.阿夫塔布
(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
代理人 陈桉
(51)Int.Cl.
A61K 31/47(2006.01)
A61K 31/517(2006.01)
A61K 45/06(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

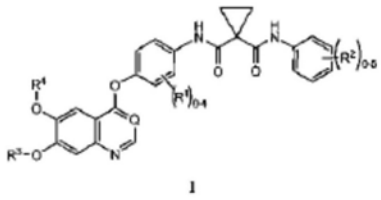
权利要求书2页 说明书47页 附图9页

(54)发明名称

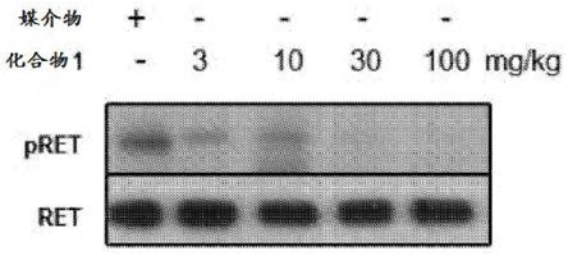
用于治疗肺腺癌的MET、VEGFR和RET的抑制剂

(57)摘要

本发明涉及用MET、VEGF和RET的抑制剂对患者、具体地肺腺癌患者、更具体地患有KIF5B-RET融合阳性非小细胞肺癌患者中的癌症的治疗，所述抑制剂是式(I)的化合物或其药学上可接受的盐。

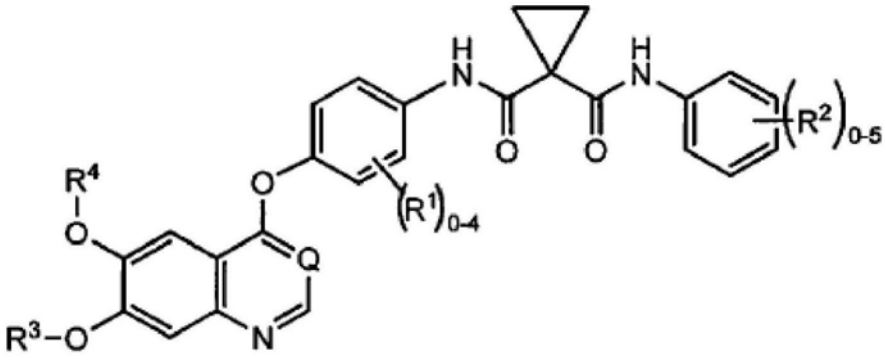


I



CN 114129566 A

1.一种用于治疗肺腺癌的方法,包括向需要这种治疗的患者施用式I化合物:



I

或其药学上可接受的盐:其中:

R^1是卤素;

R^2是卤素;

R^3是(C_1-C_6)烷基;

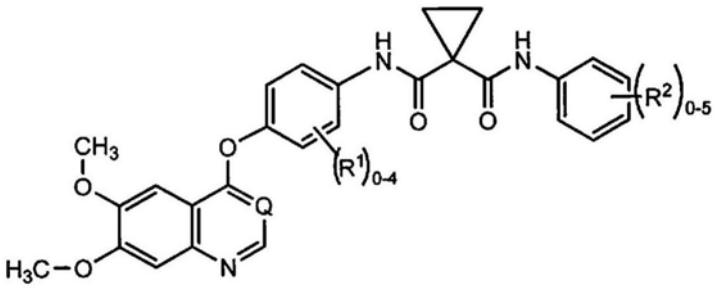
R^4是(C_1-C_6)烷基;并且

Q是CH或N。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述肺腺癌是非小细胞肺癌。

3.根据权利要求1所述的方法,其中所述肺腺癌是KIF5B-RET融合阳性非小细胞肺癌。

4.根据权利要求1-3所述的方法,其中双重MET和VEGF调节剂是式Ia的化合物



式I(a),

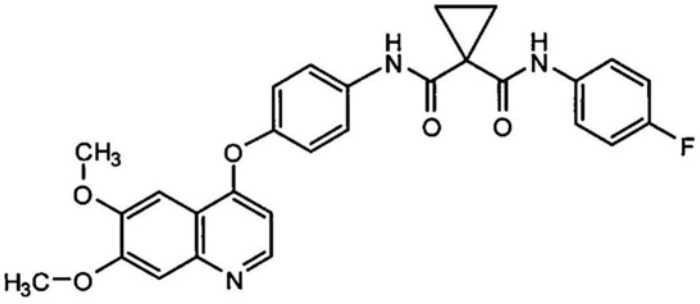
或其药学上可接受的盐,其中:

R^1是卤素;

R^2是卤素;并且

Q是CH或N。

5.根据权利要求1-4所述的方法,其中式I化合物是化合物1:



化合物1

或其药学上可接受的盐。

6.根据权利要求5所述的化合物，所述化合物是N-(4-{[6,7-双(甲氧基)喹啉-4-基]氧基}苯基)-N'-(4-氟苯基)环丙烷-1,1-二甲酰胺。

7.根据权利要求1-6所述的方法，其中所述式(I)、式I(a)的化合物和化合物I是(L)-或(D)-苹果酸盐。

8.根据权利要求1-7所述的方法，其中所述式(I)的化合物是(L)苹果酸盐和/或(D)苹果酸盐的结晶N-1形式或N-2形式。

9.根据权利要求1-8所述的方法，其中所述式I、I(a)的化合物或化合物1或者其药学上可接受的盐以另外包含药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂的药物组合物的形式施用。

10.根据权利要求1-9所述的方法，其中在另一种治疗形式之后施用所述式I化合物。

用于治疗肺腺癌的MET、VEGFR和RET的抑制剂

[0001] 本申请是申请日为2013年9月9日、中国申请号为201380052164.2、发明名称为“用于治疗肺腺癌的MET、VEGFR和RET的抑制剂”的发明申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求于2012年9月7日提交的美国临时申请第61/698,143号的优先权权益，该临时申请的全部内容通过引用并入本文。

发明领域

[0004] 本发明涉及使用MET、VEGFR和RET的抑制剂对癌症、特别是肺腺癌的检测、诊断和治疗。

[0005] 发明背景

[0006] 在世界范围内，肺癌是癌症相关死亡率的主要原因。靶向治疗的近期开发已导致非小细胞肺癌(NSCLC)的治疗模式转变。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年9月3日;361(10):947-57。Maemondo M,Inoue A,Kobayashi K,Sugawara S,Oizumi S,Isobe H,Gemma A,Harada M,Yoshizawa H,Kinoshita I,Fujita Y,Okinaga S,Hirano H,Yoshimori K,Harada T,Ogura T,Ando M,Miyazawa H,Tanaka T,Saijo Y,Hagiwara K,Morita S,Nukiwa T;North-East Japan Study Group.Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR.N Engl J Med.2010年6月24日;362(25):2380-8。表皮生长因子受体(EGFR)酪氨酸激酶抑制剂(TKI)吉非替尼(gefitinib)和厄洛替尼(erlotinib)以及间变性淋巴瘤激酶(ALK)TKI克唑替尼(crizotinib)已在具有EGFR突变或ALK基因重排的NSCLC患者中显示临床活性。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年10月28日;363(18):1693-703。另外，已在大约2％的NSCLC患者中报告有ROS1基因重排，并且已在使用克唑替尼的此患者亚组中报告有临床活性。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 rearrangemnets define aunique molecular class of lung cancers.J Clin Oncol.2012 3月10日;30(8):863-70。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

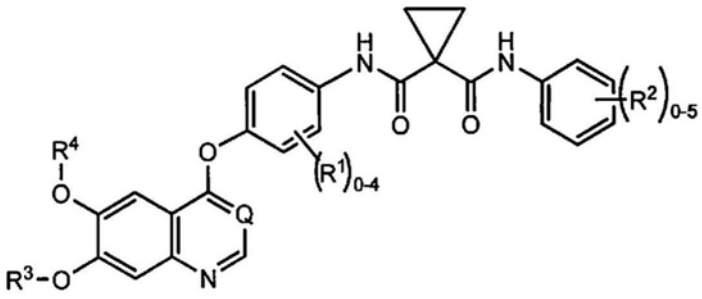
of crizotinib in advanced non-samll cell lung cancer(NSCLC)harboring ROS1 gene rearrangement.J Clin Oncol.2012 30(增刊;摘要7508)。KIF5B(驱动蛋白家族5B)基因与RET癌基因的融合近来已在1-2％的NSCLC患者中被报告为驱动突变,并且作为治疗靶点成为业界关注的重点。Kohno T,Ichikawa H,Totoki Y,Yasuda K,Hiramoto M,Nammo T,Sakamoto H,Tsuta K,Furuta K,Shimada Y,Iwakawa R,Ogiwara 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年2月12日;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年2月12日;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年2月12日;18(3):382-4。因此,鉴定NSCLC中的关键驱动基因并且开发用于患者的各基因组亚群的治疗方法变得越来越重要。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明满足了这些和其他需求,本发明涉及一种用MET、VEGFR和RET的抑制剂治疗肺腺癌的方法。该方法包括向需要这种治疗的患者施用治疗有效量的调节MET、VEGFR和RET的化合物。在一个实施方案中,肺腺癌是非小细胞肺癌(NSCLC)。更具体地,肺腺癌最常见是KIF5B-RET融合阳性NSCLC,以及包括CCDC6、NCOA4和TRIM33的其他已知的RET融合,和在染色体10上的其他RET融合。

[0009] 在一个方面,本发明涉及一种用于治疗需要这种治疗的患者中的NSCLC的方法,该方法包括向患者施用治疗有效量的同时调节MET、VEGFR和RET的化合物。

[0010] 在此方面和其他方面的一个实施方案中,双重作用MET/VEGFR/RET抑制剂是式I化合物

[0011] 

I

[0012] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0013] R^1是卤素;

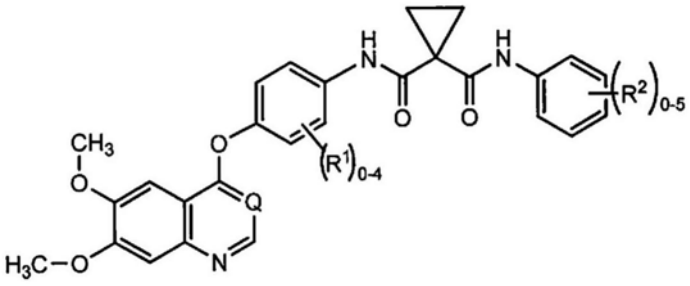
[0014] R^2是卤素;

[0015] R^3是(C_1-C_6)烷基;

[0016] R^4是(C_1-C_6)烷基;并且

[0017] Q是CH或N。

[0018] 在另一个实施方案中,式I化合物是式Ia的化合物

[0019] 

式Ia

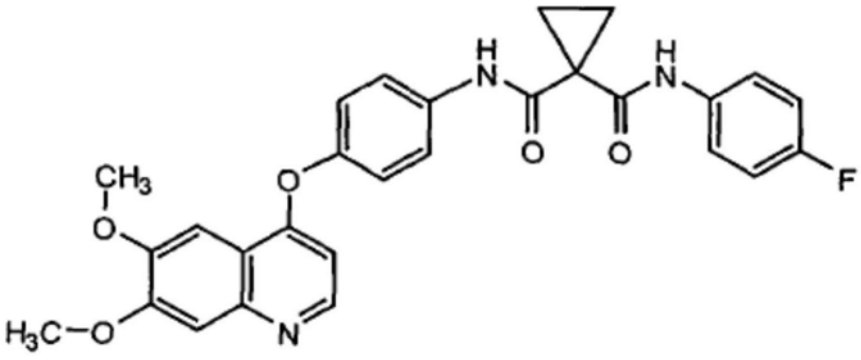
[0020] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0021] R^1是卤素;

[0022] R^2是卤素;并且

[0023] Q是CH或N。

[0024] 在另一个实施方案中,式I化合物是化合物1:

[0025] 

化合物1

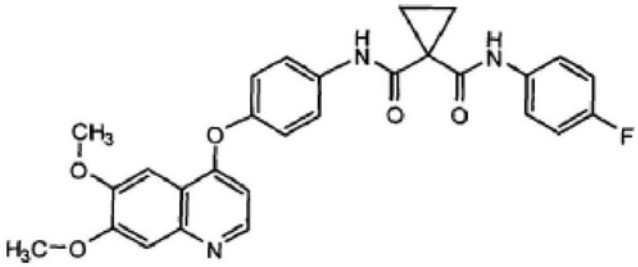
[0026] 或其药学上可接受的盐。化合物1还称为N-(4-{[6,7-双(甲氧基)喹啉-4-基]氧基}苯基)-N'-(4-氟苯基)环丙烷-1,1-二甲酰胺以及名称卡博替尼(Cabozantinib)。

[0027] 化合物1是c-MET、RET和VEGFR2的有效抑制剂。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年12月;10(12):2298-308。在临床前研究中,化合物1介导的激酶活性抑制引起肿瘤脉管系统、肿瘤侵袭和转移的快速且可靠的消退以及存活期延长。Sennino B.Inhibition of tumor invasiveness by c-MET/VEGFR blockade.提供于:Gordon Research Conference:Angiogenesis;2009年8月2-7日;Newport,RI.You WK,Falcon B,Hashizume H等人.Exaggerated regression of blood vessels,hypoxia,and apoptosis in tumors after c-MET and VEGFR inhibition.Am J Pathol(已提交)。

[0028] 在另一个实施方案中,以包含药学上可接受的添加剂、稀释剂或赋形剂的药物组合物形式施用式I、Ia的化合物或化合物1。

[0029] 在另一个方面,本发明提供一种用于检测、诊断和治疗KIF5B-RET融合阳性NSCLC以及包含CCDC6、NCOA4和TRIM33的其他已知RET融合和在染色体10上的其他RET融合的方法(参见Cancer Discovery,Alexander Drilon,Lu Wang,Adnan Hasanovic等人,首先于2013年3月26日在线发表;DOI:10.1158/2159-8290.CD-13-0035,参考美国癌症研究协会(American Association for Cancer Researc h),2013年6月),该方法包括向需要这种治疗的患者施用治疗有效量的包含式I化合物或式I化合物的苹果酸盐或式I化合物的另一种药学上可接受盐的药物组合物。在一个具体实施方案中,式I化合物是化合物1或者化合物1的苹果酸盐。

[0030] 在另一方面,本发明提供一种用于治疗需要这种治疗的患者中的是KIF5B-RET融合阳性非小细胞肺癌的肺腺癌的方法,该方法包括施用患者有效量的化合物1:

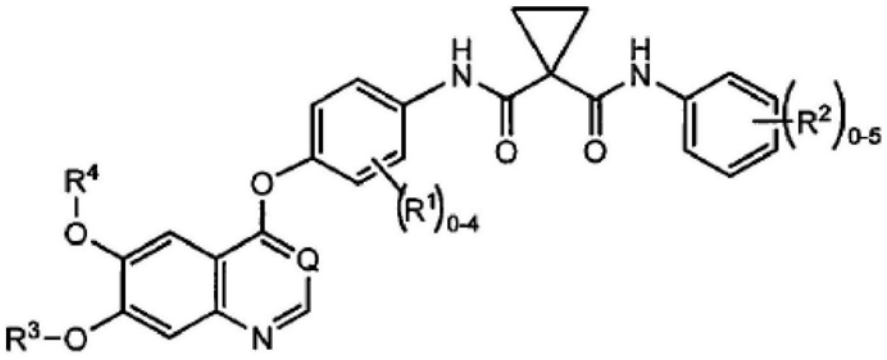
[0031] 

化合物 1

[0032] 或其药学上可接受的盐。

[0033] 本发明还包括如下项:

[0034] 1.一种用于治疗肺腺癌的方法,包括向需要这种治疗的患者施用式I化合物:

[0035] 

I

[0036] 或其药学上可接受的盐:其中:

[0037] R^1是卤素;

[0038] R^2是卤素;

[0039] R^3是(C_1-C_6)烷基;

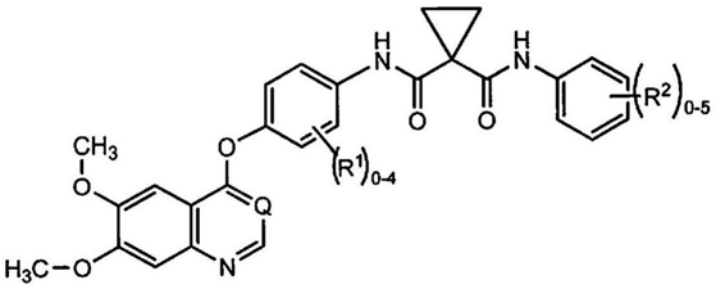
[0040] R^4是(C_1-C_6)烷基;并且

[0041] Q是CH或N。

[0042] 2.根据项1所述的方法,其中所述肺腺癌是非小细胞肺癌。

[0043] 3.根据项1所述的方法,其中所述肺腺癌是KIF5B-RET融合阳性非小细胞肺癌。

[0044] 4.根据项1-3所述的方法,其中双重MET和VEGF调节剂是式Ia的化合物

[0045] 

[0046] 式 I(a),

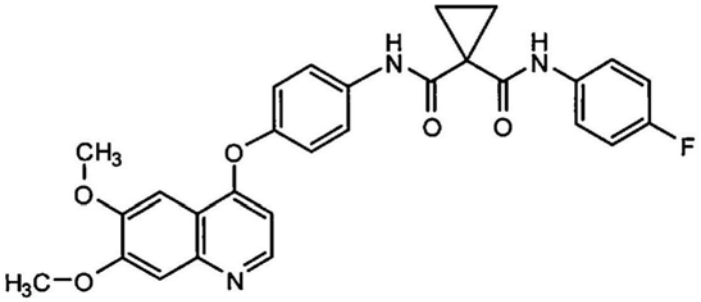
[0047] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0048] R^1是卤素;

[0049] R^2是卤素;并且

[0050] Q是CH或N。

[0051] 5.根据项1-4所述的方法,其中式I化合物是化合物1:

[0052] 

化合物 1

[0053] 或其药学上可接受的盐。

[0054] 6.根据项5所述的化合物,所述化合物是N-(4-{[6,7-双(甲氧基)喹啉-4-基]氧基}苯基)-N'-(4-氟苯基)环丙烷-1,1-二甲酰胺。

[0055] 7.根据项1-6所述的方法,其中所述式(I)、式I(a)的化合物和化合物I是(L)-或(D)-苹果酸盐。

[0056] 8.根据项1-7所述的方法,其中所述式(I)的化合物是(L)苹果酸盐和/或(D)苹果酸盐的结晶N-1形式或N-2形式。

[0057] 9.根据项1-8所述的方法,其中所述式I、I(a)的化合物或化合物1或者其药学上可接受的盐以另外包含药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂的药物组合物的形式施用。

[0058] 10.根据项1-9所述的方法,其中在另一种治疗形式之后施用所述式I化合物。

[0059] 11.根据项1-9所述的方法,其中在顺铂和/或吉西他滨治疗之后施用所述式I化合物。

[0060] 12.根据项1-9所述的方法,其中在多烯紫杉醇治疗之后施用所述式I化合物。

[0061] 13.根据项1-9所述的方法,其中在顺铂和/或吉西他滨和/或多烯紫杉醇治疗之后施用所述式I化合物。

[0062] 14.一种用于治疗是KIF5B-RET融合阳性非小细胞肺癌的肺腺癌的需要这种治疗

的患者的方法，包括施用化合物1或其药学上可接受的盐。

[0063] 15.一种用于抑制或逆转哺乳动物中的异常细胞生长进展的方法，包括施用化合物1或其药学上可接受的盐，其中所述异常细胞生长是由KIF5B-RET介导的癌症。

[0064] 16.根据项15所述的方法，其中所述癌症是肺腺癌。

[0065] 17.根据项15所述的方法，其中所述肺腺癌是非小细胞肺癌。

[0066] 18.根据项15所述的方法，其中所述肺腺癌是KIF5B-RET融合阳性非小细胞肺癌。

[0067] 19.根据项18所述的方法，其中化合物1或其药学上可接受的盐以包含化合物1或其药学上可接受的盐和至少一种药学上可接受的载体的药物组合物的形式施用。

[0068] 20.根据项18所述的方法，其中化合物1或其药学上可接受的盐以包含化合物1或其药学上可接受的盐和至少一种药学上可接受的载体的药物组合物的形式施用；其中每日施用所述药物组合物超过3个月。

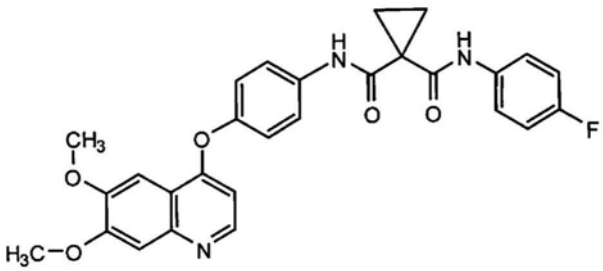
[0069] 21.根据项18所述的方法，其中化合物1或其药学上可接受的盐以包含化合物1或其药学上可接受盐和至少一种药学上可接受的载体的药物组合物的形式施用；其中以5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、65、70、75、80、85、90或95mg/日的剂量施用所述药物组合物。

[0070] 22.根据项18所述的方法，其中利用FISH、CISH或SISH测定进行所述KIF5B-RET融合阳性非小细胞肺癌的检测。

[0071] 23.根据项18所述的方法，其中利用任意形式的基因组PCR、直接测序、PCR测序、RT-PCR或类似测定进行所述KIF5B-RET融合阳性非小细胞肺癌的检测。

[0072] 24.一种诊断和治疗患者的方法，其中所述患者具有NSCLC肿瘤并且所述肿瘤被鉴定为KIF5B-RET融合阳性NSCLC，并且所述治疗包括施用式I化合物的任何一个，包括化合物1，或其药学上可接受盐和至少一种药学上可接受的载体。

[0073] 25.一种用于治疗在需要这种治疗的患者中是KIF5B-RET融合阳性非小细胞肺癌的肺腺癌的方法，包括向所述患者施用有效量的化合物1：

[0074] 

化合物 1

[0075] 或其药学上可接受的盐。

[0076] 26.根据项1-25所述方法，其中所述有效量的式I、Ia或1化合物产生选自由以下组成的组的至少一种治疗效果：肿瘤尺寸减小、转移减少、完全缓解、部分缓解、病情稳定、总响应率提高或病理学完全响应。

[0077] 附图简述

[0078] 图1A示出了在施用单一递增剂量的化合物1或水媒介物的携带TT肿瘤动物中体内RET的磷酸化的抑制。

[0079] 图1B示出了单一口服剂量的化合物1(100mg/kg)的施用对携带TT肿瘤小鼠的肿瘤裂解物中的磷酸化水平及总RET、AKT和ERK的作用。

[0080] 图1C提供了对RET磷酸化的抑制持续时间的光密度定量与化合物1的血浆浓度,以及代表性的Western印迹图像。

[0081] 图2A示出了化合物1抑制TT异体移植肿瘤生长,其与每日一次口服施用水媒介物(□)或者3mg/kg(▽)、10mg/kg(○)、30mg/kg(◆)或60mg/kg(◇)卡博替尼持续21天的携带TT肿瘤的nu/nu小鼠中血清降钙素减少相关。

[0082] 图2B示出了在从最终指定给药后采集的全血所获得的血清制品中测定的循环降钙素水平。

[0083] 图3示出了患有KIF5B-RET融合阳性NCSLC的患者对化合物1的响应。在化合物1的基线(图1A)处和9周后(图1B)获得胸部计算机断层扫描。

[0084] 图4A示出了从治疗前和治疗后肿瘤样品中获得的KIF5B-RET基因组PCR和Sanger测序。

[0085] 图4B示出了从治疗后肿瘤样品中获得的KIF5B-RET RT-PCR和Sanger测序。

[0086] 图4C示出了在肿瘤细胞中RET位点处的分离的FISH。

[0087] 发明详述

[0088] 缩写和定义

[0089] 以下的缩写和术语在本申请通篇具有所示的含义。

[0090]

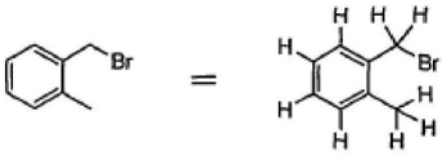
缩写	含义
Ac	乙酰基
Br	宽的
℃	摄氏度
c-	环
CBZ	CarboBenZoxy=苄氧基羰基
d	双重峰
dd	双重峰的双重峰
dt	三重峰的双重峰
DCM	二氯甲烷
DME	1,2-二甲氧基乙烷
DMF	*N,N*-二甲基甲酰胺
DMSO	二甲基亚砜
EI	电子碰撞电离
G	克
h 或 hr	小时
HPLC	高压液相色谱
L	升
M	摩尔或摩尔浓度
m	多重峰
Mg	毫克
MHz	兆赫(频率)
Min	分钟
mL	毫升
μL	微升
μM	微摩尔或微摩尔的
mM	毫摩尔的

[0091]

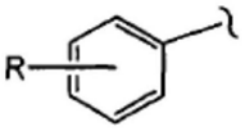
Mmol	毫摩尔
Mol	摩尔
MS	质谱分析
N	当量或当量浓度
nM	纳摩尔
NMR	核磁共振波谱法
q	四重峰
RT	室温
s	单峰
t 或 tr	三重峰
TFA	三氟乙酸
THF	四氢呋喃
TLC	薄层色谱

[0092] 符号“-”表示单键，“=”表示双键。

[0093] 当描绘或描述化学结构时，除非另有明确说明，假设所有碳具有氢取代以符合4价。例如，在下面示意图左手侧的结构中存在暗示的9个氢。在右手侧的结构中示出了这9个氢。有时，在文本公式中将结构中的特定原子描述为具有作为取代的氢(明确定义的氢)，例如-CH_2CH_2-。本领域技术人员应理解的是，前述的描述性技术在化学领域是常见的，是用于简洁明了且简单地描述其他复杂结构。

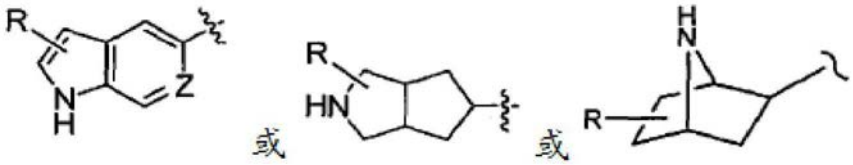
[0094] 

[0095] 如果基团“R”被描绘成“浮”在环系统上，例如在下式中：

[0096] 

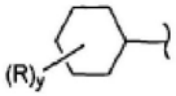
[0097] 那么除非另有规定，只要形成稳定的结构，则取代基“R”可存在于环系统的任何原子上，假设从一个环原子中将所描绘的、隐含的或明确定义的氢加以取代。

[0098] 如果基团“R”被描绘成浮在稠环系统上，例如在下式中：

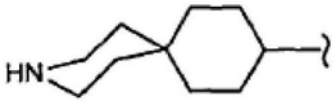
[0099] 

[0100] 那么除非另有规定，只要形成稳定的结构，则取代基“R”可存在于该稠环系统的任意原子上，假设有对所描绘的氢(例如以上化学式中的-NH-)、隐含的氢(例如在以上化学式中，其中未显示氢但应理解成存在)或者来自一个环原子的明确定义的氢(例如在以上化学式中，“Z”等于=CH-)的取代。在所描绘的实例中，“R”基团可存在于稠环系统的5元或者6元

环中。当基团“R”被描绘成存在于含有饱和碳的环系统上时，例如在下式中：

[0101] 

[0102] 其中，在此实例中，“y”可以是大于1，假设各自取代在该环上的当前描绘的、隐含的或明确定义的氢；然后，除非另有规定，其中所形成的结构是稳定的，两个“R”可存在于相同的碳上。一个简单的实例是当R为甲基时，在所示出环的碳(“环状”碳)上可以存在偕二甲基。在另一个实例中，在相同碳上的两个R(包括该碳)可形成一个环，因此形成具有所示出环的螺环(“螺环基”基团)结构，例如在下式中：

[0103] 

[0104] “卤素”或“卤”是指氟、氯、溴或碘。

[0105] “KIF5B”可指代KIF5B蛋白或者KIF5B基因。KIF5B蛋白，也被称为驱动蛋白-1重链，是由KIF5B基因所编码的蛋白。可从哺乳动物(例如人)中得到KIF5B蛋白。编码人KIF5B蛋白的人KIF5B基因局限于染色体10(10q11.22)并且含有26个外显子。在本文中将对KIF5B作进一步描述。

[0106] “KIF5B-RET融合蛋白或基因”是指包含融合伴侣的N-末端结构域(例如KIF5B和RET蛋白的C-末端结构域)的融合蛋白。融合伴侣的N-末端结构域可位于融合蛋白的N-末端，并且RET蛋白的C-末端结构域可位于融合蛋白的C-末端。融合伴侣可以是KIF5B蛋白的N-末端结构域，该结构域位于融合蛋白的N-末端。在这种情况下，可将融合蛋白表示为KIF5B-RET蛋白，该蛋白包含在N-末端的KIF5B蛋白的N-末端结构域和在C-末端的RET蛋白的C-末端结构域。另一个实施方案提供一种编码融合蛋白的融合基因，其中一个基因编码在5’端的融合伴侣位置的N-末端结构域并且一个基因编码在3’端的RET蛋白位置的C-末端结构域。

[0107] 用于本发明目的“患者”包括人和其他动物尤其是哺乳动物、及其他生物体。因此，这些方法同时适用于人的治疗和动物用途。在另一个实施方案中患者是哺乳动物，在另一个实施方案中患者是人。

[0108] 化合物的“药学上可接受的盐”表示是药学上可接受的且具备母体化合物的期望药理活性的盐。当然药学上可接受盐是无毒的。关于合适的药学上可接受盐的其他信息可参见Remington’s Pharmaceutical Sciences，第17版，Mack Publishing Company，Easton,PA,1985年，其通过引用并入本文；或者S.M.Berge等人，“Pharmaceutical Salts”，J.Pharm.Sci.,1977;66:1-19，其通过引用并入本文。

[0109] 药学上可接受的酸加成盐的例子包括与以下酸所形成的盐：无机酸，例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等；以及有机酸，例如乙酸、三氟乙酸、丙酸、己酸、环戊烷丙酸、羟基乙酸、丙酮酸、乳酸、草酸、马来酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、酒石酸、苹果酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、3-(4-羟基苯甲酰基)苯甲酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、1,2-乙二磺酸、2-羟基乙磺酸、苯磺酸、4-氯苯磺酸、2-萘磺酸、4-甲基苯磺酸、樟脑磺酸、葡庚糖酸、4,4’-亚甲基双-(3-羟基-2-烯-1-羧酸)、3-苯基丙酸、三甲基乙酸、叔丁基乙酸、十二烷基硫酸、葡萄糖酸、谷氨酸、羟基萘甲酸、水杨酸、硬脂酸、粘康酸、对甲苯磺酸等。

[0110] “前药”是指在体内被转化(通常快速地)而产生以上化学式的母体化合物(例如通过在血液中的水解)的化合物。常见的例子包括但不限于:具备含有羧酸基团的活性形式的化合物的酯和酰胺形式。本发明化合物的药学上可接受的酯类的例子包括但不限于:烷基酯类(例如含有在大约1和大约6之间的碳),其中烷基是直链或支链。可接受的酯类还包括环烷基酯类和芳烷基酯类,例如但不限于苄基酯类。本发明化合物的药学上可接受的酰胺类的例子包括但不限于:伯酰胺类、及仲和叔烷基酰胺类(例如具有在大约1个和大约6个之间的碳)。可按照常规方法来制备本发明化合物的酰胺类和酯类。在T.Higuchi和V.Stella,“Pro-drugs as Novel Delivery Systems”,A.C.S.Symposium Series的第14卷,和Bioreversible Carriers in Drug Design,Edward B.Roche编,American Pharmaceutical Association and Pergamon Press,1987中提供了对前药的详尽论述,其通过引用并入本文,用于所有目的。

[0111] “RET”或者“RET蛋白”是一种跨膜受体酪氨酸激酶,将在本文中对其作进一步的描述。

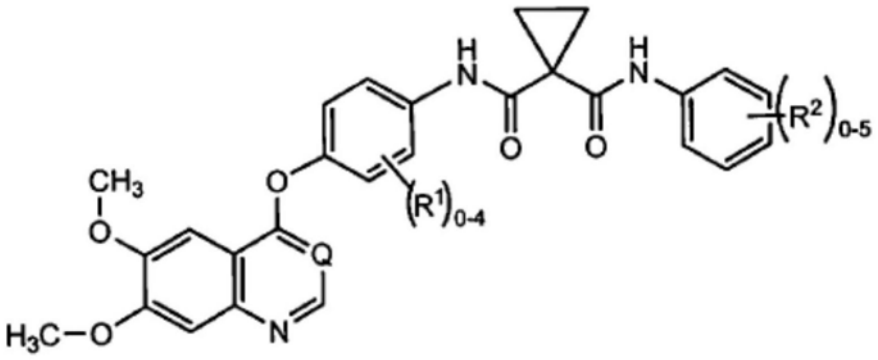
[0112] “治疗有效量”是向患者施用时减轻疾病症状的本发明化合物的量。治疗有效量意图包括有效地调节c-Met和/或VEGFR2或者有效地治疗或预防癌症的化合物(单独或者与其他活性成分组合)的量。构成“治疗有效量”的本发明化合物的量,将根据化合物、被治疗患者的疾病状态及其严重程度、年龄等而变化。可以由本领域技术人员根据他们的知识和本公开来决定治疗有效量。

[0113] 本文中使用的疾病、疾患或综合征的“治疗(treating/treatment)”包括:(i)预防疾病、疾患或综合征在人体中发生,即导致疾病、疾患或综合征的临床症状不在暴露于或易于患上疾病、疾患或综合征但尚未经历或显示疾病、疾患或综合征的症状的动物中出现;(ii)逆转或抑制疾病、疾患或综合征,即阻止其出现;和(iii)缓解疾病、疾患或综合征,即导致疾病、疾患或综合征的消退。正如本领域中所知,基于全身给药还是局部给药、年龄、体重、健康状况、性别、饮食、给药时间、药物相互作用和病症严重程度所进行的调整是必需的,并且可根据常规经验来确定。

[0114] 将本文中所描述的每个反应的“产率”表示为理论产率的百分率。

[0115] 实施方案

[0116] 在一个实施方案中,式I化合物是式Ia的化合物:

[0117] 

式 Ia

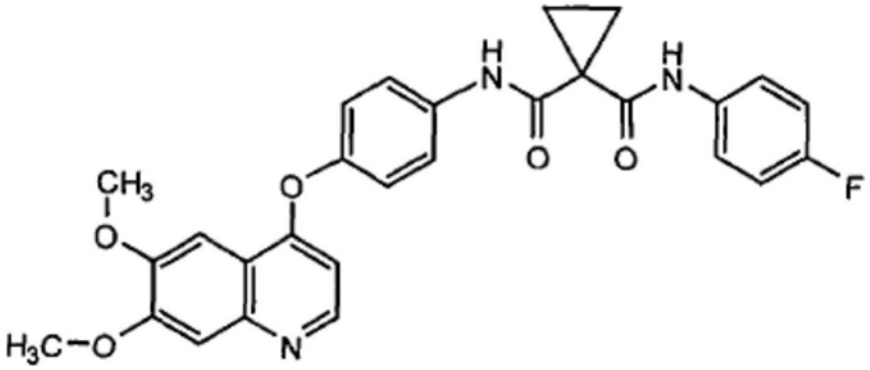
[0118] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0119] R^1是卤素；

[0120] R^2是卤素；并且

[0121] Q是CH或N。

[0122] 在另一个实施方案中，式I化合物是化合物1：

[0123] 

化合物1

[0124] 或其药学上可接受的盐。如前所述，化合物1在本文称为N-(4-{[6,7-双(甲氧基)喹啉-4-基氧}苯基)-N'-(4-氟苯基)环丙烷-1,1-二甲酰胺。WO 2005/030140(其全部内容通过引用并入本文)公开了化合物1并描述了如何制备它(实施例12、37、38和48)，而且还公开了此化合物抑制、控制和/或调节激酶的信号转导的治疗活性(测定，表4，条目289)。实施例48在WO 2005/030140的段落[0353]中。

[0125] 在其他实施方案中，以药物组合物的形式将式I、Ia的化合物或化合物1或者其药学上可接受的盐施用，其中该药物组合物另外包含药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。在一个具体实施方案中，式I化合物是化合物1。

[0126] 如本文中所述，式I、式Ia的化合物和化合物I均包括所列举的化合物以及单独异构体和异构体的混合物。在每种情况下，式I化合物包括所列举化合物的药学上可接受的盐、水合物和/或溶剂化物以及其任何单独异构体或异构体的混合物。

[0127] 在其他实施方案中，式I、Ia的化合物或化合物1可以是(L)-苹果酸盐。PCT/US2010/021194和USSN 61/325095中公开了式I化合物和化合物1的苹果酸盐，这两篇专利文献的内容通过引用并入本文。

[0128] 在其他实施方案中，式I化合物是(D)-苹果酸盐。

[0129] 在其他实施方案中，式Ia的化合物是苹果酸盐。

[0130] 在其他实施方案中，式Ia的化合物是(L)-苹果酸盐。

[0131] 在其他实施方案中，化合物1是(D)-苹果酸盐。

[0132] 在其他实施方案中，化合物1是苹果酸盐。

[0133] 在其他实施方案中，化合物1是(L)-苹果酸盐。

[0134] 在另一个实施方案中，苹果酸盐是化合物1的(L)苹果酸盐和/或(D)苹果酸盐的结晶N-1形式或N-2形式，如美国专利申请序号61/325095中所公开。关于包括化合物1的苹果酸盐的N-1和/或N-2结晶形式的结晶对映异构体的性质，还参见WO 2008/083319，其通过引用整体并入本文。PCT/US10/021194中充分描述了制备和表征此类结晶形式的方法，其通过引用整体并入本文。

[0135] 在另一个实施方案中，本发明涉及一种用于逆转或抑制NSCLC的方法，该方法包括向需要这种治疗的患者施用治疗有效量的本文中所公开的任何实施方案中的式I化合物。在一个具体实施方案中，式I化合物是化合物1。

[0136] 在另一个实施方案中，本发明涉及一种用于逆转或抑制KIF5B-RET融合阳性NSCLC的方法，该方法包括向需要这种治疗的患者施用治疗有效量的在本文中所公开的任何实施方案中的式I化合物。在一个具体实施方案中，式I化合物是化合物1。

[0137] 在另一个实施方案中，在一个或多个其他治疗之前、同时或之后施用式I化合物。在另一个实施方案中，在一个或多个治疗之后施用式I化合物。“治疗”表示本领域技术人员可用的任何治疗选择，包括手术、化学治疗剂、激素治疗、抗体、免疫治疗、放射性碘治疗和放射治疗。具体地，“治疗”表示另一种化学治疗剂或抗体。

[0138] 因此，在另一个实施方案中，在顺铂和/或吉西他滨治疗之后施用式I化合物。

[0139] 在另一个实施方案中，在多烯紫杉醇治疗之后施用式I化合物。

[0140] 在另一个实施方案中，在HER-2抗体治疗之后施用式I化合物。在另一个实施方案中，HER-2抗体是曲妥珠单抗(trastuzumab)。

[0141] 在另一个实施方案中，在顺铂和/或吉西他滨和/或多烯紫杉醇治疗之后施用式I化合物。

[0142] 在另一个实施方案中，在片剂或胶囊中每日一次口服施用式I、Ia的化合物或化合物1或者其药学上可接受的盐。在这些和其他实施方案中，式I化合物是化合物1。

[0143] 在另一个实施方案中，在胶囊或片剂中以其游离碱或苹果酸盐的形式口服施用化合物1。

[0144] 在另一个实施方案中，在含有多达100mg化合物1的胶囊或片剂中，以其游离碱或苹果酸盐的形式每日一次口服施用化合物1。

[0145] 在另一个实施方案中，在含有100mg化合物1的胶囊或片剂中，以其游离碱或苹果酸盐的形式每日一次口服施用化合物1。

[0146] 在另一个实施方案中，在含有95mg化合物1的胶囊或片剂中，以其游离碱或苹果酸盐的形式每日一次口服施用化合物1。

[0147] 在另一个实施方案中，在含有90mg化合物1的胶囊或片剂中，以其游离碱或苹果酸盐的形式每日一次口服施用化合物1。

[0148] 在另一个实施方案中，在含有85mg化合物1的胶囊或片剂中，以其游离碱或苹果酸盐的形式每日一次口服施用化合物1。

[0149] 在另一个实施方案中，在含有80mg化合物1的胶囊或片剂中，以其游离碱或苹果酸盐的形式每日一次口服施用化合物1。

[0150] 在另一个实施方案中，在含有75mg化合物1的胶囊或片剂中，以其游离碱或苹果酸盐的形式每日一次口服施用化合物1。

[0151] 在另一个实施方案中，在含有70mg化合物1的胶囊或片剂中，以其游离碱或苹果酸盐形式每日一次口服施用化合物1。

[0152] 在另一个实施方案中，在含有65mg化合物1的胶囊或片剂中，以其游离碱或苹果酸盐的形式每日一次口服施用化合物1。

[0153] 在另一个实施方案中，在含有60mg化合物1的胶囊或片剂中，以其游离碱或苹果酸

盐的形式每日一次口服施用化合物1。

[0154] 在另一个实施方案中，在含有55mg化合物1的胶囊或片剂中，以其游离碱或苹果酸盐的形式每日一次口服施用化合物1。

[0155] 在另一个实施方案中，在含有50mg化合物1的胶囊或片剂中，以其游离碱或苹果酸盐的形式每日一次口服施用化合物1。

[0156] 在另一个实施方案中，在含有45mg化合物1的胶囊或片剂中，以其游离碱或苹果酸盐形式每日一次口服施用化合物1。

[0157] 在另一个实施方案中，在含有40mg化合物1的胶囊或片剂中，以其游离碱或苹果酸盐的形式每日一次口服施用化合物1。

[0158] 在另一个实施方案中，在含有30mg化合物1的胶囊或片剂中，以其游离碱或苹果酸盐的形式每日一次口服施用化合物1。

[0159] 在另一个实施方案中，在含有25mg化合物1的胶囊或片剂中，以其游离碱或苹果酸盐的形式每日一次口服施用化合物1。

[0160] 在另一个实施方案中，在含有20mg化合物1的胶囊或片剂中，以其游离碱或苹果酸盐的形式每日一次口服施用化合物1。

[0161] 在另一个实施方案中，在含有15mg化合物1的胶囊或片剂中，以其游离碱或苹果酸盐的形式每日一次口服施用化合物1。

[0162] 在另一个实施方案中，在含有10mg化合物1的胶囊或片剂中，以其游离碱或苹果酸盐的形式每日一次口服施用化合物1。

[0163] 在另一个实施方案中，在含有5mg化合物1的胶囊或片剂中，以其游离碱或苹果酸盐的形式每日一次口服施用化合物1。

[0164] 在另一个实施方案中，在如下表中所提供的片剂中，以其游离碱或苹果酸盐的形式每日一次口服施用化合物1。

[0165]

成分	(%w/w)
化合物1	31.68
微晶纤维素	38.85
无水乳糖	19.42
羟丙基纤维素	3.00
交联羧甲基纤维素钠	3.00
颗粒内总计	95.95
胶体二氧化硅	0.30
交联羧甲基纤维素钠	3.00
硬脂酸镁	0.75
总计	100.00

[0166] 在另一个实施方案中，在如下表中所提供的片剂中，以其游离碱或苹果酸盐的形式每日一次口服施用化合物1。

[0167]

成分	(%w/w)
化合物1	25.0-33.3
微晶纤维素	适量

羟丙基纤维素	3
泊洛沙姆	0-3
交联羧甲基纤维素钠	6.0
胶体二氧化硅	0.5
硬脂酸镁	0.5-1.0
总计	100

[0168] 在另一个实施方案中,在如下表中所提供的片剂中,以其游离碱或苹果酸盐的形式每日一次口服施用化合物1。

[0169]

成分	理论量(mg/单位剂量)
化合物1	100.0
微晶纤维素PH-102	155.4
无水乳糖60M	77.7
羟丙基纤维素,EXF	12.0
交联羧甲基纤维素钠	24
胶体二氧化硅	1.2
硬脂酸镁(非牛的)	3.0
欧巴代黄	16.0
总计	416

[0170] 可以根据期望的化合物1的剂量,对上面所提供的任何片剂制剂进行调整。因此,可以成比例地对每个制剂成分的量进行调整,以提供如在前面段落中所提供的含有各种量的化合物1的稳定制剂。在另一个实施方案中,这些制剂可以含有20、40、60或80mg的化合物1。

[0171] 在这些和其他实施方案中,本发明提供一种用于抑制或逆转哺乳动物中异常细胞生长的进展的方法,该方法包括施用化合物1或其药学上可接受的盐,其中异常细胞生长是由KIF5B-RET所介导的癌症。在一个实施方案中,癌症是肺腺癌。在另一个实施方案中,肺腺癌是非小细胞肺癌。在另一个实施方案中,肺腺癌是K1F5B-RET融合阳性非小细胞肺癌。在另一个实施方案中,以包含化合物1或其药学上可接受盐及至少一种药学上可接受的载体的药物组合物的形式,而施用化合物1或其药学上可接受的盐。在另一个实施方案中,在另一形式的治疗之后施用式I化合物。在另一个实施方案中,在顺铂和/或吉西他滨治疗之后施用化合物1。在另一个实施方案中,在多烯紫杉醇治疗之后施用化合物1。在另一个实施方案中,在顺铂和/或吉西他滨和/或多烯紫杉醇治疗之后施用化合物1。

[0172] 施用

[0173] 式I、式Ia的化合物或化合物1或者其药学上可接受盐以纯的形式或者在适当的药物组合物中的施用,可以通过任何接受的施用方式或者用于相似用途的剂来进行。因此,施用可以是例如通过口服、经鼻、胃肠外(静脉内、肌内或皮下)、局部、经皮、阴道内、膀胱内、输尿管内或直肠,并且采用固体、半固体、冻干粉或液体剂型,例如片剂、栓剂、丸剂、软弹性和硬明胶剂型(可以在胶囊或片剂中)、粉剂、溶液、悬液或气雾剂等,特别是适合于精确剂量的简单施用的单位剂量形式。

[0174] 组合物将包含常规的药用载体或赋形剂和作为活性剂的式I化合物,另外还可包

含载体和佐剂等。

[0175] 佐剂包括防腐剂、润湿剂、助悬剂、甜味剂、矫味剂、芳香剂、乳化剂和分散剂。可以用各种抗细菌剂和抗真菌剂例如对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、山梨酸等来确保防止微生物作用。还可能希望包括等渗剂，例如糖类、氯化钠等。可以通过使用吸收延迟剂(例如单硬脂酸铝和明胶)而实现可注射药物制剂的延长吸收。

[0176] 若需要，式I化合物的药物组合物也可含有少量的辅助物质，例如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂、抗氧化剂等，例如，柠檬酸、失水山梨醇单月桂酸酯、油酸三乙醇胺、丁基羟基甲苯等。

[0177] 组合物的选择取决于各种因素，例如药物施用方式(例如，就口服施用而言，是片剂、丸剂或胶囊形式的组合物)和药物的生物利用度。最近，已基于可以通过增大表面积(即减小粒径)来提高生物利用度的原理来开发药物组合物，特别是显示低生物利用度的药物。例如，美国专利第4,107,288号描述了一种具有在10至1,000nm粒径范围内的颗粒的药物组合物，其中在大分子的交联基质上支持活性物质。美国专利第5,145,684号描述了药物组合物的制造，其中在表面修饰剂存在下将药物粉碎成纳米粒子(平均粒径400nm)，然后分散于液体介质中以提供显示显著高的生物利用度的药物组合物。

[0178] 适用于胃肠外注射的组合物可包括：生理可接受的无菌水溶液或非水溶液、分散液、悬液或乳液，和用于重构成无菌可注射溶液或分散液的无菌粉剂。合适的水性和非水性的载体、稀释剂、溶剂或媒介物的例子包括：水、乙醇、多元醇类(丙二醇、聚乙二醇、甘油等)、合适的其混合物、植物油(例如橄榄油)和可注射有机酯类(例如油酸乙酯)。可以例如通过使用包衣(例如卵磷脂)、通过维持所需的粒径(在分散液的情况下)和通过表面活性剂的使用而维持适当的流动性。

[0179] 一个具体的施用途径是口服，采用可根据被治疗疾病状态的严重程度进行调整的方便的每日剂量方案。

[0180] 用于口服施用的固体剂型包括胶囊、片剂、丸剂、粉剂和颗粒剂。在这种固体剂型中，将活性化合物与至少一种常用的惰性赋形剂(或载体)例如柠檬酸钠或磷酸氢钙或者以下混合：(a)填充剂或增量剂，例如淀粉类、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸；(b)粘合剂，例如纤维素衍生物、淀粉、藻酸盐类、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯树胶；(c)湿润剂，例如甘油；(d)崩解剂，例如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、交联羧甲基纤维素钠、复合硅酸盐和碳酸钠；(e)溶出延迟剂，例如石蜡；(f)吸收促进剂，例如季铵盐化合物；(g)润湿剂，例如十六醇和单硬脂酸甘油酯、硬脂酸镁等；(h)吸附剂，例如高岭土和膨润土；和(i)润滑剂，例如滑石、碳酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇类、十二烷基硫酸钠或者其混合物。在胶囊、片剂和丸剂的情况下，剂型还可包含缓冲剂。

[0181] 如上所述的固体剂型用包衣和壳、例如肠溶包衣和本领域中熟知的其他包衣来制备。这些固体剂型可含有遮光剂，并且也可以是在肠道某个部分以延迟方式释放活性化合物的组合物。可以使用的埋入式组合物的例子是聚合物和蜡类。如果适合，活性化合物也可以是用一种或多种上述赋形剂微包封的形式。

[0182] 用于口服施用的液体剂型包括：药学上可接受的乳液、溶液、悬液、糖浆剂和酏剂。例如，这种剂型的制备是通过将式I化合物或其药学上可接受盐和任选的药用佐剂在载体、增溶剂和乳化剂、油或这些物质的混合物中溶解、分散等，由此形成溶液或悬浮液，所述载

体例如是水、生理盐水、葡萄糖水溶液、甘油、乙醇等;所述增溶剂和乳化剂是例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苄醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺;所述油特别是棉籽油、花生油、玉米胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇类和山梨糖醇酐的脂肪酸酯类;或者这些物质的混合物等。

[0183] 悬液中除了活性化合物外还可含有助悬剂,例如乙氧基化异硬脂醇类、聚氧乙烯山梨醇和山梨糖醇酐酯类、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂和西黄蓍胶或者这些物质的混合物等。

[0184] 用于直肠施用的组合物是例如栓剂,该栓剂可以通过将式I化合物与例如合适的非刺激性赋形剂或载体(例如可可脂、聚乙二醇或栓剂蜡)混合而制备,该非刺激性赋形剂或载体在常温下为固体但在体温下为液体,因此在合适的体腔中融化并在其中释放出活性成分。

[0185] 用于式I化合物的局部施用的剂型包括软膏剂、粉剂、喷雾剂和吸入剂。在无菌条件下,将活性成分与生理可接受的载体和任何所需的防腐剂、缓冲剂或抛射剂混合。眼用组合物、眼膏剂、粉剂和溶液也被看作是在本公开的范围内。

[0186] 可以利用压缩气体将式I化合物分散在气溶胶制剂中。适用于此目的惰性气体是氮气、二氧化碳等。

[0187] 通常,基于预定的施用方式,药学上可接受的组合物将含有大约1%重量至大约99%重量的式I化合物或其药学上可接受盐和99%重量至1%重量的合适的药用赋形剂。在一个实例中,该组合物将含有在大约5%重量和大约75%重量之间的式I、式Ia的化合物或化合物1或者其药学上可接受盐,其余的是合适的药用赋形剂。

[0188] 制备这种剂型的实际方法对于本领域技术人员是已知的或者是明显的;例如,参见Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版(Mack Publishing Company,Easton,Pa.,1990)。根据本公开的教导,在任何情况下,待施用的组合物将含有治疗有效量的用于治疗疾病状态的式I化合物或其药学上可接受盐。

[0189] 本公开的化合物或者它们的药学上可接受盐或溶剂化物是以治疗有效量而施用;该治疗有效量将根据多种因素而变化,包括所使用具体化合物的活性、化合物的代谢稳定性和作用长度、正在进行治疗主体的年龄、体重、健康状况、性别、施用方式和时间、排泄率、药物组合、具体疾病状态的严重程度。以在大约0.1至大约1,000mg/日范围内的剂量水平向患者施用式I、式Ia的化合物或化合物1。对于具有大约70千克体重的正常成年人而言,在大约0.01至大约100mg/千克体重/日的范围内的剂量是一个例子。然而,使用的具体剂量可以变化。例如,剂量可以取决于许多因素,包括患者的需要、待治疗病症的严重程度和所使用化合物的药理活性。用于特定患者的最佳剂量的确定对于本领域技术人员是熟知的。

[0190] 在其他实施方案中,可以与其他癌症治疗同时地向患者施用式I、式Ia的化合物或化合物1。这种治疗包括其他的癌症化疗药物、激素替代治疗、放射治疗或免疫治疗等。其他治疗的选择将取决于许多因素,包括化合物的代谢稳定性和作用长度、正在进行治疗的主体的年龄、体重、健康状况、性别、饮食、施用方式和时间、排泄率、药物组合、具体疾病状态的严重程度。

[0191] 在另一方面,本发明提供一种用于检测、诊断和治疗RET融合相关疾病例如KIF5B-RET融合阳性NSCLC的方法。我们在这里更详细地描述了用于检测和诊断这种疾病的方法。

可以通过向已被确定或诊断为具有RET融合相关疾病(例如KIF5B-RET融合阳性NSCLC)的患者施用治疗有效量的药物组合物而更好地实现这些疾病的治疗,所述药物组合物包含式I化合物或式I化合物的苹果酸盐或式I化合物的另一种药学上可接受盐,包括在一个具体实施方案中式I化合物是化合物1或化合物1的苹果酸盐。下面对RET融合进行描述。

[0192] RET和KIF5B

[0193] RET蛋白、KIF5B蛋白、KIF5B-RET融合或者有时简单地称为“融合蛋白和核酸”,包括用于检测和诊断的方法、用于检测和诊断的试剂盒、筛选的方法、治疗和预防的方法和肺癌患者的各种治疗、测量治疗和其他药用成分的效力的方法,可以与下述各种治疗组合使用。

[0194] RET蛋白是一种跨膜受体酪氨酸激酶。RET是由细胞外区(含有钙粘蛋白样结构域)、跨膜结构域和含有酪氨酸激酶结构域的细胞内区所组成。当通过与辅助受体和配体(例如胶质细胞衍生的神经营养因子(GDNF))结合而使RET蛋白成为二聚物时,其通过自身磷酸化而被激活然后模拟下游信号传导通路。

[0195] 可从哺乳动物(例如人)中得到RET蛋白。编码人RET蛋白的人RET基因局限于染色体10(10q11.2)并且根据变体而含有19-21个外显子。可由人RET基因编码人RET蛋白。RET蛋白的C-末端结构域可包含由从RET基因的第12外显子到最后一个外显子(例如,第20外显子)的多核苷酸所编码的氨基酸序列。RET蛋白的C-末端结构域可包含从第12外显子的开始位置起的连续的至少大约300个氨基酸。例如,RET蛋白的C-末端结构域可包含从第12外显子(例如,第713位置)的开始位置朝向RET蛋白(20个外显子)的C-末端的、连续的大约300至大约450个氨基酸、连续的大约300至大约420氨基酸或者连续的大约300至大约402个氨基酸。

[0196] KIF5B蛋白,也称为驱动蛋白-1重链,是一种由KIF5B基因编码的蛋白。可从哺乳动物(例如人)中得到KIF5B蛋白。编码人KIF5B蛋白的人KIF5B基因局限于染色体10(10q11.22)并且含有26个外显子。KIF5B蛋白的N-末端结构域可包含由从KIF5B基因的第1外显子到第16外显子或者从第1外显子到第15外显子或者从第1外显子到第23外显子的多核苷酸所编码的氨基酸序列。KIF5B蛋白的N-末端结构域可包含从KIF5B蛋白的第1位置开始(即,至少从第1位置到第329位置的氨基酸序列)的连续的至少大约329个氨基酸。KIF5B蛋白的N-末端结构域还可包含从KIF5B蛋白的第329位置的氨基酸开始的至少两个卷曲螺旋结构域。例如,进一步包含的这两个卷曲螺旋结构域可具有从KIF5B蛋白的第329到第63820个位置的氨基酸序列。KIF5B蛋白的N-末端结构域可包含从KIF5B蛋白的第1位置开始的、连续的大约329至900个氨基酸、连续的大约329至700个氨基酸、连续的大约329至650个氨基酸或者连续的大约329至638个氨基酸。

[0197] KIF5B-RET融合是具有在染色体10上的倒位或易位的RET相关染色体重排。可利用本领域技术人员已知的和/或如本文中所描述的各种方法,对融合蛋白进行检测和验证。然后被描述用于预防或治疗肺癌的式I的组合物中包含至少一种针对融合蛋白的抑制剂、至少一种针对编码融合蛋白的融合基因的抑制剂、至少一种针对RET编码基因的抑制剂或者其组合作为活性成分。

[0198] 在融合蛋白中,可在KIF5B基因和RET基因的各种外显子之间形成融合或融合区。许多融合对于本领域技术人员是已知的。这种融合的例子包括KIF5B基因的第20或第16外

显子及RET基因的第12外显子，该第12外显子被称为融合点或断裂点。其他的RET和KIF5B融合或断裂点是已知的。术语“融合区”可指代在融合点周围的多核苷酸片段(大约30个核苷酸)或多肽(大约30个氨基酸)片段。

[0199] 在其他的变体中，融合蛋白被描述为以下的任意一种：其中KIF5B蛋白的N-末端结构域基本上是由从KIF5B蛋白的第1位置开始的连续的至少大约329个氨基酸所组成，正如由美国国立生物技术信息中心(NCBI)所描述的。融合蛋白，其中KIF5B蛋白的N-末端结构域包含从KIF5B蛋白的第329位置氨基酸开始的至少两个KIF5B卷曲螺旋结构域。融合蛋白，其中KIF5B蛋白的N-末端结构域20基本上是由从第1外显子到第16外显子或者从第1外显子到第15外显子或者从多核苷酸的第1外显子到第23外显子的多核苷酸所编码的氨基酸序列所组成，正如由美国国立生物技术信息中心(NCBI)所描述的。其他已知的在染色体10上的RET融合包括：在外显子15、16、22、23、24处的KIF5B(均具有RET外显子12)，和在外显子24处的具有RET外显子11和外显子8的KIF5B。在外显子1处的CCDC6和在外显子12处的RET；在外显子6处的NCOA4和在外显子12处的RET和在外显子14处的TRIM33和在外显子12处的RET(全部在染色体10上)是已知的RET融合。在外显子14处的TRIM33和在外显子12处的RET与肺癌有关，并且已知此类型的癌症对卡博替尼给药有良好的反应。参见Alexander Drilon、Lu Wang、Adnan Hasanovic等人的Cancer Discovery，首先于2013年3月26日在线公开；DOI:10.1158/2159-8290.CD-13-0035，参考美国癌症研究协会，2013年6月。

[0200] 在一个实施方案中，在融合蛋白中，RET蛋白的C-末端结构域基本上是由从对应于融合蛋白的第12外显子的开始位置的氨基酸开始朝向RET蛋白的C-末端的连续的大约300至450个氨基酸所组成。

[0201] 本文中使用的外显子编号是按照由美国国立生物技术信息中心(NCBI)分配的外显子编号进行编号。融合蛋白KIF5B-RET可具有由NCBI所确定的任何氨基酸序列。可用自动DNA测序仪或自动肽测序仪来确定DNA分子的核苷酸序列和由DNA分子所编码蛋白的氨基酸序列。与实际序列相比，由这种自动测序装置所确定的(核苷酸或氨基酸)序列可包含部分误差。通常，与实际序列相比，通过自动测序所确定的序列可具有至少大约90％、至少20大约95％、至少大约99％或者至少大约99.9％的序列一致性。因此，融合蛋白、融合基因或融合区可具有与由NCBI所确定序列相比具有至少大约90％、至少大约95％、至少大约99％或者至少大约99.9％的序列一致性的氨基酸序列或核苷酸序列。

[0202] 在一些实施方案中，融合蛋白可由KIF5B的638个N-末端残基和RET的402个C-末端残基所组成。融合基因具有蛋白酪氨酸激酶结构域以及卷曲螺旋结构域。卷曲螺旋结构域导致均二聚化，该二聚化将通过自身磷酸化而激活致癌的蛋白酪氨酸激酶结构域。KIF5B是一种基于微管的驱动蛋白，该蛋白由于其主动启动子而被广泛地表达并且与真核细胞中细胞器的运输有关。合并地考虑，KIF5B-RET融合基因可被高度地表达，然后在翻译后由于KIF5B而形成二聚物。然后，二聚的RET蛋白酪氨酸激酶结构域会被异常地刺激，因此促进对致癌途径的刺激。

[0203] 一旦检测到融合，它将被称为编码KIF5B-RET的融合蛋白的KIF5B-RET的融合基因。提供用于诊断肺癌的信息的方法包括在从受试者中所获得试样中对融合进行检测的步骤，如本文中所描述。诊断将会对编码融合蛋白的融合基因进行比较；以及与取自没有癌症的个体的标准样品相比RET的过表达，其中当选择至少一个因素并且在试样中进行检测时，

允许将受试者确定为以下中的任一个或全部:癌症患者、肺癌患者、NSCLC肺癌患者、RET融合相关NSCLC患者和/或KIF5B-RET融合相关NSCLC患者。

[0204] 通过使用能够与染色体10中的倒位区杂交(互补地结合)的多核苷酸(探针)和/或能够检测染色体10中的倒位的引物对例如能够产生具有包含染色体10中的倒位区的连续的100至200个核苷酸的多核苷酸片段,可以对染色体10的倒位进行检测。本文中对融合蛋白、融合基因和融合区进行了描述。在一个具体实施方案中,也可以通过检测融合蛋白或融合基因或者与融合基因相对应的mRNA,而对融合蛋白进行检测。

[0205] 可对融合蛋白的存在进行检测的方法是测定融合蛋白与特异性地与融合蛋白结合的物质(例如,抗体或适体)之间相互作用的常规测定。该常规测定可以是免疫层析、免疫组织化学染色、酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、酶免疫分析(EIA)、荧光免疫分析(FIA)、发光免疫分析(LIA)、western印迹、FACS等。

[0206] 另外,可通过使用能够与融合基因或mRNA杂交(互补地结合)的多核苷酸的常规测定(例如PCR、FISH(荧光原位杂交)等)对融合基因或mRNA的存在进行检测。下面对FISH进行更详细描述。可通过采用全转录物组(RNA)的集成技术和/或利用大规模并行测序技术的全基因组DNA测序,对融合基因进行检测和/或验证。能够与融合基因或mRNA杂交的多核苷酸可以是siRNA、寡核苷酸、DNA探针或DNA引物,该DNA引物可以通过与试样中的融合或截短的基因或转录物直接杂交而对融合基因或mRNA进行检测。

[0207] 可以使用一个或多个探针组来执行FISH测定,并且提供如下的实施方案:(1)第一探针组,它是将含有RET基因(第一染色体位点)的染色体位点作为靶的第一探针组;它是由用第一荧光物质标记的探针1A和用第二荧光物质标记的探针1B所组成;探针1A与第一区是互补的,该第一区是在前述第一染色体位点中的5'区;探针1B与第二区互补,该第二区存在于远离前述第一区的位置并且是在前述第一染色体位点中的3'区,并且当通过KIF5B基因与RET基因之间的易位而产生KIF5B-RET融合基因时RET基因中的断裂点位于前述第一区的3'尾、在前述第一区和第二区之间或者在前述第二区的5'尾中;(2)第二探针组,它是将含有KIF5B基因的染色体位点(第二染色体位点)作为靶的第二探针组;它是由用第一荧光物质标记的探针2A和用第二荧光物质标记的探针2B所组成;探针2A与第一区是互补的,该第一区是在前述第二染色体位点中的5'区,探针2B与第二区是互补的,该第二区存在于远离前述第一区的位置并且是在前述第二染色体位点中的3'区,并且当通过在KIF5B基因与RET基因之间的易位而产生KIF5B-RET融合基因时KIF5B基因中的断裂点位于前述第一区的3'尾、在前述第一区和第二区之间或者位于前述第二区的5'尾;(3)第三探针组,它由前述探针2A和前述探针1B所组成;和(4)第四探针组,它是由与含有RET基因的染色体位点(第三染色体位点)是互补的探针4A和与含有KIF5B基因的染色体位点(第四染色体位点)是互补的探针4B所组成。

[0208] 前述第一染色体位点的长度可以是0.5-2.0Mb。前述第二染色体位点的长度可以是0.5-2.0Mb。前述第三染色体位点的长度可以是0.5-2.0Mb。前述第四染色体位点的长度可以是0.5-2.0Mb。

[0209] 用于检测KIF5B基因与RET基因之间易位的试剂盒可包括一个或多个探针组。(1)第一探针组包含用第一荧光物质标记的探针1A和用第二荧光物质标记的探针1B;探针1A与第一区是互补的,该第一区是在前述第一染色体位点中的5'区,探针1B与第二区是互补的,

该第二区存在于远离前述第一区的位置并且是在前述第一染色体位点中的3'区，当通过KIF5B基因与RET基因之间易位而产生KIF5B-RET融合基因时RET基因中的断裂点位于前述第一区的3'尾、在前述第一区和第二区之间或者位于前述第二区的5'尾中；(2)第二探针组，它是将含有KIF5B基因的染色体位点(第二染色体位点)作为靶的第二探针组；它是由用第一荧光物质标记的探针2A和用第二荧光物质标记的探针2B所组成；探针2A与第一区是互补的，该第一区是在前述第二染色体位点中的5'区，探针2B与第二区是互补的，该第二区存在于远离前述第一区的位置并且是在前述第二染色体位点中的3'区，当通过KIF5B基因与RET基因之间易位而产生KIF5B-RET融合基因时KIF5B基因中的断裂点位于前述第一区的3'尾、在前述第一区和第二区之间或者位于前述第二区的5'尾；(3)第三探针组，它是由前述探针2A和前述探针1B所组成；和第四探针组，它由与含有RET基因的染色体位点(第三染色体位点)是互补的探针4A和与含有KIF5B基因的染色体位点(第四染色体位点)是互补的探针4B所组成。

[0210] 可用于确定易受到RET-KIF5B易位影响的患者的试剂盒包括一个或多个要素，该要素选自探针使用的说明书、DNA对比染色剂、用于杂交用途的缓冲剂、封装材料和对照载玻片。该试剂盒能够方便且高效率地执行本发明的检测方法。根据需要，该试剂盒可以包括所需的要素(基本成分)、前述的第一探针组、第二探针组、第三探针组或第四探针组。该试剂盒中也可以包括两个或更多类型的探针组。例如，该试剂盒可以包括第一探针组和第三探针组。因为上面已描述了各探针组的细节内容，所以这里将不再重复。

[0211] 可以直接地使用编码前述融合多肽的基因组DNA或者取自该基因组DNA的转录物来执行“对KIF5B-RET融合多核苷酸的存在或不存在的检测”，但也可以使用取自该转录物(前述融合多肽)的翻译产物而间接地执行该检测。

[0212] 因为通过10p11.2区与10q11.2区之间的倒位而形成编码融合多肽的基因组DNA，所以可在“对KIF5B-RET融合多核苷酸的存在或不存在的检测”中检测到本发明的现象。在此倒位的检测中，例如，可检测出在RET基因的激酶结构域编码区上游的5'-侧区与在RET基因的编码区的下游的3'-侧区之间的断裂，或者可检测出在编码钙粘蛋白重复序列的区域和在RET基因的编码区上游的5'-侧区和跨膜结构域的编码区和在RET基因的编码区下游的3'-侧区之间的断裂，或者可检测出在部分或全部的曲螺旋结构域的编码区和在KIF5B基因的编码区上游的5'-侧区和在KIF5B基因的卷曲螺旋结构域的编码区下游的3'-侧区之间断裂。

[0213] 本领域技术人员已知的和可利用的技术可用于本发明的“对KIF5B-RET融合多核苷酸的存在或不存在的检测”。如果“编码前述融合多肽的基因组DNA”为对象，则可采用例如使用荧光等的原位杂交(ISH)法、基因组PCR法、直接测序法、DNA印迹法或基因组微阵列分析法。如果“取自前述基因组DNA的转录物”为对象，则可采用例如RT-PCR法、直接测序法、RNA印迹法、斑点印迹法或cDNA微阵列分析法。

[0214] 本发明的试剂盒还可以包括其他要素。这些其他要素的例子是探针使用的说明书、DNA反染色(例如DAPI)、杂交缓冲剂、洗涤缓冲剂、溶剂、淬灭剂、对照载玻片、反应容器和其他设备。也可以包含用于诊断目的说明书。此外，也可以包含显示如何检测取自应该在这些患者中安排使用RET激酶抑制剂的癌症患者中检测(阳性鉴定)染色体样品中的KIF5B-RET易位的说明书等。此外，还可以包括用于确定疗程的计划和对此计划的解释。

[0215] 假定有相对较长的探针(大约200kb(探针1A)至大约1,370kb(探针4B))。因此,如果实现本发明中所预期的特定杂交,那么探针与靶序列之间的互补无需是高度限制性的。靶序列之间的相似性的一个例子为至少90%、优选至少95%、更优选至少98%。

[0216] 在其中使用第一探针组和第二探针组的情况下,在其中在KIF5B基因与RET基因之间发生易位的染色体样品中,单独地对两个荧光信号进行分离和检测;在其中不发生易位的染色体样品中,通常观察到相互紧靠的两个荧光信号,或者观察到是这两个荧光信号的组合的信号(黄色)。因此,KIF5B基因与RET基因之间易位的存在或不存在被反映在荧光信号的谱型中。因此,可以基于荧光信号的谱型来判断KIF5B基因与RET基因之间的易位。

[0217] 上面所实现的判断优选地且通常是基于与对照品(试样)的结果比较来进行。这里,对照品是从非小细胞肺癌患者中获得的染色体样品或者从显示癌前病变的患者中获得的染色体样品。另外,也可以将取自无癌前病变的患者的染色体样品、取自未患有癌症的患者的染色体样品或者取自正常的健康受试者的染色体样品用作对照品。也可以将从细胞株中获得的染色体样品用作对照品。

[0218] 当融合基因是编码KIF5B-RET的融合蛋白的融合基因KIF5B-RET时,可通过使用能够与融合区杂交(互补地结合)并且/或者能够产生具有包含融合区的连续的100至200个核苷酸的多核苷酸片段的引物对的多核苷酸(探针),而对融合基因KIF5B-RET进行检测。另外,可使用特异性地与融合蛋白KIF5B-RET的融合区结合的抗体或适体,对融合蛋白KIF5B-RET进行检测。

[0219] 另外,可以通过是显色原位杂交(CISH)法与银原位杂交(SISH)法的组合的融合测定而执行检测。本说明书中的“融合点”是指从KIF5B的各个基因中所获得的部分与从RET基因中所获得的部分发生融合的点。

[0220] 术语“能够与融合区(或倒位区)杂交”可指代具有与该融合区(或倒位区)的互补序列或者具有至少90%序列一致性的序列。另一个实施方案提供一种用于诊断癌症的组合物,该组合物包括一个或多个选自能够与融合区杂交的多核苷酸、能够产生包含融合区的具有连续的100至200个核苷酸的多核苷酸片段的引物对的组分。另外,还包括能够与染色体10中的倒位区杂交的多核苷酸、能够产生包含染色体10的倒位区的具有连续100至200个核苷酸的多核苷酸片段的引物对和与融合区结合的抗体或适体。另一个实施方案提供一种用于诊断癌症的融合蛋白和/或融合基因的使用方法。患者可以是任何哺乳动物,例如灵长类动物(例如人或猴)、啮齿动物(例如小鼠或大鼠),特别是人。用于任何所述测定的试样可以是细胞(例如,肺细胞);组织(例如,肺组织);体液(例如,血液);循环的肿瘤DNA、循环的肿瘤细胞。可以以本领域技术人员已知的任何方式包括从肿瘤的手术活检、肿瘤的穿刺活检、肿瘤的细针吸出物、胸腔积液中采集,以及从患者中分离细胞和组织的其他已知方法,来采集这些样品。例如,可以在循环的肿瘤细胞中执行FISH测定(本文中描述的)。

[0221] 患者可接受治疗或者具有用激酶抑制剂治疗的计划。试样可包括从人癌细胞或其提取物中获得的细胞。

[0222] 另一个实施方案提供一种编码融合蛋白的融合基因,其中一个基因编码在5’端的融合伴侣位置的N-末端结构域并且一个基因编码在3’端的RET蛋白位置的C-末端结构域。在一个具体实施方案中,当融合蛋白是KIF5B-RET蛋白时,可将融合基因表示为KIF5B-RET基因,其中一个基因编码在5’端的KIF5B位置的N-末端结构域并且一个基因编码在3’端的

RET蛋白位置的C-末端结构域。

[0223] 另一个实施方案提供一种表达载体,该表达载体包含融合基因和任选地可操作地连接到融合基因的转录因子(例如,启动子等)。另一个实施方案提供一种利用表达载体进行转化的转化细胞。

[0224] 经常对在治疗或诊断过程中所获得的生物试样(活检样品等)进行甲醛固定,但在这种情况下有利的是采用原位杂交,因为作为检测对象的DNA基因组在甲醛固定的情况下是稳定的,因为检测灵敏度高。

[0225] 在原位杂交中,可以通过将下述(a)或(b)的具有至少15个碱基链长的多核苷酸进行杂交,而对生物试样中的编码KIF5B-RET融合多肽的基因组DNA进行检测:

[0226] (a)多核苷酸,其是选自杂交到编码KIF5B蛋白的多核苷酸的探针和杂交到编码RET蛋白的多核苷酸的探针的至少一个探针

[0227] (b)多核苷酸,其是杂交到编码KIF5B蛋白的多核苷酸与编码RET蛋白的多核苷酸的融合位点的探针。

[0228] 然而,基因的DNA序列会在自然界中发生突变(即,非人工地)。因此,这种天然变体也可以是本发明的对象(在下文中也是类似的)。

[0229] 本发明的在(a)中所陈述的多核苷酸可以是任意的多核苷酸,假设它可以通过杂交到编码KIF5B蛋白的多核苷酸或编码RET蛋白(是该多核苷酸的靶基因序列)的多核苷酸而检测编码生物试样中的前述KIF5B-RET融合多肽的基因组DNA的存在。优选的是在下面(a1)至(a4)中所陈述的多核苷酸。

[0230] (a1)杂交到部分或全部的卷曲螺旋结构域的编码区和在KIF5B基因的编码区(在下文中也被称为“5'KIF5B探针1”)上游的5'-侧区的多核苷酸与杂交到激酶结构域的编码区和在RET基因的编码区(在下文中也被称为“3'RET探针1”)下游的3'-侧区的多核苷酸的组合。

[0231] (a2)杂交到在RET基因的激酶结构域的编码区(在下文中也被称为“5'RET探针1”)上游的5'-侧区上游的多核苷酸与杂交到激酶结构域的编码区和在RET基因的编码区(在下文中也被称为“3'RET探针1”)下游的3'-侧区的多核苷酸的组合。

[0232] (a3)杂交到钙粘蛋白重复序列的编码区和在RET基因(在下文中也被称为“5'RET探针2”)的区域的上游的5'-侧区的多核苷酸与杂交到跨膜结构域的编码区和在RET基因的该编码区(在下文中也被成为3'RET探针2”)下游的3'-侧区的多核苷酸的组合。

[0233] (a4)杂交到部分或全部的卷曲螺旋结构域的编码区和在KIF5B基因(在下文中也被称为“5'KIF5B探针1”)的编码区的上游的5'-侧区的多核苷酸与杂交到卷曲螺旋结构域的编码区和在KIF5B基因(在下文中也被称为“3'KIF5B探针1”。)的编码区的下游的3'-侧区的多核苷酸的组合

[0234] 由于对靶碱基序列的特异性和检测灵敏度的原因,原位杂交中所使用的(a1)的多核苷酸所杂交的区域(靶碱基序列)优选地是在距离KIF5B基因与RET基因的融合位点为1,000,000个碱基内的区域,并且由于同样的原因,原位杂交中所使用的(a2)至(a4)的多核苷酸所杂交的区域优选地是在距离KIF5B基因或RET基因中的断裂点为1,000,000个碱基内的区域。

[0235] 由于对靶碱基序列的特异性和检测灵敏度的原因,原位杂交中所使用的在上面

(a)或(b)中陈述的多核苷酸优选地是由可以覆盖全部的前述靶碱基序列的多种类型多肽所构成的采集物。在这种情况下,构成该采集物的多核苷酸的长度为至少15个碱基、优选100至1000个碱基。

[0236] 优选地,用荧光染料等对原位杂交中所使用的在上面(a)或(b)中陈述的多核苷酸进行标记,以便进行检测。这种荧光染料的例子包括DEAC、FITC、R6G、TexRed和Cy5,但不局限于这些染料。除了荧光染料外,也可用染料(发色体)例如DAB或者银等(基于酶金属沉积)对前述多核苷酸进行标记。

[0237] 在原位杂交中,如果使用5'KIF1B探针1和3'RET探针1,或者如果使用5'RET探针1和3'RET探针1,或者如果使用5'RET探针2和3'RET探针2,或者如果使用5'KIF1B探针1和3'KIF1B探针1,那么优选的是用相互不同的染料对这些探针进行标记。当以这种方式使用用不同染料标记的探针的组合来执行原位杂交时,当由5'KIF1B探针1的标记所产生的信号(例如,荧光)与由3'RET探针1的标记所产生的信号重叠时,可以判断已检测出编码KIF5B-RET融合多肽的基因组DNA。另一方面,当由5'RET探针1的标记所产生的信号与由3'RET探针1的标记所产生的信号是分开的或者由5'RET探针2的标记所产生的信号与由3'RET探针2的标记所产生的信号是分开的或者由5'KIF1B探针1的标记所产生的信号与由3'KIF1B探针1的标记所产生的信号是分开的时,可以片段已检测出编码KIF5B-RET融合多肽的基因组DNA。

[0238] 可以利用已知技术执行多核苷酸标记。例如,可将用荧光染料等通过切口平移或随机引物法所标记的底物碱基整合到多核苷酸中,由此对该多核苷酸进行标记。在原位杂交中,在杂交上面(a)或(b)中所陈述多核苷酸时所采用的条件和前述的生物试样可基于各种因素(例如相关多核苷酸的长度)而变化,但高严格性杂交条件的一个例子是0.2xSSC、65℃,并且低严格性杂交条件的一个来自是2.0xSSC、50℃。应注意,可以由本领域技术人员通过适当地选择各种条件,例如盐浓度(SSC的稀释比)和温度、以及表面活性剂(NP-40等)的浓度、甲酰胺的浓度和pH值,而实现具有与前述条件相同严格性的杂交条件。

[0239] 用于使用上面(a)或(b)中所陈述的多核苷酸而不是前述原位杂交法来检测编码KIF5B-RET融合多肽的基因组DNA的方法的例子是DNA印迹法、RNA印迹法和斑点印迹法。在这些方法中,通过将上面(a)或(b)中所陈述多核苷酸杂交到从前述生物试样所获得核酸提取物已被转录的膜,而对前述的融合基因进行检测。在使用(a)的多核苷酸的情况下,当杂交到编码KIF5B蛋白的多核苷酸的多肽和杂交到编码RET蛋白的多核苷酸的多肽识别在该膜上所形成的相同的带时,可以判断以检测出编码KIF5B-RET融合多肽的基因组DNA。

[0240] 基因组微阵列分析和DNA微阵列分析是用于检测用上面(b)的多核苷酸来编码KIF5B-RET融合多肽的基因组DNA的其他方法。在这些方法中,将(b)的多核苷酸的阵列固定在底物上,并且通过将生物试样放置成与在该阵列上的多核苷酸接触对相关的基因组DNA进行检测。在PCR或测序中,可将下面(c)中所陈述的多核苷酸用于使用从生物试样中制备的DNA(基因组DNA,cDNA)或RNA作为模板而特异性地扩增部分或全部的KIF5B-RET融合多核苷酸。(c)多核苷酸是被设计成夹持编码KIF5B蛋白的多核苷酸与编码RET蛋白的多核苷酸的融合位点的一对引物。"是一对引物的多核苷酸"是其中一个引物杂交到编码KIF5B蛋白的多核苷酸且另一个引物杂交到编码碱基序列中的RET蛋白的多核苷酸(例如用作靶的前述融合多核苷酸)的引物组。这些多核苷酸的长度通常为15至100个碱基、更优选17至30个

碱基。

[0241] 从PCR检测的精度和灵敏度的观点来看，本发明的(c)中所陈述的多核苷酸优选地是在距离编码KIF5B蛋白的多核苷酸与编码RET蛋白的多核苷酸的融合位点为5000个碱基内的前述融合多核苷酸的碱基序列的互补序列。

[0242] 可以利用已知技术基于用作靶的KIF5B-RET融合多核苷酸的碱基序列，而适当地设计“是一对引物的多核苷酸”。“是一对引物的多核苷酸”的优选例是由选自KIF5B-RET-F1、KIF5B-int15-F1、KIF5B-int15-F2、KIF5B-ex16-F1、KIF5B-ex23-F1、KIF5B-ex 24-F1、KIF5B-F-orf2438和KIF5B-int15-F3.5的一个引物所组成的引物组，以及由选自KIF5B-RET-R1、RET-int11-R3、RET-int7-R1、RET-int1 1-R0.5、RET-int11-R1、RET-int7-R2和RET-R-orf2364的一个引物所组成的一个引物。更优选地，它是KIF5B-RET-F1和KIF5B-RET-R1、KIF5B-int15-F1和KIF5B-RET-R1、KIF5B-int15-F2和RET-int11-R3、KIF5B-ex16-F1和KIF5B-RET-R1、KIF5B-ex23-F1和KIF5B-RET-R1或者KIF5B-ex24-F1引物和RET-int7-R1引物。

[0243] 本发明提供用于确定、评估或检测KIF5B-RET融合的方法；用于确定、评估、评价和/或治疗患有癌症(例如具有KIF5B-RET融合的癌症)的受试者的方法；分离的KIF5B-RET核酸分子、核酸构建体、含有该核酸分子的宿主细胞；纯化的KIF5B-RET肽和粘合剂；检测试剂(例如，能够例如特异性地检测KIF5B-RET核酸或蛋白的探针、引物、抗体、试剂盒)；用于鉴定与5'KIF5B-3'RET融合相互作用(例如抑制)的分子(例如新型激酶抑制剂)的筛选测定；以及用于评价、确定、评估和/或治疗患有癌症(例如具有KIF5B-RET融合的癌症)的受试者的测定和试剂盒。本文中所确定的组合物和方法可以例如用于鉴定新的KIF5B-RET抑制剂；用于评价、鉴定或选择受试者(例如患有癌症的患者)；并且用于治疗或预防癌症。

[0244] KIF5B-RET核酸分子。在一个方面，本发明的特征是一种包括KIF5B基因的片段和RET原癌基因的片段的核酸分子(例如，分离或纯化的)。在一个实施方案中，核酸分子包括KIF5B的外显子(例如，编码驱动蛋白结构域或其片段的一个或多个外显子)与RET的外显子(例如，编码RET酪氨酸激酶结构域或其片段的一个或多个外显子)的融合，例如框架内融合。

[0245] 在一个实施方案中，5'KIF5B-3'RET核酸分子包括足够的KIF5B和足够的RET序列，使得被编码的5'KIF5B-3'RET融合具有激酶活性，例如，具有与野生型RET相比提高的活性(例如激酶活性)，例如在本文中所提及的癌细胞中。在一个实施方案中，被编码的5'KIF5B-3'RET融合包含至少1、2、3、4、5、6、7、9、10或11个从KIF5B中获得的外显子和至少1、2、3、4、5、6、7、9或10个RET外显子。在一个实施方案中，被编码的5'KIF5B-3'RET融合多肽包含驱动蛋白结构域、卷曲螺旋结构域或其功能片段、及RET酪氨酸激酶结构域或其功能片段。

[0246] 在一个实施方案中，核酸分子包括具有KIF5B的外显子15与RET的外显子12的框架内融合的核苷酸序列(例如，在染色体10中的11MB臂间倒位内的序列)。在其他实施方案中，核酸分子包括连接到(例如，并置到)染色体10的核苷酸43、611、042-43、611、118区域中的核苷酸的染色体10的32、316、376-32、316、416的区域中的核苷酸序列。在另一个实施方案中，核酸分子包括包括断裂点的核苷酸序列。例如，KIF5B-RET融合可以包含KIF5B或其片段的至少外显子15(例如，KIF5B或其片段的外显子1-15)与RET或其片段的至少外显子12(例如，RET的外显子12-20或者其片段)的框架内融合。在某些实施方案中，KIF5B-RET融合处于

5'-KIF5B到3'-RET的构型。在一个实施方案中，核酸分子包括KIF5B基因的外显子1-15的核苷酸序列或其片段或者与之大体上相同的序列。在另一个实施方案中，核酸分子包括RET基因的外显子12-20的核苷酸序列或其片段，或者与之大体上相同的序列。

[0247] 在其他实施方案中，核酸分子包括编码KIF5B-RET融合多肽的核苷酸序列，该KIF5B-RET融合多肽包含KIF5B基因的片段和RET原癌基因的片段。在一个实施方案中，核苷酸序列编码KIF5B-RET融合多肽，该KIF5B-RET融合多肽包含驱动蛋白结构域或其功能片段、及RET酪氨酸激酶结构域或其功能片段。

[0248] 在另一个实施方案中，核酸分子包括KIF5B-RET融合，该融合包括RET转录物与KIF5B转录物之间的融合连接点。在另一个实施方案中，核酸分子包括RET或其片段的至少外显子11(例如，RET的外显子1-11或其片段)与至少外显子16或其片段(例如，KIF5B的外显子16-25或其片段)的融合(例如框架内融合)。在某些实施方案中，KIF5B-RET融合采用5'-RET至3'-KIF5B的构型。在一个实施方案中，核酸分子包括与RET基因的外显子1-11相对应的核苷酸或其片段或者与之大体上相同的序列。

[0249] 在一个相关的方面，本发明的特征为包含本文中所描述KIF5B-RET核酸分子的核酸构件体。在某些实施方案中，这些核酸分子可操作地连接到天然或异源的调控序列。还包括包含本文中所描述KIF5B-RET核酸分子的载体和宿主细胞，例如，适合于产生本文中所描述核酸分子和多肽的载体和宿主细胞。

[0250] 在另一方面，本发明的特征为减少或抑制编码本文中所描述KIF5B-RET融合的核酸分子的表达的核酸分子。这种核酸分子的例子包括例如反义分子、核酶、RNAi、杂交到编码KIF5B-RET的核酸或KIF5B-RET的转录调控区且阻断或减少KIF5B-RET的mRNA表达的三股螺旋分子。

[0251] 本发明还以一种核酸分子为特征，例如适用于杂交到、可用于鉴定或者基于本文中所描述KIF5B-RET融合的探针、引物、诱物或包含侧部的库组件的核酸片段。在某些实施方案中，探针、引物或诱物分子是能够许采集、检测或分离本文中所描述KIF5B-RET融合核酸分子的寡核苷酸。该寡核苷酸可以包含与本文中所描述KIF5B-RET融合核酸分子的片段大体上为互补的核苷酸序列。核酸片段(例如寡核苷酸与靶KIF5B-RET序列)之间的序列一致性无需是精确的，只要这些序列是充分地互补以便能够采集、检测或分离靶序列。在一个实施方案中，该核酸片段是包含寡核苷酸长度在大约5和25之间例如在10和20之间或者在10和15之间的核苷酸的探针或引物。在其他实施方案中，核酸片段是诱物，该诱物包含长度在大约100至300个核苷酸、130至230个核苷酸、150至200个核苷酸、200至350、350至950、300至600、500至1000、750至2000个核苷酸00核苷酸之间的寡核苷酸并且不必包含KIF5B-RET融合核酸。

[0252] 在一个实施方案中，核酸片段可以用于鉴定或捕获(例如通过杂交)KIF5B-RET融合。例如，该核酸片段可以是用于鉴定或捕获(例如通过杂交)本文中所描述的KIF5B-RET融合的探针、引物。在一个实施方案中，该核酸片段可以用于确定或捕获KIF5B-RET断裂点…1。在一个实施方案中，核酸片段杂交到在形成KIF5B的外显子15与RET的外显子12的框架内融合的染色体重排内的核苷酸序列(例如，在染色体10上的11MB臂间倒位内的序列)。在一个实施方案中，该核酸片段杂交到在连接到(例如，并置到)染色体10的核苷酸43、611、042-43、611、118区域中的核苷酸的染色体10的32、316、376-32、316、416区域中的核苷酸序列。

[0253] 本文中所描述的探针或引物可以用于例如FISH检测或PCR扩增。在其中检测是基于PCR的一个示范性实施方案中，可以通过使用引物或引物对而执行KIF5B-RET融合连接点的扩增，例如，用于位于本文中所描述KIF5B-RET融合连接点(例如本文中描述的染色体重排的突变或连接)侧面的序列的扩增。在一个实施方案中，一对分离的寡核苷酸引物可以扩增包含KIF5B-RET融合中的位置或与之相邻的区域。例如，正向引物可以被设计成杂交到在KIF5B基因组或mRNA序列内部的核苷酸序列。

[0254] 所述核酸片段可以可检测地用例如放射性同位素标记、荧光标记、生物发光标记、化学发光标记、酶标记、结合对标记进行标记，或者可以包含亲和标签、标签或标识符(例如，接头、条形码或其他序列标识符)。

[0255] 确定KIF5B-RET融合存在的方法包括：直接地获取KIF5B-RET融合核酸分子或多肽存在于取自受试者的样品中的信息。该样品可以是由体液、细胞所组成的样品。组织，例如肿瘤组织，可以包含核酸样品、蛋白质样品、肿瘤活检或者循环的肿瘤细胞或核酸，它可以是选自肺癌，包括NSCLC、SCLC、SCC或其组合及腺癌或黑色素瘤。

[0256] 检测核酸分子中的KIF5B-RET融合的方法是采用以下的任何方法：核酸杂交测定、基于扩增的测定、PCR-RFLP测定、实时PCR、测序、筛选分析、FISH、光谱核型分析或MFISH、比较基因组杂交)、原位杂交、SSP、HPLC或者质谱法基因分型。

[0257] 描述了检测KIF5B-RET融合多肽的方法，包括以下方法：使蛋白样品和与KIF5B-RET融合多肽特异性结合的试剂接触；并且检测KIF5B-RET融合多肽与该试剂的复合物的形成。多肽检测的方法包括使用用可检测基团标记的试剂来简化对结合和未结合试剂的检测，其中试剂是抗体分子，其中对KIF5B-RET融合的水平或活性进行评价，其中在受试者中治疗的开始、期间或之后对KIF5B-RET融合进行检测，其中在癌症诊断的时间对KIF5B-RET融合进行检测，其中以预定的间隔对KIF5B-RET融合进行检测，例如第一时间点并且至少在一个随后的时间点。

[0258] 也包含对治疗的反应，特别是其中响应于KIF5B-RET融合存在的确定而采用以下中的一个或多个：(1)将患者人群分组；(2)将受试者鉴定或选择为有可能或不可能对治疗产生反应；(3)选择治疗选择方案；和/或(4)预测受试者中疾病的时间进程。

[0259] 一种经分离或纯化的核酸分子，其编码KIF5B-RET融合或包含其片段的断裂点。一种经分离或纯化的KIF5B-RET核酸分子，其可操作地连接到天然或异源的调控序列。一种经分离或纯化的载体，其包含编码KIF5B-RET融合或包含其片段的断裂点的核酸分子。一种载体，其包含主细胞。一种核酸分子，其特异性地减小或抑制编码KIF5B-RET融合的核酸分子的表达，该核酸分子可以是选自反义分子、核酶、siRNA或三股螺旋分子。一种经分离或纯化的KIF5B-RET融合多肽或者含有其片段的断裂点。一种经分离或纯化的KIF5B-RET融合多肽，其具有RET激酶活性和/或二聚或多聚活性。一种经分离或纯化的抗体分子，其特异性地与KIF5B-RET融合多肽结合。抗体分子，其中所述抗体分子是针对KIF5B-RET融合多肽的单特异性抗体分子。

[0260] 本发明中用于检测KIF5B-RET多核苷酸的翻译产物的方法的例子是：免疫染色法、免疫印迹法、ELISA法、流式细胞分析技术、免疫沉淀法和抗体阵列分析。在这些方法中，使用与KIF5B-RET融合多肽结合的抗体。这种抗体的例子是：对含有KIF5B蛋白与RET蛋白的融合位点的多肽为特异性的抗体(在下文中也被称为“融合位点特异性抗体”)、与由RET蛋白

的前述融合位点(在下文中也被称为“RET-C末端抗体”)的C末端侧的区域所组成多肽相结合的抗体和与由KIF5B蛋白的前述融合位点的N末端侧的区域所组成的多肽相结合的抗体(在下文中也被称为“KIF5B-N末端抗体”)。这里,“融合位点特异性抗体”表示特异性地与含有前述融合位点的多肽结合的抗体但不与野生型(正常型)KIF5B蛋白或者野生型(正常型)RET蛋白相结合。

[0261] 可以利用前述融合位点特异性抗体或者前述RET-C末端抗体与KIF5B-N末端抗体的组合来检测KIF5B-RET融合多肽。然而,因为例如在正常肺细胞中几乎未检测到RET蛋白的表达,所以即使在免疫染色中单独使用RET-C末端抗体也可以检测出KIF5B-RET融合多肽在肺腺癌组织中的存在。

[0262] 本领域技术人员可以通过选择适当的已知方法而制备“与KIF5B-RET融合多肽结合的抗体”。这种已知方法的一个方法来自是如下的方法:其中用由RET蛋白的C末端部、KIF5B-RET融合多肽所构成的前述多肽、由KIF5B蛋白的N末端部所构成的前述多肽等对免疫动物进行接种的,由此激活动物的免疫系统,然后回收动物的血清(多克隆抗体);以及用于制作单克隆抗体的方法,例如杂交瘤法、重组DNA法和噬菌体展示法。如果使用结合有标记物的抗体,则可以通过对该标记进行检测而直接地检测靶蛋白。如果可以与抗体结合并且可以检测,则对标记物没有特别限制。标记物的实例包括过氧化物酶、β-D-半乳糖苷酶、微过氧化物酶、辣根过氧化物酶(HRP)、荧光素异硫氰酸酯(FITC)、罗丹明异硫氰酸酯(RITC)、碱性磷酸酶、生物素和放射性物质。而且,除了使用抗体直接地检测结合有标记物的靶蛋白的方法外,也可采用使用结合有标记物的蛋白G、蛋白A或第二抗体而间接地检测靶蛋白的方法。

[0263] 如果利用前述方法在从受试者中所分离试样中检测出KIF5B-RET融合多核苷酸的存在,那么判断利用RET酪氨酸激酶抑制剂例如式I、Ia或化合物1来治疗患者中癌症的效率将是较高的,但如果未检测出KIF5B-RET融合多核苷酸的存在,则判断利用RET酪氨酸激酶抑制剂治疗患者中癌症的效率将是较低的。

[0264] 如上所述,在下面(a)至(c)中所陈述具有至少15个碱基链长的任何多核苷酸可有利地用于检测KIF5B-RET融合多核苷酸的存在或不存在;(a)一种多核苷酸,其是选自杂交到编码KIF5B蛋白的多核苷酸的探针和杂交到编码RET蛋白的多核苷酸的探针的至少一个探针;(b)一种多核苷酸,其是杂交到编码KIF5B蛋白的多核苷酸与编码RET蛋白的多核苷酸的融合位点的探针;(c)一种多核苷酸,其是被设计成夹持编码KIF5B蛋白的多核苷酸与编码RET蛋白的多核苷酸的融合位点的一对引物。

[0265] 这些多核苷酸具有与靶基因的特定碱基序列为互补的碱基序列互补。这里,如果可以杂交,“互补的”可表示不完全地互补。例如,这些多肽与指定的碱基序列具有80%或更高、优选90%或更高、更优选95%或更高、更优选100%的同源性。

[0266] 在(a)至(c)的多核苷酸中,在部分或全部的DNA或RNA中,可用人工核酸例如PNA(聚酰胺核酸、肽核酸)、LNA(商标,锁核酸、桥接核酸)、ENA(商标,2’-O,4’-C-亚乙基-桥接核酸)、GNA(甘油核酸)和TNA(苏糖核酸)对核苷酸进行替换。

[0267] 此外,如上所述,有利地将与KIF5B-RET融合多肽相结合的抗体用于检测KIF5B-RET融合多核苷酸的翻译产物。因此,本发明提供一种用于利用包含此抗体的RET酪氨酸激酶抑制剂来确定癌症治疗效果的药物。

[0268] 本发明的融合基因的检测方法包括检测在从试验受试者所获得样品中存在本公开的多核苷酸的步骤。作为从试验受试者中所获得的样品是从试验受试者中采集的物质(从活体中分离的样品),特别是是任何类型的所采集的体液(优选血液)、肺泡和支气管洗涤液、经过活检的哟,并且使用痰样品。优选地,使用取自试验受试者肺中受影响区域的活检样品或痰样品。可以从该样品中提取并使用基因组DNA。另外,可以使用其转录物(通过基因组的转录和翻译所产生的产物;例如mRNA、cDNA和蛋白)。尤其优选的是制备并使用mRNA或cDNA。

[0269] 可以利用已知方法来提取基因组DNA,并且可以使用市售的DNA提取试剂盒而容易地执行提取。

[0270] 可以按照已知的基因分析方法(例如,通常用作基因检测方法的已知方法,例如PCR、LCR(连接酶链式反应)、SDA(链置换扩增)、NASBA(基于核酸序列的扩增)、ICAN(等温和嵌合引物引发的核酸扩增)、LAMP(环介导等温扩增)法、TMA(Gen-Probe的TMA系统)、原位杂交法和微阵列法)来执行检测的步骤。例如,采用其中将与被检测多核苷酸杂交的核酸用作探针的杂交技术、其中将与被检测多核苷酸杂交的DNA用作引物的基因扩增技术等。

[0271] 具体地,使用来源于从试验受试者中所获得样品的核酸例如mRNA等而执行检测。利用基因扩增反应的方法,通过使用被设计成能够特异性地扩增被检测多核苷酸的序列的引物,而测定mRNA的量。只要引物能够特异性地扩增被检测多核苷酸的序列并且基于被检测多核苷酸的碱基序列而设计,那么对于本发明检测方法中所使用的引物或者检测试剂盒中所包含的引物没有特别限制。可以使用引物设计软件等(例如,由PE Biosystems生产的Primer Express)来设计PCR扩增监测方法中所使用的引物。另外,因为PCR产物的大小越大则扩增效率越低下,所以合适的是将正义引物和反义引物设计成使得当扩增mRNA或cDNA时所获得扩增产物的大小变为1kb以下。

[0272] 更具体地,从编码KIF5B的部分中设计出正义引物(5'-引物),并且从编码RET的部分中设计出反义引物(3'-引物)。优选的是使用本发明检测试剂盒中所包含的引物,更优选的是使用最适合包含在检测试剂盒中的引物。在PCR扩增监测方法中,也可以通过将与各自基因相对应的上述正义引物混合,而设计用于检测在单个反应液中的所有融合多核苷酸的多重PCR。利用适用于各扩增技术的方法,可以确认靶基因(全部基因或其特定部分)是否已被扩增。例如,在PCR法中,利用琼脂糖凝胶电泳法对PCR产物进行分析并进行溴化乙锭染色等,由此能够确认是否已获得具有目标大小的扩增片段。当获得具有目标大小的扩增片段时,这表明从受试者中所获得样品中存在被检测的多核苷酸。可以以这种方式检测被检测多核苷酸的存在。

[0273] 本发明的融合基因的检测方法优选地包括:通过基因扩增反应来检测从试验受试者中所获得样品中存在特定多核苷酸的步骤和检测是否已获得具有目标大小的扩增片段的步骤。

[0274] 采用杂交技术的检测是利用例如northern杂交、斑点印迹法、DNA微阵列法和RNA保护法而执行。作为用于杂交的探针,可以使用包含由分别在作为核酸分子中心的融合点的上游和下游位置的16个碱基所组成的序列的探针,所述核酸分子是由与被检测多核苷酸杂交的至少32个连续碱基所组成或者在严格的条件下(优选地在更严格的条件下)具有其互补链或者包含其互补链。

[0275] 杂交可以采用本领域技术人员已知的“严格的条件”或者“更严格的条件”。也可以采用基因扩增技术，例如RT-PCR。在RT-PCR方法中，在基因扩增的过程中执行PCR扩增监测(实时PCR)法，由此可以更加定量地对被检测多核苷酸的存在进行分析。可以采用PCR扩增监测方法。实时PCR是一种已知方法，并且可以通过使用用于此方法的市售仪器和试剂盒而简单地执行。

[0276] 部分的本发明实施方案的融合蛋白检测方法包括检测从试验受试者中所获得样品中存在特定多肽，即由被检测多核苷酸所编码的多肽(在下文中被称为被检测多肽)的步骤。可以利用免疫分析法或酶活性测定法，通过制备来源于从试验受试者中所获得样品(例如，从试验受试者中获得的癌组织或细胞)的可溶性液体并且将该液体中所包含的被检测多肽与抗KIF5B抗体和抗RET抗体混合，而执行这种检测步骤。优选地，可以采用使用对被检测多肽为特异性的单克隆抗体或多克隆抗体的技术，例如酶免疫分析法、双抗体夹心ELISA法、荧光免疫分析法、放射免疫测定法和免疫印迹法。

[0277] 当在本发明检测方法中对来源于从试验受试者中所获得样品的被检测多核苷酸或被检测多肽进行检测时，试验受试者是患有多核苷酸阳性癌症的受试者(患者)并且为其提供使用RET抑制剂的治疗。

[0278] 本发明的检测试剂盒至少包含被设计成在本发明检测方法中能够特异性地扩增被检测多核苷酸的正义和反义引物。正义和反义引物组是用作用于使被检测多核苷酸扩增的引物的一组多核苷酸。

[0279] 在一个实施方案中，本发明的引物组包括(1)包含从编码KIF5B的部分中设计出的正义引物和从编码RET的部分中设计出的反义引物并且是用于检测KIF5B基因与RET基因的融合基因的引物组，其中反义引物是由在严格的条件下(优选地在更严格的条件下)与“被检测多核苷酸”杂交的核酸分子(优选地由至少16个碱基组成的核酸分子)所组成，并且正义引物是由在严格的条件下(优选地在更严格的条件下)与“被检测多核苷酸”的互补链杂交的核酸分子(优选由至少16个碱基所组成的核酸分子)所组成。

[0280] 引物组中包含以下的引物组(2)和(3)作为引物组(1)的更特异性的变体。

[0281] (2)一个正义引物的引物组，其是由包含至少任意的16个连续碱基的寡核苷酸所组成。

[0282] (3)一个正义引物的引物组，其是由包含至少任意的16个连续碱基的寡核苷酸所组成。

[0283] 在这些引物组(1)至(3)中，在其中选择正义引物和反义引物的位置之间的间隔被选择成优选地1kb以下，或者利用正义引物和反义引物所扩增的扩增产物的大小优选为1kb以下。

[0284] 另外，引物具有通常由15至40个碱基、优选16至24个碱基、更优选18至24个碱基、特别优选20至24个碱基所组成的链长度。

[0285] 引物组可以用于扩增并检测被检测的多核苷酸。此外，虽然没有具体的限制，但本发明引物组中所包含的代表性引物可以通过例如化学分析而制备。

[0286] 筛选抗癌药物的方法包括：使样品化合物与表达融合蛋白的细胞接触；及测定细胞中的融合蛋白表达水平，其中与用样品化合物处理前的或者未处理细胞中的水平相比用样品化合物进行处理的细胞中的融合蛋白表达水平降低，将样品化合物确定为用于抗癌药

物的候选化合物。

[0287] 筛选抗癌药物的方法还可包括:在样品化合物的处理之前测定细胞中融合蛋白表达水平的步骤。在这种情况下,当与在相同细胞中用样品化合物处理之前相比在样品化合物处理之后融合蛋白表达水平减小时,可将该样品化合物确定为抗癌药物的候选化合物。可替代地,筛选抗癌药物的方法可包括:提供表达融合蛋白的细胞,以及使样品化合物与一部分的所提供细胞接触。在这种情况下,当和不与样品化合物接触的细胞相比与样品化合物接触的细胞中融合蛋白表达水平降低时,可将该样品化合物确定为抗癌药物的候选化合物。

[0288] 筛选方法中所使用的细胞可以是来源于其中融合基因或融合蛋白被表达和/或被活化的癌细胞的细胞、细胞的提取物或者细胞的培养物。癌细胞可以是实体癌细胞,特别是肺癌,例如非小细胞肺癌例如肺腺癌,如上所述。

[0289] 又一个实施方案提供一种筛选针对肺癌的抗癌药物的方法,该方法包括:用样品化合物处理表达融合蛋白的细胞;测定细胞中的融合蛋白表达水平,其中当与用样品化合物处理前的或未处理细胞的水平相比用样品化合物处理细胞中的融合蛋白表达水平降低时,将该样品化合物确定为针对肺癌的抗癌药物的候选化合物。

[0290] 可将KIF5B-RET融合蛋白用作用于诊断肺癌或者用于治疗或预防或肺癌的标志。肺癌的治疗或预防包括向需要治疗的患者施用治疗有效量的至少一种针对融合蛋白的抑制剂、至少一种针对编码融合蛋白的融合基因的抑制剂、至少一种针对RET编码基因的抑制剂或者其组合。抑制剂可以是例如式I、Ia或化合物1。

[0291] 另一个实施方案提供一种预防和/或治疗癌症的方法,该方法包括向需要治疗的患者施用药学(治疗)有效量的至少一种针对融合蛋白的抑制剂、至少一种针对编码融合蛋白的融合基因的抑制剂、至少一种针对RET编码基因的抑制剂或者其组合,其中的任意一个可以是式1的化合物和本文中所公开的其他具体化合物。该方法还可包括:在施用这种治疗的步骤之前鉴定需要癌症预防和/或治疗的患者的步骤。另一个实施方案提供一种用于预防和/或治疗癌症的组合物,包括施用至少一种针对融合蛋白的抑制剂,该组合物包含式1单独或者连同至少一种针对编码融合蛋白的融合基因的抑制剂、至少一种针对RET编码基因的抑制剂或者其组合。另一个实施方案提供一种针对融合蛋白的抑制剂、针对编码融合蛋白的融合基因的抑制剂、针对RET编码基因的抑制剂或者其组合用于预防和/或治疗癌症的使用方法。该抑制剂可以是例如式I、Ia或化合物1。

[0292] 在本发明中,癌症可以是肺癌,特别是小细胞肺癌(SCLC)非小细胞肺癌(NSCLC)例如肺腺癌、鳞状细胞肺癌或者大细胞肺癌。

[0293] 在组合物中,针对融合蛋白的抑制剂是选自特异性地与融合蛋白结合的适体、特异性地与融合蛋白结合的抗体20的至少一个,并且针对融合基因或RET编码基因的抑制剂是选自siRNA、shRNA、miRNA、及能够特异性地与融合基因或RET编码基因结合的适体的至少一个。

[0294] 可单独使用或者结合式I、Ia或1的化合物使用抑制RET的表达和/或RET激酶活性(例如,转录、翻译或稳定性)的任何RET激酶抑制剂。

[0295] 该抑制剂可以是RET特异性的或者它可以是非特异性的(例如,非特异性激酶抑制剂、多靶抑制剂)。已开发出若干个RET激酶抑制剂,并且正在对它们的临床应用进行研究。

在RET激酶活性的下游存在激酶，例如磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)和细胞外信号激酶1/2(ERK)(Wixted JH等人，J Biol Chem 2011)和STAT3(Hwang JH等人，Mol Endocrinol 2003;17:1155-1166)。抑制这种下游信号传输路径的药物也可以被用作RET激酶抑制剂的替代物或者用作辅助剂，单独或者连同式1的化合物。

[0296] 在一个模式中，被判断具有KIF5B-RET易位的受试者也被判断为在除易位位点以外的位点具有RET突变。RET突变的一个例子是激活突变。RET激活突变是与野生型突变相比导致活化增加的任意突变。例如，RET激活突变可导致持久的RET活化。甚至可以存在与RET抑制剂使用相关的或者由于其使用而形成的继发RET激活突变变体。由于例如提高RET信号增强的激酶结构域的点突变、缺失、插入、复制或倒位或者这些中两个以上的组合，因而发生了提高RET信号活性增加的突变。就被判断同时具有KIF5B-RET易位和RET突变的受试者而言，也可以决定用RET激酶抑制剂对他们进行处理。另外，可基于该决定对他们进行处理/治疗。

[0297] 如上所述，利用RET酪氨酸激酶抑制剂治疗癌症的效果在其中通过本发明方法而检测出KIF5B-RET融合多核苷酸的患者中被认为较高。由于该原因，可以通过选择性地向具有KIF5B基因和RET基因的癌症患者施用RET酪氨酸激酶抑制剂，而高效率地执行癌症治疗。因此，本发明提供一种用于治疗癌症的方法，该方法包括向通过本文中所描述诊断方法而确定使用该RET酪氨酸激酶抑制剂治疗癌症的效果较高的患者施用式I、Ia或化合物1的RET酪氨酸激酶抑制剂的步骤。

[0298] 在本发明中，“试样”不仅是生物试样(例如，细胞、组织、器官、体液(血液、淋巴液等)、消化液、痰液、肺泡/支气管灌洗液、尿、粪便)，而且包括核酸提取物(基因组DNA提取物、mRNA提取物或者由mRNA提取物所制备的cDNA制品或cRNA制品)或者从这些生物试样中获得的蛋白提取物。该试样也可以是已经过甲醛固定处理、酒精固定处理、冷冻处理或石蜡埋入处理的试样。

[0299] 而且，可由本领域技术人员在考虑试样的类型、状态等选择合适的已知技术之后，制备基因组DNA、mRNA、cDNA或蛋白。

[0300] 除了作为活性成分的前述物质(多核苷酸、抗体)外，本发明的药物还可含有其他药学上可接受的成分。这种成分的例子包括：缓冲剂、乳化剂、助悬剂、稳定剂、防腐剂、生理盐水等。作为缓冲剂，可使用磷酸盐类、柠檬酸盐类、乙酸盐类等。作为乳化剂，可使用阿拉伯树胶、海藻酸钠、西黄蓍胶等。作为助悬剂，可使用单硬脂酸甘油酯、单硬脂酸铝、甲基纤维素、羧甲基纤维素、羟甲基纤维素、十二烷基硫酸钠等。作为稳定剂，可使用丙二醇、亚硫酸二甲酯、抗坏血酸等。作为防腐剂，可使用叠氮化钠、苯扎氯铵、对羟基苯甲酸、氯丁醇等。

[0301] 此外，除了含有多核苷酸和抗体的制品外，可组合入制品例如底物、阳性对照(例如，KIF5B-RET融合多核苷酸、KIF5B-RET融合多肽或者具有它们的细胞等)及附接到多核苷酸和抗体的标记检测所必需的阴性对照、原位杂交等中所使用的反染色试剂(DAPI等)、抗体检测(例如，第二抗体、蛋白G、蛋白A)中所需的分子和抗体稀释或洗涤中所使用的缓冲溶液，作为用于本发明方法的试剂盒。此试剂盒可包括用于试剂盒使用的说明书。本发明还提供用于本发明方法的前述试剂盒。

[0302] 当检测出融合蛋白基本上是由融合伴侣的N-末端结构域和RET蛋白的C-末端结构域所组成时，本文中所描述的检测方法尤其有用。融合蛋白可以是基本上由KIF5B蛋白的N-

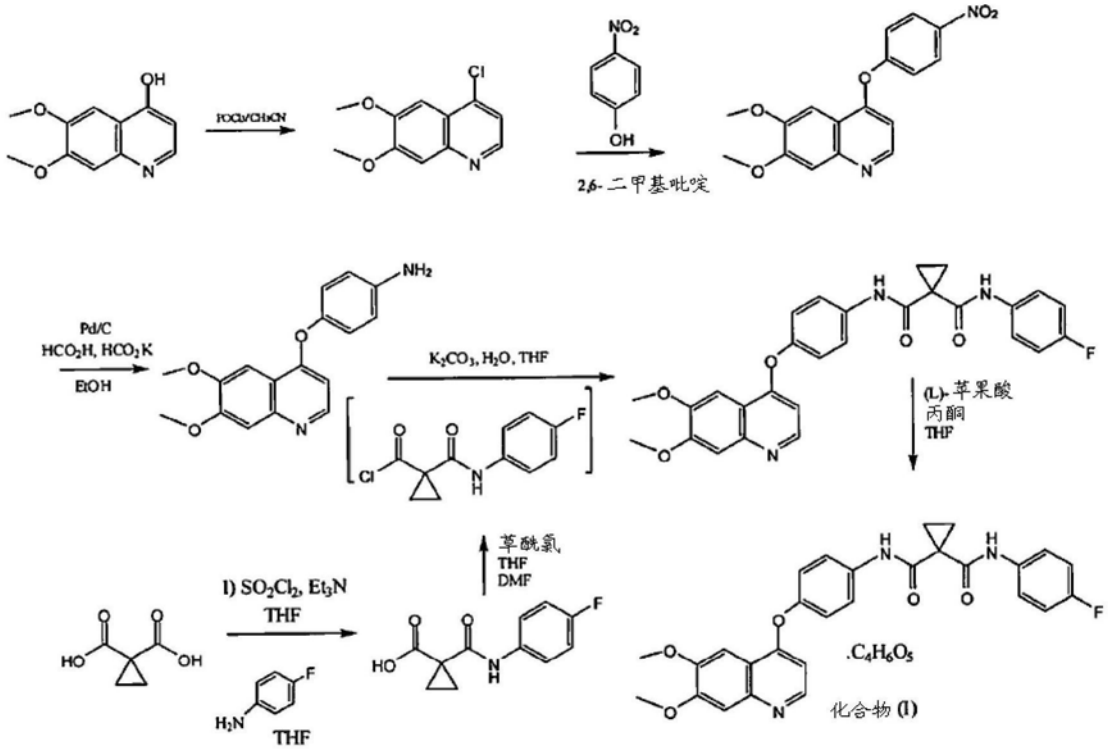
末端结构域和RET蛋白的C-末端结构域所组成的KIF5B-RET融合蛋白。该方法可以用于诊断肺癌，特别是非小细胞肺癌，并且包括对包含在染色体10中的倒位或易位的aRET相关染色体重排、其中RET蛋白与其他蛋白融合的融合蛋白、编码融合蛋白的融合基因和与取自未患有癌症的个体的标准样品相比RET的过表达中的至少一个进行检测。当在测试样品中检测出选自以上组的上述重排中的一个时，将RET抑制剂例如式I、Ia或化合物1用于个体的治疗。

[0303] 化合物1的制备

[0304] N-(4-{[6,7-双(甲氧基)喹啉-4-基]氧基}苯基)-N'-(4-氟苯基)环丙烷-1,1-二甲酰胺及其(L)-苹果酸盐的制备。

[0305] 在方案1中示出了用于制备N-(4-[6,7-双(甲氧基)喹啉-4-基]氧基}苯基)-N'-(4-氟苯基)环丙烷-1,1-二甲酰胺及其(L)-苹果酸盐的制备的合成路线：

[0306] 方案1

[0307] 

[0308] 4-氯-6,7-二甲氧基-喹啉的制备

[0309] 向反应器中顺序地加入6,7-二甲氧基-喹啉-4-醇(10.0kg)和乙腈(64.0L)。将所形成的混合物加热至大约65℃，添加三氯氧磷($POCl_3$，50.0kg)。在添加$POCl_3$后，将反应混合物的温度升高至大约80℃。当剩余的反应物小于起始材料的2%时(过程中高效液相色谱[HPLC]分析)，判断反应结束(大约9.0小时)。将反应混合物冷却至大约10℃，然后淬灭入二氯甲烷(DCM，238.0kg)、30%NH_4OH(135.0kg)和冰(440.0kg)的已冷却溶液。将所形成的混合物升温至大约14℃，将各相分离。将有机相用水(40.0kg)洗涤，通过真空蒸馏将其浓缩以除去溶剂(大约190.0kg)。将甲基叔丁基醚(MTBE，50.0kg)添加到该批次中，将混合物冷却至大约10℃，在此期间产物被结晶析出。通过离心回收固体，用正己烷(20.0kg)洗涤，在大约40℃下干燥，得到标题化合物(8.0kg)。

[0310] 6,7-二甲基-4-(4-硝基苯氧基)喹啉的制备

[0311] 反应器中顺序地加入4-氯-6,7-二甲氧基喹啉(8.0kg)、4-硝基苯酚(7.0kg)、4-二甲氨基吡啶(0.9kg)和2,6-二甲基吡啶(40.0kg)。将反应器内容物加热至大约147℃。当反应结束时(利用过程中HPLC分析判断剩余小于起始材料的5%时,大约20小时),使反应器内容物冷却至大约25℃。添加甲醇(26.0kg),接着添加溶解于水(50.0kg)的碳酸钾(3.0kg)。将反应器内容物搅拌大约2小时。将所形成的固体沉淀物过滤,用水(67.0kg)洗涤,在25℃下干燥大约12小时,得到标题化合物(4.0kg)。

[0312] 4-(6,7-二甲氧基-喹啉-4-基氧基)苯胺的制备

[0313] 将含有甲酸钾(5.0kg)、甲酸(3.0kg)和水(16.0kg)的溶液添加到已加热至大约60℃的6,7-二甲氧基-4-(4-硝基苯氧基)喹啉(4.0kg)、10%钯/碳(50%水润湿,0.4kg)在四氢呋喃(THF,40.0kg)中的混合物中。执行该添加使得反应混合物的温度保持在大约60℃。当如利用过程中HPLC分析测定的认为反应结束时(剩余小于起始材料的2%,通常为15小时),将反应器内容物过滤。通过真空蒸馏在大约35℃下将滤液浓缩至其原体积的一半,这导致产物的沉淀。通过过滤将产物浓缩,用水(12.0kg)洗涤,在大约50℃下真空干燥,得到标题化合物(3.0kg;97%的曲线下面积(AUC))。

[0314] 1-(4-氟-苯基氨甲酰基)环丙烷羧酸的制备

[0315] 以使批温度不超过10℃的速率,将三乙胺(8.0kg)添加到市售的环丙烷-1,1-二甲酸(21,10.0kg)在THF(63.0kg)中的经冷却(大约4℃)溶液中。将该溶液搅拌大约30分钟,然后添加亚硫酰氯(9.0kg),将批温度保持在低于10℃。当添加结束时,以使批温度不超过10℃的速率,添加4-氟苯胺(9.0kg)溶解于THF(25.0kg)的溶液。将混合物搅拌大约4小时,然后用乙酸异丙酯(87.0kg)稀释。将此溶液顺序地用氢氧化钠水溶液(2.0kg溶解于50.0L水)、水(40.0L)和氯化钠水溶液(10.0kg溶解于40.0L的水)洗涤。通过真空蒸馏将有机溶液浓缩,接着添加庚烷,这导致固体的沉淀。通过离心回收固体,然后在大约35℃下真空干燥,得到标题化合物(10.0kg)。

[0316] 1-(4-氟-苯基氨甲酰基)环丙烷甲酰氯的制备

[0317] 以使批温度不超过30℃的速率,将草酰氯(1.0kg)添加到1-(4-氟-苯基氨甲酰基)环丙烷甲酸(2.0kg)在THF(11kg)与N,N-二甲基甲酰胺(DMF;0.02kg)混合物中的溶液中。在不作进一步处理的情况下,将此溶液用于下一步骤。

[0318] N-(4-{[6,7-双(甲氧基)喹啉-4-基]氧基}苯基)-N'-(4-氟苯基)环丙烷-1,1-二甲酰胺的制备

[0319] 以使批温度不超过30℃的速率,将来自之前步骤的含有1-(4-氟苯基氨甲酰基)环丙烷甲酰氯的溶液添加到4-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基氧基)苯胺(3.0kg)和碳酸钾(4.0kg)在THF(27.0kg)和水(13.0kg)中的混合物中。当反应结束(通常在10分钟)时,添加水(74.0kg)。将混合物在15-30℃下搅拌大约10小时,这导致产物的沉淀。通过过滤回收产物,用预先制备的THF(11.0kg)和水(24.0kg)的溶液洗涤,在大约65℃下真空干燥大约12小时,得到标题化合物(游离碱,5.0kg)。^{1}HNMR(400MHz,d_6-DMSO):δ10.2(s,1H),10.05(s,1H),8.4(s,1H),7.8(m,2H),7.65(m,2H),7.5(s,1H),7.35(s,1H),7.25(m,2H),7.15(m,2H),6.4(s,1H),4.0(d,6H),1.5(s,4H)。LC MS:M+H=502。

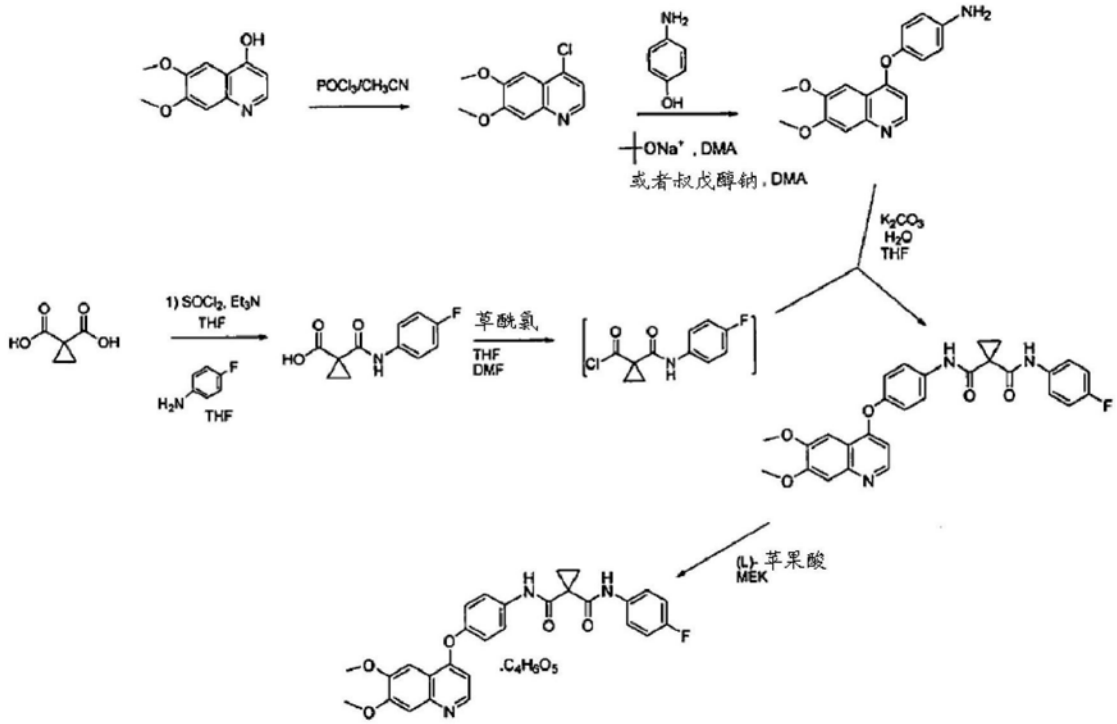
[0320] N-(4-{[6,7-双(甲氧基)喹啉-4-基]氧基}苯基)-N'-(4-氟苯基)环丙烷-1,1-二甲酰胺(L)-苹果酸盐的制备

[0321] 将L-苹果酸(2.0kg)溶解于水(2.0kg)的溶液添加到环丙烷-1,1-二甲酸[4-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基氧基)苯基]酰胺(4-氟苯基)甲酰胺游离碱(15,5.0kg)在乙醇中的溶液中,将批温度维持在大约25℃。然后添加碳(0.5kg)和巯基二氧化硅(0.1kg),将所形成的混合物加热至大约78℃,此时添加水(6.0kg)。然后将反应混合物过滤,接着添加异丙醇(38.0kg),使其冷却至大约25℃。通过过滤回收产物,用异丙醇(20.0kg)洗涤,在大约65℃下干燥,得到标题化合物(5.0kg)。

[0322] N-(4-{[6,7-双(甲氧基)喹啉-4-基]氧基}苯基)-N'-(4-氟苯基)环丙烷-1,1-二甲酰胺及其(L)-苹果酸盐的替代制备方法。

[0323] 方案2中示出了可以用于N-(4-{[6,7-双(甲氧基)喹啉-4-基]氧基}苯基)-N'-(4-氟苯基)环丙烷-1,1-二甲酰胺及其(L)-苹果酸盐的制备的替代合成路线,如PCT/US2012/024591中所描述,其全部内容通过引用并入本文。

[0324] 方案2

[0325] 

[0326] 4-氯-6,7-二甲氧基喹啉的制备

[0327] 向反应器中顺序地加入6,7-二甲氧基喹啉-4-醇(47.0kg)和乙腈(318.8kg)。将所形成的混合物加热至大约60℃,添加三氯氧磷($POCl_3$,130.6kg)。在添加$POCl_3$后,将反应混合物的温度升高至大约77℃。当剩余的反应物小于起始材料的3%时(过程中高效液相色谱[HPLC]分析),认为反应结束(大约13小时)。将反应混合物冷却至大约2-7℃,然后淬灭入二氯甲烷(DCM,482.8kg)、26%NH_4OH(251.3kg)和水(900L)的经冷却溶液中。将所形成的混合物升温至大约20-25℃,将各相分离。经过AW hyflo super-cel NF(硅藻土;5.4kg)的过滤床将有机相过滤。将过滤床用DCM(118.9kg)洗涤。将合并的有机相用盐水(282.9kg)洗涤,与水(120L)混合。将各相分离,通过真空蒸馏除去溶剂以将有机相浓缩(剩余体积为大约95L)。将DCM(686.5kg)加入到含有有机相的反应器中,通过真空蒸馏浓缩以除去溶剂(剩余体积为大约90L)。然后加入甲基叔丁基醚(MTBE,226.0kg)将混合物的温度调节至-20至-25

℃并维持2.5小时，然后将所形成的固体沉淀物过滤，用正庚烷(92.0kg)洗涤，在过滤器中在大约25℃下在氮气中干燥，得到标题化合物(35.6kg)。

[0328] 4-(6,7-二甲氧基-喹啉-4-基氧基)苯胺的制备

[0329] 在20-25℃下，将溶解于N,N-二甲基乙酰胺(DMA，184.3kg)的4-氨基苯酚(24.4kg)加入到含有4-氯-6,7-二甲氧基喹啉(35.3kg)、叔丁醇钠(21.4kg)和DMA(167.2kg)的反应器中。然后，将此混合物加热至100-105℃并维持大约13小时。在利用过程中HPLC分析测定认为反应结束后(剩余小于起始材料的2％)，将反应器内容物冷却至15-20℃，以维持15-30℃温度的速率加入水(预先冷却的，2-7℃，587L)。将所形成的固体沉淀物过滤，用水(47L)与DMA(89.1kg)的混合物洗涤，最后用水(214L)洗涤。然后，在大约25℃下在过滤器中将滤饼干燥，获得粗的4-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基氧基)苯胺(59.4kg(湿)，41.6kg(干)基于LOD计算)。将粗4-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基氧基)苯胺在四氢呋喃(THF，211.4kg)和DMA(108.8kg)的混合物中(大约75℃)回流大约1小时，然后冷却至0-5℃并陈化大约1小时，其后将固体过滤，用THF(147.6kg)洗涤，在大约25℃下过滤器中进行真空干燥，获得4-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基氧基)苯胺(34.0kg)。

[0330] 4-(6,7-二甲氧基-喹啉-4-基氧基)苯胺的替代制备方法

[0331] 将4-氯-6,7-二甲氧基喹啉(34.8kg)和4-氨基苯酚(30.8kg)和叔戊醇钠(1.8当量)88.7kg，35％重量，溶解于THF)加入到反应器中，接着加入N,N-二甲基乙酰胺(DMA，293.3kg)。然后，将此混合物加热至105-115℃并保持大约9小时。在利用过程中HPLC分析测定认为反应结束之后(剩余小于起始材料的2％)，将反应器内容物冷却至15-25℃，在2小时内添加水(315kg)，同时将温度保持在20-30℃之间。然后，在20-25℃下将反应混合物再搅拌1小时。通过过滤收集粗产物，用88kg水与82.1kg DMA的混合物洗涤，接着用175kg水洗涤。将该产物在过滤干燥器中干燥53小时。LOD显示小于1w/w％。

[0332] 在一个替代的步骤中，使用1.6当量的叔戊醇钠并将反应温度从升高至110-120℃。另外，将冷却温度升高到35-40℃，将添加水后的起始温度调整为35-40℃，使其温升至45℃。

[0333] 1-(4-氟-苯基氨甲酰基)环丙烷甲酸的制备

[0334] 以使批温度不超过5℃的速率，将三乙胺(19.5kg)添加到经冷却的(大约5℃)环丙烷-1,1-二甲酸(24.7kg)在THF(89.6kg)中的溶液中。将溶液搅拌大约1.3小时，然后添加亚硫酰氯(23.1kg)，将批温度保持在低于10℃。当添加结束时，将溶液搅拌大约4小时，将温度保持在低于10℃。然后，以使批温度不超过10℃的速率，添加4-氟苯胺(18.0kg)溶解于THF(33.1kg)的溶液。将混合物搅拌大约10小时，其后认为反应结束。然后，将反应混合物用乙酸异丙酯(218.1kg)稀释。将此溶液顺序地用氢氧化钠水溶液(10.4kg，50％，溶解于119L的水)洗涤，再用水(415L)稀释，然后用水(100L)最后用氯化钠水溶液(20.0kg，溶解于100L水)洗涤。通过在低于40℃的温度下进行真空蒸馏而将有机溶液浓缩(剩余体积为100L)，接着添加正庚烷(171.4kg)，这导致固体的沉淀。通过过滤回收固体，用正庚烷(102.4kg)洗涤，产生的湿的粗的1-(4-氟苯基氨甲酰基)环丙烷羧酸(29.0kg)。在大约25℃下，将粗的1-(4-氟苯基氨甲酰基)环丙烷羧酸溶解于甲醇(139.7kg)，接着添加水(320L)而形成浆料，通过过滤加以回收，顺序地用水(20L)和正庚烷(103.1kg)洗涤，然后在大约25℃下在氮气中在过滤器中干燥，得到标题化合物(25.4kg)。

[0335] 1-(4-氟-苯基氨甲酰基)环丙烷甲酰氯的制备

[0336] 以使批温度不超过25℃的速率,将草酰氯(12.6kg)添加到1-(4-氟-苯基氨甲酰基)环丙烷羧酸(22.8kg)在THF(96.1kg)与N,N-二甲基甲酰胺(DMF;0.23kg)的混合物中的溶液中。在不作进一步处理的情况下。将此溶液用于下一步骤。

[0337] 1-(4-氟-苯基氨甲酰基)环丙烷甲酰氯的替代制备

[0338] 向反应器中加入1-(4-氟-苯基氨甲酰基)环丙烷甲酸(35kg)、344g DMF和175kg THF。将混合物调整为12-17℃,然后在1小时内向反应混合物中加入19.9kg草酰氯。将反应混合物在12-17℃下搅拌3至8小时。在未作进一步处理的情况下,将此溶液用于下一步骤。

[0339] 环丙烷-1,1-二甲酸[4-(6,7-二甲氧基-喹啉-4-基氧基)苯基]酰胺(4-氟苯基)酰胺的制备

[0340] 以使批温度不超过30℃的速率,将来自之前步骤的含有1-(4-氟苯基氨甲酰基)环丙烷甲酰氯的溶液添加到化合物4-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基氧基)苯基胺(23.5kg)和碳酸钾(31.9kg)在THF(245.7kg)和水(116L)的混合物中的溶液中。当反应结束时(在大约20分钟),添加水(653L)。将混合物在20-25℃下搅拌大约10小时,这导致产物的沉淀。通过过滤回收产物,用预先制备的THF(68.6kg)和水(256L)的溶液洗涤,首先在大约25℃下在氮气中在过滤器中进行干燥,然后在大约45℃下进行真空干燥,得到标题化合物(41.0kg,38.1kg,基于LOD计算)。

[0341] 环丙烷-1,1-二甲酸[4-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基氧基)苯基]酰胺(4-氟苯基)酰胺的替代制备

[0342] 向反应器中加入4-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基氧基)苯胺(35.7kg,1当量),接着加入412.9kg THF。向反应混合物中加入48.3K_2CO_3溶解于169kg水的溶液。将在上面1-(4-氟-苯基氨甲酰基)环丙烷甲酰氯的替代制备中所描述的酰氯溶液转移到含有4-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基氧基)苯胺的反应器中,同时在最小2小时内将温度保持在20-30℃。在最小3小时内将反应混合物在20-25℃下搅拌。然后将反应温度调整为30-25℃,将该混合物搅拌。停止搅拌,使混合物的各相分离。取出并丢弃下面的水相。向剩余的上层有机相中添加804kg水。在最小16小时内将反应物在15-25℃下搅拌。

[0343] 产物沉淀。将产物过滤,用179kg水与157.9kg THF的混合物分为两份进行洗涤。将粗产物在真空下干燥至少2小时。然后将干燥的产物溶解于285.1kg的THF。将所形成的悬液转移到反应容器中,搅拌直到悬浮液变为澄清(溶解)的溶液,这需要加热至30-35℃并维持大约30分钟。然后,在2小时内将456kg水以及20kg SDAG-1乙醇(用甲醇变性的乙醇)添加到该溶液中。将该混合物在15-25℃下搅拌至少16小时。将产物过滤,用143kg水与126.7THF的混合物分两份进行洗涤。将产物在40℃的最大温度设定点下干燥。

[0344] 在一个替代步骤中,将酰氯形成期间的反应温度调整为10-15℃。将重结晶温度从15-25℃改变为45-50℃并维持1小时,然后用2小时冷却至15-25℃。

[0345] 环丙烷-1,1-二甲酸[4-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基氧基)苯基]酰胺(4-氟-苯基)酰胺苹果酸盐的制备

[0346] 将环丙烷-1,1-二甲酸[4-(6,7-二甲氧基-喹啉-4-基氧基)苯基]酰胺(4-氟-苯基)酰胺(1-5;13.3kg)、L-苹果酸(4.96kg)、甲基乙基酮(MEK;188.6kg)和水(37.3kg)加入到反应器中,将该混合物加热回流(大约74℃)大约2小时。将反应器温度降低至50至55℃,

将反应器内容物过滤。使用相似量的起始材料(13.3kg)、L-苹果酸(4.96kg)、MEK(198.6kg)和水(37.2kg)，再重复2次上述的这些顺序步骤。在大气压下在大约74℃下使用MEK(1133.2kg)将合并的滤液共沸地干燥(剩余体积约为711L;KF<0.5％w/w)。将反应器内容物的温度降低至20至25℃并维持大约4小时，将所形成的固体沉淀物过滤，用MEK(448kg)洗涤。在50℃下进行真空干燥，得到标题化合物(45.5kg)。

[0347] 环丙烷-1,1-二甲酸[4-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基氧基)苯基]酰胺(4-氟苯基)酰胺(L)苹果酸盐的替代制备方法

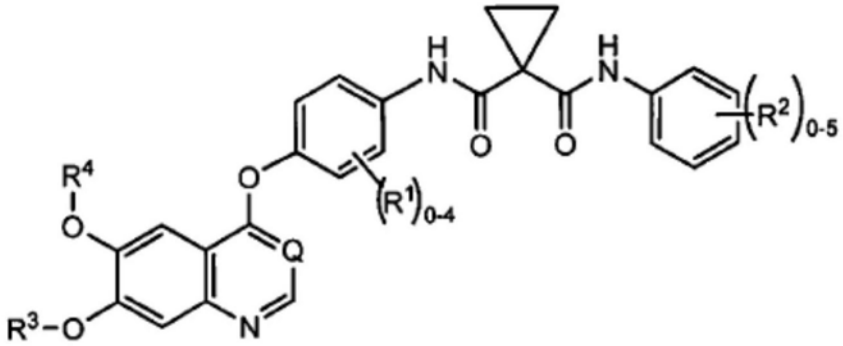
[0348] 将环丙烷-1,1-二甲酸[4-(6,7-二甲氧基-喹啉-4-基氧基)苯基酰胺(4-氟苯基)酰胺(47.9kg)、L-苹果酸(17.2)、658/2kg甲基乙基酮和129.1kg水(37.3kg)加入到反应器中，将混合物在50-55℃下加热大约1-3小时，然后在55-60℃下再加热4-5小时。通过经过1μm滤筒的过滤，使混合物变澄清。将反应器温度调整为20-25℃，在150-200mm Hg的真空度下在55℃的最大加热套温度下真空蒸馏至558-731L的体积范围。

[0349] 再进行2次真空蒸馏，分别加入380kg和380.2kg甲基乙基酮。在第三次蒸馏后，通过加入159.9kg甲基乙基酮以获得880L的总体积，而将该批次的体积调整为18v/w的环丙烷-1,1-二甲酸[4-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基氧基)苯基]酰胺(4-氟-苯基)酰胺。将甲基乙基酮调整为245.7g，执行另一次真空蒸馏。在20-25℃下将反应混合物适度搅拌达至少24小时。将产物过滤，用415.1kg甲基乙基酮分三份进行洗涤。在加热套温度设定点为45℃下将产物进行真空干燥。

[0350] 在一个替代的步骤中，改变添加顺序，将17.7kg L-苹果酸溶解于129.9kg水的溶液添加到溶解于甲基乙基酮(673.3kg)的环丙烷-1,1-二甲酸[4-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基氧基)苯基]酰胺(4-氟-苯基)酰胺(48.7kg)中。

[0351] 本发明包括以下的具体实施方案。

[0352] 实施方案1.一种用于治疗肺腺癌的方法，该方法包括向患者施用式I化合物：

[0353] 

I

[0354] 或其药学上可接受的盐，其中：

[0355] R^1是卤素；

[0356] R^2是卤素；

[0357] R^3是(C_1-C_6)烷基；

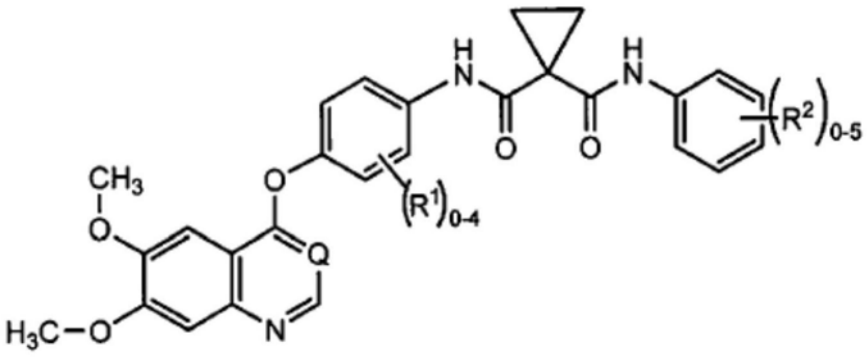
[0358] R^4是(C_1-C_6)烷基；并且

[0359] Q是CH或N。

[0360] 实施方案2.实施方案1的方法，其中肺腺癌是非小细胞肺癌。

[0361] 实施方案3.实施方案1的方法,其中肺腺癌是KIF5B-RET融合阳性非小细胞肺癌。

[0362] 实施方案4.实施方案1至3的方法,其中双重MET和VEGF调节剂是式Ia的化合物

[0363] 

式 I(a),

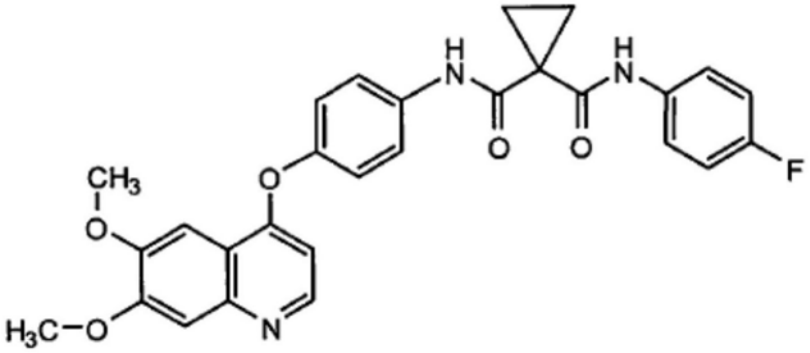
[0364] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0365] R^1是卤素;

[0366] R^2是卤素;并且

[0367] Q为CH或N。

[0368] 实施方案5.实施方案1至4的方法,其中式I化合物是化合物1:

[0369] 

化合物 1

[0370] 或其药学上可接受的盐。

[0371] 实施方案6.实施方案5的方法,其是N-(4-{[6,7-双(甲氧基)喹啉-4-基]氧基}苯基)-N'-(4-氟苯基)环丙烷-1,1-二甲酰胺。

[0372] 实施方案7.实施方案1-6的方法,其中式(I)、式I(a)的化合物和化合物I是(L)-或(D)-苹果酸盐。

[0373] 实施方案8.实施方案1至7的方法,其中式(I)的化合物是(L)苹果酸盐和/或(D)苹果酸盐的结晶N-1形式或N-2形式。

[0374] 实施方案9.实施方案1至8的方法,其中式I、I(a)的化合物或化合物1或者其药学上可接受的盐以另外包含药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂的药物组合物的形式施用。

[0375] 实施方案10.实施方案1至9的方法,其中在另一种治疗形式之后施用式I化合物。

[0376] 实施方案11.实施方案1至9的方法,其中在顺铂和/或吉西他滨治疗之后施用式I

化合物。

[0377] 实施方案12.实施方案1至9的方法,其中在多烯紫杉醇治疗之后施用式I化合物。

[0378] 实施方案13.实施方案1至9的方法,其中在铂(顺铂或卡铂)和/或紫杉醇和/或吉西他滨和/或多烯紫杉醇和/或长春瑞滨和/或依利替康和/或培美曲塞治疗之后施用式I化合物。

[0379] 实施方案14.一种用于治疗需要这种治疗的患者中是KIF5B-RET融合阳性非小细胞肺癌的肺腺癌的方法,该方法包括施用化合物1或其药学上可接受的盐。

[0380] 实施方案15.一种用于抑制或逆转哺乳动物中的异常细胞生长的发展的方法,该方法包括施用化合物1或其药学上可接受的盐,其中异常细胞生长是由KIF5B-RET介导的癌症。

[0381] 实施方案16.实施方案15的方法,其中癌症是肺腺癌。实施方案17.实施方案15的方法,其中肺腺癌是非小细胞肺癌。

[0382] 实施方案18.实施方案15的方法,其中肺腺癌是KIF5B-RET融合阳性非小细胞肺癌。

[0383] 实施方案19.实施方案18的方法,其中化合物1或其药学上可接受的盐以包含化合物1或其药学上可接受盐和至少一种药学上可接受的载体的药物组合物的形式施用。

[0384] 实施方案20.实施方案18的方法,其中化合物1或其药学上可接受的盐以包含化合物1或其药学上可接受的盐和至少一种药学上可接受的载体的药物组合物的形式施用;其中每天施用药物组合物超过3个月时间。

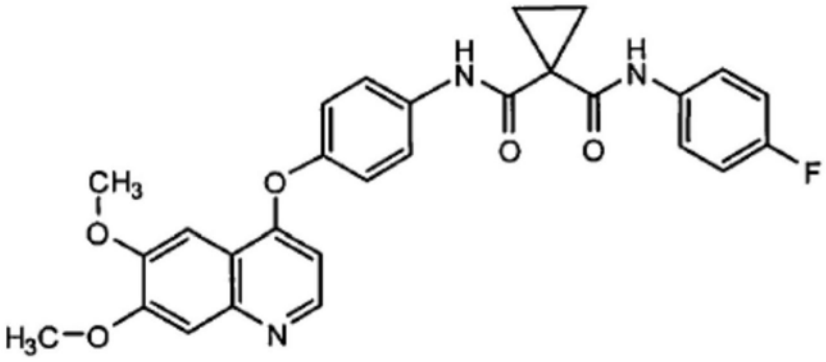
[0385] 实施方案21.实施方案18的方法,其中化合物1或其药学上可接受的盐以包含化合物1或其药学上可接受的盐及至少一种药学上可接受的载体的药物组合物的形式施用;其中以5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、65、70、75、80、85、90或95mg/日的剂量施用该药物组合物。

[0386] 实施方案22.实施方案18的方法,其中通过FISH、CISH或SISH测定进行KIF5B-RET融合阳性非小细胞肺癌的检测。

[0387] 实施方案23.实施方案18的方法,其中利用任意形式的基因组PCR、直接测序、PCR测序、RT-PCR或类似测定进行KIF5B-RET融合阳性非小细胞肺癌的检测。

[0388] 实施方案24.一种诊断和治疗患者的方法,其中患者患有NSCLC肿瘤并且所述肿瘤被鉴定为KIF5B-RET融合阳性NSCLC,并且该治疗包括施用式I化合物的任何一个,包括化合物1或其药学上可接受盐及至少一种药学上可接受的载体。

[0389] 实施方案25.一种用于治疗在需要治疗的患者中是KIF5B-RET融合阳性非小细胞肺癌的肺腺癌的方法,该方法包括向患者施用有效量的化合物1:

[0390] 

化合物1

[0391] 或其药学上可接受的盐。

[0392] 实施方案26.实施方案1-25的方法,其中有效量的式I、Ia或1的化合物产生选自由以下组成的组的至少一种治疗效果:肿瘤尺寸减小、转移减少、完全缓解、部分缓解、病情稳定、总响应率提高、病理学完全响应。

[0393] 生物实施例

[0394] 化合物1是RET的有效体外抑制剂

[0395] 以前已证明,当描绘针对270人激酶的蛋白激酶时,化合物1是MET(IC_{50}=1.3nmol/L)和VEGFR2(IC_{50}=0.035nmol/L)的ATP竞争性抑制剂。参见Yakes,Mol Cancer Ther.2011年12月;10(12):2298-308。化合物1也是RET的有效抑制剂,具有5.2nmol/L的生物化学IC_{50}值。RET激活激酶结构域突变M918T和Y791F—已知与遗传性和散发性甲状腺髓样癌有关—也被化合物1抑制,IC_{50}值分别为27和1173nmol/L。此外,化合物1对RET突变体V804L无效(IC_{50}>5000nmol/L)无效,已知这导致对RET抑制剂的耐药性。在细胞测定中,化合物1抑制TT细胞中的RET自身磷酸化,TT细胞是具有RET的激活C634W突变体的表达降钙素的人甲状腺髓样癌细胞系,并且IC_{50}值为85nmol/L。另外,对于化合物1对在10%血清中生长的TT细胞生长的作用进行了72小时(3日)的研究。化合物1的处理导致对增殖的剂量依赖性抑制,IC_{50}值为94nmol/L。

[0396] 生物实施例

[0397] 化合物1在体内抑制RET的非配体依赖性磷酸化

[0398] 向携带TT肿瘤的动物施用单一递增剂量的化合物1或水媒介物,在给药4小时后采集肿瘤。通过Western免疫印迹分析,在合并的裂解物中测定磷酸化和总RET的水平。在一个独立研究中,向携带TT肿瘤的小鼠施用单一口服剂量的卡博替尼(100mg/kg)或水媒介物,在给药后的指定时间点测定肿瘤裂解物中的磷酸化和总RET、AKT和ERK的水平。RET的磷酸化抑制持续时间的光密度定量分析与卡博替尼血浆浓度的关系示出了代表性的免疫印迹图像。

[0399] 化合物1的单一递增口服剂量给药,在不存在RET蛋白水平降低的情况下,在TT异体移植肿瘤中导致RET磷酸化剂量依赖性抑制,如图1A中所示。此结果与显示多种甲状腺髓样癌细胞系对对于由siRNA所造成的RET和RET抑制具有选择性的药理制剂的敏感性数据是一致。基于剂量-反应关系,在此异体移植模型中导致RET磷酸化50%抑制(IC_{50})的预测血浆浓度约为7μmol/L。在随后的研究中,单一100mg/kg口服剂量导致给药后TT异体移植肿瘤中

对RET磷酸化抑制达4至24小时，如图1B中所示。此效果是可逆转的，因为在处理后48小时时RET的磷酸化返回到基础水平，如图1C中所示。另外，化合物1在给药后降低AKT和ERK的磷酸化水平达4至24小时，这与对RAS/RAF/MAPK路径的RET介导活化的抑制是一致的。化合物1的血浆浓度分别与RET(15μmol/L)、AKT和ERK(42μmol/L)的最大和持续抑制相关。

[0400] 生物实施例

[0401] 化合物1抑制TT肿瘤生长

[0402] 在与指数肿瘤生长相对应的时间段内，在nu/nu小鼠中对化合物1抑制TT异体移植肿瘤生长的能力进行了评估。以3mg/kg(▽)、10mg/kg(○)、30mg/kg(◆)或60mg/kg(◇)的剂量给携带TT肿瘤的nu/nu小鼠每日一次口服施用水媒介物(□)或卡博替尼达21天。每周2次测定肿瘤重量。数据点代表各治疗组的平均肿瘤重量(单位是毫克)和SE。在来源于最后指定给药后所采集全血的血清制品中，测定循环的降钙素浓度(*表示显著性下降，$P<0.05$，与取自赋形剂治疗对照动物的血清样品比较时循环降钙素的下降)。

[0403] 化合物1抑制TT异体移植肿瘤生长，这与血清降钙素浓度降低相关，如图2A中所示，在10和30mg/kg剂量下实现剂量依赖性抑制。而且，在30和60mg/kg剂量下观察到与3,000至45,000nmol/L的周期性峰值血浆浓度相关的病情稳定。化合物1的亚慢性给药的耐受性良好，正如在整个给药期中所收集的稳定体重所表明。假设已知TT异体移植肿瘤分泌大量的人降钙素，这与给药期结束时所测定的肿瘤尺寸、循环的降钙素的血清浓度相关。取自赋形剂治疗对照动物的血清显示高水平的循环降钙素，在30和60mg/kg两者的剂量下当与赋形剂对照动物相比较时循环的降钙素浓度显著地降低(75％；$P<0.005$)，如图2B中所示。此外，该循环血浆降钙素浓度的降低与上述TT肿瘤生长抑制相关。肿瘤的免疫组织化学分析表明在不存在总蛋白水平降低的情况下磷酸化RET和MET水平有显著且剂量依赖性的降低，如图2C中所示。而且，化合物1治疗也导致活肿瘤组织中Ki67和CD31的剂量依赖性降低，从而对细胞增殖和血管分布的标志造成负面影响，如表1中的总结。

[0404]

表1. TT异体移植肿瘤的组织化学分析的总结

卡博替尼剂量 (mg/kg)	RET(Y1062)		MET(Y1230/4/5)		CD31		Ki67	
	相对面积	抑制 (%)[a]	相对面积	抑制 (%)[a]	阳性细胞 (%)	降低 (%)[a]	阳性细胞 (%)	降低 (%)[a]
媒介物	32.7 ± 2.6	na	27.4 ± 2.6	na	55.3 ± 6.9	na	26.6 ± 3.9	na
3	25.2 2.9	23	21.6 ± 2.7	21	35.9 ± 4.7	35	20.7 ± 2.6	22
10	17.4 1.9	47	17.2 ± 2.3	37	33.5 ± 4.9	39	19.4 ± 3.0	27
30	12.5 2.0	62	10.7 ± 1.5	61	26.4 ± 6.4	52	14.3 ± 3.9	46
60	9.7 2.1	70	8.2 ± 2.2	70	22.7 ± 8.6	59	8.1 ± 2.5	69

[a]P<0.05，除非另有说明

[0405] 病例研究

[0406] 于2009年4月对一名以前是吸烟者的51岁日本妇女进行了右胸膜积液的评估。胸

部的计算机断层(CT)扫描显示在右中叶中的一个肿块及右胸膜积液。胸膜积液的细胞学检查证明是肺腺癌,并且利用高分辨率熔化分析确定EGFR是野生型的。全身性诊断检测未显示远处转移的证据。在CT扫描中在颈部或者甲状腺中也没有肿瘤。该患者被诊断为IIIB期(cT4N0M0,第6版,肺癌分期的国际系统)肺腺癌。用4个周期的顺铂和吉西他滨对她进行了治疗,原发性肿瘤显示部分反应。然而,在治疗结束后8个月,报告了原发性肿瘤的重新生长。患者随后使用13个周期的作为二线治疗药的多烯紫杉醇和2个周期的作为三线治疗药的研究药物(抗-HER2[2型人表皮生长因子受体]抗体)。于2011年5月,她同意参加化合物1单药治疗的1期研究,她以40mg的开始剂量每日1次使用卡博替尼。Yamamoto,N.,Nokihara,H.,Wakui,H.,Yamada,Y.,Frye,J.,DeCillis,A.,和Tamura,T。在具有晚期实体肿瘤的日本患者中卡博替尼(XL184)单药治疗的1期多递增研究研究。Molecular Cancer Therapeutics.2011年10月增刊1摘要C26)和Nokihara,H.,Yamamoto,N.,Nakamichi,S.,Wakui,H.,Yamada,Y.,Frye,J.,Decillis,A.,和Tamura,T.Annals of Oncology,第23卷,增刊9,于2012年9月17日发行。

[0407] 在第9周的胸部CT扫描显示其原发性肺肿瘤中的部分反应(40.1%的肿瘤减小)(图3),随后在第17周加以确认。在10个周期(月)的卡博替尼治疗期间,由于3级血清脂肪酶升高并且在腹部超声检查中没有胰腺炎的临床症状或异常表现而中断药物。在2012年2月,她由于进行性疾病而中止了卡博替尼单药治疗。

[0408] KIF5B-RET融合的检测

[0409] 回顾性地,使用治疗前和治疗后样品,在该患者中对KIF5B-RET融合的存在进行了评估。在诊断中从胸膜积液细胞中提取基因组DNA作为治疗前样品,在疾病进展期间从胸膜积液中提取基因组DNA和总RNA作为治疗后样品。使用QIAamp DNA Mini试剂盒(Qiagen,Valencia,CA,USA)分离出基因组DNA。按照生产商的说明书将TRIzol(Invitrogen,Carlsbad,CA,USA)用于总RNA的提取并使用型号2100生物分析仪(Agilent Technologies,Santa Clara,CA,USA)来定量。该样品显示>6.0的RNA完整性数。

[0410] 使用Superscript III逆转录酶(Invitrogen)将总RNA(500ng)逆转录为cDNA。使用KAPA Taq DNA聚合酶(KAPA Biosystems,Woburn,MA,USA),对cDNA(对应于10ng的总RNA)或者10ng基因组DNA执行聚合酶链反应(PCR)扩增。在热循环仪中在以下条件下进行了反应:40个周期,在95℃下15秒、在60℃下15秒和在72℃下1min(用于逆转录酶(RT)-PCR)或3min(用于基因组PCR),以及在72℃下10min的最终延伸。将编码甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的基因扩增以便估计cDNA合成的效率。使用BigDye Terminator试剂盒和ABI3130x1 DNA测序仪(Applied Biosystems,Foster City,CA,USA)在两个方向上对PCR产物进行了直接测序。此研究获得位于日本东京的国立癌症中心的伦理审查委员会的批准。本研究中所使用的PCR引物示于表2。

[0411] 表2.PCR引物

[0412]

基因组PCR				
序号	名称	位置	序列	用途
1	KIF5B-int15-F2.2	KIF5B 内含子15	5'-GGCATTTGACTTGGTGGTAGAT-3'	PCR
2	KIF5B-RET-R1	RET 外显子12	5'-TCCAAATTCGCCTTCTCCTA-3'	PCR
3	AD12-001Tseq-R1	RET 内含子11	5'-CCTGGGAACCCACAGTCAAG-3'	测序
RT-PCR				
序号	名称	位置	序列	用途
3	KIF5B-867F	KIF5B 外显子10	5'-ATTAGGTGGCAACTGTAGAACC-3'	PCR
4	RET-2381R	KIF5B 外显子12	5'-AGCCACAGATCAGGAAAAGA-3'	PCR
5	KIF5B-RET-F1	KIF5B 外显子15	5'-AGGAAATGACCAACCACCAG-3'	测序
6	GAPDH-F	GAPDH 外显子7	5'-CCAAGGTCATCCATGACAAC-3'	PCR
7	GAPDH-R	GAPDH 外显子9	5'-CACCCTGTTGCTGTAGCCA-3'	PCR

[0413] 在治疗前和治疗后样品的基因组DNA中对KIF5B(内含子15)基因与RET(内含子11)基因的融合进行了检测，如图4A中所示，该检测显示使用治疗前和治疗后肿瘤样品的KIF5B-RET基因组PCR和Sanger测序。RT-PCR产物的Sanger测序确认了在肿瘤细胞中变体1转录物(KIF5B外显子15;RET外显子12)(是最常见类型的KIF5B-RET融合转录物)的表达，如图4B中所示，该图显示使用治疗后肿瘤样品的KIF5B-RET RT-PCR和Sanger测序。将BR0020(KIF5B-RET变体1融合阳性)和BR2001(KIF5B-RET融合阴性)用作阳性和阴性对照。将GAPOH(甘油醛-3-磷酸脱氢酶)转录物扩增以便估计cDNA的数量和质量。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年2月12日;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年2月12日;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年2月12日;18(3):382-4。使用分裂的RET探针组(Chromosome Science Labo Inc,Sapporo,Japan)对从治疗前胸膜积液样品中获得的细胞材料进行荧光原位杂交(FISH)分析，该RET探针组与RET基因的相邻的5'着丝粒(RP11-379D20,用Spectrum Green标记)和3'端粒(RP11-875 A4,用Spectrum Red标记)序列杂交，如图4C中所述，图4C显示了在RET位点处的分裂的FISH。肿瘤细胞除了融合

信号(放大倍数,100×)外还显示分开的(5'绿色和3'橙色)信号。在肿瘤细胞中在大于信号大于1倍距离处观察到用5'和3'探针所鉴定的分开的信号。因此,判断肿瘤具有RET基因的重排,与上面的PCR结果一致。

[0414] 这是首次报告的病例,其后RET TKI已在KIF5B-RET融合阳性NSCLC患者中显示显著的抗肿瘤化学活性。到目前为止,体外研究表明由KIF5B-RET介导的生长和信号转导性能在用TKI(例如凡德他尼(vandetanib)、舒尼替尼(sunitinib)或索拉非尼(sorafenib))治疗后降低。然而,尚未有KIF5B-RET融合阳性NSCLC的患者对这些药物产生反应的报告。我们的报告表明具有KIF5B-RET融合的晚期NSCLC患者会对治疗性RET抑制异常地敏感。

[0415] 我们已确定大约2%的NSCLC患者具有KIF5B-RET融合。KIF5B-RET融合阳性NSCLC仅包括所有肺癌中的一个小亚群。然而,肺癌是一个常见疾病并且肺癌患者的数量每年都在增加,因此此亚群转化成世界范围内相当大数量的患者。因此,作者建议开发用于鉴定KIF5B-RET融合阳性NSCLC的系统筛选方法。于2007年公布在NSCLC中发现了EML4-ALK重排,并且美国食品药品管理局于2011年批准克唑替尼用于此疾病,接着在日本于2012获得批准。Soda M,Choi YL,Enomoto M,Takada S,Yamashita Y,Ishikawa S,Fujiwara S,Watanabe H,Kurashina K,Hatanaka H,Bando M,Ohno S,Ishikawa Y,Aburatani H,Niki T,Sohara Y,Sugiyama Y,Mano H.Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer.Nature.2007年8月2日;448(7153):561-6。该KIF5B-RET阳性患者对化合物1具有显著的临床反应,并且次发现提示KIF5B-RET融合是NSCLC中的驱动癌基因和有希望的治疗靶点。

[0416] 化合物1是针对RET(一种与肿瘤病理学有关的激酶)的TK的有效抑制剂。例如,Yakes揭示了化合物1显示对RET的强抑制,IC_{50}值为5.2±4.3nMol/L。Yakes FM,Chen J,Tan J,Yamaguchi K,Shi Y,Yu P,Qian F,Chu F,Bentzien F,Cancilla B,Orf J,You A,Laird AD,Engst S,Lee L,Lesch J,Chou YC,Joly AH.Cabozantinib(XL 184),a novel MET and VEGFR2 inhibitor,simultaneously suppresses metastasis,angiogenesis,and tumor growth.Mol Cancer Ther.2011年12月;10(12):2298-308。RET中的激活突变在甲状腺髓样癌(MTC)的肿瘤发生中发挥重要作用。Sennino B,Naylor RM,Tabruyn SP,You WK,Aftab DT McDonald DM.Reduction of tumor invasiveness and metastasis and prolongation of survival of RIP-Tag2 mice after inhibition of VEGFR plus c-Met by XL184.Mol Cancer Ther.2009年8增刊1(摘要A13)。在卡博替尼的I期剂量递增研究中,在患有MTC的37名患者中有25名(68%)已确认部分反应或者病情稳定达6个月或更长。Kurzrock R,Sherman SI,Ball DW,Forastiere AA,Cohen RB,Mehra R,Pfister DG,Cohen EE,Janisch L,Nauling F,Hong DS,Ng CS,Ye L,Gagel RF,Frye J,Müller T,Ratain MJ,Salgia R.Activity of XL 184(Cabozantinib),an oral tyrosine kinase inhibitor,in patients with medullary thyroid cancer.JClin Oncol.2011 7月1日;29(19):2660-6。在此研究中,在患者中观察到具有和不具有已知的RET突变的肿瘤消退,提示一些反应是由对除RET以外靶的抑制例如MET和/或VEGFR2而引起,或者作为RET路径中的未知畸变。

[0417] 总之,我们的具有KIF5B-RET融合的NSCLC患者对卡博替尼具有临床响应,提示卡博替尼可能在具有KIF5B-RET融合的晚期NSCLC患者中有效。RET-TKI针对KIF5B-RET融合阳

性NSCLC的紧急临床评价得到保证。

[0418] 其他实施方案

[0419] 为了清楚和理解的目的，已通过示例说明和实例详细描述了前述公开内容。并且已参考各种具体和优选的实施方案和技术描述了本发明。然而，应当理解的是，在本发明的精神和范围内可以作出许多变型和修改。对于本领域技术人员显而易见的是，可以在所附权利要求的范围内实施这些变化和修改。因此，应理解，以上描述意图是说明性的而不是限制性的。

[0420] 因此，不应参考以上的描述来确定本发明的范围，而应参考所附权利要求连同这种权利要求所提供的等同物的全部范围来确定本发明的范围。

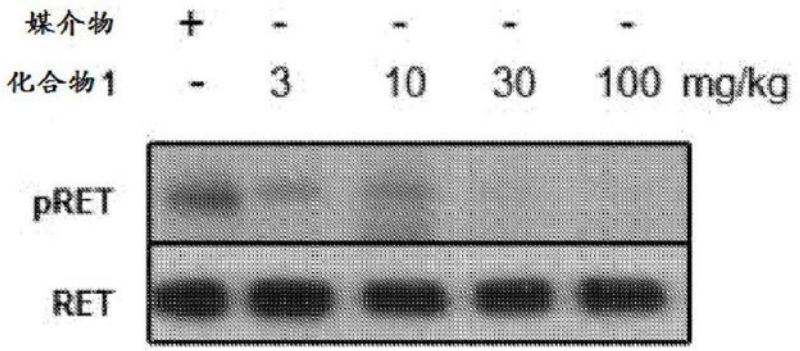

媒介物 + - - - -
化合物1 - 3 10 30 100 mg/kg
pRET
RET

图1A

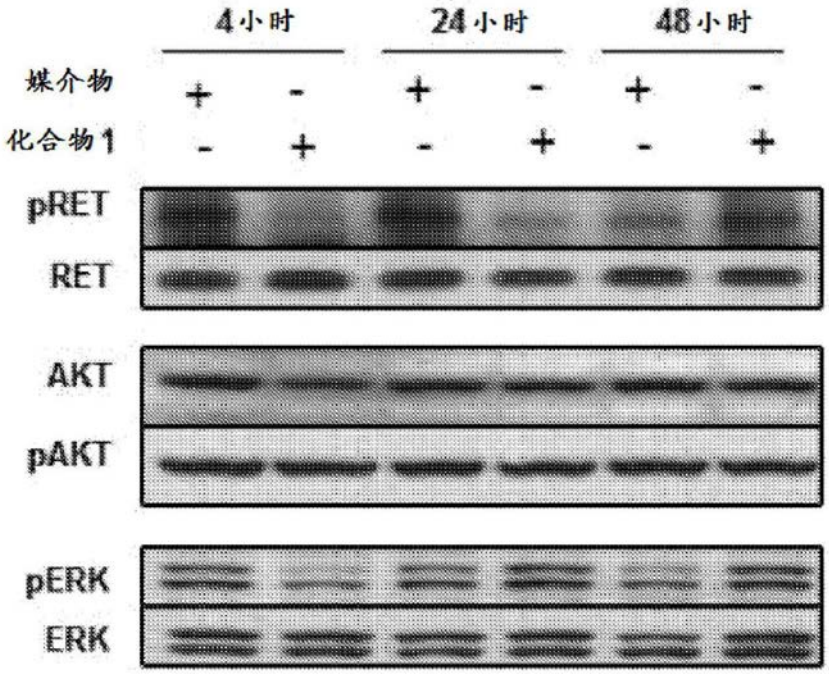

4小时 24小时 48小时
媒介物 + - + - + -
化合物1 - + - + - +
pRET
RET
AKT
pAKT
pERK
ERK

图1B

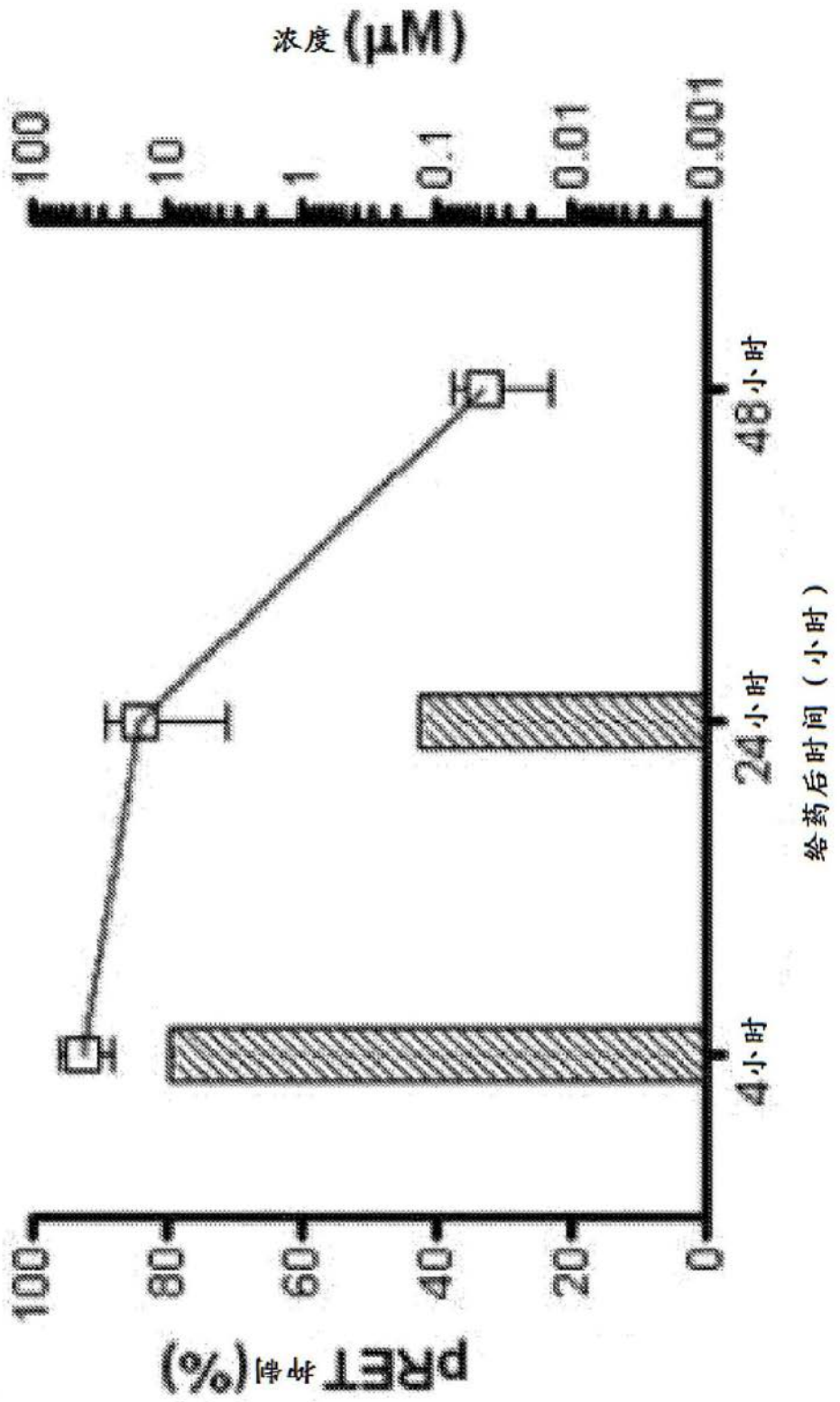

浓度 (μM)
100
10
1
0.1
0.01
0.001
48小时
24小时
4小时
给药后时间（小时）
pRET 抑制 (%)
100
80
60
40
20
0

图1C

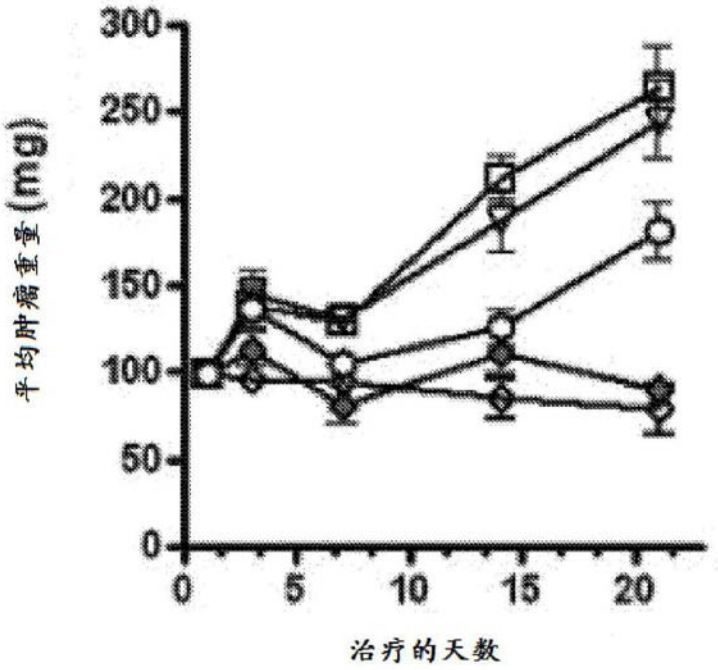

300
250
200
150
100
50
0
平均肿瘤重量(mg)
0
5
10
15
20
治疗的天数

图2A

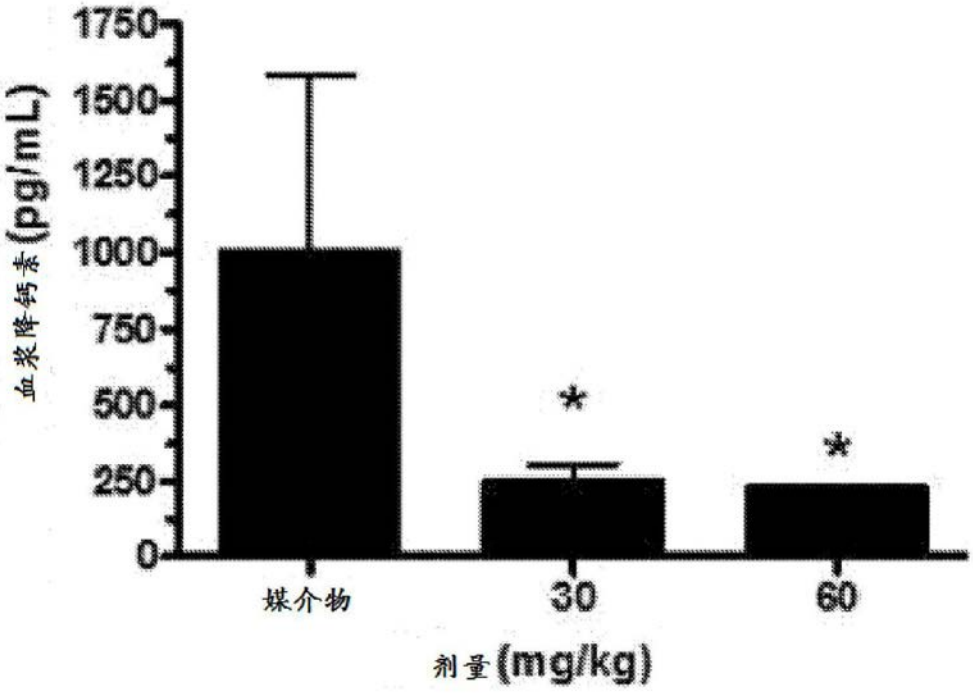

1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
血浆降钙素(pg/mL)
*
*
媒介物
30
60
剂量(mg/kg)

图2B

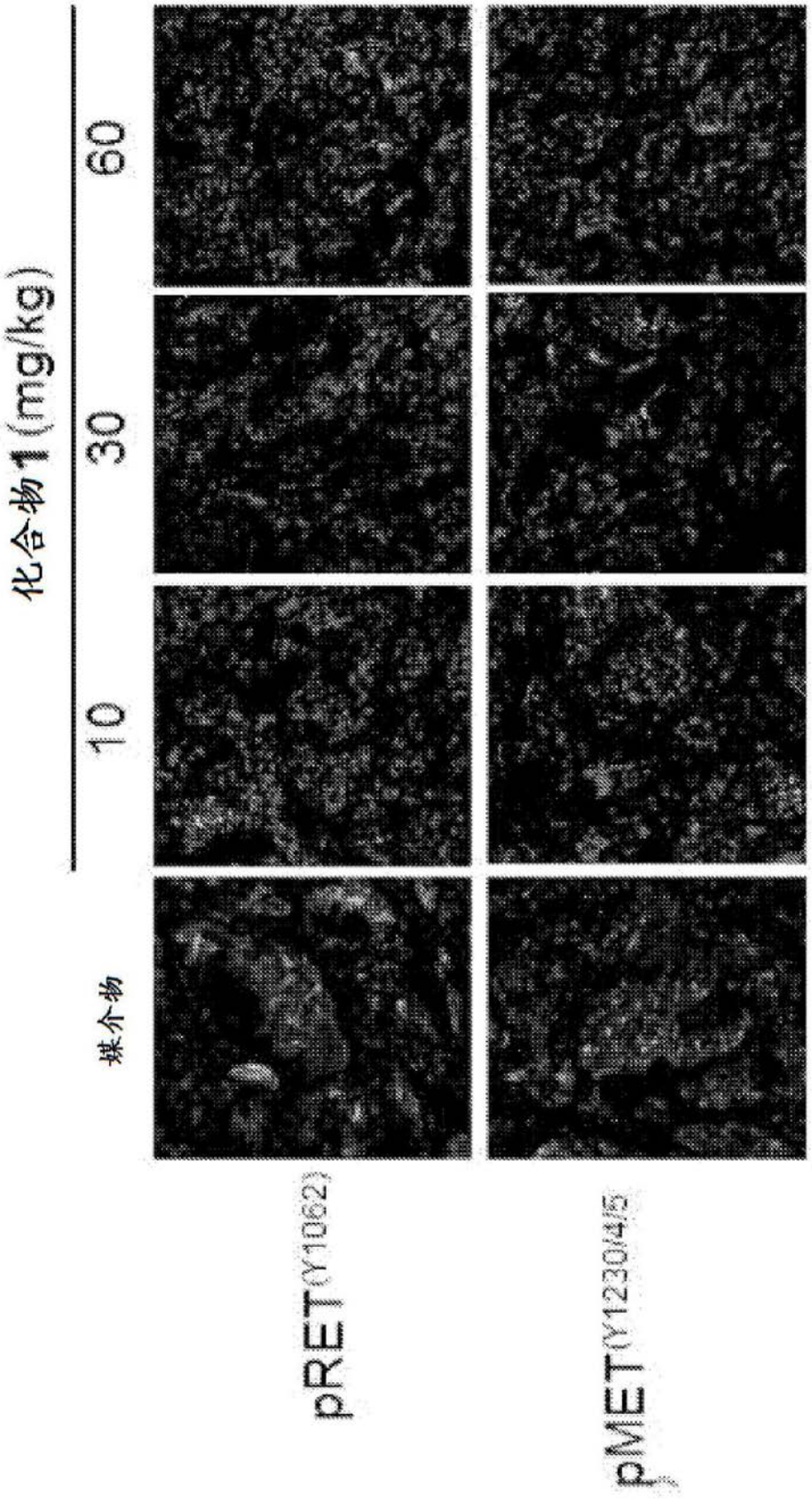


图2C

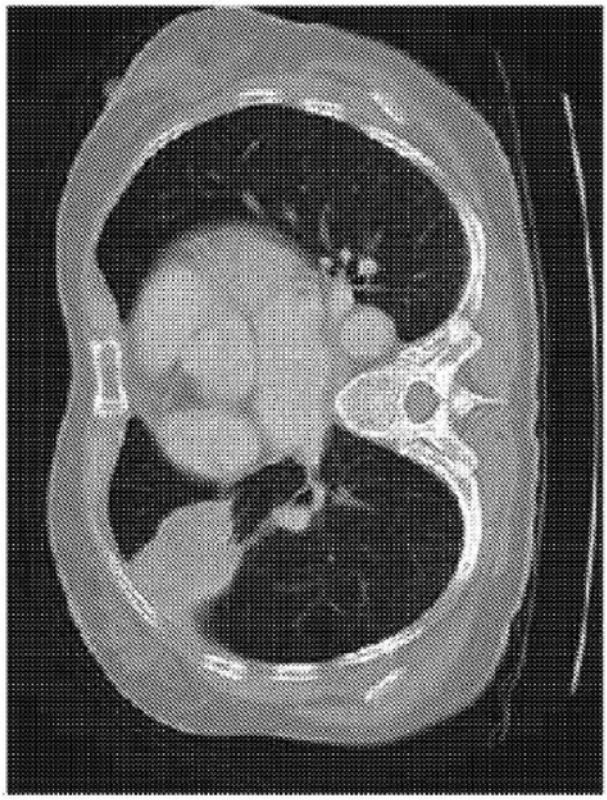


图3A

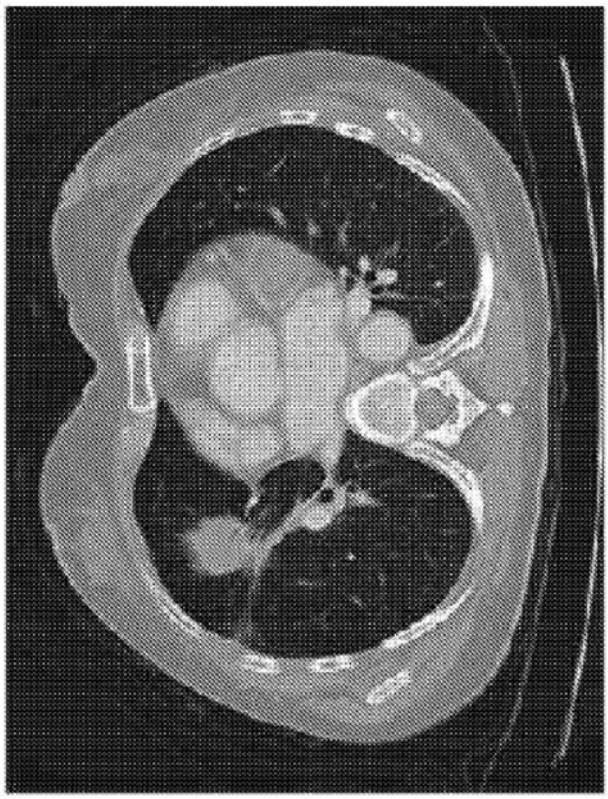


图3B

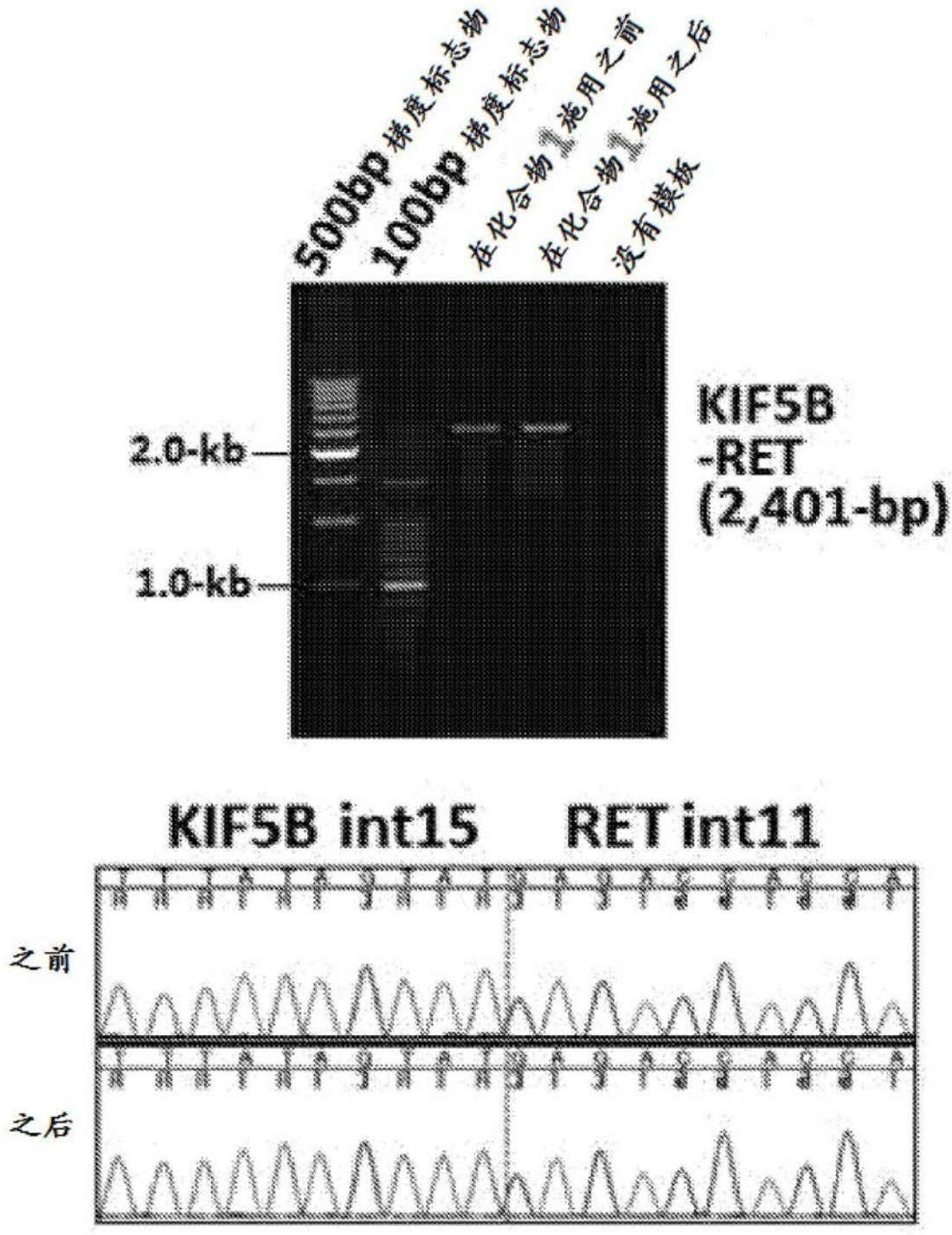

500bp 梯度标志物
100bp 梯度标志物
在化合物1施用之前
在化合物1施用之后
没有模板
2.0-kb
1.0-kb
KIF5B
-RET
(2,401-bp)
KIF5B int15
RET int11
之前
之后

图4A

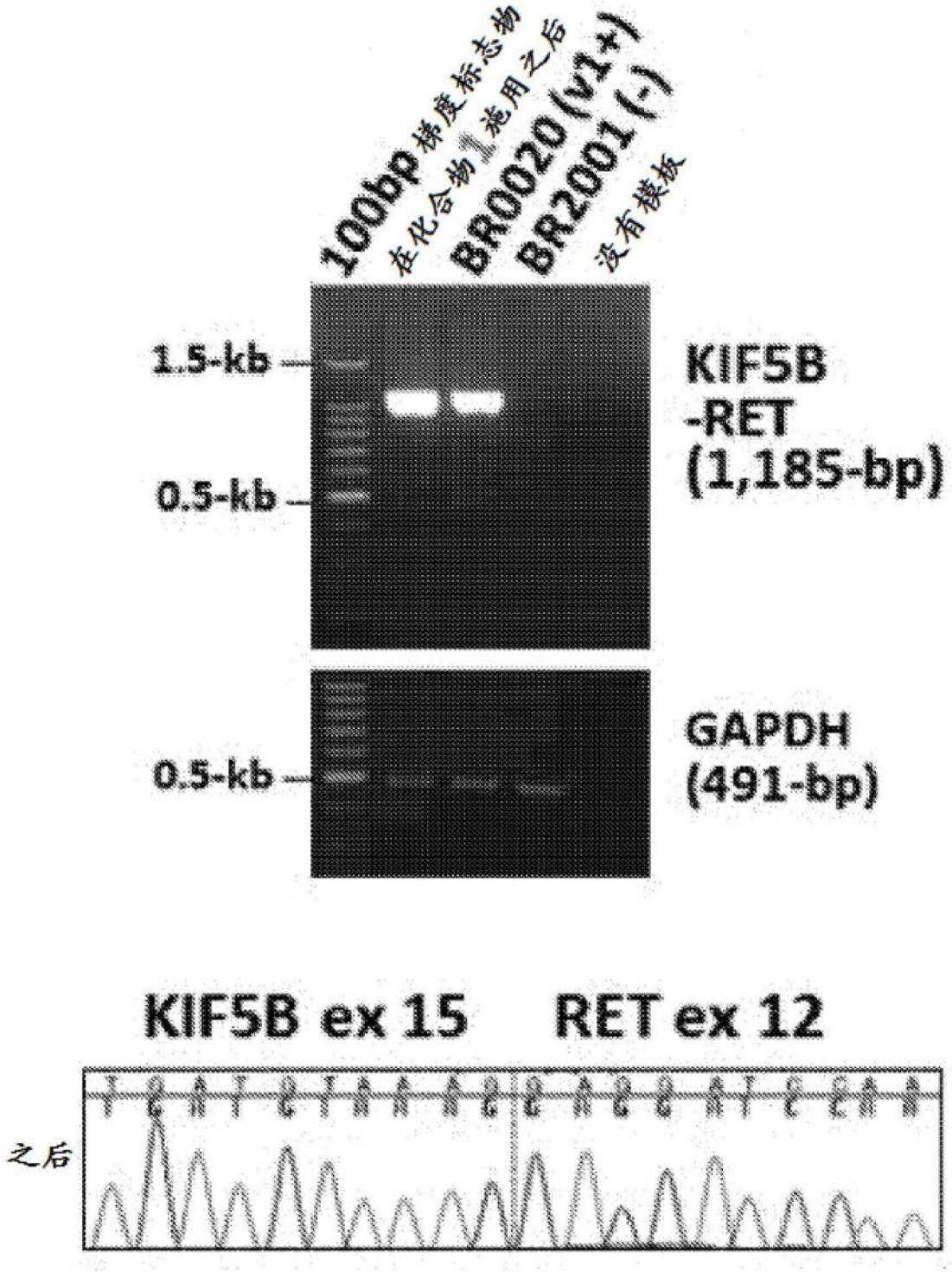

100bp 梯度标志物
在化合物1施用之后
BR0020 (v1+)
BR2001 (-)
没有模板
1.5-kb
0.5-kb
KIF5B
-RET
(1,185-bp)
0.5-kb
GAPDH
(491-bp)
KIF5B ex 15
RET ex 12
之后

图4B

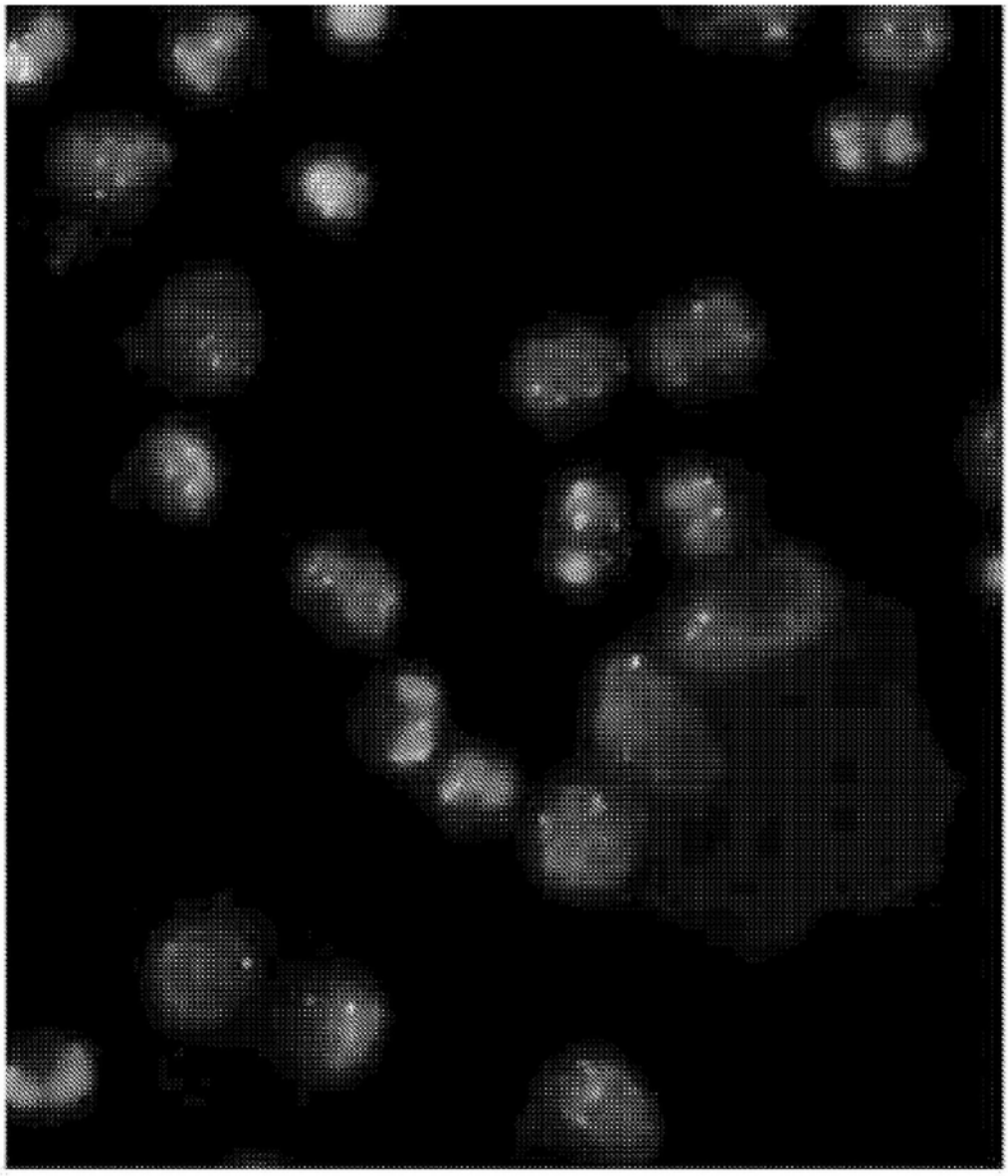


图4C