



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201313698 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 04 月 01 日

(21)申請案號：101127848

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 08 月 01 日

(51)Int. Cl. : C07D401/14 (2006.01)

A61K31/4545 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2011/08/02 美國

61/514,386

(71)申請人：輝瑞大藥廠(美國) PFIZER INC. (US)

美國

(72)發明人：克里斯天聖 詹姆士 蓋爾 CHRISTENSEN, JAMES GAIL (US) ; 鄒亞紅 ZOU, YAHONG (CN)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：7 共 103 頁

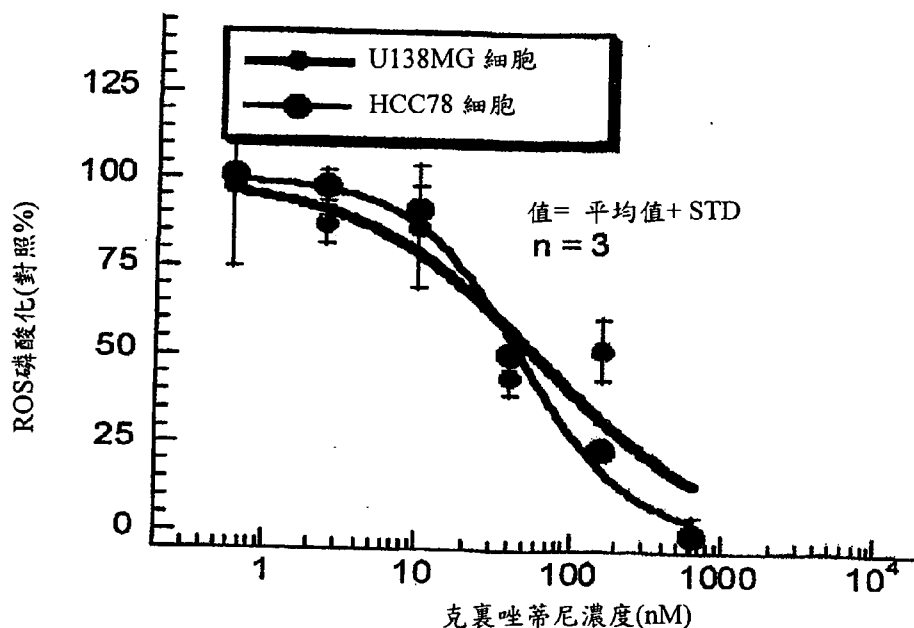
(54)名稱

治療不正常細胞生長之方法

METHOD OF TREATING ABNORMAL CELL GROWTH

(57)摘要

本發明係關於 ROS 激酶抑制劑之用途，其用於治療哺乳動物中之不正常細胞生長。具體而言，本發明提供治療患有由至少一種遺傳改變之 ROS 調介之癌症的哺乳動物之方法。具體而言，本發明提供藉由投與克裏唑蒂尼(crizotinib)治療患有由至少一種遺傳改變之 ROS 調介之癌症的哺乳動物之方法。





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201313698 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 04 月 01 日

(21)申請案號：101127848

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 08 月 01 日

(51)Int. Cl. : C07D401/14 (2006.01)

A61K31/4545 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2011/08/02 美國

61/514,386

(71)申請人：輝瑞大藥廠(美國) PFIZER INC. (US)

美國

(72)發明人：克里斯天聖 詹姆士 蓋爾 CHRISTENSEN, JAMES GAIL (US) ; 鄒亞紅 ZOU, YAHONG (CN)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：7 共 103 頁

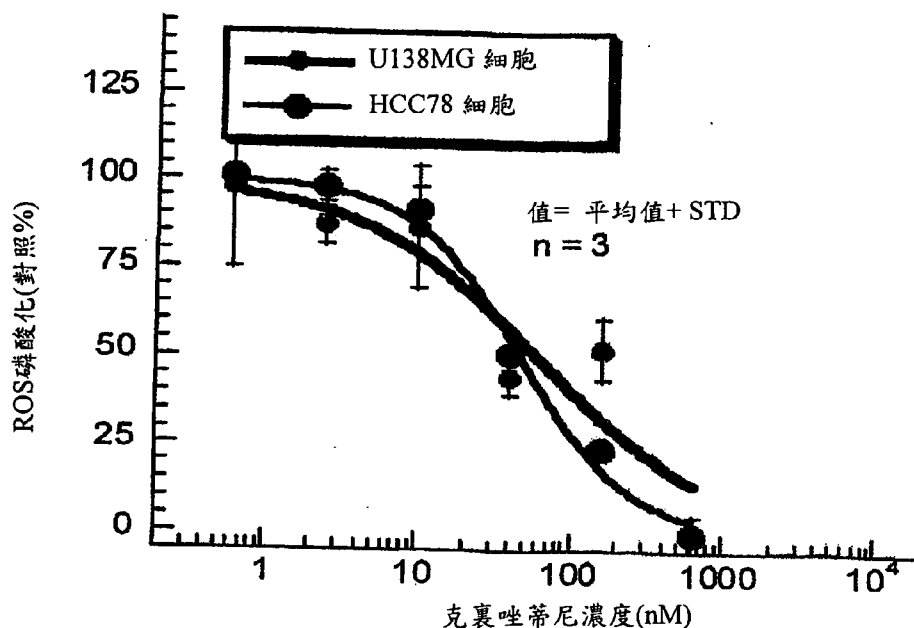
(54)名稱

治療不正常細胞生長之方法

METHOD OF TREATING ABNORMAL CELL GROWTH

(57)摘要

本發明係關於 ROS 激酶抑制劑之用途，其用於治療哺乳動物中之不正常細胞生長。具體而言，本發明提供治療患有由至少一種遺傳改變之 ROS 調介之癌症的哺乳動物之方法。具體而言，本發明提供藉由投與克裏唑蒂尼(crizotinib)治療患有由至少一種遺傳改變之 ROS 調介之癌症的哺乳動物之方法。



發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 101127848

※ 申請日： 101.8.1

※IPC 分類：C07D401/14 (2006.01)

A61K31/4545 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

治療不正常細胞生長之方法

METHOD OF TREATING ABNORMAL CELL GROWTH

二、中文發明摘要：

本發明係關於ROS激酶抑制劑之用途，其用於治療哺乳動物中之不正常細胞生長。具體而言，本發明提供治療患有由至少一種遺傳改變之ROS調介之癌症的哺乳動物之方法。具體而言，本發明提供藉由投與克裏唑蒂尼(crizotinib)治療患有由至少一種遺傳改變之ROS調介之癌症的哺乳動物之方法。

三、英文發明摘要：

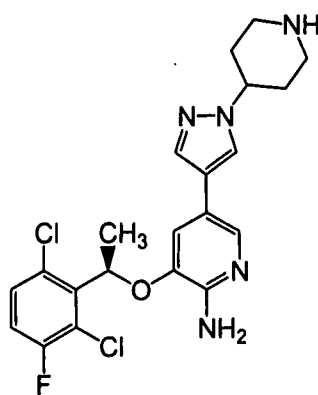
The present invention relates to the use of ROS kinase inhibitors for treating abnormal cell growth in mammals. In particular, the invention provides methods of treating mammals suffering from cancer mediated by at least one genetically altered ROS. In particular, the invention provides methods of treating mammals suffering from cancer mediated by at least one genetically altered ROS by administration of crizotinib.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

1

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於ROS抑制劑之用途，其用於治療哺乳動物中之不正常細胞生長。具體而言，本發明提供治療患有癌症之哺乳動物之方法。

本申請案主張2011年8月2日所申請之美國臨時申請案第61/514,386號之權利，其全文以引用之方式併入本文中。

【先前技術】

人類癌症包含各種各樣的疾病，其統稱為全世界發展國家中主要死亡原因之一(American Cancer Society, Cancer Facts and Figures 2005. Atlanta: American Cancer Society; 2005)。癌症之進展係由一系列複雜多重遺傳及分子事件(包括基因突變、染色體易位及核型不正常)引起(Hanahan 等人 *Cell* 100:57-70 (2000))。儘管癌症之潛在遺傳病因係多樣且複雜的，但已觀察到每一癌症類型呈現常見特性且獲得有利於其進展之能力。該等獲得之能力包括失調細胞生長、補充血管之持續能力(即，血管發生)、及腫瘤細胞局部擴展以及轉移至繼發性器官位點之能力(Hanahan 等人 *Cell* (2000))。因此，鑑別新穎治療劑之能力呈遞顯著未滿足之需要，該等治療劑1) 抑制在癌症進展期間改變之分子靶標或2) 靶向多種腫瘤中之癌症進展常見之多個過程。

V-ros UR2肉瘤病毒致癌基因同系物1 (ROS-1或ROS)係屬於胰島素受體亞族且涉及細胞增殖及分化過程之原癌基因受體酪胺酸激酶。Nagarajan等人*Proc Natl Acad Sci*

83:6568-6572 (1986))。ROS在人類中多種不同組織之上皮細胞中表現。已在神經膠母細胞瘤以及中樞神經系統腫瘤中發現ROS表現及/或活化之缺陷(Charest等人, *Genes Chromos. Can.* 37(1): 58-71 (2003))。已闡述產生ROS激酶之異常融合蛋白的涉及ROS之遺傳改變, 包括神經膠母細胞瘤(Charest等人(2003); Birchmeier等人, *Proc Natl Acad Sci* 84:9270-9274 (1987))及NSCLC (Rimkunas等人, *Clin Cancer Res* epub, 6月1日(2012))中之FIG-ROS缺失易位、NSCLC中之SLC34A2-ROS易位(Rikova等人, *Cell* 131:1190-1203 (2007)、NSCLC(Rikova等人, (2007))及膽管上皮癌(Gu等人, *PLoS ONE* 6(1): e15640 (2011))中之CD74-ROS易位、及已知驅動小鼠中之腫瘤生長之ROS的截短活性形式(Birchmeier等人 *Mol. Cell. Bio.* 6(9):3109-3115 (1986))。肺癌患者腫瘤試樣中已報告其他融合物(包括TPM3-ROS1、SDC4-ROS1、EZR-ROS1及LRIG3-ROS1)(Takeuchi等人 *Nature Medicine* (2012))。

鈉依賴性磷酸鹽轉運蛋白同型異構體NaPi-3b蛋白質(SLC34A2)係690個胺基酸磷酸鹽轉運蛋白, 其於人類肺及小腸中表現, 且其具有鈉依賴性活性。已在卵巢癌中發現SLC34A2表現及/或活性中之缺陷(Rangel等人, *Oncogene* 22(46): 7225-7232 (2003))。CD74係針對MIF免疫細胞因子以高親和性起MHC II類伴侶蛋白作用的整合膜蛋白(Leng等人, *J. Exp. Med.* 197:1467-1476 (2003))。FIG (融合於神經膠母細胞瘤中)係編碼454個胺基酸蛋白質之基因, 該蛋白包括PSD-95、Disc Large、ZO-1 (PDZ)結構域、兩個

超螺旋區域及白胺酸拉鏈。FIG已顯示藉由經由其第二超螺旋結構域與SNARE蛋白相互作用而於外周與Golgi裝置結合，且因此經推斷在Golgi-調介之小胞輸送中起作用(Charest等人(2003))。

SLC34A2-ROS易位發生在染色體(4p15)與染色體(6q22)之間且產生兩個融合蛋白變體，其組合鈉依賴性磷酸鹽轉運蛋白同型異構體NaPi-3b蛋白質(SLC34A2)之N末端與原癌基因酪胺酸蛋白激酶ROS前體(ROS)激酶之跨膜及激酶結構域(WO 2007/084631)。迄今為止，已鑑別SLC34A2-ROS融合蛋白之兩個變體，其分別係724個胺基酸(SLC34A2-ROS(L)；長變體)及621個胺基酸(SLC34A2-ROS(S)；短變體)(WO 2007/084631)。SLC34A2-ROS易位亦可闡述為ROS基因與SLC34A2基因之融合，其隨後產生特徵在於由SLC34A2-ROS融合基因編碼之蛋白序列的異常SLC34A2-ROS融合蛋白。

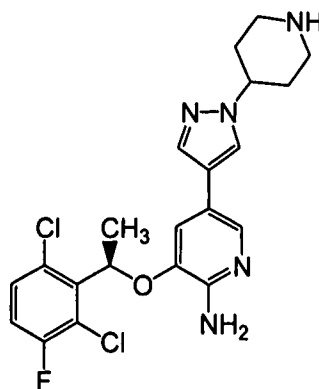
CD74-ROS易位發生在染色體(5q32)與染色體(6q22)之間且產生組合CD74之N末端與原癌基因酪胺酸蛋白激酶ROS前體(ROS)激酶之跨膜及激酶結構域的融合蛋白。所得CD74-ROS融合蛋白係703個胺基酸蛋白質(WO 2009/051846)。CD74-ROS易位亦可闡述為ROS基因與CD74基因之融合，其隨後產生特徵在於由CD74-ROS融合基因編碼之蛋白序列的異常CD74-ROS融合蛋白。

FIG-ROS缺失易位以染色體(6q21)上之240千鹼基之染色體內純合缺失的方式發生，以產生組成型活化酪胺酸激酶

(Charest 等人 (2003))。已報告 FIG-ROS 融合蛋白之變體，其分別係 878 個胺基酸 (FIG-ROS(L)；長變體) 及 630 個胺基酸 (FIG-ROS(S)；短變體) (Gu 等人 (2011)；US 2011/0287445)。由於涉及 ROS 基因之融合及缺失參與人類癌症之病源，故可用於減弱該等融合及缺失中之 ROS 激酶活性之活性的 ROS 之發現抑制劑代表癌症療法中之顯著未滿足需要。

【發明內容】

在一個態樣中，本發明提供治療需要該治療之人類之癌症的方法，該方法包含向該人類投與治療有效量之式 1 之 ROS 激酶抑制劑：



1

或其醫藥上可接受之鹽，其中該癌症係由至少一種遺傳改變之 ROS 調介。式 1 化合物可在本文中不同地由其通用名克裏唑蒂尼 (crizotinib) 或其化學名 3-[(R)-1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-5-(1-六氫吡啶-4-基-1H-吡唑-4-基)-吡啶-2-基胺提及。

在本發明之此態樣之一個實施例中，至少一種遺傳改變

之ROS係ROS之融合基因。在此態樣之另一實施例中，ROS之融合基因係SLC34A2-ROS基因或CD74-ROS基因。在此態樣之另一實施例中，至少一種遺傳改變之ROS係涉及ROS激酶之遺傳缺失。在此態樣之另一實施例中，遺傳缺失係FIG-ROS基因。在此態樣之另一實施例中，至少一種遺傳改變之ROS係遺傳改變之ROS激酶。在此態樣之另一實施例中，遺傳改變之ROS激酶係ROS融合物。在此態樣之另一實施例中，ROS融合物係SLC34A2-ROS激酶或CD74-ROS激酶。在此態樣之另一實施例中，至少一種遺傳改變之ROS係涉及ROS激酶之缺失蛋白質。在此態樣之另一實施例中，缺失蛋白質係FIG-ROS激酶。

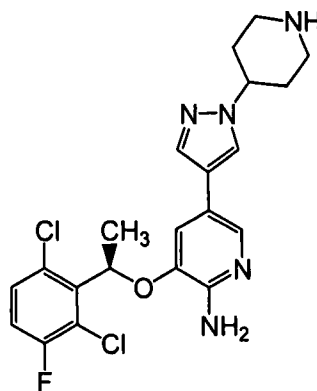
在此態樣之另一實施例中，癌症選自肺癌、骨癌、胰腺癌、皮膚癌、頭頸癌、皮膚或眼內黑色素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛區癌、胃癌、結腸癌、乳癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、外陰癌、何傑金氏病(Hodgkin's Disease)、食管癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、甲狀旁腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、前列腺癌、慢性或急性白血病、淋巴細胞性淋巴瘤、膀胱癌、腎或輸尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、中樞神經系統(CNS)贅瘤、原發性CNS淋巴瘤、脊柱瘤、腦幹膠質瘤、垂體腺瘤及其組合。在此態樣之另一實施例中，癌症選自由以下組成之群：非小細胞肺癌(NSCLC)、神經膠母細胞瘤、鱗狀細胞癌、激素難治性前列腺癌、乳頭狀腎細胞癌、結腸直腸腺癌、神經母細胞瘤、退行發育

性大細胞淋巴瘤(ALCL)及胃癌。在此態樣之另一實施例中，癌症係非小細胞肺癌(NSCLC)。在此態樣之另一實施例中，癌症係神經膠母細胞瘤。在此態樣之另一實施例中，式1化合物係以包含式1化合物及至少一種醫藥上可接受之載劑的醫藥組合物形式投與。在此態樣之另一實施例中，式1化合物或其醫藥上可接受之鹽係以包含式1化合物或其醫藥上可接受之鹽及至少一種醫藥上可接受之載劑的醫藥組合物形式投與。

在另一態樣中，本發明提供包含向具有由ROS激酶調介之不正常細胞生長的哺乳動物投與治療有效量之ROS激酶抑制劑的方法。在本發明之此態樣之一個實施例中，不正常細胞生長係由至少一種遺傳改變之ROS激酶調介。在另一實施例中，不正常細胞生長係由ROS激酶之融合基因調介。在另一實施例中，不正常細胞生長係由涉及ROS激酶之遺傳缺失調介。在另一實施例中，融合基因係SLC34A2-ROS或CD74-ROS。在另一實施例中，遺傳缺失係FIG-ROS。在另一實施例中，不正常細胞生長係由ROS激酶之融合蛋白調介。在另一實施例中，不正常細胞生長係由涉及ROS激酶之缺失蛋白質調介。在另一實施例中，融合蛋白係SLC34A2-ROS或CD74-ROS。在另一實施例中，缺失蛋白質係FIG-ROS。在此態樣之一些該等實施例中，該方法包含向具有由ROS激酶調介之不正常細胞生長的該哺乳動物投與治療有效量之ROS激酶抑制劑，藉此治療該不正常細胞生長。

在此態樣之另一實施例中，ROS激酶抑制劑係ROS激酶之小分子抑制劑。在另一實施例中，ROS激酶抑制劑係胺基-吡啶化合物或胺基-吡嗪化合物。

在本發明之前述態樣中之每一者的另一實施例中，ROS激酶抑制劑係式1化合物：



1

或其醫藥上可接受之鹽。

在本發明之此態樣之另一實施例中，不正常細胞生長係癌症。在本發明之前述態樣中之每一者的另一實施例中，癌症選自肺癌、骨癌、胰腺癌、皮膚癌、頭頸癌、皮膚或眼內黑色素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛區癌、胃癌、結腸癌、乳癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、外陰癌、何傑金氏病、食管癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、甲狀旁腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、前列腺癌、慢性或急性白血症、淋巴細胞性淋巴瘤、膀胱癌、腎或輸尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、中樞神經系統(CNS)贅瘤、原發性CNS淋巴瘤、脊柱瘤、腦幹膠質瘤、垂體腺瘤及其組合。

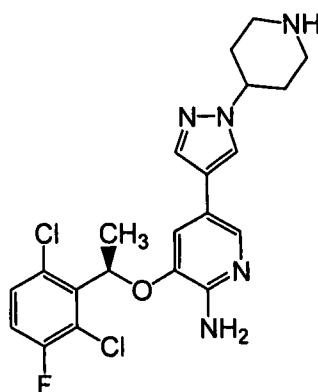
在本發明之此態樣之又一實施例中，癌症選自由以下組成之群：非小細胞肺癌(NSCLC)、神經膠母細胞瘤、鱗狀細胞癌、激素難治性前列腺癌、乳頭狀腎細胞癌、結腸直腸腺癌、神經母細胞瘤、退行發育性大細胞淋巴瘤(ALCL)及胃癌。在本發明之前述態樣中之每一者的又一實施例中，癌症係非小細胞肺癌(NSCLC)。在又一實施例中，癌症係神經膠母細胞瘤。

在本發明之此態樣之又一實施例中，化合物或其醫藥上可接受之鹽係以包含式1化合物及至少一種醫藥上可接受之載劑的醫藥組合物形式投與。在此態樣之另一實施例中，式1化合物或其醫藥上可接受之鹽係以包含式1化合物或其醫藥上可接受之鹽及至少一種醫藥上可接受之載劑的醫藥組合物形式投與。

在另一態樣中，本發明提供包含向患有由ROS激酶調介之癌症的哺乳動物投與治療有效量之ROS激酶抑制劑的方法。在本發明之此態樣之一個實施例中，癌症係由至少一種遺傳改變之ROS激酶調介。在另一實施例中，癌症係由ROS激酶之融合基因調介。在另一實施例中，不正常細胞生長係由涉及ROS激酶之遺傳缺失調介。在另一實施例中，融合基因係SLC34A2-ROS或CD74-ROS。在另一實施例中，遺傳缺失係FIG-ROS。在另一實施例中，不正常細胞生長係由ROS激酶之融合蛋白調介。在另一實施例中，不正常細胞生長係由涉及ROS激酶之缺失蛋白質調介。在另一實施例中，融合蛋白係SLC34A2-ROS或CD74-ROS。

在另一實施例中，缺失蛋白質係FIG-ROS。在此態樣之一些該等實施例中，該方法包含向患有由ROS激酶調介之癌症的該哺乳動物投與治療有效量之ROS激酶抑制劑，藉此治療該癌症。

在此態樣之另一實施例中，ROS激酶抑制劑係ROS激酶之小分子抑制劑。在另一實施例中，ROS激酶抑制劑係胺基-吡啶化合物或胺基-吡嗪化合物。在本發明之前述態樣中之每一者的另一實施例中，ROS激酶抑制劑係式1化合物：



1

或其醫藥上可接受之鹽。

在另一實施例中，癌症選自肺癌、骨癌、胰腺癌、皮膚癌、頭頸癌、皮膚或眼內黑色素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛區癌、胃癌、結腸癌、乳癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、外陰癌、何傑金氏病、食管癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、甲狀旁腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、前列腺癌、慢性或急性白血病、淋巴細胞性淋巴瘤、膀胱癌、腎或輸尿管

癌、腎細胞癌、腎盂癌、中樞神經系統(CNS)贅瘤、原發性CNS淋巴瘤、脊柱瘤、腦幹膠質瘤、垂體腺瘤及其組合。

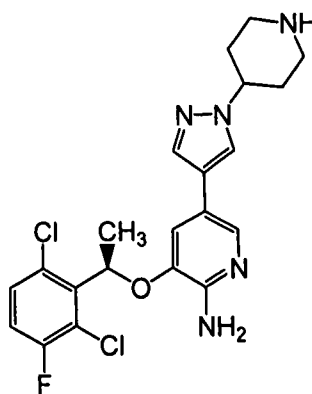
在本發明之此態樣之又一實施例中，癌症選自由以下組成之群：非小細胞肺癌(NSCLC)、神經膠母細胞瘤、鱗狀細胞癌、激素難治性前列腺癌、乳頭狀腎細胞癌、結腸直腸腺癌、神經母細胞瘤、退行發育性大細胞淋巴瘤(ALCL)及胃癌。在又一實施例中，癌症係非小細胞肺癌(NSCLC)。在又一實施例中，癌症係神經膠母細胞瘤。

在本發明之此態樣之又一實施例中，化合物或其醫藥上可接受之鹽係以包含式1化合物及至少一種醫藥上可接受之載劑的醫藥組合物形式投與。在此態樣之另一實施例中，式1化合物或其醫藥上可接受之鹽係以包含式1化合物或其醫藥上可接受之鹽及至少一種醫藥上可接受之載劑的醫藥組合物形式投與。

在另一態樣中，本發明提供包含藉由投與治療有效量之ROS激酶抑制劑治療需要該治療之哺乳動物之由至少一種ROS激酶調介之癌症的方法。在本發明之此態樣之一個實施例中，癌症係由至少一種遺傳改變之ROS激酶調介。在另一實施例中，癌症係由ROS激酶之融合基因調介。在另一實施例中，癌症係由涉及ROS激酶之遺傳缺失調介。在另一實施例中，融合基因係SLC34A2-ROS或CD74-ROS。在另一實施例中，遺傳缺失係FIG-ROS。在另一實施例中，不正常細胞生長係由ROS激酶之融合蛋白調介。在另

一實施例中，不正常細胞生長係由涉及ROS激酶之缺失蛋白質調介。在另一實施例中，融合蛋白係SLC34A2-ROS或CD74-ROS。在另一實施例中，缺失蛋白質係FIG-ROS。

在此態樣之另一實施例中，ROS激酶抑制劑係ROS激酶之小分子抑制劑。在另一實施例中，ROS激酶抑制劑係胺基-吡啶化合物或胺基-吡嗪化合物。在本發明之前述態樣中之每一者的另一實施例中，ROS激酶抑制劑係式1化合物：



1

或其醫藥上可接受之鹽。

在另一實施例中，癌症選自肺癌、骨癌、胰腺癌、皮膚癌、頭頸癌、皮膚或眼內黑色素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛區癌、胃癌、結腸癌、乳癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、外陰癌、何傑金氏病、食管癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、甲狀旁腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、前列腺癌、慢性或急性白血症、淋巴細胞性淋巴瘤、膀胱癌、腎或輸尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、中樞神經系統(CNS)贅瘤、原發

性 CNS 淋巴瘤、脊柱瘤、腦幹膠質瘤、垂體腺瘤及其組合。

在本發明之此態樣之又一實施例中，癌症選自由以下組成之群：非小細胞肺癌(NSCLC)、神經膠母細胞瘤、鱗狀細胞癌、激素難治性前列腺癌、乳頭狀腎細胞癌、結腸直腸腺癌、神經母細胞瘤、退行發育性大細胞淋巴瘤(ALCL)及胃癌。在又一實施例中，癌症係非小細胞肺癌(NSCLC)。在又一實施例中，癌症係神經膠母細胞瘤。

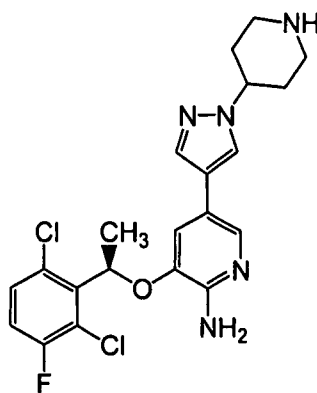
在本發明之此態樣之又一實施例中，化合物或其醫藥上可接受之鹽係以包含式1化合物及至少一種醫藥上可接受之載劑的醫藥組合物形式投與。在此態樣之另一實施例中，式1化合物或其醫藥上可接受之鹽係以包含式1化合物或其醫藥上可接受之鹽及至少一種醫藥上可接受之載劑的醫藥組合物形式投與。

在另一態樣中，本發明提供治療需要該治療之哺乳動物之不正常細胞生長的方法，該方法包含向該哺乳動物投與治療有效量之ROS激酶抑制劑。在本發明之此態樣之一個實施例中，不正常細胞生長係由至少一種遺傳改變之ROS激酶調介。在另一實施例中，不正常細胞生長係由ROS激酶之融合基因調介。在另一實施例中，不正常細胞生長係由涉及ROS激酶之遺傳缺失調介。在另一實施例中，融合基因係SLC34A2-ROS或CD74-ROS。在另一實施例中，遺傳缺失係FIG-ROS。在另一實施例中，不正常細胞生長係由ROS激酶之融合蛋白調介。在另一實施例中，不正常細

胞生長係由涉及ROS激酶之缺失蛋白質調介。在另一實施例中，融合蛋白係CD74-ROS。在另一實施例中，融合蛋白係SLC34A2-ROS。在另一實施例中，缺失蛋白質係FIG-ROS。

在此態樣之另一實施例中，ROS激酶抑制劑係ROS激酶之小分子抑制劑。在另一實施例中，ROS激酶抑制劑係胺基-吡啶化合物或胺基-吡嗪化合物。

在本發明之前述態樣中之每一者的另一實施例中，ROS激酶抑制劑係式1化合物：



1

或其醫藥上可接受之鹽。

在本發明之此態樣之另一實施例中，不正常細胞生長係癌症。在本發明之前述態樣中之每一者的另一實施例中，癌症選自肺癌、骨癌、胰腺癌、皮膚癌、頭頸癌、皮膚或眼內黑色素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛區癌、胃癌、結腸癌、乳癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、外陰癌、何傑金氏病、食管癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、甲狀旁腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、前列腺癌、慢性或急性白血病、淋

巴細胞性淋巴瘤、膀胱癌、腎或輸尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、中樞神經系統(CNS)贅瘤、原發性CNS淋巴瘤、脊柱瘤、腦幹膠質瘤、垂體腺瘤及其組合。

在本發明之此態樣之又一實施例中，癌症選自由以下組成之群：非小細胞肺癌(NSCLC)、神經膠母細胞瘤、鱗狀細胞癌、激素難治性前列腺癌、乳頭狀腎細胞癌、結腸直腸腺癌、神經母細胞瘤、退行發育性大細胞淋巴瘤(ALCL)及胃癌。在本發明之前述態樣中之每一者的又一實施例中，癌症係非小細胞肺癌(NSCLC)。在又一實施例中，癌症係神經膠母細胞瘤。

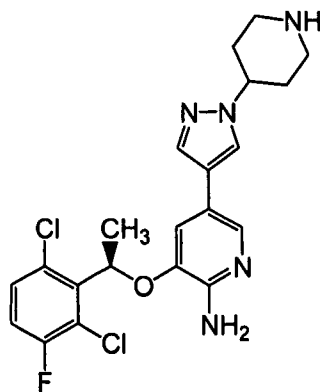
在本發明之此態樣之又一實施例中，化合物或其醫藥上可接受之鹽係以包含式1化合物及至少一種醫藥上可接受之載劑的醫藥組合物形式投與。在此態樣之另一實施例中，式1化合物或其醫藥上可接受之鹽係以包含式1化合物或其醫藥上可接受之鹽及至少一種醫藥上可接受之載劑的醫藥組合物形式投與。

在本發明之前述態樣中之每一者的一個實施例中，哺乳動物係人類。在本發明之前述態樣中之每一者的另一實施例中，哺乳動物係狗。

在另一態樣中，本發明提供治療需要該治療之哺乳動物中顯示對至少一種遺傳改變之ROS激酶呈陽性之癌症的方法，該方法包含向該哺乳動物投與治療有效量之ROS激酶抑制劑。在本發明之此態樣之一個實施例中，遺傳改變之ROS激酶係ROS之融合基因。在另一實施例中，融合基因

係 SLC34A2-ROS 或 CD74-ROS。在另一實施例中，融合基因係 SLC34A2-ROS。在另一實施例中，融合基因係 CD74-ROS。在另一實施例中，遺傳改變之 ROS 激酶係涉及 ROS 激酶之遺傳缺失。在另一實施例中，遺傳缺失係 FIG-ROS。在另一實施例中，遺傳改變之 ROS 激酶係 ROS 激酶之融合蛋白。在另一實施例中，遺傳改變之 ROS 激酶係涉及 ROS 激酶之缺失蛋白質。在另一實施例中，融合蛋白係 SLC34A2-ROS 或 CD74-ROS。在另一實施例中，融合蛋白係 CD74-ROS。在另一實施例中，融合蛋白係 SLC34A2-ROS。在另一實施例中，缺失蛋白質係 FIG-ROS。

在此態樣之另一實施例中，ROS 激酶抑制劑係 ROS 激酶之小分子抑制劑。在另一實施例中，ROS 激酶抑制劑係胺基-吡啶化合物或胺基-吡嗪化合物。在本發明之前述態樣中之每一者的另一實施例中，ROS 激酶抑制劑係式 1 化合物：



1

或其醫藥上可接受之鹽。

在另一實施例中，癌症選自肺癌、骨癌、胰腺癌、皮膚癌、頭頸癌、皮膚或眼內黑色素瘤、子宮癌、卵巢癌、直

腸癌、肛區癌、胃癌、結腸癌、乳癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、外陰癌、何傑金氏病、食管癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、甲狀旁腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、前列腺癌、慢性或急性白血病、淋巴細胞性淋巴瘤、膀胱癌、腎或輸尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、中樞神經系統(CNS)贅瘤、原發性CNS淋巴瘤、脊柱瘤、腦幹膠質瘤、垂體腺瘤及其組合。

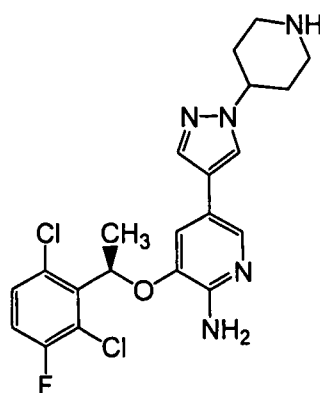
在本發明之此態樣之又一實施例中，癌症選自由以下組成之群：非小細胞肺癌(NSCLC)、神經膠母細胞瘤、鱗狀細胞癌、激素難治性前列腺癌、乳頭狀腎細胞癌、結腸直腸腺癌、神經母細胞瘤、退行發育性大細胞淋巴瘤(ALCL)及胃癌。在又一實施例中，癌症係非小細胞肺癌(NSCLC)。在又一實施例中，癌症係神經膠母細胞瘤。

在本發明之此態樣之又一實施例中，化合物或其醫藥上可接受之鹽係以包含式1化合物及至少一種醫藥上可接受之載劑的醫藥組合物形式投與。在此態樣之另一實施例中，式1化合物或其醫藥上可接受之鹽係以包含式1化合物或其醫藥上可接受之鹽及至少一種醫藥上可接受之載劑的醫藥組合物形式投與。

在另一態樣中，本發明提供治療ROS陽性癌症之方法，該方法包含向需要該治療之哺乳動物投與治療有效量之ROS激酶抑制劑。在本發明之此態樣之一個實施例中，ROS陽性癌症係由ROS之融合基因調介。在另一實施例

中，融合基因係SLC34A2-ROS或CD74-ROS。在另一實施例中，融合基因係SLC34A2-ROS。在另一實施例中，融合基因係CD74-ROS。在另一實施例中，ROS陽性癌症係由涉及ROS激酶之遺傳缺失調介。在另一實施例中，遺傳缺失係FIG-ROS。在另一實施例中，ROS陽性癌症係由ROS激酶之融合蛋白調介。在另一實施例中，ROS陽性癌症係由涉及ROS激酶之缺失蛋白質調介。在另一實施例中，ROS激酶之融合蛋白係SLC34A2-ROS或CD74-ROS。在另一實施例中，ROS激酶之融合蛋白係CD74-ROS。在另一實施例中，ROS激酶之融合蛋白係SLC34A2-ROS。在另一實施例中，ROS激酶之缺失蛋白質係FIG-ROS。

在此態樣之另一實施例中，ROS激酶抑制劑係ROS激酶之小分子抑制劑。在另一實施例中，ROS激酶抑制劑係胺基-吡啶化合物或胺基-吡嗪化合物。在本發明之前述態樣中之每一者的另一實施例中，ROS激酶抑制劑係式1化合物：



1

或其醫藥上可接受之鹽。

在另一實施例中，ROS陽性癌症選自肺癌、骨癌、胰腺

癌、皮膚癌、頭頸癌、皮膚或眼內黑色素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛區癌、胃癌、結腸癌、乳癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、外陰癌、何傑金氏病(Hodgkin's Disease)、食管癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、甲狀旁腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、前列腺癌、慢性或急性白血症、淋巴細胞性淋巴瘤、膀胱癌、腎或輸尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、中樞神經系統(CNS)贅瘤、原發性CNS淋巴瘤、脊柱瘤、腦幹膠質瘤、垂體腺瘤及其組合。

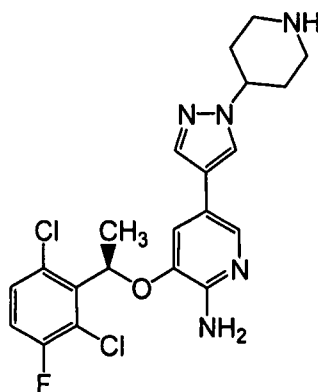
在本發明之此態樣之又一實施例中，ROS陽性癌症選自由以下組成之群：非小細胞肺癌(NSCLC)、神經膠母細胞瘤、鱗狀細胞癌、激素難治性前列腺癌、乳頭狀腎細胞癌、結腸直腸腺癌、神經母細胞瘤、退行發育性大細胞淋巴瘤(ALCL)及胃癌。在又一實施例中，ROS陽性癌症係非小細胞肺癌(NSCLC)。在又一實施例中，ROS陽性癌症係神經膠母細胞瘤。

在此態樣之一些實施例中，式1化合物或其醫藥上可接受之鹽係以包含式1化合物或其醫藥上可接受之鹽及至少一種醫藥上可接受之載劑的醫藥組合物形式投與。

在另一態樣中，本發明提供包含向具有由ROS激酶調介之不正常細胞生長的哺乳動物投與治療有效量之ROS激酶抑制劑的方法。在本發明之此態樣之一個實施例中，不正常細胞生長係由至少一種遺傳改變之ROS激酶調介。在另一實施例中，不正常細胞生長係由ROS激酶之融合基因調

介。在另一實施例中，不正常細胞生長係由涉及ROS激酶之遺傳缺失調介。在另一實施例中，融合基因係SLC34A2-ROS或CD74-ROS。在另一實施例中，遺傳缺失係FIG-ROS。在另一實施例中，不正常細胞生長係由ROS激酶之融合蛋白調介。在另一實施例中，不正常細胞生長係由涉及ROS激酶之缺失蛋白質調介。在另一實施例中，融合蛋白係SLC34A2-ROS或CD74-ROS。在另一實施例中，缺失蛋白質係FIG-ROS。

在此態樣之另一實施例中，ROS激酶抑制劑係ROS激酶之小分子抑制劑。在另一實施例中，ROS激酶抑制劑係胺基-吡啶化合物或胺基-吡嗪化合物。在本發明之前述態樣中之每一者的另一實施例中，ROS激酶抑制劑係式1化合物：



1

或其醫藥上可接受之鹽。

在本發明之此態樣之另一實施例中，不正常細胞生長係癌症。在另一實施例中，癌症選自肺癌、骨癌、胰腺癌、皮膚癌、頭頸癌、皮膚或眼內黑色素瘤、子宮癌、卵巢

癌、直腸癌、肛區癌、胃癌、結腸癌、乳癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、外陰癌、何傑金氏病、食管癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、甲狀旁腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、前列腺癌、慢性或急性白血病、淋巴細胞性淋巴瘤、膀胱癌、腎或輸尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、中樞神經系統(CNS)贅瘤、原發性CNS淋巴瘤、脊柱瘤、腦幹膠質瘤、垂體腺瘤及其組合。

在本發明之此態樣之又一實施例中，癌症選自由以下組成之群：非小細胞肺癌(NSCLC)、神經膠母細胞瘤、鱗狀細胞癌、激素難治性前列腺癌、乳頭狀腎細胞癌、結腸直腸腺癌、神經母細胞瘤、退行發育性大細胞淋巴瘤(ALCL)及胃癌。在又一實施例中，癌症係非小細胞肺癌(NSCLC)。在又一實施例中，癌症係神經膠母細胞瘤。

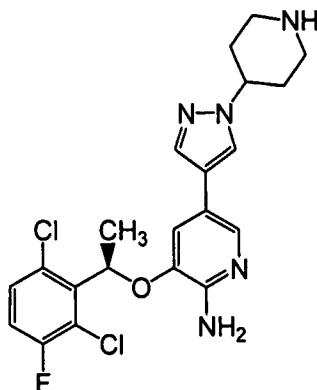
在本發明之此態樣之又一實施例中，化合物或其醫藥上可接受之鹽係以包含式1化合物及至少一種醫藥上可接受之載劑的醫藥組合物形式投與。在此態樣之另一實施例中，式1化合物或其醫藥上可接受之鹽係以包含式1化合物或其醫藥上可接受之鹽及至少一種醫藥上可接受之載劑的醫藥組合物形式投與。

在本發明之此態樣之又一實施例中，化合物或其醫藥上可接受之鹽係以包含式1化合物及至少一種醫藥上可接受之載劑的醫藥組合物形式投與。在此態樣之另一實施例中，式1化合物或其醫藥上可接受之鹽係以包含式1化合物

或其醫藥上可接受之鹽及至少一種醫藥上可接受之載劑的醫藥組合物形式投與。

在另一態樣中，本發明提供包含向已知呈ROS陽性之患者投與治療有效量之ROS激酶抑制劑的方法。在一個實施例中，患者患有由至少一種遺傳改變之ROS激酶調介之癌症。在另一實施例中，癌症係由ROS激酶之融合基因調介。在另一實施例中，癌症係由涉及ROS激酶之遺傳缺失調介。在另一實施例中，融合基因係SLC34A2-ROS或CD74-ROS。在另一實施例中，遺傳缺失係FIG-ROS。在另一實施例中，癌症係由ROS激酶之融合蛋白調介。在另一實施例中，癌症係由ROS激酶之融合蛋白調介。在另一實施例中，融合蛋白係SLC34A2-ROS或CD74-ROS。在另一實施例中，缺失蛋白質係FIG-ROS。

在此態樣之另一實施例中，ROS激酶抑制劑係ROS激酶之小分子抑制劑。在另一實施例中，ROS激酶抑制劑係胺基-吡啶化合物或胺基-吡嗪化合物。在本發明之前述態樣中之每一者的另一實施例中，ROS激酶抑制劑係式1化合物：



1

或其醫藥上可接受之鹽。

在另一實施例中，癌症選自肺癌、骨癌、胰腺癌、皮膚癌、頭頸癌、皮膚或眼內黑色素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛區癌、胃癌、結腸癌、乳癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、外陰癌、何傑金氏病、食管癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、甲狀旁腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、前列腺癌、慢性或急性白血病、淋巴細胞性淋巴瘤、膀胱癌、腎或輸尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、中樞神經系統(CNS)贅瘤、原發性CNS淋巴瘤、脊柱瘤、腦幹膠質瘤、垂體腺瘤及其組合。

在本發明之此態樣之又一實施例中，癌症選自由以下組成之群：非小細胞肺癌(NSCLC)、神經膠母細胞瘤、鱗狀細胞癌、激素難治性前列腺癌、乳頭狀腎細胞癌、結腸直腸腺癌、神經母細胞瘤、退行發育性大細胞淋巴瘤(ALCL)及胃癌。在本發明之前述態樣中之每一者的又一實施例中，癌症係非小細胞肺癌(NSCLC)。在又一實施例中，癌症係神經膠母細胞瘤。

在本發明之此態樣之又一實施例中，化合物或其醫藥上可接受之鹽係以包含式1化合物及至少一種醫藥上可接受之載劑的醫藥組合物形式投與。

在本發明之此態樣之又一實施例中，化合物或其醫藥上可接受之鹽係以包含式1化合物及至少一種醫藥上可接受之載劑的醫藥組合物形式投與。在此態樣之另一實施例

中，式1化合物或其醫藥上可接受之鹽係以包含式1化合物或其醫藥上可接受之鹽及至少一種醫藥上可接受之載劑的醫藥組合物形式投與。

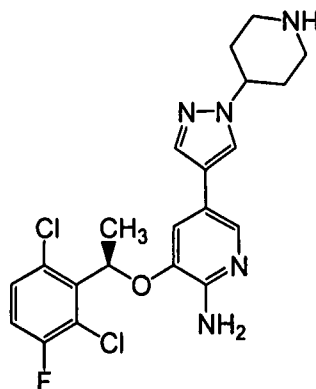
在另一態樣中，本發明提供包含以下之方法：

i. 鑑別患有顯示對至少一種遺傳改變之ROS激酶呈陽性之癌症之患者；及

ii. 向該患者投與治療有效量之ROS激酶抑制劑。

在本發明之此態樣之一個實施例中，該遺傳改變之ROS激酶係ROS之融合基因。在另一實施例中，融合基因係SLC34A2-ROS或CD74-ROS。在另一實施例中，融合基因係SLC34A2-ROS。在另一實施例中，融合基因係CD74-ROS。在另一實施例中，該遺傳改變之ROS激酶係涉及ROS激酶之遺傳缺失。在另一實施例中，遺傳缺失係FIG-ROS。在另一實施例中，該遺傳改變之ROS激酶係ROS激酶之融合蛋白。在另一實施例中，該遺傳改變之ROS激酶係涉及ROS激酶之缺失蛋白質。在另一實施例中，融合蛋白係SLC34A2-ROS或CD74-ROS。在另一實施例中，融合蛋白係SLC34A2-ROS。在另一實施例中，融合蛋白係CD74-ROS。在另一實施例中，缺失蛋白質係FIG-ROS。在此態樣之一些該等實施例中，該方法包括(i)鑑別患有顯示對至少一種遺傳改變之ROS激酶呈陽性之癌症之患者；及(ii)向該患者投與治療有效量之ROS激酶抑制劑，藉此治療該癌症。在此態樣之一些實施例中，該治療可逆轉或抑制癌症之進展。

在此態樣之另一實施例中，ROS激酶抑制劑係ROS激酶之小分子抑制劑。在另一實施例中，ROS激酶抑制劑係胺基-吡啶化合物或胺基-吡嗪化合物。在本發明之前述態樣中之每一者的另一實施例中，ROS激酶抑制劑係式1化合物：



1

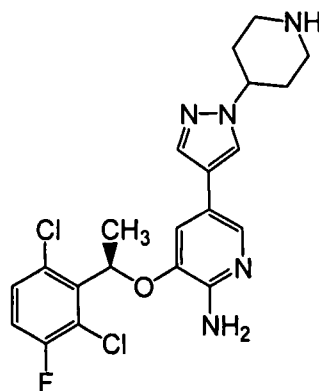
或其醫藥上可接受之鹽。

在本發明之此態樣之另一實施例中，不正常細胞生長係癌症。在本發明之前述態樣中之每一者的另一實施例中，癌症選自肺癌、骨癌、胰腺癌、皮膚癌、頭頸癌、皮膚或眼內黑色素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛區癌、胃癌、結腸癌、乳癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、外陰癌、何傑金氏病、食管癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、甲狀旁腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、前列腺癌、慢性或急性白血病、淋巴細胞性淋巴瘤、膀胱癌、腎或輸尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、中樞神經系統(CNS)贅瘤、原發性CNS淋巴瘤、脊柱瘤、腦幹膠質瘤、垂體腺瘤及其組合。

在本發明之此態樣之又一實施例中，癌症選自由以下組成之群：非小細胞肺癌(NSCLC)、神經膠母細胞瘤、鱗狀細胞癌、激素難治性前列腺癌、乳頭狀腎細胞癌、結腸直腸腺癌、神經母細胞瘤、退行發育性大細胞淋巴瘤(ALCL)及胃癌。在本發明之前述態樣中之每一者的又一實施例中，癌症係非小細胞肺癌(NSCLC)。在又一實施例中，癌症係神經膠母細胞瘤。

在本發明之此態樣之又一實施例中，化合物或其醫藥上可接受之鹽係以包含式1化合物及至少一種醫藥上可接受之載劑的醫藥組合物形式投與。在此態樣之另一實施例中，式1化合物或其醫藥上可接受之鹽係以包含式1化合物或其醫藥上可接受之鹽及至少一種醫藥上可接受之載劑的醫藥組合物形式投與。

在一個態樣中，本發明提供ROS激酶抑制劑之用途，其用於製備用於治療需要該治療之人類之癌症的藥劑，該治療包含向該哺乳動物投與治療有效量之式1之ROS激酶抑制劑



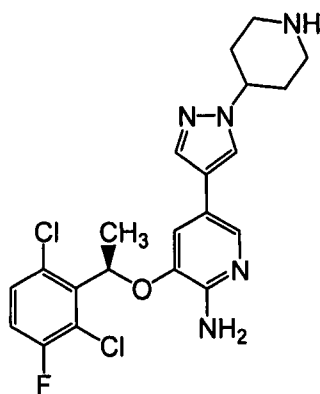
1

或其醫藥上可接受之鹽，其中癌症係由至少一種遺傳改變之ROS調介。在本發明之此態樣之一個實施例中，癌症係由ROS之融合基因調介。在此態樣之另一實施例中，ROS之融合基因係SLC34A2-ROS基因或CD74-ROS基因。在此態樣之另一實施例中，癌症係由涉及ROS激酶之遺傳缺失調介。在此態樣之另一實施例中，遺傳缺失係FIG-ROS基因。在此態樣之另一實施例中，癌症係由遺傳改變之ROS激酶調介。在此態樣之另一實施例中，遺傳改變之ROS激酶係ROS融合物。在此態樣之另一實施例中，ROS融合物係SLC34A2-ROS激酶或CD74-ROS激酶。在此態樣之另一實施例中，癌症係由涉及ROS激酶之缺失蛋白質調介。在此態樣之另一實施例中，缺失蛋白質係FIG-ROS激酶。

在此態樣之另一實施例中，癌症選自肺癌、骨癌、胰腺癌、皮膚癌、頭頸癌、皮膚或眼內黑色素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛區癌、胃癌、結腸癌、乳癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、外陰癌、何傑金氏病(Hodgkin's Disease)、食管癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、甲狀旁腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、前列腺癌、慢性或急性白血症、淋巴細胞性淋巴瘤、膀胱癌、腎或輸尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、中樞神經系統(CNS)贅瘤、原發性CNS淋巴瘤、脊柱瘤、腦幹膠質瘤、垂體腺瘤及其組合。在此態樣之另一實施例中，癌症選自由以下組成之群：非小細胞肺癌(NSCLC)、神經膠母細胞瘤、鱗狀細胞癌、激素難治性前列腺癌、乳

頭狀腎細胞癌、結腸直腸腺癌、神經母細胞瘤、退行發育性大細胞淋巴瘤(ALCL)及胃癌。在此態樣之另一實施例中，癌症係非小細胞肺癌(NSCLC)。在此態樣之另一實施例中，癌症係神經膠母細胞瘤。在此態樣之另一實施例中，式1化合物係以包含式1化合物及至少一種醫藥上可接受之載劑的醫藥組合物形式投與。

在一個態樣中，本發明提供ROS激酶抑制劑之用途，其用於製備用於治療由至少一種遺傳改變之ROS激酶調介之癌症的藥劑。在一個實施例中，ROS激酶抑制劑係ROS激酶之小分子抑制劑。在另一實施例中，ROS激酶抑制劑係胺基-吡啶化合物或胺基-吡嗪化合物。在另一實施例中，ROS激酶抑制劑係式1化合物：

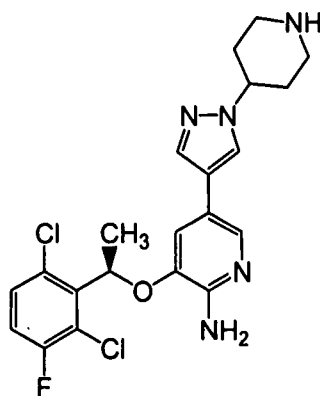


1

或其醫藥上可接受之鹽。在本發明之此態樣之一個實施例中，該遺傳改變之ROS激酶係ROS之融合基因。在另一實施例中，融合基因係SLC34A2-ROS或CD74-ROS。在另一實施例中，融合基因係SLC34A2-ROS。在另一實施例中，融合基因係CD74-ROS。在另一實施例中，該遺傳改變之

ROS激酶係涉及ROS激酶之遺傳缺失。在另一實施例中，遺傳缺失係FIG-ROS。在另一實施例中，該遺傳改變之ROS激酶係ROS激酶之融合蛋白。在另一實施例中，該遺傳改變之ROS激酶係涉及ROS激酶之缺失蛋白質。在另一實施例中，融合蛋白係SLC34A2-ROS或CD74-ROS。在另一實施例中，融合蛋白係SLC34A2-ROS。在另一實施例中，融合蛋白係CD74-ROS。在另一實施例中，缺失蛋白質係FIG-ROS。在本發明之此態樣之又一實施例中，ROS陽性癌症係非小細胞肺癌(NSCLC)。在又一實施例中，ROS陽性癌症係神經膠母細胞瘤。

在另一態樣中，本發明提供ROS激酶抑制劑之用途，其用於製備用於治療ROS陽性癌症的藥劑。在一個實施例中，ROS激酶抑制劑係ROS激酶之小分子抑制劑。在另一實施例中，ROS激酶抑制劑係胺基-吡啶化合物或胺基-吡嗪化合物。在另一實施例中，ROS激酶抑制劑係式1化合物：



1

或其醫藥上可接受之鹽。在本發明之此態樣之一個實施例中，該遺傳改變之ROS激酶係ROS之融合基因。在另一實

施例中，融合基因係SLC34A2-ROS或CD74-ROS。在另一實施例中，融合基因係SLC34A2-ROS。在另一實施例中，融合基因係CD74-ROS。在另一實施例中，該遺傳改變之ROS激酶係涉及ROS激酶之遺傳缺失。在另一實施例中，遺傳缺失係FIG-ROS。在另一實施例中，該遺傳改變之ROS激酶係ROS激酶之融合蛋白。在另一實施例中，該遺傳改變之ROS激酶係涉及ROS激酶之缺失蛋白質。在另一實施例中，融合蛋白係SLC34A2-ROS或CD74-ROS。在另一實施例中，融合蛋白係SLC34A2-ROS。在另一實施例中，融合蛋白係CD74-ROS。在另一實施例中，缺失蛋白質係FIG-ROS。在本發明之此態樣之又一實施例中，ROS陽性癌症係非小細胞肺癌(NSCLC)。在又一實施例中，ROS陽性癌症係神經膠母細胞瘤。

在另一態樣中，本發明提供套組，其包含ROS激酶抑制劑之醫藥組合物及一組用於向患有ROS陽性癌症之患者投與該醫藥組合物的說明書。在本發明之此態樣之一個實施例中，ROS陽性癌症選自由以下組成之群：非小細胞肺癌(NSCLC)、神經膠母細胞瘤、鱗狀細胞癌、激素難治性前列腺癌、乳頭狀腎細胞癌、結腸直腸腺癌、神經母細胞瘤、退行發育性大細胞淋巴瘤(ALCL)及胃癌。在本發明之此態樣之又一實施例中，ROS陽性癌症係非小細胞肺癌(NSCLC)。在又一實施例中，ROS陽性癌症係神經膠母細胞瘤。

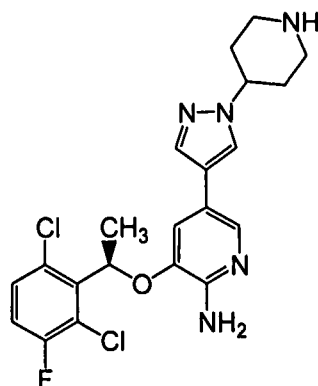
在另一態樣中，本發明提供套組，其包含ROS激酶抑制

劑之醫藥組合物及一組用於向患有ROS陽性癌症之患者投與該醫藥組合物的說明書。在一個實施例中，該ROS陽性癌症係由至少一種遺傳改變之ROS激酶調介。在另一實施例中，該遺傳改變之ROS激酶係ROS之融合基因。在另一實施例中，融合基因係SLC34A2-ROS或CD74-ROS。在另一實施例中，融合基因係SLC34A2-ROS。在另一實施例中，融合基因係CD74-ROS。在另一實施例中，該遺傳改變之ROS激酶係涉及ROS激酶之遺傳缺失。在另一實施例中，遺傳缺失係FIG-ROS。在另一實施例中，該遺傳改變之ROS激酶係ROS激酶之融合蛋白。在另一實施例中，該遺傳改變之ROS激酶係涉及ROS激酶之缺失蛋白質。在另一實施例中，融合蛋白係SLC34A2-ROS或CD74-ROS。在另一實施例中，融合蛋白係SLC34A2-ROS。在另一實施例中，融合蛋白係CD74-ROS。在另一實施例中，缺失蛋白質係FIG-ROS。在本發明之此態樣之一個實施例中，ROS陽性癌症選自由以下組成之群：非小細胞肺癌(NSCLC)、神經膠母細胞瘤、鱗狀細胞癌、激素難治性前列腺癌、乳頭狀腎細胞癌、結腸直腸腺癌、神經母細胞瘤、退行發育性大細胞淋巴瘤(ALCL)及胃癌。在本發明之此態樣之又一實施例中，ROS陽性癌症係非小細胞肺癌(NSCLC)。在又一實施例中，ROS陽性癌症係神經膠母細胞瘤。

在另一態樣中，本發明提供套組，其包含克裏唑蒂尼之醫藥組合物及一組用於向患有ROS陽性癌症之患者投與該醫藥組合物的說明書。在一個實施例中，該ROS陽性癌症

係由至少一種遺傳改變之ROS激酶調介。在另一實施例中，該遺傳改變之ROS激酶係ROS之融合基因。在另一實施例中，融合基因係SLC34A2-ROS或CD74-ROS。在另一實施例中，融合基因係SLC34A2-ROS。在另一實施例中，融合基因係CD74-ROS。在另一實施例中，該遺傳改變之ROS激酶係涉及ROS激酶之遺傳缺失。在另一實施例中，遺傳缺失係FIG-ROS。在另一實施例中，該遺傳改變之ROS激酶係ROS激酶之融合蛋白。在另一實施例中，該遺傳改變之ROS激酶係涉及ROS激酶之缺失蛋白質。在另一實施例中，融合蛋白係SLC34A2-ROS或CD74-ROS。在另一實施例中，融合蛋白係SLC34A2-ROS。在另一實施例中，融合蛋白係CD74-ROS。在本發明之此態樣之一個實施例中，ROS陽性癌症選自由以下組成之群：非小細胞肺癌(NSCLC)、神經膠母細胞瘤、鱗狀細胞癌、激素難治性前列腺癌、乳頭狀腎細胞癌、結腸直腸腺癌、神經母細胞瘤、退行發育性大細胞淋巴瘤(ALCL)及胃癌。在本發明之此態樣之又一實施例中，ROS陽性癌症係非小細胞肺癌(NSCLC)。在又一實施例中，ROS陽性癌症係神經膠母細胞瘤。

在另一態樣中，本發明提供藉由投與式1化合物或其醫藥上可接受之鹽抑制細胞中之ROS激酶活性的方法：



1

在另一態樣中，本發明提供治療哺乳動物之癌症之方法，該方法包含向該哺乳動物投與治療有效量之3-[(*R*)-1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-5-(1-六氫吡啶-4-基-1*H*-吡唑-4-基)-吡啶-2-基胺或其醫藥上可接受之鹽，其中癌症係由至少一種遺傳改變之ROS調介。在一些該等實施例中，至少一種遺傳改變之ROS係遺傳改變之ROS基因或遺傳改變之ROS蛋白質。

在此態樣之一些實施例中，該治療可逆轉或抑制癌症之進展。在此態樣之常見實施例中，哺乳動物係人類。

在此態樣之常見實施例中，至少一種遺傳改變之ROS係遺傳改變之ROS基因，例如ROS融合基因。在一些該等實施例中，ROS融合基因係SLC34A2-ROS基因或CD74-ROS基因。在其他該等實施例中，ROS融合基因係FIG-ROS基因。

在此態樣之常見實施例中，至少一種遺傳改變之ROS係遺傳改變之ROS蛋白質，例如ROS融合蛋白。在一些該等實施例中，ROS融合蛋白係SLC34A2-ROS激酶或CD74-ROS激酶。在其他該等實施例中，ROS融合蛋白係FIG-

ROS 激酶。

在此態樣之一些實施例中，本發明提供逆轉或抑制哺乳動物中之癌症進展的方法，該方法包含向該哺乳動物投與治療有效量之3-[(*R*)-1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-5-(1-六氫吡啶-4-基-1*H*-吡唑-4-基)-吡啶-2-基胺或其醫藥上可接受之鹽，其中癌症係由ROS融合基因調介。在一些該等實施例中，ROS融合基因係SLC34A2-ROS基因。在其他該等實施例中，ROS融合基因係CD74-ROS基因。在又一些該等實施例中，ROS融合基因係FIG-ROS基因。在一些實施例中，ROS融合基因選自由SLC34A2-ROS基因、CD74-ROS基因及FIG-ROS基因組成之群。

在此態樣之其他實施例中，本發明提供逆轉或抑制哺乳動物中之癌症進展的方法，該方法包含向該哺乳動物投與治療有效量之3-[(*R*)-1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-5-(1-六氫吡啶-4-基-1*H*-吡唑-4-基)-吡啶-2-基胺或其醫藥上可接受之鹽，其中癌症係由ROS融合蛋白調介。在一些該等實施例中，ROS融合蛋白係SLC34A2-ROS激酶。在其他該等實施例中，ROS融合蛋白係CD74-ROS激酶。在又一些該等實施例中，ROS融合蛋白係FIG-ROS激酶。在一些實施例中，ROS融合蛋白選自由SLC34A2-ROS激酶、CD74-ROS激酶及FIG-ROS激酶組成之群。

在此態樣之一些實施例中，癌症選自肺癌、骨癌、胰腺癌、皮膚癌、頭頸癌、皮膚或眼內黑色素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛區癌、胃癌、結腸癌、乳癌、輸卵管

癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、外陰癌、何傑金氏病、食管癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、甲狀旁腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、前列腺癌、慢性或急性白血病、淋巴細胞性淋巴瘤、膀胱癌、腎或輸尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、中樞神經系統(CNS)贅瘤、原發性CNS淋巴瘤、脊柱瘤、腦幹膠質瘤、垂體腺瘤及其組合。

在此態樣之其他實施例中，癌症選自由以下組成之群：非小細胞肺癌(NSCLC)、神經膠母細胞瘤、鱗狀細胞癌、激素難治性前列腺癌、乳頭狀腎細胞癌、結腸直腸腺癌、神經母細胞瘤、退行發育性大細胞淋巴瘤(ALCL)及胃癌。在此態樣之一些實施例中，癌症係非小細胞肺癌(NSCLC)。在此態樣之其他實施例中，癌症係神經膠母細胞瘤。

在此態樣之常見實施例中，3-[(R)-1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-5-(1-六氫吡啶-4-基-1*H*-吡唑-4-基)-吡啶-2-基胺或其醫藥上可接受之鹽係以包含3-[(R)-1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-5-(1-六氫吡啶-4-基-1*H*-吡唑-4-基)-吡啶-2-基胺或其醫藥上可接受之鹽及至少一種醫藥上可接受之載劑的醫藥組合物形式投與。

在此態樣之一些實施例中，該方法進一步包含在該投與步驟之前鑑別患有癌症之哺乳動物的步驟，該癌症之特徵在於至少一種遺傳改變之ROS，例如遺傳改變之ROS基因或遺傳改變之ROS蛋白。在一些該等實施例中，癌症之特

徵在於具有遺傳改變之ROS多核苷酸及/或遺傳改變之ROS多肽。

在又一態樣中，本發明提供治療哺乳動物之癌症之方法，該方法包含：(i)鑑別患有特徵在於至少一種遺傳改變之ROS之癌症的哺乳動物；及(ii)向該哺乳動物投與治療有效量之3-[(*R*)-1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-5-(1-六氫吡啶-4-基-1*H*-吡唑-4-基)-吡啶-2-基胺或其醫藥上可接受之鹽。在一些該等實施例中，至少一種遺傳改變之ROS係遺傳改變之ROS基因或遺傳改變之ROS蛋白質。

在此態樣之一些實施例中，該治療可逆轉或抑制癌症之進展。在此態樣之常見實施例中，哺乳動物係人類。

在此態樣之一些實施例中，至少一種遺傳改變之ROS係遺傳改變之ROS基因，例如ROS融合基因。在一些該等實施例中，ROS融合基因係SLC34A2-ROS基因或CD74-ROS基因。在其他該等實施例中，ROS融合基因係FIG-ROS基因。

在此態樣之一些實施例中，至少一種遺傳改變之ROS係遺傳改變之ROS蛋白質，例如ROS融合蛋白。在一些該等實施例中，ROS融合蛋白係SLC34A2-ROS激酶或CD74-ROS激酶。在其他該等實施例中，ROS融合蛋白係FIG-ROS激酶。

在此態樣之一些實施例中，本發明提供逆轉或抑制哺乳動物之癌症進展之方法，該方法包含：(i)鑑別患有特徵在於至少一種ROS融合基因之癌症的哺乳動物；及(ii)向該哺

乳動物投與治療有效量之3-[(*R*)-1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-5-(1-六氫吡啶-4-基-1*H*-吡唑-4-基)-吡啶-2-基胺或其醫藥上可接受之鹽。在一些該等實施例中，ROS融合基因係SLC34A2-ROS基因。在其他該等實施例中，ROS融合基因係CD74-ROS基因。在又一些該等實施例中，ROS融合基因係FIG-ROS基因。在一些實施例中，ROS融合基因選自由SLC34A2-ROS基因、CD74-ROS基因及FIG-ROS基因組成之群。

在此態樣之一些實施例中，本發明提供逆轉或抑制哺乳動物之癌症進展之方法，該方法包含：(i)鑑別患有特徵在於至少一種ROS融合蛋白之癌症的哺乳動物；及(ii)向該哺乳動物投與治療有效量之3-[(*R*)-1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-5-(1-六氫吡啶-4-基-1*H*-吡唑-4-基)-吡啶-2-基胺或其醫藥上可接受之鹽。在一些該等實施例中，ROS融合蛋白係SLC34A2-ROS激酶。在其他該等實施例中，ROS融合蛋白係CD74-ROS激酶。在又一些該等實施例中，ROS融合蛋白係FIG-ROS激酶。在一些實施例中，ROS融合蛋白選自由SLC34A2-ROS激酶、CD74-ROS激酶及FIG-ROS激酶組成之群。

在此態樣之一些實施例中，癌症之特徵在於具有遺傳改變之ROS多核苷酸及/或遺傳改變之ROS多肽。

在此態樣之一些實施例中，癌症選自肺癌、骨癌、胰腺癌、皮膚癌、頭頸癌、皮膚或眼內黑色素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛區癌、胃癌、結腸癌、乳癌、輸卵管

癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、外陰癌、何傑金氏病、食管癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、甲狀旁腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、前列腺癌、慢性或急性白血病、淋巴細胞性淋巴瘤、膀胱癌、腎或輸尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、中樞神經系統(CNS)贅瘤、原發性CNS淋巴瘤、脊柱瘤、腦幹膠質瘤、垂體腺瘤及其組合。

在此態樣之其他實施例中，癌症選自由以下組成之群：非小細胞肺癌(NSCLC)、神經膠母細胞瘤、鱗狀細胞癌、激素難治性前列腺癌、乳頭狀腎細胞癌、結腸直腸腺癌、神經母細胞瘤、退行發育性大細胞淋巴瘤(ALCL)及胃癌。在此態樣之一些實施例中，癌症係非小細胞肺癌(NSCLC)。在此態樣之其他實施例中，癌症係神經膠母細胞瘤。

在此態樣之常見實施例中，3-[(R)-1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-5-(1-六氫吡啶-4-基-1*H*-吡唑-4-基)-吡啶-2-基胺或其醫藥上可接受之鹽係以包含3-[(R)-1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-5-(1-六氫吡啶-4-基-1*H*-吡唑-4-基)-吡啶-2-基胺或其醫藥上可接受之鹽及至少一種醫藥上可接受之載劑的醫藥組合物形式投與。

【實施方式】

除非另外指明，否則本文中所有提及之本發明化合物均包括提及其鹽、溶劑合物、水合物及複合物、及其鹽之溶劑合物、水合物及複合物，包括其多晶型、立體異構體及

同位素標記之變化形式。

定義

除非另有說明，否則本文所用所有技術及科學術語皆具有與熟習本發明所屬技術者通常所瞭解的意義相同之意義。儘管在本發明之實踐或測試中可使用與彼等本文所闡述者相類似或等價之任何方法及材料，但本文仍對較佳方法及材料加以闡述。在闡述實施例並主張本發明時，應根據下文所展示定義使用某些術語。

除非上下文另外明確指出，否則單數形式「一」(「a」、「an」)及「該」亦包括複數個指示物。因此，例如，「該方法」之指示物包括一或多種本文所述類型及/或在閱讀本揭示內容後彼等熟習此項技術者顯而易見之方法及/或步驟。

除非另外指明，否則本文所用術語「不正常細胞生長」係指獨立於正常調節機制之細胞生長(例如，失去接觸抑制)。

除非另外指明，否則本文所用術語「投與」係指其中患者藉由其自身努力攝取如本文所述治療劑的自身投與動作、其中患者經由另一努力(例如，醫生、護士、家庭成員或IV)攝取如本文所述治療劑的投與動作。投與亦包括處方如本文所述治療劑之動作。除非另外指明，否則本文所用術語「投與」係指如上文剛剛定義之「投與」之處理動作。

本文所用「抗體」(「antibody」或「antibodies」)係指

所有類型之免疫球蛋白，包括IgG、IgM、IgA、IgD及IgE，包括Fab或其抗原識別片段，包括嵌合、多株及單株抗體。本文所用術語「人類化抗體」係指胺基酸在非抗原結合區域中經替代以更接近地類似於人類抗體、同時仍保持初始結合能力的抗體分子。

術語「生物試樣」在本文中係以其最寬泛含義使用，且意指懷疑含有SLC34A2-ROS融合物、CD74-ROS融合物、FIG-ROS融合物或經截短ROS多核苷酸或多肽或其片段之任何生物試樣，且可包含細胞、分離自細胞之染色體(例如，多個分裂中期染色體)、基因組DNA(存於溶液中或結合至固體載體以供(例如)南方分析(Southern analysis))、RNA(存於溶液中或結合至固體載體以供(例如)北方分析(northern analysis))、cDNA(存於溶液中或結合至固體載體)、來自細胞、血液、尿、髓或組織之提取物及諸如此類。

本文所用術語「缺失基因」係指自遺傳事件產生之基因，藉此來自基因組中之同一染色體上之不同位置的兩個基因經由兩個基因之間之核苷酸之缺失(亦稱為「遺傳缺失」)融合。缺失基因包括(但不限於)上述FIG-ROS基因。

本文所用術語「融合基因」係指自遺傳事件產生之基因，藉此來自基因組中之不同位置之兩個基因融合、易位、或反轉以產生新基因。融合基因之特定實例包括(但不限於)SLC34A2基因及ROS基因之融合以形成SLC34A2-ROS基因、及CD74基因及ROS基因之融合以形成CD74-

ROS 基因。

本文所用術語「遺傳改變之ROS」係指本文所述ROS融合物或缺失中之任一者，不管基因組DNA、核苷酸、或蛋白質或多肽。術語「遺傳改變之ROS多核苷酸」係指編碼本文所述遺傳改變之ROS蛋白質中之任一者的多核苷酸。術語「遺傳改變之ROS蛋白質」係指本文所述融合、缺失、截短或突變中之任一者。本文所用術語「遺傳改變之ROS蛋白質」可與「遺傳改變之ROS多肽」互換使用。較佳遺傳改變之ROS蛋白質包括「ROS融合物」。較佳ROS融合物包括(但不限於) SLC34A2-ROS融合蛋白及CD74-ROS融合蛋白。較佳遺傳改變之ROS多肽包括SLC34A2-ROS融合多肽及CD74-ROS融合多肽。

本文所用「ROS激酶」係指本文所述含有ROS蛋白質之激酶部分之任何蛋白質。ROS激酶包括(但不限於)本文所述遺傳改變之ROS蛋白質及野生型ROS蛋白質。術語「遺傳改變之ROS激酶」係指由遺傳改變之ROS多核苷酸編碼之蛋白質或多肽。

本文所用術語「ROS多肽特異性試劑」係指對本文所述ROS激酶中之任一者具有特異性之任一試劑，例如抗體、AQUA肽、核酸探針、核酸引物及諸如此類。舉例而言，較佳「ROS多肽特異性試劑」係對本文所述遺傳改變之ROS激酶中之任一者具有特異性之抗體。更佳地，本文所用「ROS多肽特異性試劑」係對SLC34A2-ROS融合多肽及/或CD74-ROS融合多肽及/或FIG-ROS融合多肽具有特異

性之抗體。在「ROS多肽特異性試劑」係抗體時，該試劑在本文中可稱作「ROS多肽特異性抗體」。該ROS多肽特異性抗體係（例如）「SLC34A2-ROS融合多肽抗體」、「SLC34A2-ROS融合蛋白抗體」或「FIG-ROS融合蛋白抗體」。

除非另外指明，否則本文所用術語「治療(treating)」意指逆轉、減輕、抑制此術語所應用之病症或病況之進展、或該病症或病況之一或多種症狀。除非另外指明，否則本文所用術語「治療(treatment)」係指如上文剛剛定義之「治療(treating)」之處理動作。術語「治療(treatment)」包括上述「投與(「administering」或「administration」)。

本文所用術語「醫藥上可接受之鹽」包括酸加成鹽及鹼式鹽(包括雙鹽)。

適宜酸加成鹽係由可形成無毒鹽之酸形成。實例包括乙酸鹽、天冬胺酸鹽、苯甲酸鹽、苯磺酸鹽、碳酸氫鹽/碳酸鹽、硫酸氫鹽/硫酸鹽、硼酸鹽、樟腦磺酸鹽、檸檬酸鹽、乙二磺酸鹽、乙磺酸鹽、甲酸鹽、富馬酸鹽、葡庚糖酸鹽、葡萄糖酸鹽、葡糖醛酸鹽、六氟磷酸鹽、羥苯醌苯酸鹽、鹽酸鹽/氯化物、氫溴酸鹽/溴化物、氫碘酸鹽/碘化物、羥乙磺酸鹽、乳酸鹽、蘋果酸鹽、馬來酸鹽、丙二酸鹽、甲磺酸鹽、甲基硫酸鹽、茶酸鹽、2-茶磺酸鹽、菸鹼酸鹽、硝酸鹽、乳清酸鹽、草酸鹽、棕櫚酸鹽、雙羥茶酸鹽、磷酸鹽/磷酸氫鹽/磷酸二氫鹽、糖二酸鹽、硬脂酸鹽、琥珀酸鹽、酒石酸鹽、甲苯磺酸鹽及三氟乙酸鹽。

適宜鹼式鹽係由可形成無毒鹽之鹼形成。實例包括鋁鹽、精胺酸鹽、苜星青黴素鹽、鈣鹽、膽鹼鹽、二乙胺鹽、二醇胺鹽、甘油鹽、離胺酸鹽、鎂鹽、葡胺鹽、醇胺鹽、鉀鹽、鈉鹽、胺丁三醇鹽及鋅鹽。

關於適宜醫藥上可接受之鹽，參見「Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use」，Stahl及Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002)，其揭示內容之全文以引用方式併入本文中。

本發明化合物之醫藥上可接受之鹽可藉由將化合物及期望酸或鹼(若適當)之溶液混合在一起容易地製得。可將鹽自溶液中沈澱出來且藉由過濾收集或可藉由蒸發掉溶劑回收。鹽之電離度可在完全電離至幾乎無電離之間變化。

本發明之化合物既可以非溶合形式存在亦可以溶合形式存在。本文所用術語「溶劑合物」闡述包含本發明化合物及一或多種醫藥上可接受之溶劑分子(例如，乙醇)的分子複合物。當溶劑為水時，使用術語「水合物」。本發明之醫藥上可接受之溶劑合物包括其中結晶溶劑可經同位素取代之水合物及溶劑合物，例如， D_2O 、 d_6 -丙酮、 d_6 -DMSO。

本發明亦包括同位素標記化合物，除一或多個原子由原子質量或質量數不同於自然界中通常所發現的原子質量或質量數的原子代替外，其與式1化合物相同。可納入本發明化合物中之同位素的實例包括氫、碳、氮、氧、磷、硫、氟及氯之同位素，例如分別為 2H 、 3H 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{18}O 、 ^{17}O 、 ^{31}P 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{18}F 及 ^{36}Cl 。含有上述同位

素及/或其他原子之其他同位素的本發明化合物及該等化合物之醫藥上可接受之鹽屬於本發明之範圍。某些同位素標記之本發明化合物，例如彼等納入有諸如 ^3H 及 ^{14}C 等放射性同位素之化合物可用於藥物及/或基質組織分佈分析中。含氚即 ^3H 及碳-14即 ^{14}C 同位素因其易於製備及可檢測性而尤佳。此外，用諸如氘(即 ^2H)等較重同位素進行取代因具有更強之代謝穩定性從而能夠提供某些治療優勢，例如，活體內半衰期增加或劑量需要量減少，且因而在一些情況下可能較佳。同位素標記之本發明式1化合物通常可藉由實施針對未標記化合物所述之程序、用易於獲得之同位素標記之試劑替代非同位素標記之試劑來製得。

本發明範圍亦包括複合物，例如晶籠化合物、藥物-宿主包合複合物，其中與上述溶劑合物對比，藥物及宿主係以化學計量或非化學計量量存在。本發明亦包括含有兩種或更多種有機及/或無機組份之藥物複合物，該等組份可係化學計量量或非化學計量量。所得複合物可經離子化、部分離子化或未離子化。關於該等複合物，參見J Pharm Sci, 64 (8), 1269-1288, Haleblan (1975年8月)，其揭示內容之全文以引用方式併入本文中。

診斷測試

彼等熟習此項技術者已知之多種分析模式可對於本發明用作診斷測試以確定生物試樣中之遺傳改變之ROS的存在或不存在。在診斷測試所得之測試結果顯示生物試樣含有遺傳改變之ROS時，將自其採集生物試樣之患者視為ROS

陽性。類似地，在診斷測試所得之測試結果顯示生物試樣(其中生物試樣係癌症腫瘤生檢)含有遺傳改變之ROS時，將癌症視為ROS陽性癌症。具體而言，若生物試樣包含癌細胞，則癌症之特徵可在於含有遺傳改變之ROS基因或遺傳改變之ROS蛋白質，例如ROS融合基因或ROS融合蛋白，其係藉由使用彼等熟習此項技術者已知或如本文所述之技術檢測遺傳改變之ROS多核苷酸及/或多肽的存在來達成。

免疫分析

用於本發明方法之實踐中之免疫分析可為均勻免疫分析或不均勻免疫分析。在均勻分析中，免疫反應通常涉及突變體ROS多肽特異性試劑(例如，SLC34A2-ROS融合多肽特異性抗體、CD74-ROS融合多肽特異性抗體或FIG-ROS融合多肽特異性抗體)、經標記分析物及感興趣之生物試樣。在抗體結合至經標記分析物時，自標記產生之信號直接或間接經改變。免疫反應及其程度之檢測二者均係在均勻溶液中實施。可採用之免疫化學標記包括自由基、放射性同位素、螢光染料、酶、噬菌體、輔酶等等。亦可有利地採用半導體奈米晶體標記或「量子點」，且其製備及用途已加以充分闡述(通常參見K. Barovsky, *Nanotech. Law & Bus.* 1 (2): 論文14 (2004)及其中引用之專利)。

在不均勻分析方法中，試劑通常係生物試樣、突變體ROS激酶多肽特異性試劑(例如，抗體)及適於產生可檢測信號之方式。可使用如下文進一步闡述之生物試樣。通常

將抗體固定於載體(例如珠粒、板或載玻片)上，且使其與液相中懷疑含有抗原之試樣接觸。隨後自液相分離載體且針對採用產生可檢測信號之方式的該信號檢驗載體相或液相。信號與生物試樣中分析物之存在相關。用於產生可檢測信號之方式包括放射性標記、螢光標記、酶標記、量子點等等。舉例而言，若欲檢測之抗原含有第二結合位點，則在分離步驟之前，結合至該位點之抗體可連接至可檢測基團並添加至液相反應溶液中。固體載體上之可檢測基團的存在指示測試試樣中之抗原之存在。適宜免疫分析之實例係放射性免疫分析、免疫螢光方法、酶聯免疫分析及諸如此類。

可用於實施本文揭示之方法之免疫分析模式及其變化形式已為業內所熟知(通常參見 E. Maggio, Enzyme-Immunoassay, (1980) (CRC Press公司, Boca Raton, Fla.); 亦參見(例如)美國專利第 4,727,022 號(Skold 等人, 「Methods for Modulating Ligand-Receptor Interactions and their Application」); 美國專利第 4,659,678 號(Forrest 等人, 「Immunoassay of Antigens」); 美國專利第 4,376,110 號(David 等人, 「Immunometric Assays Using Monoclonal Antibodies」))。適於形成試劑-抗體複合物之條件已為彼等熟習此項技術者所熟知。可檢測試劑之濃度應足夠以使 SLC34A2-ROS 融合多肽之結合與背景相比可檢測。

用於本文所揭示方法之實踐(例如, IHC、西方印跡、免

疫螢光及流式細胞術)中之抗體包括(但不限於)特異性結合至全長SLC34A2或CD74(例如,結合至蛋白質之N末端)或全長ROS(例如,結合ROS之激酶結構域中之表位)的抗體。該等抗體可自市場購得(例如,參見由Abcam公司(Cambridge MA)以產品ab5512銷售之ROS特異性多株抗體)。若所用抗體特異性結合至全長ROS或全長SLC34A2(例如在西方印跡分析中或藉由流式細胞術),則可對相同試樣採用另一方法以檢測本發明突變體ROS多肽或多核苷酸(例如,SLC34A2-ROS多肽或多核苷酸)之存在。舉例而言,可利用Abcam's ab5512抗體實施關於滲透化細胞之流式細胞術,之後使細胞裂解並使用對編碼SLC34A2或CD74之cDNA之5'端具有特異性(即,與其雜交)之PCR引物(例如,正向引物)及對編碼ROS之cDNA之3'端之補體具有特異性(即,與其雜交)之PCR引物(例如,反向引物)PCR分析遺傳物質(例如,mRNA或基因組DNA)。

用於本發明方法中之所有抗體皆可根據已知技術(例如沈澱)連接至適於診斷分析之固體載體(例如,自諸如乳膠或聚苯乙烯等材料形成之珠粒、板、載玻片或孔)。抗體或其他ROS多肽特異性試劑同樣可根據已知技術連接至可檢測基團,例如放射標記(例如,35S、125I、131I)、酶標記(例如,辣根過氧化物酶、鹼性磷酸酶)及螢光標記(例如,螢光素)。

基於細胞之分析(例如流式細胞術(FC)、免疫組織化學(IHC)或免疫螢光(IF))在實踐本發明方法中尤其合意,此

乃因該等分析模式在臨床上適宜，允許活體內檢測遺傳改變之ROS蛋白質表現，並避免因操作得自(例如)腫瘤試樣之細胞以獲得提取物而導致人為改變活性之風險。因此，在一些較佳實施例中，本發明方法係以流式細胞術(FC)、免疫組織化學(IHC)或免疫螢光(IF)分析模式實施。

可在接受靶向抑制ROS激酶活性之藥物治療之前、期間及之後，採用流式細胞術(FC)測定哺乳動物腫瘤中之遺傳改變之ROS蛋白質的表現。舉例而言，若需要時，可針對SLC34A2-ROS融合多肽表現或CD74-ROS融合多肽表現及/或活化、以及針對鑑別癌細胞類型之標記等，藉由流式細胞術分析來自穿刺抽出物之腫瘤細胞。可根據標準方法實施流式細胞術。例如，參見Chow等人，*Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)* 46: 72-78 (2001)。簡言之且舉例而言，可採用以下細胞分析法：於37°C下，用2%多聚甲醛固定細胞10分鐘，之後在冰上，於90%甲醇中通透處理30分鐘。隨後可將細胞用一級ROS多肽特異性抗體染色，洗滌並用螢光標記之二級抗體標記。隨後可根據所用儀器之特定方案，利用流式細胞儀(例如，Beckman Coulter FC500)分析細胞。該分析可鑑別腫瘤中SLC34A2-ROS融合多肽或CD74-ROS融合多肽之表現程度。用ROS抑制治療劑治療腫瘤後之類似分析顯示，表現SLC34A2-ROS融合多肽之腫瘤或表現CD74-ROS融合多肽之腫瘤對ROS激酶之靶向抑制劑出現反應。

亦可在接受靶向抑制ROS激酶活性之藥物治療之前、期

間及之後，採用免疫組織化學(IHC)染色法測定哺乳動物癌症(例如NSCLC)中遺傳改變之ROS蛋白質的表現及/或活化狀態。可根據熟知技術實施IHC。(例如，參見ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL，第10章，Harlow及Lane編輯，Cold Spring Harbor Laboratory (1988))。簡言之且舉例而言，藉由以下方式製備石蠟包埋組織(例如，來自生物檢體之腫瘤組織)用於免疫組織化學染色：先後用二甲苯及乙醇脫除組織切片之石蠟；依序在水及PBS中水合；在檸檬酸鈉緩衝液中加熱載玻片，使抗原解除掩蔽；在過氧化氫中培育切片；在封阻溶液中封阻；在一級抗SLC34A2-ROS融合多肽抗體或抗CD74-ROS融合多肽抗體及二級抗體中培育載玻片；且最後使用ABC抗生物素蛋白/生物素方法根據製造商之說明書檢測。亦可採用免疫螢光(IF)分析以測定用靶向抑制ROS激酶活性之藥物治療之前、期間及之後哺乳動物癌症中SLC34A2-ROS融合多肽或CD74-ROS融合多肽之表現及/或活化狀態。可根據熟知技術實施IF。例如，參見J.M. Polak及S. Van Noorden (1997) INTRODUCTION TO IMMUNOCYTOCHEMISTRY，第2版；ROYAL MICROSCOPY SOCIETY MICROSCOPY HANDBOOK 37, BioScientific/Springer-Verlag。簡言之且舉例而言，可將患者試樣先後固定於多聚甲醛及甲醇中，用封阻溶液(例如馬血清)封阻，與抗SLC34A2-ROS融合多肽、CD74-ROS融合多肽或FIG-ROS融合多肽之一級抗體一起培育，之後與經螢光染料(例如Alexa 488)標記之二級抗體

一起培育，並用落射螢光顯微鏡分析。

用於上述分析中之抗體可有利地連接至螢光染料(例如，Alexa488、PE)、或用於多參數分析之其他標記(例如量子點)、以及其他信號轉導(EGFR、磷酸化-AKT、磷酸化-Erk 1/2)及/或細胞標記(細胞角蛋白)抗體。用於量測遺傳改變之ROS多肽之多種其他方案(包括酶聯免疫吸附分析(ELISA)、放射性免疫分析(RIA)及螢光活化細胞分選(FACS))已為業內所知且提供用於診斷SLC34A2-ROS融合多肽、CD74-ROS融合多肽或FIG-ROS融合多肽表現之改變或不正常程度的基礎。藉由在適於複合物形成之條件下組合取自正常哺乳動物個體(較佳人類)之體液或細胞提取物與SLC34A2-ROS融合多肽、CD74-ROS融合多肽或FIG-ROS融合多肽之抗體來確立SLC34A2-ROS融合多肽、CD74-ROS融合多肽或FIG-ROS融合多肽表現之正常或標準值。可藉由各種方法、但較佳藉由光度方式對標準複合物形成之量進行定量。將來自生檢組織之個體對照及患病試樣中表現之SLC34A2-ROS融合多肽、CD74-ROS融合多肽或FIG-ROS融合多肽之量與標準值進行比較。標準與個體值之間之偏差確立用於診斷疾病之參數。

肽及核苷酸分析

類似地，可製備用於檢測/定量包含腫瘤細胞之生物試樣中的表現遺傳改變之ROS多肽的AQUA肽並用於AQUA分析中，如上文部分E中詳細闡述。因此，在本發明方法之一些較佳實施例中，ROS多肽特異性試劑包含對應於包

含 SLC34A2-ROS 融合多肽、CD74-ROS 融合多肽或 FIG-ROS 融合多肽之融合結點的肽序列之重同位素標記之磷酸肽(AQUA肽)。用於實踐本發明方法中之ROS多肽特異性試劑亦可為可直接雜交及檢測生物試樣中之融合或經截短多肽表現轉錄物的mRNA、寡核苷酸或DNA探針。

簡言之且舉例而言，可用螢光素標記之RNA探針探測福爾馬林(formalin)固定、石蠟包埋之患者試樣，之後用甲醯胺、SSC及PBS洗滌並用螢光顯微鏡分析。編碼遺傳改變之ROS多肽之多核苷酸亦可用於診斷目的。可使用之多核苷酸包括寡核苷酸序列、反義RNA及DNA分子及PNA。多核苷酸可用於檢測並定量生檢組織中之基因表現，其中SLC34A2-ROS融合多肽、CD74-ROS融合多肽或缺失ROS多肽之表現可與疾病相關。診斷分析可用於區分SLC34A2-ROS融合多肽、CD74-ROS融合多肽或缺失ROS多肽之不存在、存在及過量表現，並監測治療性幹預期間SLC34A2-ROS融合多肽、CD74-ROS融合多肽或缺失ROS多肽量的調節。在一個較佳實施例中，與能夠檢測多核苷酸序列(包括編碼SLC34A2-ROS融合多肽、CD74-ROS融合多肽或FIG-ROS融合多肽之基因組序列或緊密相關分子)之PCR探針的雜交可用於鑑別編碼遺傳改變之ROS多肽的核苷酸序列。該等探針之構築及用途已為彼等熟習此項技術者所知且闡述於美國專利公開案US2010/0221737中。

探針之特異性(不管其係來自高特異性區域(例如，融合結點中之獨特核苷酸)或較低特異性區域(例如，3'編碼區

域))及雜交或擴增之嚴格度(最大、高、中間或低)可確定探針是否僅鑑別編碼遺傳改變之ROS多肽之天然序列、等位基因或相關序列。探針亦可用於檢測相關序列，且較佳應含有至少50%來自編碼遺傳改變之ROS多肽之序列中之任一者的核苷酸。

SLC34A2-ROS融合多核苷酸、CD74-ROS融合多核苷酸或缺失ROS多核苷酸可用於南方或北方分析、斑點印跡或其他基於膜之技術中；用於PCR技術中；或用於利用來自患者生檢之流體或組織實施檢驗試條、針、ELISA或晶片分析中以檢測遺傳改變之ROS多肽表現。該等定性或定量方法已為業內所熟知。在特定態樣中，編碼遺傳改變之ROS多肽之核苷酸序列可用於檢測各種癌症(包括肺癌，包括NSCLC)之活化或誘發之分析中。可藉由標準方法標記遺傳改變之ROS多核苷酸並在適於形成雜交複合物之條件下將其添加至患者之液體或組織試樣中。在適宜培育階段後，洗滌試樣並將信號定量並與標準值進行比較。若生檢或提取試樣中之信號之量自相當之對照試樣之信號量顯著改變，則核苷酸序列與試樣中之核苷酸序列雜交，且試樣中編碼SLC34A2-ROS融合多肽、CD74-ROS融合多肽或缺失ROS多肽之核苷酸序列之改變量之存在指示存在相關疾病。該等分析亦可用於評價動物研究、臨床試驗、或監測個別患者之治療中之特定治療性治療方案的功效。

為提供診斷特徵在於表現遺傳改變之ROS多肽之疾病的基礎，確立表現之正常或標準曲線。此可藉由以下方式完

成：在適於雜交或擴增之條件下組合取自正常個體(動物或人類)之體液或細胞提取物與編碼SLC34A2-ROS融合多肽、CD74-ROS融合多肽或缺失ROS多肽(例如，FIG-ROS融合多肽)之序列或其片段。可藉由比較自正常個體獲得之值與來自實驗之值對標準雜交進行定量，其中使用已知量之實質上純化之多核苷酸。可比較自正常試樣獲得之標準值與自具有疾病症狀之患者之試樣獲得之值。使用標準值與個體值之間之偏差確立疾病之存在。

一旦確立疾病且開始治療方案，則可定期重複雜交分析以評價患者中之表現程度是否開始接近正常患者中所觀察到者。自連續分析獲得之結果可用於顯示經若干天至數月範圍內之時段之治療功效。

遺傳改變之ROS多核苷酸之其他診斷用途可涉及聚合酶鏈反應(PCR)(為彼等熟習此項技術者之標準之另一較佳分析模式)之用途。(例如，參見MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL，第2版，Sambrook, J., Fritsch, E. F.及Maniatis, T.編輯，Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))。PCR寡聚物可以化學方式合成、以酶方式生成或自重組來源產生。寡聚物較佳由兩種核苷酸序列組成，一者具有正義定向(5'至3')且另一者具有反義定向(3'至5')，其在最佳條件下用於鑑別特定基因或條件。可在較不嚴格條件下採用相同兩個寡聚物、寡聚物之巢式組或甚至寡聚物之兼併彙集以檢測及/或定量緊密相關之DNA或RNA序列。

亦可用於定量SLC34A2-ROS融合多肽、CD74-ROS融合多肽或缺失ROS多肽之表現之方法包括放射標記或生物素化核苷酸、對照核酸之共擴增及其上插入實驗結果之標準曲線 (Melby 等人, *J. Immunol. Methods*, 159: 235-244 (1993); Duplaa 等人, *Anal. Biochem.* 229-236 (1993))。可藉由以ELISA模式運行分析使多種試樣之定量速度加速，其中感興趣之寡聚物係提供於各種稀釋物中且分光光度或比色反應產生快速定量。

遺傳改變之ROS多核苷酸可用於產生雜交探針，其用於定位天然基因組序列。可使用熟知技術將序列定位至特定染色體或染色體之特殊區域。該等技術包括螢光原位雜交 (FISH)、FACS、或人工染色體構築，例如酵母人工染色體、細菌人工染色體、細菌P1構築或單一染色體cDNA文庫，如參見Price, C. M., *Blood Rev.* 7: 127-134 (1993)及Trask, B. J., *Trends Genet.* 7: 149-154 (1991)。在一個非限制性實施例中，採用FISH (如Verma 等人 HUMAN CHROMOSOMS: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUES, Pergamon Press, New York, N.Y. (1988)中所述)且可與其他物理染色體定位技術及遺傳圖譜數據相關。遺傳圖譜數據之實例可參見1994 Genome Issue of *Science* (265: 1981f)。編碼SLC34A2-ROS融合多核苷酸、CD74-ROS融合多核苷酸或缺失ROS多核苷酸之基因在物理染色體圖譜上之位置與特定疾病或特定疾病之誘因之間的相關性可有助於限定與該遺傳疾病相關之DNA之區域。核苷酸序列可用於檢測

正常、載劑或受感染個體之間之基因序列的差異。

染色體製劑之原位雜交及物理定位技術(例如使用確立染色體標記之連接分析)可用於延伸遺傳圖譜。即使未知特定人類染色體之數量或臂，另一哺乳動物物種(例如小鼠)之染色體上之基因的放置經常亦可揭示相關標記。可藉由物理定位將新序列分配至染色體臂或其部分。此為研究者使用定位選殖或其他基因發現技術尋找疾病基因提供有價值之資訊。

應注意，可組合檢測遺傳改變之ROS多核苷酸之所有方法(例如，PCR及FISH)與檢測遺傳改變之ROS多核苷酸或遺傳改變之ROS多肽之其他方法。舉例而言，可檢測生物試樣之遺傳物質中之SLC34A2-ROS多核苷酸(例如，在循環腫瘤細胞中)，之後對試樣之蛋白質進行西方印跡分析或免疫組織化學(IHC)分析以確定SLC34A2-ROS多核苷酸是否實際上表現為生物試樣中之SLC34A2-ROS多肽。可使用特異性結合至由經檢測SLC34A2-ROS多核苷酸編碼之多肽的抗體實施該等西方印跡或IHC分析，或可使用特異性結合至全長SLC34A2 (例如，結合至蛋白質之N末端)或全長ROS (例如，結合ROS之激酶結構域中之表位)的抗體實施該等分析。業內已知該等分析(例如，參見美國專利7,468,252)。

ROS激酶治療劑

已顯示遺傳改變之ROS多肽出現在人類NSCLC之至少一個亞群中(參見Rikova等人，*Cell* 131:1190-1203 (2007))。

因此，可藉由抑制ROS激酶在該癌症中之活性或藉由抑制ROS激酶在該癌症中之表現在活體內抑制哺乳動物癌症(例如NSCLC)之進展，該癌症中表現至少一種ROS融合蛋白(例如，SLC34A2-ROS融合蛋白)。特徵在於表現突變體ROS激酶之癌症中之ROS活性可藉由使癌症(例如腫瘤)與ROS激酶治療劑接觸加以抑制。

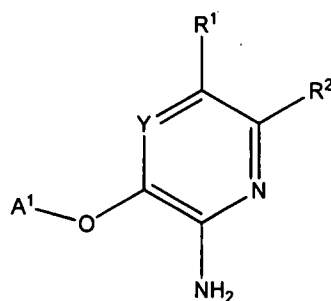
ROS激酶治療劑可為包含至少一種生物或化學化合物之任何組合物，該化合物在活體內直接或間接抑制ROS激酶(包括下述ROS激酶抑制劑化合物)之表現及/或活性。該等化合物包括直接作用於ROS激酶自身或作用於改良ROS之活性的蛋白質或分子或藉由抑制ROS之表現間接起作用之治療劑。該等組合物亦包括僅包含單一ROS激酶抑制化合物之組合物，以及包含多種治療劑(包括彼等抗其他RTK者)之組合物，其亦可包括非特異性治療劑，如化學治療劑或一般轉錄抑制劑。

小分子ROS激酶抑制劑

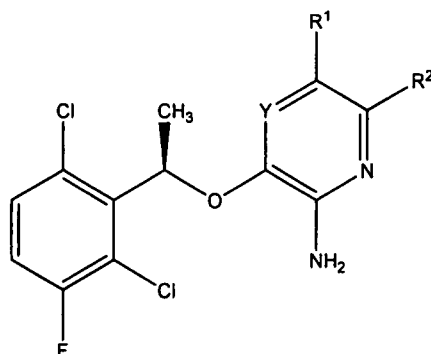
用於本發明方法之實踐中之ROS激酶治療劑係小分子ROS激酶抑制劑。小分子激酶抑制劑係一類通常抑制其靶標酶之活性的分子，其係藉由特異性且經常不可逆地結合至酶之催化位點及/或結合至酶內防止酶採用其活性必需之構形之ATP結合裂隙或另一結合位點來達成。小分子ROS激酶抑制劑可使用ROS激酶三維結構之X射線結晶學或電腦建模經合理設計，或可藉由用於抑制ROS之化合物文庫之高通量篩選發現。該等方法已為業內所熟知且已加

以闡述。可藉由(例如)檢驗該等化合物抑制一組激酶中之ROS活性而非其他激酶活性的能力及/或藉由檢驗包含腫瘤細胞之生物試樣中的ROS活性之抑制確認ROS抑制之特異性，該等腫瘤細胞已知表現ROS融合蛋白或經改變以表現ROS融合蛋白。

本文中顯示可用作ROS激酶治療劑之小分子ROS抑制劑之實例包括美國專利第7230098號、美國專利第7,858,643號及WO 2006/021881中所揭示類型之胺基-吡啶及胺基-吡嗪化合物，每一案件所有其所揭示之全文皆以引用方式併入本文中。特定而言，對於本發明用作ROS激酶治療劑之胺基-吡啶及胺基-吡嗪化合物包括具有以下通式之化合物：

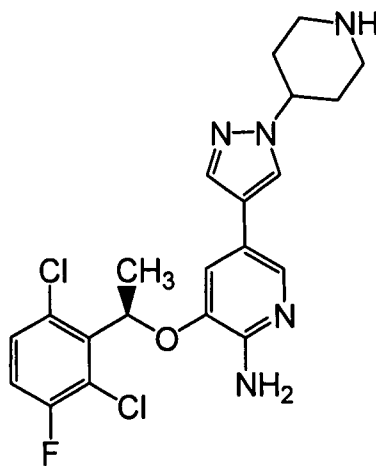


或其醫藥上可接受之鹽，其中Y、R¹、R²及A¹具有如美國專利第7,230,098號中闡述之一般含義。更特定而言，對於本發明用作ROS激酶治療劑之胺基-吡啶及胺基-吡嗪化合物包括具有以下通式之化合物：



或其醫藥上可接受之鹽，其中Y、R¹及R²具有如美國專利第7,858,643號中闡述之一般含義。已顯示上述類型之胺基-吡啶及胺基-吡嗪化合物為ROS激酶抑制劑且因此對於本發明用作ROS激酶治療劑。特定而言，若顯示癌症對遺傳改變之ROS激酶(例如，SLC34A2-ROS、CD74-ROS或FIG-ROS)呈陽性，則可向需要癌症治療之患者投與該等化合物。

一種尤佳化合物係化合物3-[(R)-1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-5-(1-六氫吡啶-4-基-1H-吡唑-4-基)-吡啶-2-基胺(克裏唑蒂尼)，由式1表示：



1

其製備闡述於美國專利第7,858,643號中。(亦參見McDermott, U.等人, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 19936-19941 (2007))。式1化合物揭示於國際專利公開案WO 2006/021884及美國專利申請案第2006/0046991號中，每一案件內容之全文皆以引用方式併入本文中。另外，式1化合物之外消旋物揭示於國際專利公開案WO 2006/021881及

美國專利申請案第2006/0128724號中，每一案件內容之全文皆以引用方式併入本文中。

最初設計為c-Met/HGFR抑制劑之克裏唑蒂尼在本文中已顯示具有抗ROS激酶之活性，且因此具有抗本文所述ROS融合蛋白及ROS缺失蛋白質之活性。在酶及基於細胞之分析二者中評價克裏唑蒂尼對ROS催化活性之效應。本文提供之數據證實克裏唑蒂尼係重組人類ROS-1激酶(催化結構域)之有效ATP競爭性抑制劑。

下文所述ROS-1酶分析提供0.097 nM之平均 K_i 值($n=4$)。克裏唑蒂尼劑量依賴性抑制HCC78細胞中之ROS磷酸化，該等細胞呈現導致組成型活性SLC34A2-ROS融合蛋白表現之4p15、6q22染色體易位事件(Rikova等人 (2007))，平均 IC_{50} 值為41 nM ($n=11$) (表1，圖1)。克裏唑蒂尼亦劑量依賴性抑制具有FIG-ROS融合物之U138MG人類神經膠母細胞瘤細胞中的ROS磷酸化(Charest等人 (2003))，平均 IC_{50} 值為49 nM ($n=2$) (表1，圖1)。

在經改造以表現各種ROS-融合蛋白(包括CD74-ROS、FIG-ROS(S)、FIG-ROS(L)、SLC34A2-ROS(S)及SLC34A2-ROS(L))之一組3T3細胞系中，克裏唑蒂尼抑制ROS磷酸化， IC_{50} 值在3.4 nM至36 nM範圍內(表1)。

亦評價克裏唑蒂尼對HCC78之細胞存活力的效應，該等HCC78呈現導致組成型活性SLC34A2-ROS融合蛋白表現之4p15、6q22染色體易位事件(Rikova等人 (2007))。克裏唑蒂尼證實對HCC78細胞存活力具有濃度依賴性抑制(圖2)。

針對HCC78細胞存活力之抑制計算之 IC_{50} 值係約59 nM。該等結果表明HCC78細胞依賴於用於細胞生長及存活之ROS融合且克裏唑蒂尼係ROS依賴性細胞生長及存活之有效抑制劑。

在分子層面上，組成型活化之ROS融合激酶在調節RTK催化活性及停靠調節性受質之細胞內區域中誘發多個酪氨酸殘基之磷酸化。評價克裏唑蒂尼抑制HCC78人類NSCLC細胞中之SLC34A2-ROS依賴性信號傳導途徑的能力，以進一步理解抗腫瘤作用機制並確認ROS激酶活性之抑制與下游信號轉導相關。克裏唑蒂尼劑量依賴性抑制活體外HCC78細胞中之ROS磷酸化(活化環)、以及下游接頭或信號傳導分子(包括SHP2、STAT3、AKT及ERK1/2) (圖3)。該等結果證實關鍵信號傳導途徑與克裏唑蒂尼之有效劑量之間具有相關性。

進一步評價克裏唑蒂尼誘發HCC78人類NSCLC細胞中之細胞凋亡的能力。克裏唑蒂尼證實劑量依賴性誘發HCC78 NSCLC細胞中之活化半胱天冬酶-3之量(圖4)，此證實增加之細胞凋亡亦與有效劑量量相關。

在一組ROS融合物改造之腫瘤異種移植物模型中評價克裏唑蒂尼之抗腫瘤功效。在NIH3T3細胞中改造代表人類癌症適應症之腫瘤異種移植物，該等適應症與ROS染色體易位(包括CD74-ROS、人類NSCLC中鑑別之SLC34A2-ROS之長及短變體、及人類NSCLC、神經膠母細胞瘤及膽管上皮癌中鑑別之Fig-ROS之長及短變體)相關(Rimkunas等人

(2012)；Gu 等人 (2011))。克裏唑蒂尼證實利用 75/mg PO BID之投藥方案之所有 3T3-ROS 改造腫瘤模型中之顯著細胞減少效應(圖 5)。

在裸鼠中之 3T3-CD74-ROS 及 3T3-SLC34A2-ROS(L) 異種移植物模型中評價克裏唑蒂尼抑制活體內 ROS 磷酸化及腫瘤生長之能力。克裏唑蒂尼證實劑量為 160 mg/kg/天 (80 mg/kg BID)、80 mg/kg/天 (40 mg/kg BID)、40 mg/kg/天 (20 mg/kg BID) 及 20 mg/kg/天 (10 mg/kg BID) 之 3T3-CD74-Ros 腫瘤異種移植物中之腫瘤生長的劑量依賴性抑制(圖 6B)。克裏唑蒂尼亦證實在所有治療群組中之 3T3-CD74-Ros 腫瘤中之 ROS 磷酸化的顯著抑制(圖 6A)。在 3T3-SLC34A2-ROS(L) 異種移植物模型中觀察克裏唑蒂尼之類似抗腫瘤功效(圖 7)。

投與路徑及劑型

經口投與

本發明化合物可經口投與。經口投與可涉及吞嚥以便化合物進入胃腸道，或可採用經頰或舌下投與，藉此化合物直接自口腔進入血流。

適於經口投與之調配物包括固體調配物，例如錠劑；含有顆粒、液體、或粉末之膠囊；菱形錠劑(包括液體填充者)；咀嚼劑；多-及奈米顆粒；凝膠；固體溶液；脂質體；膜劑(包括黏性黏著劑)；陰道錠；噴霧劑及液體調配物。

液體調配物包括懸浮液、溶液、糖漿劑及酏劑。該等調

配物可用作軟質或硬質膠囊內之填充物且通常包括醫藥上可接受之載劑(例如，水、乙醇、聚乙二醇、丙二醇、甲基纖維素、或適宜油)及一或多種乳化劑及/或懸浮劑。液體調配物亦可藉由(例如)對藥袋中之固體實施再構成來製得。

本發明化合物亦可用於快速溶解、快速崩解劑型中，例如彼等闡述於Liang及Chen之Expert Opinion in Therapeutic Patents, 11(6), 981-986(2001)中者，其揭示內容之全文以引用方式併入本文中。

對於錠劑劑型，端視劑量，藥物可佔該劑型之1 wt%至80 wt%，更通常佔該劑型之5 wt%至60 wt%。除藥物外，錠劑通常含有崩解劑。崩解劑之實例包括羥基乙酸澱粉鈉、羧甲基纖維素鈉、羧甲基纖維素鈣、交聯羧甲基纖維素鈉、交聚維酮(crospovidone)、聚乙烯吡咯啉酮、甲基纖維素、微晶纖維素、低碳數烷基取代之羥丙基纖維素、澱粉、預膠凝澱粉及藻酸鈉。一般而言，崩解劑會佔該劑型之1 wt%至25 wt%、較佳5 wt%至20 wt%。

黏合劑通常用以賦予錠劑調配物黏著特性。適宜黏合劑包括微晶纖維素、明膠、糖、聚乙二醇、天然及合成樹膠、聚乙烯吡咯啉酮、預膠凝澱粉、羥丙基纖維素及羥丙基甲基纖維素。錠劑亦可含有稀釋劑，例如乳糖(單水合物、經噴霧乾燥之單水合物、無水物及諸如此類)、甘露醇、木糖醇、葡萄糖、蔗糖、山梨醇、微晶纖維素、澱粉及二水合磷酸氫鈣。

錠劑亦可視情況包括表面活性劑(例如月桂基硫酸鈉及聚山梨醇酯80)及助流劑(例如二氧化矽及滑石粉)。若存在，則表面活性劑之量通常佔錠劑之0.2 wt%至5 wt%，且助流劑通常佔錠劑之0.2 wt%至1 wt%。

錠劑通常亦含有潤滑劑，例如，硬脂酸鎂、硬脂酸鈣、硬脂酸鋅、硬脂基富馬酸鈉及硬脂酸鎂與月桂基硫酸鈉之混合物。潤滑劑通常係以佔錠劑0.25 wt%至10 wt%、較佳0.5 wt%至3 wt%之量存在。

其他習用成份包括抗氧化劑、著色劑、矯味劑、防腐劑及遮味劑。

例示性錠劑含有多達約80 wt%藥物、約10 wt%至約90 wt%黏合劑、約0 wt%至約85 wt%稀釋劑、約2 wt%至約10 wt%崩解劑及約0.25 wt%至約10 wt%潤滑劑。

錠劑摻合物可直接或藉由輥壓製來形成錠劑。或者，錠劑摻合物或摻合物之各部分可在製錠前經濕法、乾法或熔融粒化、熔融凝結或擠出。最終調配物可包括一或多個層且可經塗佈或未經塗佈；或經囊封。

錠劑調配物論述於H. Lieberman及L. Lachman之「Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets，第1卷」，Marcel Dekker, N.Y., N.Y., 1980 (ISBN 0-8247-6918-X)中，其揭示內容之全文以引用方式併入本文中。

經口投與之固體調配物可調配成而能直接釋放及/或以改良方式釋放。以改良方式釋放調配物包括延時釋放、持續釋放、脈動釋放、受控釋放、靶向釋放及程式性釋放。

適宜以改良方式釋放調配物闡述於美國專利第6,106,864號中。其他適宜釋放技術(例如高能分散液及滲透性及經塗佈粒子)之詳細內容可參見Verma等人, Pharmaceutical Technology On-line, 25(2), 1-14 (2001)。使用口香糖達成受控釋放闡述於WO 00/35298中。該等參考文獻之揭示內容之全文以引用方式併入本文中。

非經腸投與

本發明化合物亦可直接投與至血流、肌肉、或內部器官中。適於非經腸投與之方式包括靜脈內、動脈內、腹膜腔內、鞘內、心室內、尿道內、胸骨內、顱內、肌內及皮下投與。適於非經腸投與之器件包括針式(包括微型針)注射器、無針式注射器及輸注技術。

非經腸調配物通常係水溶液, 其可含有賦形劑(例如鹽、碳水化合物)及緩衝劑(較佳至3-9之pH), 但對於某些應用, 可能更適合將其調配為無菌非水性溶液或乾燥形式以同適宜媒劑(例如無菌、無致熱源的水)組合使用。

非經腸調配物在無菌條件下之製備(例如藉由凍乾)可容易地使用彼等熟習此項技術者所熟知的標準醫藥技術達成。

用於製備非經腸溶液之本發明化合物的溶解性可藉助適當調配技術(例如納入增溶劑)來增強。

非經腸投與之調配物可經調配而能直接釋放及/或以改良方式釋放。以改良方式釋放調配物包括延時釋放、持續釋放、脈動釋放、受控釋放、靶向釋放及程式性釋放。因

此，可將本發明之化合物調配成固體、半固體、或觸變液體用於以植入之儲積物形式投與，進而以改良方式釋放活性化合物。該等調配物之實例包括藥物塗佈之支架及PGLA微球體。

局部投與

本發明化合物亦可局部投與至皮膚或黏膜，亦即經皮或穿過皮膚投與。用於此目的之典型調配物包括凝膠、水凝膠、洗劑、溶液、乳霜、軟膏、可撒施粉劑、敷料、發泡體、膜、皮膚貼片、薄片、植入物、海綿、纖維、繃帶及微乳液。亦可使用脂質體。典型載劑包括醇、水、礦物油、液體凡士林、白色凡士林、甘油、聚乙二醇及丙二醇。可納入增滲劑；參見(例如) J Pharm Sci(88(10), 955-958, Finnin及Morgan, 1999年10月)。其他局部投與方式包括藉由電穿孔、電離子透入法、聲透入法、超音促滲法及微型針或無針(例如，Powderject™、Bioject™等)注射之遞送。該等參考文獻之揭示內容之全文以引用方式併入本文中。

局部投與之調配物可經調配而能直接釋放及/或以改良方式釋放。以改良方式釋放調配物包括延時釋放、持續釋放、脈動釋放、受控釋放、靶向釋放及程式性釋放。

吸入/鼻內投與

本發明化合物亦可經鼻內投與或藉由吸入投與，該等投與通常以下列形式：來自乾粉吸入器之乾粉(單獨地、作為混合物(例如，與乳糖之乾燥摻合物)、或作為混合組份

粒子(例如，與磷脂(例如磷脂醯膽鹼)混合))或作為來自加壓容器、幫浦、噴射器、霧化器(較佳係使用電流體動力學以生成細霧之霧化器)或噴霧器之氣溶膠噴霧(使用或不使用適宜推進劑，例如1,1,1,2-四氟乙烷或1,1,1,2,3,3,3-七氟丙烷)。對於鼻內使用，粉劑可包括生物黏著劑，例如，脫乙酰殼多糖或環糊精。

加壓容器、幫浦、噴射器、霧化器或噴霧器含有本發明化合物之溶液或懸浮液，其包含(例如)乙醇、乙醇水溶液、或適於活性物質分散、增溶或延長釋放之替代劑、作為溶劑之推進劑及可選表面活性劑(例如山梨醇酐三油酸酯、油酸、或寡聚乳酸)。

在乾粉或懸浮液調配物中使用之前，將該藥品微粉化至適於藉由吸入遞送之大小(通常小於5微米)。此可藉由任何適當粉碎方法(例如螺旋噴射研磨、流化床噴射研磨、超臨界流體處理)來形成奈米粒子、高壓均化或噴霧乾燥而達成。

用於吸入器或吹藥器中之膠囊(例如，自明膠或HPMC製得)、泡罩及藥筒可經調配以含有本發明化合物之粉末混合物、適宜粉末基質(例如乳糖或澱粉)及性能改良劑(例如L-白胺酸、甘露醇或硬脂酸鎂)。乳糖可為無水的或呈單水合物形式，較佳為後者。其他適宜賦形劑包括葡聚糖、葡萄糖、麥芽糖、山梨醇、木糖醇、果糖、蔗糖及海藻糖。

適用於使用電流體動力學以產生細霧之霧化器中的溶液調配物每次噴射可含有1 µg至20 mg本發明化合物，且噴

射體積可在1 μ L至100 μ L間變化。典型調配物包括本發明化合物、丙二醇、無菌水、乙醇及氯化鈉。可用於代替丙二醇之替代性溶劑包括甘油及聚乙二醇。

可將適宜矯味劑(例如薄荷醇及左薄荷醇)、或增甜劑(例如糖精或糖精鈉)添加至彼等欲以吸入/鼻內投與之本發明調配物中。

吸入/鼻內投與之調配物可使用(例如)聚(DL-乳酸-共乙二醇)(PGLA)調配而能直接釋放及/或以改良方式釋放。以改良方式釋放調配物包括延時釋放、持續釋放、脈動釋放、受控釋放、靶向釋放及程式性釋放。

在使用乾粉吸入劑及氣溶膠之情形下，劑量單位藉助可遞送計量量之閥來確定。本發明之單元通常經佈置以投與計量劑量或含期望量之本發明化合物的「噴霧量」(puff)。整個日劑量可以單個劑量或更通常以分開之劑量全天投與。

直腸/陰道內投與

本發明化合物可經直腸或陰道(例如以栓劑、陰道栓、或灌腸劑之形式)投與。可可油係傳統栓劑基質，但視需要可使用多種替代物。

經直腸/陰道投與之調配物可經調配而能直接釋放及/或以改良方式釋放。以改良方式釋放調配物包括延時釋放、持續釋放、脈動釋放、受控釋放、靶向釋放及程式性釋放。

經眼投與

本發明化合物亦可直接投與至眼或耳內，通常呈存於等滲且pH調節之無菌鹽水中之微粉化懸浮液或溶液之液滴劑形式。其他適於經眼及耳投與之調配物包括軟膏、可生物降解(例如可吸收性凝膠海綿、膠原)及不可生物降解之(例如聚矽氧)植入物、糯米紙囊劑、晶狀體及顆粒或泡狀系統(例如非離子表面活性劑囊泡或脂質體)。可將諸如交聯聚丙烯酸、聚乙烯醇、透明質酸、纖維素聚合物(例如，羥丙基甲基纖維素、羥乙基纖維素或甲基纖維素)或雜多糖聚合物(例如，結蘭膠)等聚合物與防腐劑(例如，苯紫氣銨)一起納入。該等調配物亦可藉由電離子透入法遞送。

經眼/耳投與之調配物可經調配而能直接釋放及/或以改良方式釋放。以改良方式釋放調配物包括延時釋放、持續釋放、脈動釋放、受控釋放、靶向釋放或程式性釋放。

其他技術

本發明化合物可與可溶性大分子體(例如，環糊精及其適宜衍生物或含有聚乙二醇的聚合物)組合使用，以改良其在以任一上述投與方式使用時之溶解性、溶解速率、遮味情況、生物利用度及/或穩定性。

吾人發現藥物-環糊精複合物(舉例而言)可廣泛用於大多數劑型及投與路徑。包含複合物及不包含複合物之情況皆可使用。作為與藥物直接複合之替代形式，環糊精可用作輔助添加劑，即作為載劑、稀釋劑或增溶劑。最經常用於該等目的者係 α -、 β -、及 γ -環糊精，其實例可參見PCT公開案第WO 91/11172號、第WO 94/02518號及第WO

98/55148號，其揭示內容之全文以引用方式併入本文中。

劑量

所投與活性化合物之量可依賴於所治療個體、病症或病況之嚴重程度、投與速率、化合物之沈積及處方醫師之決定。然而，有效劑量通常在約0.001至約100 mg/kg體重/天、較佳約0.01至35 mg/kg/天範圍內，其以單個劑量或分開劑量投與。對於70 kg之人類而言，此可總計為約0.07至約7000 mg/天、較佳約0.7至約2500 mg/天。在一些情況中，低於上述範圍下限之劑量可能更合適，而在其他情形下可使用仍更大劑量而不會造成任何有害副作用，其中該等較大劑量通常分成若干較小劑量來全天投與即可。

成份套組

由於可能期望投與活性化合物之組合，舉例而言，出於治療特定疾病或病況之目的，故本發明之範圍涵蓋：兩種或更多種醫藥組合物(其至少一者含有本發明之化合物)可方便地組合成適於共投與該等組合物之套組形式。因此，本發明之套組包括兩種或更多種分開的醫藥組合物(其中至少一者含有本發明化合物)及用於單獨保存該等組合物之構件(例如容器、分開式瓶子、或分開式箔片組)。此一套組之實例係用於包裝錠劑、膠囊及諸如此類之常見泡罩包裝。

本發明套組尤其適於投與不同劑型(例如，經口及非經腸)、用於以不同劑量間隔投與單獨的組合物、或用於相互滴定單獨的組合物。為有助於依從性，該套組通常包括用於投與之指示或說明，並可能提供有記憶輔助物件。該

等指示或說明可呈「標記」或文本形式。其他該等指示或說明可含有關於診斷測試以確定癌症是否係ROS陽性或患者是否係ROS陽性的資訊。

實例

活體外分析

材料及方法

活體外方法

ROS-1酶分析

使用微流遷移率變動分析量測ROS-1酶之抑制。在96孔板中之50 μ L體積中實施反應，且其含有0.25 nM重組人類ROS-1催化結構域(aa 1883-2347)、GST標記(Invitrogen公司)、1.5 μ M磷光體-受體肽、5'FAM-KKSRGDYMTMQIG-CONH₂ (Caliper LifeSciences)、測試化合物(11個劑量3倍連續稀釋物，最終2% DMSO)或僅DMSO、1 mM DTT、0.002% Tween-20及存於25 mM Hepes, pH 7.1中之5 mM MgCl₂，且在20-min預培育後藉由添加ATP (56 μ M最終濃度，約K_m等級)開始反應。將反應物於室溫下培育1小時，隨後藉由添加0.1 M EDTA (pH 8)停止。在電泳分離螢光標記之肽受質及磷酸化產物後在LabChip EZ Reader II (Caliper LifeSciences)上測定反應完成之程度(在DMSO情況下約5%轉化)。藉由使用非線性回歸方法(GraphPad Prism, GraphPad軟體，San Diego, CA)將轉化%擬合成用於競爭抑制之方程來計算每一試驗之K_i值且實驗量測之ATP K_m=56 μ M。一組四個試驗產生0.097 nM之平均K_i

值。

細胞系

HCC78細胞係自患有定型為非小細胞肺癌之肺腺癌之65歲人的胸膜積液確立的人類非小細胞肺癌細胞系。HCC78細胞係自DSMZ細胞庫(Braunschweig, Germany)購得。U138細胞及NIH3T3細胞係自American Tissue Culture Corporation TCC購得。

NIH3T3-ROS融合細胞系生成

NIH3T3 ROS融合物改造之細胞系係在內部生成。將ROS融合變體SLC34A2-ROS (L)、SLC34A2-ROS (S)、CD74-ROS (L)、FIG-ROS (L)及FIG-ROS (S)選殖至逆轉錄病毒載體pMSCV puro (Clontech)中。在293T細胞中藉由與pMSCV載體共轉染並包裝質粒pC10A1產生具有EML4-ALK基因之逆轉錄病毒。使用逆轉錄病毒上清液轉導NIH3T3細胞且利用2 $\mu\text{g/ml}$ 嘌呤黴素選擇彙集群體達5天並在用於後續實驗之前藉由DNA測序驗證。

細胞激酶磷酸化分析

使用多種血清飢餓細胞實施用於直接測定克裏唑蒂尼抑制配體依賴性或組成型激酶磷酸化之能力的細胞分析(即，ELISA或免疫印跡法)。

基於細胞之磷酸化-ROS ELISA分析

使用一組具有各種ROS融合物之細胞系測定克裏唑蒂尼對ROS磷酸化之效力。將細胞以20,000細胞/孔之密度平鋪於96孔板中之100 μl 生長培養基中。使用ROS融合物陰性

細胞孔作為背景。使平鋪細胞黏附過夜。次日，移除生長培養基並使細胞在無血清之培養基(具有0.04% BSA)中培養。實施克裏唑蒂尼之連續稀釋，向每一孔中添加適當對照或指定濃度之克裏唑蒂尼，並於37°C下將細胞培育1小時。生成細胞裂解物並如製造商之方案中所述藉由使用PathScan® Phospho-Ros (panTyr) Sandwich ELISA Kit (Cell Signaling，目錄號：7093)測定HCC78細胞中之SLC34A2-ROS的總磷酸化-酪胺酸量。藉由利用四參數分析方法之濃度反應曲線擬合計算EC₅₀值。

針對SLC34A2-ROS之基於細胞之磷酸化-ROS ELISA分析

使用具有SLC34A2-ROS融合物之HCC78細胞測定克裏唑蒂尼對ROS磷酸化之效力。將HCC78細胞以20,000細胞/孔之密度平鋪於96孔板中之100 µl具有10% FBS及青黴素/鏈黴素之RPMI培養基中。使用無細胞孔作為背景。使平鋪細胞黏附過夜。次日，移除生長培養基並使細胞在無血清之培養基(具有0.04% BSA)中培養。實施克裏唑蒂尼之連續稀釋，向每一孔中添加適當對照或指定濃度之克裏唑蒂尼，並於37°C下將細胞培育1小時。生成細胞裂解物並如製造商之方案中所述藉由使用PathScan® Phospho-Ros (panTyr) Sandwich ELISA Kit (Cell Signaling，目錄號：7093)測定HCC78細胞中之SLC34A2-ROS的總磷酸化-酪胺酸量。藉由利用四參數分析方法之濃度反應曲線擬合計算IC₅₀值。基於細胞之磷酸化-ROS ELISA分析提供45 nM之平均IC₅₀值(n=8)。

免疫印跡

亦使用免疫印跡法測定HCC78細胞中之相對激酶磷酸化狀態及總蛋白質量且測定3T3-CD74-ROS腫瘤裂解物中之所關注蛋白質。對於活體外研究而言，用各個劑量量之克裏唑蒂尼將HCC78細胞處理3小時。使細胞在冷的1×細胞裂解緩衝液(Cell Signaling Technologies, Boston MT)中裂解。

對於活體內研究而言，用克裏唑蒂尼75 mg/kg PO BID治療具有腫瘤之小鼠達10天。在研究結束時，在最後一次劑量7小時後切除腫瘤。將所切除腫瘤在乾冰上快速冷凍，使用液氮冷卻之冷凍研鉢及研杵粉碎，並在冷的1×細胞裂解緩衝液(Cell Signaling Technologies, Boston MT)中裂解。自細胞及腫瘤裂解物萃取蛋白質並使用BSA分析(Pierce, Rockford, IL)測定蛋白質濃度。藉由SDS-PAGE分離自細胞及腫瘤裂解物二者萃取之蛋白質試樣，將其轉移至耐綸膜，並利用以下抗體實施感興趣之蛋白質之免疫印跡雜交。

用於免疫印跡研究中之抗體均係來自Cell Signaling Technology (Danvers, Massachusetts, United States)且列舉如下：抗總ROS (目錄號：3266)、抗磷酸化ROS (目錄號：3078)、抗磷酸化SHP2 (目錄號：5431)、抗磷酸化STAT3 (目錄號：9131)、抗總AKT (目錄號：9272)、抗磷酸化-AKT S473 (目錄號：4161)、抗總-MAPK44/42 (目錄號：9102)、抗磷酸化-MAPK44/42 (目錄號：4370)、裂解半胱天冬酶-3 (目錄號：9661)。

細胞存活力、增殖及存活分析

細胞存活力分析

所培養HCC78細胞適於具有10% FBS及青黴素/鏈黴素 (Invitrogen) 之 RPMI 生長培養基 (Invitrogen, Carlsbad, CA), 只要可能標準化篩選即可。使一些需要特殊培養基之細胞在供貨商推薦之培養基中生長。使細胞胰蛋白酶化並以 3000-5000 細胞 / 孔之密度接種於 96 孔板 (Corning Costar第3904號板, Kennebunk, ME) 中並使其黏附過夜。次日, 一式兩份地用以9個連續濃度投與之單一試劑藥物處理細胞(以4倍之比率自 10 μ M 逐漸降低至 152 pM, 從而產生完整S形曲線)。在 37°C 下再培養3-5天後(直至細胞鋪滿達到約70-80%為止), 添加製造商推薦體積之1/5的 Cell Titer Glo (Promega, Madison, WI) 以使用 Envision 多重讀數器 (Perkin-Elmer, Waltham, MA) 間接量測細胞存活力/增殖。亦在細胞接種一天後且在藥物治療之前自細胞板取基線細胞計數讀數。自最終細胞計數減去基線計數並用 PRISM (Graphpad, La Jolla, CA) 或 XLFIT (IDBS, Surrey, UK) 繪圖。針對HCC78細胞存活力之抑制計算之IC₅₀值係約 59 nM。

細胞增殖/存活分析

將細胞以低密度在96孔板中接種於生長培養基(補充有2%、5%或10%胎牛血清-FBS之培養基)中並於37°C下培養過夜。次日, 向指定孔中添加克裏唑蒂尼或適當對照之連續稀釋物, 且於37°C下將細胞培育72小時。隨後實施Cell

Titer Glo分析(Promega, Madison, WI)以測定相對細胞數量。藉由利用四參數分析方法之濃度反應曲線擬合計算EC₅₀值。

活體內方法

無胸腺小鼠中之皮下異種移植模型

自 Charles River (Wilmington, MA)獲得雌性 nu/nu 小鼠 (5-8週齡)。在無塵室條件下將動物維持於無菌濾蓋籠中，該等籠具有安裝於HEPA過濾通氣槽上之Alpha-Dri/bed-o-cob梳形襯墊。動物接受可自由獲得無菌齧齒動物混合飼料及水。藉由以450Xg離心5-10分鐘收穫植入無胸腺小鼠中之指定細胞並使其沈澱。將細胞沈澱洗滌一次並重新懸浮於無血清之培養基中。對細胞補充50% Matrigel (BD Biosciences, San Jose CA)以有利於獲取腫瘤。將細胞 (5×10^6 ，存於100 μ L中)經皮下植入小鼠之後肋區域中並使其生長至指定大小，之後針對每一實驗投與化合物。藉由利用電子卡尺之量測測定腫瘤大小且腫瘤體積計算為其長度 $\times$ 寬度² $\times 0.4$ 之積。

數據及結果

實例 1

生物化學酶分析中之ROS1激酶活性由克裏唑蒂尼之抑制

在酶及基於細胞之分析二者中評價克裏唑蒂尼對ROS催化活性之效應。證實克裏唑蒂尼為重組、人類ROS1激酶(催化性結構域)之有效ATP競爭抑制劑，平均Ki值為0.097 nM (n=4)。

實例 2

基於細胞之分析中之克裏唑蒂尼之激酶活性

克裏唑蒂尼以 41 nM 之平均 IC_{50} 值 ($n=11$) 劑量依賴性抑制 HCC78 細胞中之 ROS 磷酸化，該等細胞呈現導致該等細胞中之組成型活性 SLC34A2-ROS 融合蛋白表現之 4p15、6q22 染色體易位事件 (Rikova 等人，(2007)) (表 1，圖 1)。

克裏唑蒂尼亦以 49 nM 之平均 IC_{50} 值 ($n=2$) 抑制具有 FIG-ROS 融合物之 U138MG 人類神經膠母細胞瘤細胞中的 ROS 磷酸化 (Charest 等人，(2003)) (表 1，圖 1)。

在一組經改造以表現各種 ROS-融合蛋白之 3T3 細胞系中，克裏唑蒂尼以 3.4 nM 至 36 nM 範圍內之 IC_{50} 值抑制該等細胞中之 ROS 磷酸化 (表 1)。

表 1

基於細胞之 ROS1 激酶磷酸化分析	IC_{50} (nM) 平均值+ STD	n
HCC78 人類 NSCLC 細胞中之內源 SLC34A2-ROS 磷酸化	41 ± 14	11
U138MG 人類膠質瘤細胞中之內源 FIG-ROS 磷酸化	49 ± 18	2
3T3-CD74-ROS 細胞中之經改造 CD74-ROS 磷酸化	3.4 ± 2.4	4
3T3-FIG-ROS(S) 細胞中之經改造 FIG-ROS(S) 磷酸化	19 ± 11	4
3T3-FIG-ROS(L) 細胞中之經改造 FIG-ROS(L) 磷酸化	8.7 ± 0.6	3
3T3- SLC34A2-ROS(S) 細胞中之經改造 SLC34A2-ROS(S) 磷酸化	19 ± 15	2
3T3- SLC34A2-ROS(L) 細胞中之經改造 SLC34A2-ROS(L) 磷酸化	36	1

實例 3

活體外 HCC78 人類 NSCLC 細胞中之 ROS 調介之信號轉導之抑制及細胞凋亡之誘發

評價克裏唑蒂尼抑制HCC78細胞中之SLC34A2-ROS依賴性信號傳導途徑的能力。

如圖3中之免疫印跡中所闡釋，在藥物治療3小時後在活體外HCC78細胞中，克裏唑蒂尼劑量依賴性抑制ROS磷酸化(活化環)、以及下游接頭或信號傳導分子(包括SHP2、STAT3、AKT及ERK1/2)(圖3)。該等數據證實關鍵信號傳導途徑與克裏唑蒂尼之有效劑量之間具有相關性。

利用西方印跡分析評價克裏唑蒂尼之細胞凋亡之半胱天冬酶-3標記的劑量依賴性調節。在藥物治療3小時後，在HCC78 NSCL細胞中觀察到活化半胱天冬酶-3量之顯著劑量依賴性誘發(圖4)，此指示增加之細胞凋亡亦與有效劑量相關。

實例4

在裸鼠中之一組致癌ROS融合變體經改造異種移植物腫瘤模型中經口投與後之克裏唑蒂尼的細胞減少效應

在一組ROS融合物經改造腫瘤異種移植物模型中在代表人類癌症適應症之NIH3T3細胞中評價克裏唑蒂尼之抗腫瘤功效，該等適應症與ROS染色體易位(包括CD74-ROS、人類NSCLC中鑑別之兩種形式之SLC34A2-ROS、及人類NSCLC、神經膠母細胞瘤及膽管上皮癌中鑑別之兩種形式之FIG-ROS)相關(Rimkunas等人，(2012) *Clin Cancer Res.* 6月1日。[在印刷之前電子出版])；Gu等人，(2011) *PLoS One.* 6(1):e15640)。

克裏唑蒂尼證實利用 75/mg PO BID 之投藥方案之具有人類致癌 ROS 融合變體之所有 5 個 3T3-ROS 經改造腫瘤模型中具有顯著細胞減少效應，如圖 5 中所示。在腫瘤體積達到約 200 mm³ 時，小鼠開始接受克裏唑蒂尼治療，且在藥物治療之約 4 至 5 天內腫瘤快速消退至 5 mm³ 至 10 mm³ 之大小。在開始投藥後之約 7 天內對照腫瘤達到 1500 mm³ 之大小，且此研究之平均克裏唑蒂尼治療之間係約 10 天。

實例 5

裸鼠中之 3T3-CD74-ROS 及 3T3-SLC34A2-ROS(L) 異種移植物模型中由克裏唑蒂尼之 ROS 磷酸化及腫瘤生長的劑量依賴性抑制

為評價 ROS 激酶活性及腫瘤生長由克裏唑蒂尼之藥效動力學抑制，實施利用多重劑量量下之經口 BID 投與之裸鼠中的 3T3-CD74-ROS 腫瘤異種移植物研究。在整個研究中利用電子游標卡尺量測腫瘤體積並在經口投與克裏唑蒂尼達 10 天後(穩定狀態)第 7 小時收穫腫瘤試樣。藉由 ELISA 定量腫瘤中之 ROS 磷酸化狀態。

克裏唑蒂尼證實腫瘤生長中之劑量依賴性抑制，如圖 6B 中所示。在 160 mg/kg/天組(80 mg/kg BID)及 80 mg/kg/天組(40 mg/kg BID)中分別觀察到 94% 及 61% 之腫瘤消退，且在 40 mg/kg/天組(20 mg/kg BID)及 20 mg/kg/天組(10 mg/kg BID)中分別觀察到 78% 及 54% 之腫瘤生長抑制。

在最後一次克裏唑蒂尼經口投與7小時後，在所有治療組中觀察到3T3-CD74-ROS腫瘤中之ROS磷酸化顯著抑制(圖6A)。

亦在3T3-SLC34A2-ROS(L)模型中觀察到克裏唑蒂尼之類似抗腫瘤功效程度(圖7)。

實例6

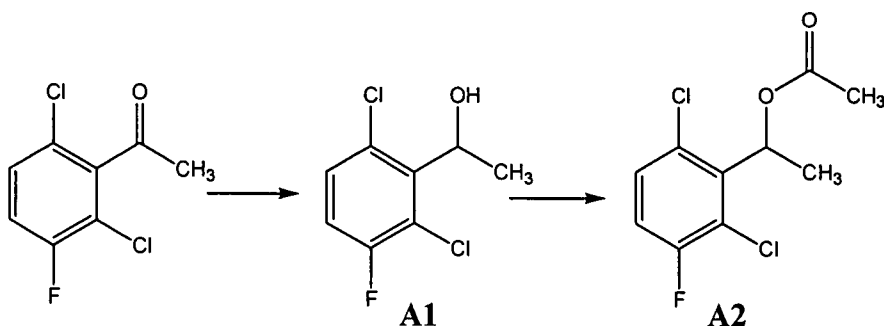
式1化合物(克裏唑蒂尼)之合成

PLE係由Roche生產之酶且經由Biocatalytics公司以來自豬肝之粗酯酶製劑(通常稱作PLE-AS，自Biocatalytics以ICR-123形式購得，以硫酸銨懸浮液形式銷售)之形式銷售。在CAS登記簿中將酶分類為「甲酸-酯水解酶，CAS編號9016-18-6」。相應酶分類編號係EC 3.1.1.1。已知酶對大量酯之水解具有寬的受質特異性。在pH滴定器中使用基於丁酸乙酯之水解之方法測定脂肪酶活性。1 LU (脂肪酶單位)係於22°C、pH 8.2下每分鐘釋放1 μmol 可滴定丁酸之酶的量。本文報告之製劑(PLE-AS，呈懸浮液形式)通常係以已宣告活性> 45 LU/mg(蛋白質含量為約40 mg/mL)之不透明棕綠色液體形式運輸。

(1S)-1-(2,6-二氯-3-氟苯基)乙醇

(1S)-1-(2,6-二氯-3-氟苯基)乙醇(在下文反應圖中示為化合物(S-1))係藉由外消旋乙酸1-(2,6-二氯-3-氟苯基)乙酯之酶促水解、酯化及根據反應圖B逆轉之化學水解之組合製得。外消旋乙酸1-(2,6-二氯-3-氟苯基)乙酯(化合物A2)係根據反應圖A製得。

反應圖 A

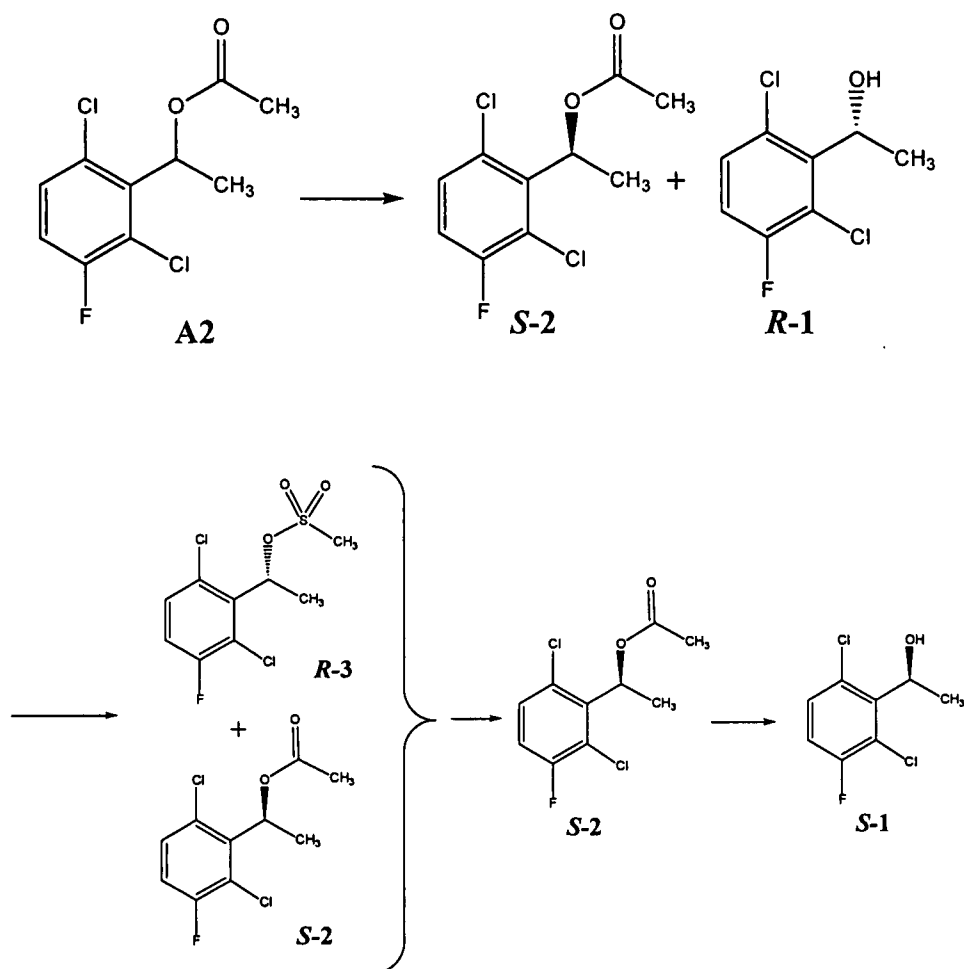


1-(2,6-二氯-3-氟苯基)乙醇 (A1)：向 2',6'-二氯-3'-氟-苯乙酮 (Aldrich, 目錄號 52,294-5) (207 mg, 1 mmol) 存於 2 mL 無水 CH_3OH 中之溶液中添加硼氫化鈉 (90 mg, 2.4 mmol)。將反應混合物於室溫下攪拌 1 h, 隨後蒸發, 從而產生無色油狀殘餘物。藉由急驟層析 (用存於己烷中之 0→10% EtOAc 洗脫) 純化殘餘物, 從而產生無色油狀化合物 A1 (180 mg; 0.88 mmol; 86.5% 產率); MS (APCI) (M^+H^-) 208; ^1H NMR (400 MHz, 氯仿- D) δ ppm 1.64 (d, $J=6.82$ Hz, 3 H) 3.02 (d, $J=9.85$ Hz, 1 H) 6.97-7.07 (m, 1 H) 7.19-7.33 (m, 1 H)。

乙酸 1-(2,6-二氯-3-氟苯基)乙酯 (A2)：向化合物 A1 (2.2 g, 10.5 mmol) 存於 20 mL CH_2Cl_2 中之溶液中依序添加乙酸酐 (1.42 mL, 15 mmol) 及吡啶 (1.7 mL, 21 mmol)。將反應混合物於室溫下攪拌 12 h 且隨後蒸發, 從而產生淺黃色油狀殘餘物。藉由急驟層析 (用存於己烷中之 7→9% EtOAc 洗脫) 純化殘餘物, 從而產生無色油狀化合物 A2 (2.26 g; 9.0 mmol; 85.6% 產率); ^1H NMR (400 MHz, 氯仿- D) δ ppm 1.88 (d, $J=6.82$ Hz, 3 H) 2.31 (s, 3 H) 6.62 (q, $J=6.82$ Hz, 1

H) 7.25 (t, $J=8.46$ Hz, 1 H) 7.49 (dd, $J=8.84$, 5.05 Hz, 1 H)。

反應圖 B



向配備有 pH 電極、頂置式攪拌器及鹼添加管線 (1 M NaOH) 之 50 mL 夾套燒瓶中添加 1.2 mL 100 mM 磷酸鉀緩衝液 (pH 7.0) 及 0.13 mL PLE AS 懸浮液。隨後逐滴添加化合物 A2 (0.13 g, 0.5 mmol, 1.00 當量) 並將所得混合物於室溫下攪拌 20 h, 使用 1 M NaOH 將反應內容物之 pH 維持於 7.0 下。藉由 RP-HPLC 監測反應物之轉化及對映異構體過量 (ee's) 二者, 並在消耗 50% 起始材料後停止 (在該等條件

下約17小時)。隨後將混合物用10 mL乙酸乙酯萃取三次以回收呈R-1及S-2之混合物形式的酯及醇二者。

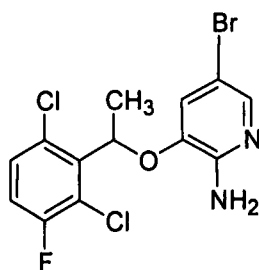
在氮氣氛下向R-1及S-2之混合物(0.48 mmol)存於4 mL吡啶中之溶液中添加甲磺醯氯(0.06 mL, 0.6 mmol)。將反應混合物於室溫下攪拌3 h, 隨後蒸發以獲得油狀物。向混合物中添加水(20 mL)且隨後添加EtOAc (20 mL×2)以萃取水溶液。將有機層合併、乾燥、過濾並蒸發, 從而產生R-3及S-2之混合物。此混合物未經進一步純化即用於下一步驟反應中。¹H NMR (400 MHz, 氯仿-D) δ ppm 1.66 (d, $J=7.1$ Hz, 3 H) 1.84 (d, $J=7.1$ Hz, 3 H) 2.09 (s, 3 H) 2.92 (s, 3 H) 6.39 (q, $J=7.0$ Hz, 1 H) 6.46 (q, $J=6.8$ Hz, 1 H) 6.98-7.07 (m, 1 H) 7.07-7.17 (m, 1 H) 7.23-7.30 (m, 1 H) 7.34 (dd, $J=8.8, 4.80$ Hz, 1 H)。

在氮氣氛下向存於4 mL DMF中之R-3及S-2之混合物(0.48 mmol)中添加乙酸鉀(0.027 g, 0.26 mmol)。將反應混合物加熱至100°C並保持12 h。向反應混合物中添加水(20 mL)並添加EtOAc (20 mL × 2)以萃取水溶液。乾燥合併之有機層, 過濾並蒸發, 從而產生S-2之油狀物(72 mg, 在兩個步驟中61%產率)。對掌性 ee : 97.6%。¹H NMR (400 MHz, 氯仿-D) δ ppm 1.66 (d, $J=7.1$ Hz, 3 H) 2.09 (s, 3 H) 6.39 (q, $J=6.8$ Hz, 1 H) 7.02 (t, $J=8.5$ Hz, 1 H) 7.22-7.30 (m, 1 H)。

在氮氣氛下於0°C下向化合物S-2 (4.64 g, 18.8 mmol)中緩慢添加甲醇鈉(19 mmol; 0.5 M, 存於甲醇中)。在室溫

下將所得混合物攪拌4小時。蒸發溶劑並添加 H₂O (100 mL)。將冷卻之反應混合物用乙酸鈉-乙酸緩衝液溶液中中和至 pH 7。添加乙酸乙酯(100 mL×2)以萃取水溶液。將合併之有機層經 Na₂SO₄ 乾燥，過濾並蒸發，從而獲得白色固體狀 S-1 (4.36 g, 94.9% 產率)；SFC-MS：97% ee, ¹H NMR (400 MHz, 氯仿 -D) δ ppm 1.65 (d, *J*=6.8 Hz, 3 H) 5.58 (q, *J*=6.9 Hz, 1 H) 6.96-7.10 (m, 1 H) 7.22-7.36 (m, 1 H)。

5-溴-3-[1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-吡啶-2-基胺(外消旋物)：



1. 於 0°C 下使用冰浴將 2,6-二氯-3-氟苯乙酮(15 g, 0.072 mol)在 THF (150 mL, 0.5 M)中攪拌 10 min。緩慢添加氫化鋰鋁(2.75 g, 0.072mol)。將該反應物在環境溫度下攪拌 3 hr。在冰浴中冷卻反應物，並逐滴添加水(3 mL)，之後緩慢添加 15% NaOH (3 mL)。將混合物於環境溫度下攪拌 30 min。添加 15% NaOH (9 mL)、MgSO₄並過濾混合物以移除固體。將固體用 THF (50 mL)洗滌並濃縮濾液，從而產生黃色油狀 1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙醇(14.8 gm, 95% 產率)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.45 (d, 3H), 5.42 (m, 2H), 7.32 (m, 1H), 7.42 (m, 1H)。

2. 於 0°C 下向三苯基膦(8.2 g, 0.03 mol)及 DEAD (13.65

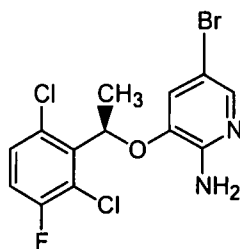
mL 40%存於甲苯中之溶液)存於THF (200 mL)中之攪拌溶液中添加1-(2,6-二氯-3-氟-苄基)-乙醇(4.55 g, 0.021 mol)及3-羥基-硝基吡啶(3.35 g, 0.023 mol)存於THF (200 mL)中之溶液。在氮氣氛下於環境溫度下攪拌所得鮮橙色溶液4小時，此時消耗所有起始材料。移除溶劑，並將粗物質乾式裝載至矽膠上，並用乙酸乙酯-己烷(20:80)洗脫，從而得到粉色固體狀3-(2,6-二氯-3-氟-苄氧基)-2-硝基-吡啶(6.21 g, 0.021 mol, 98%)。¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 1.8-1.85 (d, 3H), 6.0-6.15 (q, 1H), 7.0-7.1 (t, 1H), 7.2-7.21 (d, 1H), 7.25-7.5 (m, 2H), 8.0-8.05 (d, 1H)。

3. 將3-(2,6-二氯-3-氟-苄氧基)-2-硝基-吡啶(9.43 g, 0.028 mol)及鐵屑(15.7 g, 0.28 mol)懸浮於AcOH (650 mL)及EtOH (500 mL)之攪拌混合物中。將反應物緩慢加熱回流並攪拌1 hr。將反應物冷卻至室溫，隨後添加二乙醚(500 mL)及水(500 mL)。藉由添加碳酸鈉小心地中和溶液。將合併之有機萃取物用飽和NaHCO₃ (2×100 mL)、H₂O (2×100 mL)及鹽水(1×100 mL)洗滌，隨後乾燥(Na₂SO₄)，過濾並在真空下濃縮至乾燥，從而得到淺粉色固體狀3-(2,6-二氯-3-氟-苄氧基)-吡啶-2-基胺(9.04 g, 0.027 mol, 99%)。¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 1.8-1.85 (d, 3H), 4.9-5.2 (brs, 2H), 6.7-6.84 (q, 1H), 7.0-7.1 (m, 1H), 7.2-7.3 (m, 1H), 7.6-7.7 (m, 1H)。

4. 使用冰浴將3-(2,6-二氯-3-氟-苄氧基)-吡啶-2-基胺(9.07 g, 0.03 mol)存於乙腈中之攪拌溶液冷卻至0℃。向此

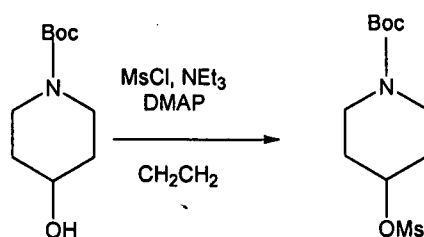
溶液中逐滴添加 N-溴琥珀醯亞胺 (NBS) (5.33 g, 0.03 mol)。將反應物於 0°C 下攪拌 15 min。在真空下將反應物濃縮至乾燥。將所得深色油狀物溶解於 EtOAc (500 mL) 中，並經由矽膠層析純化。隨後在真空中移除溶劑，從而得到白色結晶固體狀 5-溴-3-(2,6-二氯-3-氟-苄氧基)-吡啶-2-基胺 (5.8 g, 0.015 mol, 51%)。¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 1.85-1.95 (d, 3H), 4.7-5.0 (brs, 2H), 5.9-6.01 (q, 1H), 6.8-6.95 (d, 1H), 7.01-7.2 (t, 1H), 7.4-7.45 (m, 1H), 7.8-7.85 (d, 1H)。

5-溴-3-[1(R)-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-吡啶-2-基胺：



如上文針對外消旋物所述製備對映異構體純 R 異構體，但使用上述對映異構體純起始材料。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.74 (d, 3H), 6.40 (m, 1H), 6.52 (br s, 2H), 7.30 (m, 1H), 7.48 (m, 1H), 7.56 (s, 1H); MS *m/z* 382 (M+1)。

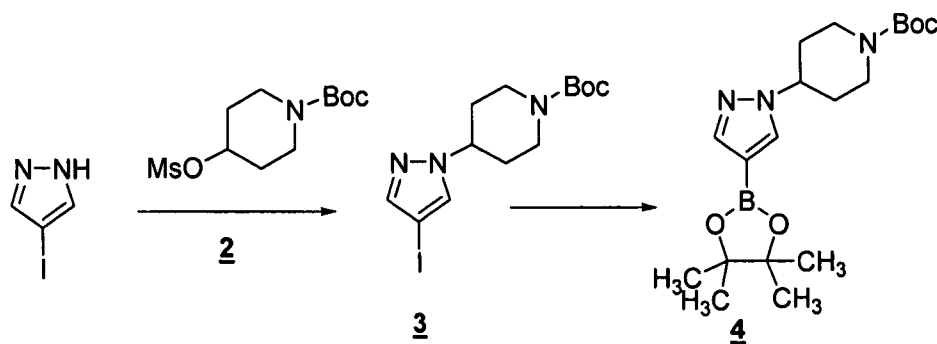
4-甲烷磺醯氧基-六氫吡啶-1-甲酸第三丁基酯(2)



2

向冷卻至 0°C 之 4-羥基-六氫吡啶-1-甲酸第三丁基酯 (7.94 g, 39.45 mmol) 存於 CH₂Cl₂ (100 mL) 中之攪拌溶液中緩慢添加 NEt₃ (5.54 mL, 39.45 mmol)，之後添加甲磺酰氯 (3.06 mL, 39.45 mmol) 及 DMAP (48 mg, 0.39 mmol)。將混合物在室溫下攪拌過夜。向混合物中添加水 (30 mL)。用 CH₂Cl₂ (3×30 mL) 萃取，之後乾燥 (Na₂SO₄) 並在真空中移除溶劑，從而獲得白色固體狀 4-甲磺酰氧基-六氫吡啶-1-甲酸第三丁基酯 (11.00 g, >99% 產率)。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 4.89 (m, 1H), 3.69 (m, 2H), 3.31 (m, 2H), 3.04 (s, 3H), 1.95 (m, 2H), 1.83 (m, 2H), 1.46 (s, 9H)。

甲酸第三丁基-4-[4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼啉-2-基)-1H-吡唑-1-基]六氫吡啶-1-酯



甲酸第三丁基 4-(4-碘-1H-吡唑-1-基)六氫吡啶-1-酯 (3)

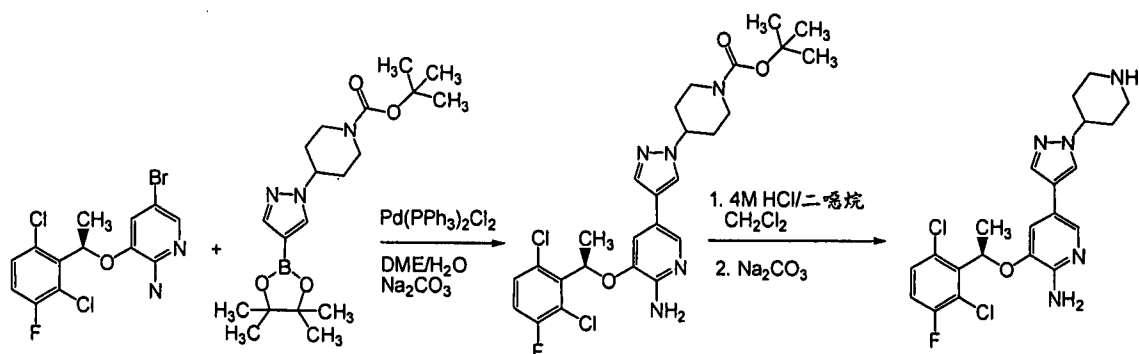
於 4°C 下向 4-碘吡唑 (0.57 mmol) 存於 DMF (2 L) 中之攪拌

溶液中逐滴添加NaH (1.2當量, 0.68 mmol)。於4°C下將所得混合物攪拌1小時且隨後添加4-甲磺醯氧基-六氫吡啶-1-甲酸第三丁基酯化合物2 (1.1當量, 0.63 mmol)。將所得混合物加熱至100°C並保持12 h。將反應物用H₂O驟冷並用EtOAc萃取若干次。將合併之有機層乾燥, 過濾並濃縮, 從而獲得橙色油狀物。藉由矽膠層析(用存於戊烷中之5% EtOAc洗脫)純化殘餘物, 從而產生白色固體狀化合物3 (140 g, 66%)。

甲酸第三丁基-4-[4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼啉-2-基)-1*H*-吡啶-1-基]六氫吡啶-1-酯(4)

向化合物3 (140 g, 0.37 mol)存於1.5 L DMSO中之溶液中依序添加雙(戊醯)二硼(1.4當量, 134 g, 0.52 mol)及乙酸鉀(4當量, 145 g, 1.48 mol)。將混合物用氮吹掃若干次且隨後添加二氯雙(三苯基膦)鉍(II) (0.05當量, 12.9 g, 0.018 mol)。將所得混合物於80°C下加熱2 h。將反應混合物冷卻至室溫並經由Celite®床過濾並用EtOAc洗滌。將濾液用飽和NaCl (500 mL×2)洗滌, 經Na₂SO₄乾燥, 過濾並濃縮。藉由矽膠層析(用存於己烷中之5% EtOAc洗脫)純化殘餘物, 從而產生白色固體狀化合物4 (55 g, 40%)。

3-[(*R*)-1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-5-(1-六氫吡啶-4-基-1*H*-吡啶-4-基)-吡啶-2-基胺(1)



向 3-[(*R*)-1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-5-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧硼啉-2-基)-吡啶-2-基胺 (15.22 g, 35.64 mmol) 及 4-(4-溴-吡啶-1-基)-六氫吡啶-1-甲酸第三丁基酯 (14.12 g, 42.77 mmol) 存於 DME (143 mL) 中之攪拌溶液中添加 Na_2CO_3 (11.33 g, 10692 mmol) 存於水 (36 mL) 中之溶液。使溶液脫氣並充氮三次。向該溶液中添加 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (1.25 mg, 1.782 mmol)。使反應溶液脫氣並再次充氮三次。將反應溶液於 87°C 油浴下攪拌約 16 小時 (或直至消耗硼烷頻哪醇酯為止)，冷卻至環境溫度並用 EtOAc (600 mL) 稀釋。將反應混合物經由 Celite® 墊過濾並用 EtOAc 洗滌。將 EtOAc 溶液用鹽水洗滌，經 Na_2SO_4 乾燥並濃縮。在用 EtOAc/己烷系統洗脫之矽膠管柱 (Biotage 90+ 管柱：用 600 mL 100% 己烷平衡，區段 1：2250 mL 50% EtOAc/己烷線性，區段 2：4500 mL 75% EtOAc/己烷線性，區段 3：4500 mL 100% EtOAc) 上純化粗產物，從而獲得 4-(4-{6-氨基-5-[(*R*)-1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-吡啶-3-基}-吡啶-1-基)-六氫吡啶-1-甲酸第三丁基酯 (11.8 g, 60% 產率，約 95% 純度)， R_f 為 0.15 (50% EtOAc/己烷)。MS m/e 550 ($\text{M}+1$)⁺。

向 4-(4-{6-胺基-5-[(*R*)-1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-吡啶-3-基}-吡啶-1-基)-六氫吡啶-1-甲酸第三丁基酯 (11.8 g, 21.45 mmol) 存於 CH₂Cl₂ (59 mL, 0.2 M) 中之溶液中添加 4 N HCl/二噁烷 (21 mL)。將溶液攪拌過夜，從而形成固體。用玻璃棒徹底碾壓固體並經超音波處理，從而釋放固體中捕獲之起始材料。另外添加 4 N HCl/二噁烷 (21 mL) 並於室溫下再攪拌 2 小時，其中 LCMS 顯示無起始材料。在內襯有濾紙之布氏漏斗 (Buchner funnel) 中過濾懸浮液。保存母液，此乃因其含有 <5% 產物。將固體轉移至 500 mL 燒杯並添加 HPLC 水直至固體完全溶解為止。藉助添加固體 Na₂CO₃ 將 pH 調節至 10。用 CH₂Cl₂ (5×200 mL) 萃取水溶液或直至 LCMS 顯示水層中無產物為止。將 CH₂Cl₂ 溶液經 Na₂SO₄ 乾燥並濃縮。在用 CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃ 系統洗脫之矽膠管柱 (Biotage 40+管柱：用 600 mL 100% CH₂Cl₂ 平衡產生副產物，區段 1：1200 mL 10% MeOH/CH₂Cl₂ 線性，區段 2：2400 mL 10% MeOH/CH₂Cl₂ 梯度，區段 3：2400 mL 9% MeOH/1% NEt₃/CH₂Cl₂) 上純化重新溶解於 CH₂Cl₂ (10 mL) 及 MeOH (1 mL) 中之粗產物。收集期望部分，從而提供 3-[(*R*)-1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-5-(1-六氫吡啶-4-基-1*H*-吡啶-4-基)-吡啶-2-基胺 (7.19 g, 75% 合併產率，白色固體)。MS *m/e* 450 (*M*+1)⁺。 ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 7.92 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.58 (m, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.45 (m, 1H), 6.90 (s, 1H), 6.10 (m, 1H), 5.55 (bs, 2H), 4.14 (m, 1H), 3.05 (m, 2H), 2.58 (m, 2H), 1.94 (m,

2H), 1.80 (d, 3H), 1.76 (m, 2H)。

將固體產物 3-[(*R*)-1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-5-(1-六氫吡啶-4-基-1*H*-吡唑-4-基)-吡啶-2-基胺溶解於二氯甲烷中，且緩慢蒸發溶劑以生成微細結晶固體。在高真空乾燥後，確認試樣係熔點為 194°C 之單晶多晶型形式 A。

【圖式簡單說明】

圖 1：在 U138MG 細胞及 HCC78 細胞中，克裏唑蒂尼對 SLC34A2-ROS 磷酸化之濃度依賴性抑制。

圖 2：克裏唑蒂尼對 HCC78 細胞存活力之濃度依賴性抑制。

圖 3：在 HCC78 人類 NSCLC 細胞中，克裏唑蒂尼對 SLC34A2-ROS 磷酸化及 ROS 調介之信號轉導的濃度依賴性抑制。

圖 4：在具有 SLC34A2-ROS 融合物之 HCC78 人類 NSCLC 細胞中，克裏唑蒂尼對裂解半胱天冬酶 3 量的劑量依賴性增加。

圖 5：克裏唑蒂尼在一組 ROS 融合物改造 3T3-ROS 腫瘤模型中之細胞減少效應，該等模型在裸鼠中具有人類 CD74-ROS、SLC34A2-ROS (L)、SLC34A2-ROS (S)、FIG-ROS (L) 及 FIG-ROS (S)。

圖 6：在裸鼠中之 3T3-CD74-ROS 異種移植物模型中，克裏唑蒂尼對 ROS 磷酸化(A)及腫瘤生長(B)的劑量依賴性抑制。

圖 7：在裸鼠中之 3T3-SLC34A2-ROS(L) 異種移植物模型中，克裏唑蒂尼對腫瘤生長之劑量依賴性抑制。

七、申請專利範圍：

1. 一種3-[(R)-1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-5-(1-六氫吡啶-4-基-1*H*-吡唑-4-基)-吡啶-2-基胺或其醫藥上可接受之鹽的用途，其用於製造用於治療哺乳動物之癌症的藥劑，其中該癌症係由至少一種遺傳改變之ROS調介。
2. 如請求項1之用途，其中該哺乳動物係人類。
3. 如請求項1之用途，其中該至少一種遺傳改變之ROS係遺傳改變之ROS基因。
4. 如請求項3之用途，其中該遺傳改變之ROS基因係ROS融合基因。
5. 如請求項4之用途，其中該ROS融合基因係SLC34A2-ROS基因或CD74-ROS基因。
6. 如請求項4之用途，其中該ROS融合基因係FIG-ROS基因。
7. 如請求項1之用途，其中該至少一種遺傳改變之ROS係ROS融合蛋白。
8. 如請求項7之用途，其中該ROS融合蛋白係SLC34A2-ROS激酶。
9. 如請求項7之用途，其中該ROS融合蛋白係CD74-ROS激酶。
10. 如請求項7之用途，其中該ROS融合蛋白係FIG-ROS激酶。
11. 如請求項1至10中任一項之用途，其中該癌症係選自肺癌、骨癌、胰腺癌、皮膚癌、頭頸癌、皮膚或眼內黑色

素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛區癌、胃癌、結腸癌、乳癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、外陰癌、何傑金氏病(Hodgkin's Disease)、食管癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、甲狀旁腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、前列腺癌、慢性或急性白血症、淋巴細胞性淋巴瘤、膀胱癌、腎或輸尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、中樞神經系統(CNS)贅瘤、原發性CNS淋巴瘤、脊柱瘤、腦幹膠質瘤、垂體腺瘤及其組合。

12. 如請求項1至10中任一項之用途，其中該癌症係選自由以下組成之群：非小細胞肺癌(NSCLC)、神經膠母細胞瘤、鱗狀細胞癌、激素難治性前列腺癌、乳頭狀腎細胞癌、結腸直腸腺癌、神經母細胞瘤、退行發育性大細胞淋巴瘤(ALCL)及胃癌。
13. 如請求項1至10中任一項之用途，其中該癌症係非小細胞肺癌(NSCLC)。
14. 如請求項1至10中任一項之用途，其中該癌症係神經膠母細胞瘤。
15. 如前述請求項中任一項之用途，其中3-[(R)-1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-5-(1-六氫吡啶-4-基-1H-吡唑-4-基)-吡啶-2-基胺或其醫藥上可接受之鹽係以包含3-[(R)-1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-5-(1-六氫吡啶-4-基-1H-吡唑-4-基)-吡啶-2-基胺或其醫藥上可接受之鹽及至少一種醫藥上可接受之載劑的醫藥組合物形式投與。

八、圖式：

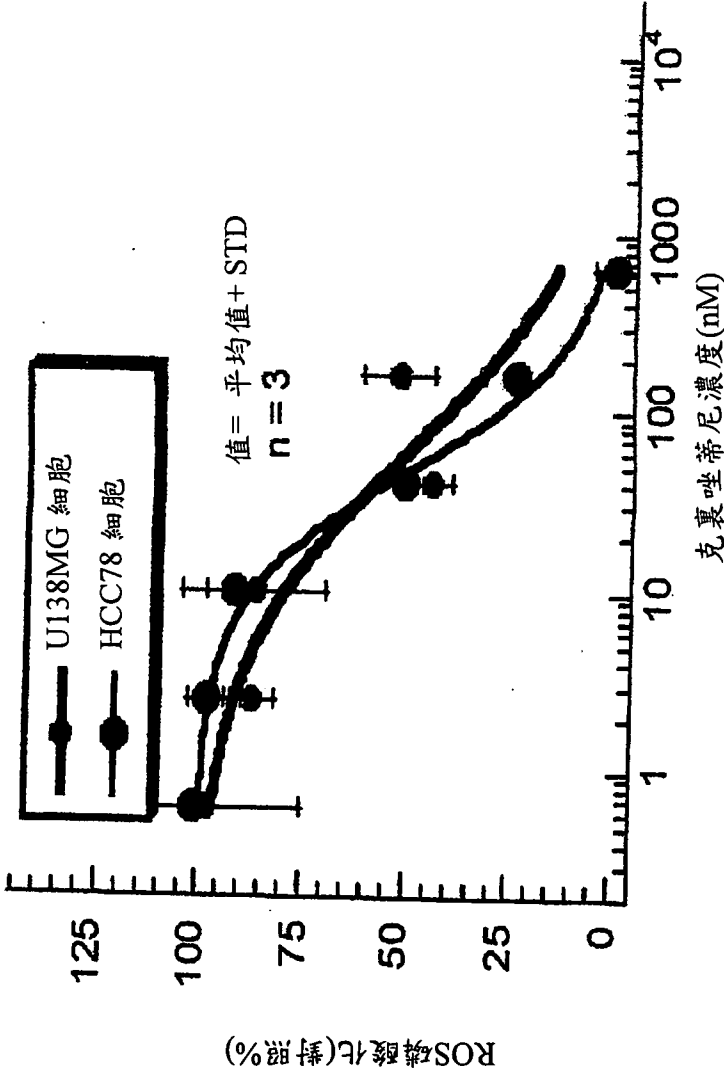


圖 1

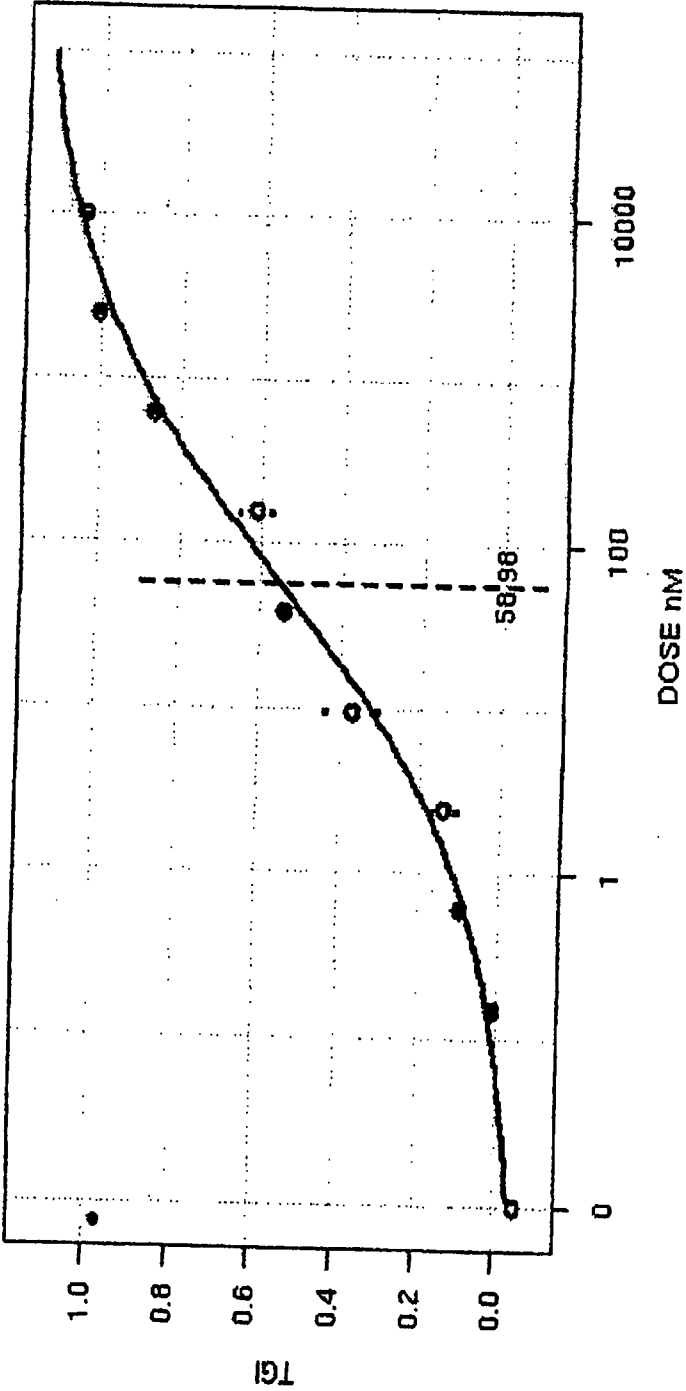


圖 2

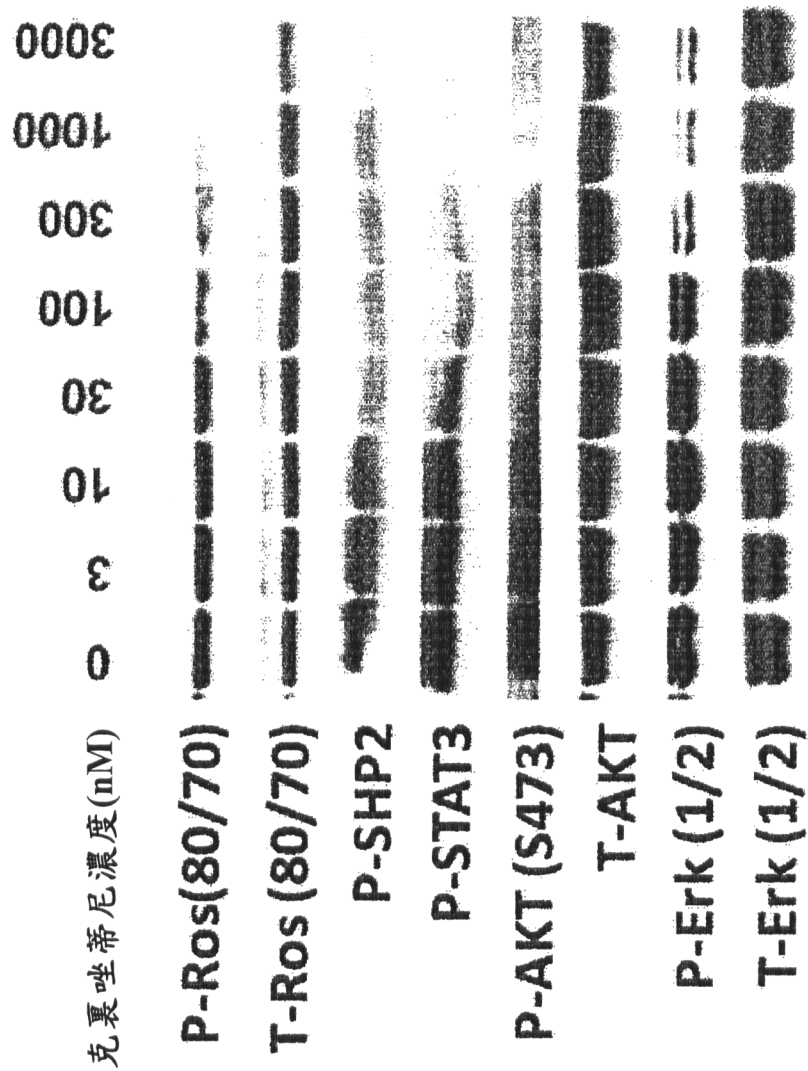


圖 3

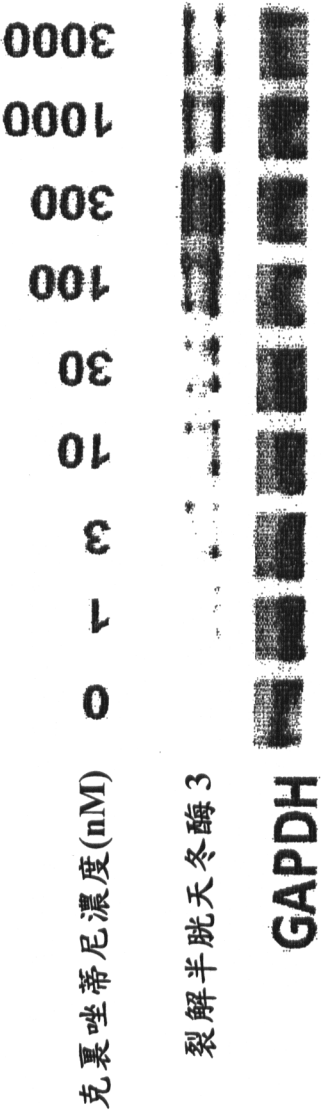


圖 4

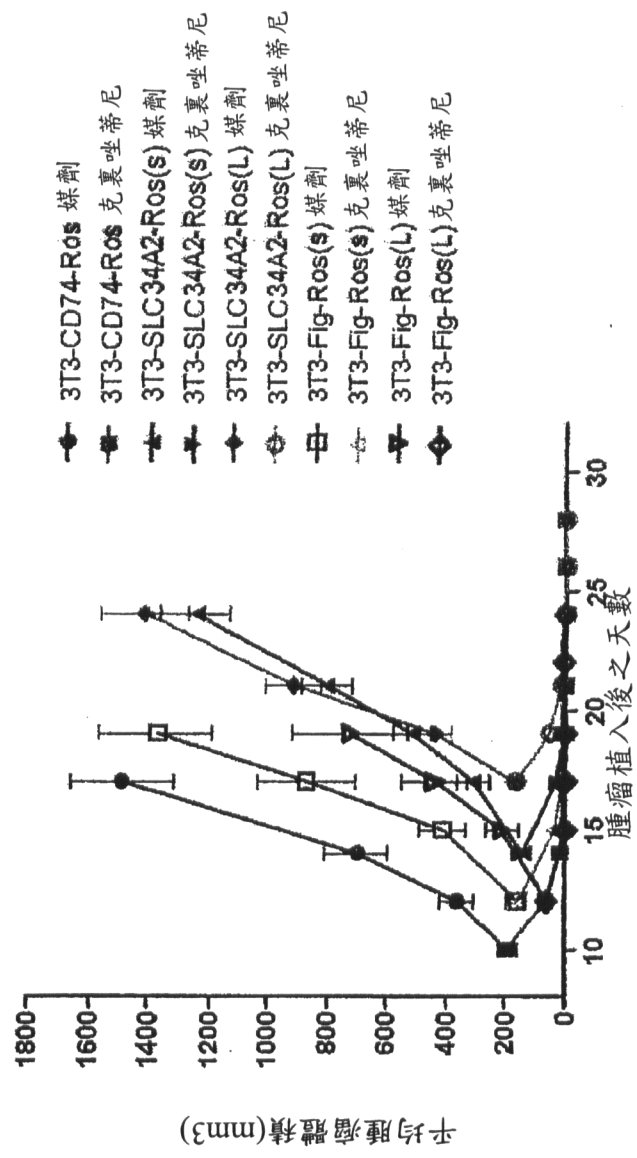


圖 5

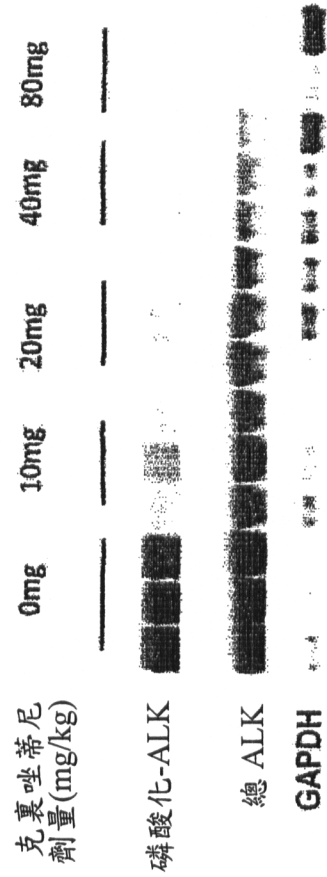


圖 6A

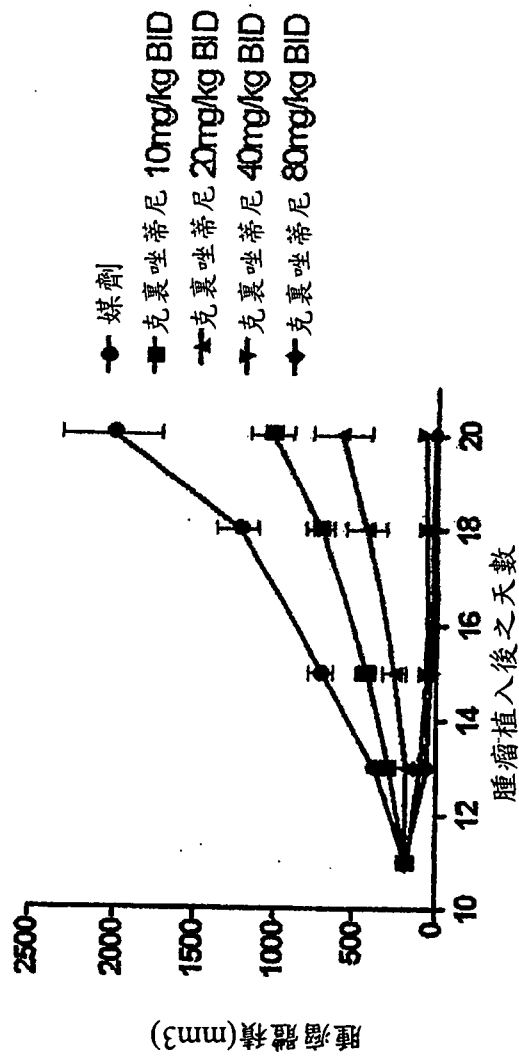


圖 6B

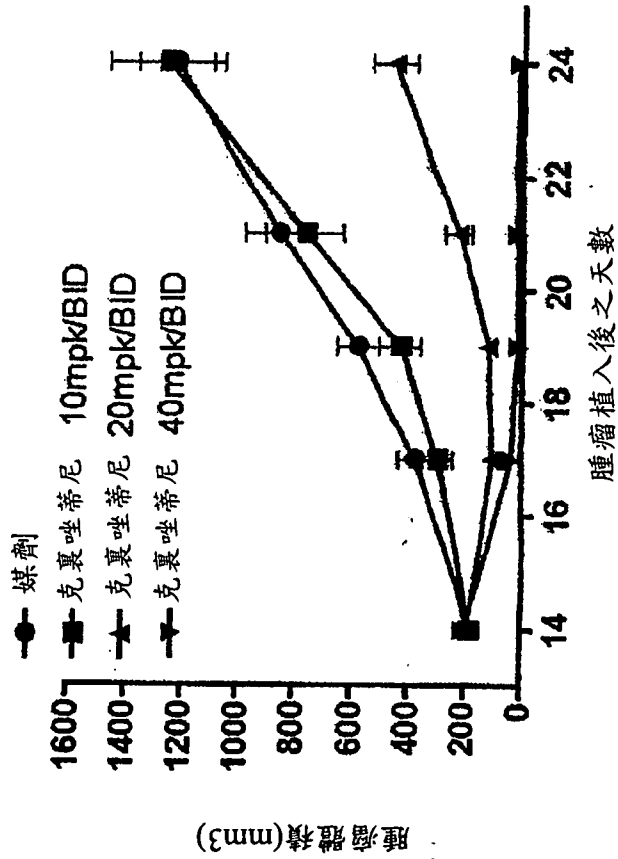


圖 7