

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 726 605**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/47** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.09.2013 PCT/US2013/058768**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.03.2014 WO14039971**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2013 E 13765886 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2019 EP 2892532**

54 Título: **Inhibidores de MET, VEGFR y RET para usar en el tratamiento del adenocarcinoma de pulmón**

30 Prioridad:

**07.09.2012 US 201261698143 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**08.10.2019**

73 Titular/es:

**EXELIXIS, INC. (100.0%)  
1851 Harbor Bay Parkway  
Alameda, CA 94502, US**

72 Inventor/es:

**AFTAB, DANA, T.**

74 Agente/Representante:

**SALVÀ FERRER, Joan**

ES 2 726 605 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Inhibidores de MET, VEGFR y RET para usar en el tratamiento del adenocarcinoma de pulmón

5 **Campo de la invención**

**[0001]** La presente invención se refiere a la detección, diagnóstico y tratamiento del cáncer, especialmente adenocarcinoma de pulmón, usando un inhibidor de MET, VEGFR, y RET.

10 **Antecedentes de la invención**

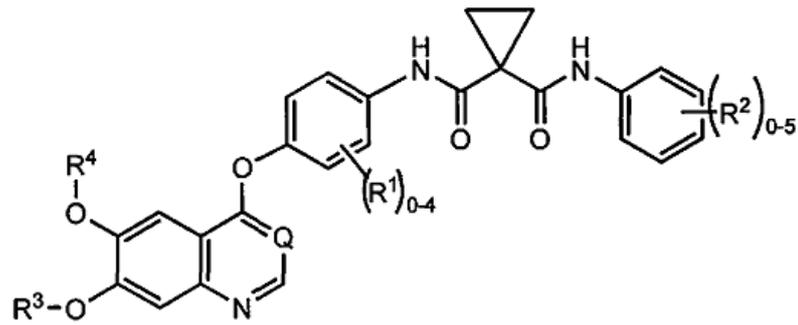
**[0002]** El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en todo el mundo. Los desarrollos recientes en terapias dirigidas han dado lugar a un cambio de paradigma en el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC). Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, Sunpaweravong P, Han B, Margono B, Ichinose Y, Nishiwaki Y, Ohe Y, Yang JJ, Chewaskulyong B, Jiang H, Duffield EL, Watkins CL, Armor AA, Fukuoka M. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med.* 2009 Sep 3; 361 (10): 947-57. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, Gemma A, Harada M, Yoshizawa H, Kinoshita I, Fujita Y, Okinaga S, Hirano H, Yoshimori K, Harada T, Ogura T, Ando M, Miyazawa H, Tanaka T, Saijo Y, Hagiwara K, Morita S, Nukiwa T; North-East Japan Study Group. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med.* 2010 Jun 24; 362 (25): 2380-8. Los inhibidores de tirosina quinasa (TKI) del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), gefitinib y erlotinib, y la quinasa del linfoma anaplásico (ALK) TKI, crizotinib, han demostrado actividad clínica en pacientes con NSCLC con mutaciones de *EGFR* o reordenamientos del gen *ALK*. Kwak EL, Bang, YJ, Camidge DR, Shaw AT, Salomon B, Maki RG, Ou SH, Dezube BJ, Janne PA, Costa DB, Varella-García M, Kim WH, Lynch TJ, Fidias P, Stubbs H, Engelman JA, Sequist LV, Tan W, Gandhi L, Mino-Kenudson M, Wei GC, Shreeve SM, Ratain MJ, Settleman J, Christensen JG, Haber DA, Wilner K, Salgia R, Shapiro GI, Clark JW, Iafrate AJ. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2010 Oct 28; 363 (18): 1693-703. Además, se ha descrito que el reordenamiento del gen *ROS1* en aproximadamente el 2% de los pacientes con NSCLC, y se ha descrito la actividad clínica usando crizotinib en este subgrupo de pacientes. Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, Massion PP, Siwak-Tapp C, González A, Fang R, Mark EJ, Batten JM, Chen H, Wilner KD, Kwak EL, Clark JW, Carbone DP, Ji H, Engelman JA, Mino-Kenudson M, Pao W, Iafrate AJ. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol.* 2012 Mar 10; 30 (8): 863-70. Shaw AT, Camidge, Engelman JA, Solomon BJ, Kwak EL, Clark JW, Salgia R, Shapiro, de Bang YJ, Tan W, Tye L, Wilner KD, Stephenson P, Varella-García M, Bergethon K, Iafrate AJ, Ou SH. Clinical activity of crizotinib in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) harboring ROS1 gene arrangement. *J Clin Oncol.* 2012 30 (supl.; resumen 7508). La fusión del gen *KIF5B* (la familia quinesina 5B) y el oncogén *RET* se ha descrito recientemente como una mutación impulsora en el 1-2% de los pacientes con NSCLC y son un foco como diana terapéutica. Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, Sakamoto H, Tsuta K, Furuta K, Shimada Y, Iwakawa R, Ogiwara H, Oike T, Enari M, Schetter AJ, Okayama H, Haugen A, Skaug V, Chiku S, Yamanaka I, Arai Y, Watanabe S, Sekine I, Ogawa S, Harris CC, Tsuda H, Yoshida T, Yokota J, Shibata T. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nat Med.* 2012 Feb 12; 18 (3): 375-7. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, Asaka R, Hamanaka W, Ninomiya H, Uehara H, Lim Choi Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Mano H, Ishikawa Y. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med.* 2012 Feb 12; 18 (3): 378-81. Lipson D, Capelletti M, Yelensky R, Otto G, Parker A, Jarosz M, Curran JA, Balasubramanian S, Bloom T, Brennan KW, Donahue A, SR Downing, Frampton GM, García L, Juhn F, Mitchell KC, White E, White J, Zwirko Z, Peretz, T, H Nechushtan, Soussan-Gutman L, Kim J, H Sasaki, Kim HR, Park Si, Ercan D, Sheehan CE, Ross JS, Cronin MT, Janne PA, Stephens PJ. Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. *Nat Med.* 2012 Feb 12; 18 (3): 382-4. Por lo tanto, cada vez es más importante identificar los genes impulsores clave en NSCLC y desarrollar terapias para cada subconjunto genómico de pacientes.

50 **Características de la invención**

**[0003]** Estas y otras necesidades se satisfacen por la presente invención que está dirigida a un procedimiento para el tratamiento de adenocarcinoma de pulmón usando un inhibidor de MET, VEGFR, y RET. El procedimiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que modula MET, VEGFR y RET a un paciente en necesidad de dicho tratamiento. En una realización, el adenocarcinoma de pulmón es el cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC). Más particularmente, el adenocarcinoma de pulmón es más frecuentemente NSCLC positivo en la fusión *KIF5B-RET* y otras fusiones de RET conocidas incluyendo CCDC6, NCOA4, y TRIM33, y otras fusiones de RET en el cromosoma 10.

**[0004]** En un aspecto, la presente invención está dirigida a un procedimiento para el tratamiento de NSCLC en un paciente en necesidad de tal tratamiento, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que modula de forma simultánea MET, VEGFR, y RET al paciente.

**[0005]** En una realización de este y otros aspectos, el inhibidor de MET/VEGFR/RET de acción dual es un compuesto de Fórmula I

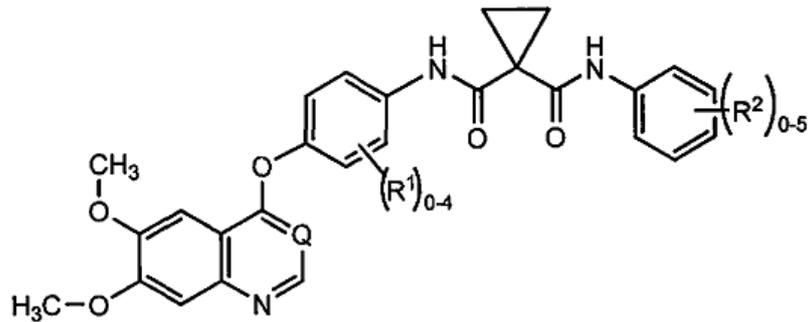


15 **I**

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

20 R<sup>1</sup> es halo;  
 R<sup>2</sup> es halo;  
 R<sup>3</sup> es alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>);  
 R<sup>4</sup> es alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); y  
 Q es CH o N.

25 **[0006]** En otra realización, el compuesto de fórmula I es un compuesto de Fórmula Ia

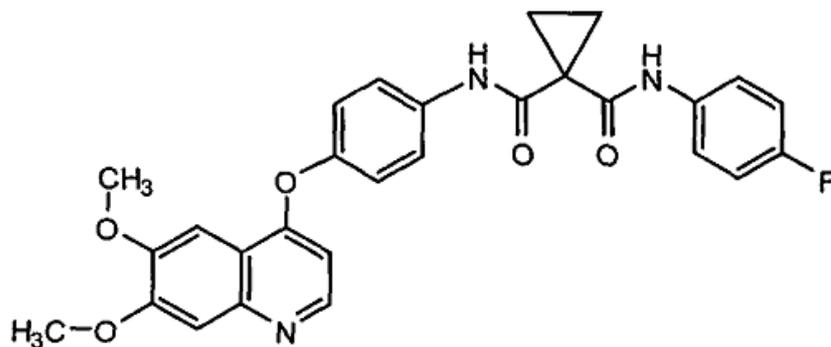


40 **Fórmula Ia**

45 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

R<sup>1</sup> es halo;  
 R<sup>2</sup> es halo; y  
 Q es CH o N.

50 **[0007]** En otra realización, el compuesto de fórmula I es el compuesto 1:



65 **Compuesto 1**

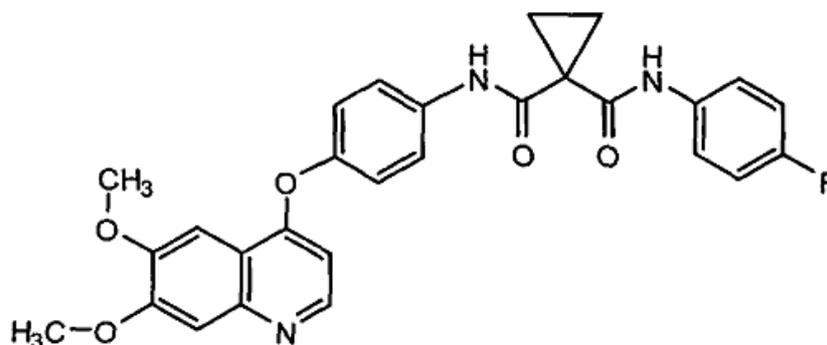
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El compuesto 1 se conoce como N-(4-{{6,7-bis (metiloxi)quinolin-4-il}oxi} fenil)-N'-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida y por el nombre Cabozantinib.

5 [0008] El compuesto 1 es un potente inhibidor de c-MET, RET y VEGFR2. Yakes FM, Chen J, Tan J, Yamaguchi K, Shi Y, Yu P, Qian F, Chu F, Bentzien F, Cancilla B, Orf J, Usted A, Laird AD, Engst S, Lee L, Lesch J, Chou YC, Joly AH. Cabozantinib (XL184), a novel MET and VEGFR2 inhibitor, simultaneously supresses metástasis, angiogenesis and tumor growth. *Mol Ther Cancer*. 2011 Dec; 10 (12): 2298-308. En estudios preclínicos, la inhibición de la actividad de la quinasa mediada por el compuesto 1 produjo una regresión rápida y robusta de la vasculatura tumoral, invasión tumoral y metástasis y supervivencia prolongada. Sennino B. Inhibition of tumor invasiveness by c-MET/VEGFR blockade. Presentado en: Gordon Research Conference: Angiogenesis; 2-7 de agosto de 2009; Newport, RI. Usted WK, Falcon B, Hashizume H et al. Exaggerated regression of blood vessels, hipoxia, and apoptosis in tumors after c-MET and VEGFR inhibition. *Am J Pathol*, presentado.

15 [0009] En otra realización, el compuesto de Fórmula I, la, o el Compuesto 1 se administran como una composición farmacéutica que comprende un aditivo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

20 [0010] En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para detectar, diagnosticar y tratar NSCLC positivo de la fusión *KIF5B-RET*, y otras fusiones de RET conocidas incluyendo *CCDC6*, *NCOA4*, y *TRIM33*, y y otras fusiones de RET en el cromosoma 10 (Ver *Cancer discovery*, Alexander Delong, Lu Wang, Adnan Hasanovic, et al, publicada en línea primero el 26 de marzo de 2013; DOI: 10.1158/2159-8290.CD-13-0035, en referencia a la American Association for Cancer Research, junio de 2013) que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I o la sal de malato de un compuesto de Fórmula I u otra sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de Fórmula I, a un paciente en necesidad de tal tratamiento. En una realización específica, el Compuesto de Fórmula I es el Compuesto 1 o la sal de malato del Compuesto 1.

30 [0011] En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para el tratamiento de un adenocarcinoma de pulmón que es cáncer de pulmón no microcítico positivo en la fusión *KIF5B-RET* en un paciente en necesidad de tal tratamiento, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz del compuesto 1:



Compuesto 1

50 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

#### Breve descripción de las figuras

55 [0012] La figura 1A representa la inhibición de la fosforilación de RET in vivo en animales portadores de tumores TT que fueron administrados con una única dosis escalada del Compuesto 1 o el vehículo de agua.

La Figura 1B representa el efecto de la administración de una única dosis oral del Compuesto 1 (100 mg/kg) en ratones que llevan tumores TT sobre los niveles de fosforilación y RET, AKT y ERK total en lisados tumorales.

60 La figura 1C proporciona una cuantificación densitométrica de la duración de la inhibición de la fosforilación de RET frente a las concentraciones plasmáticas de Compuesto 1, junto con las imágenes de transferencia Western representativas.

La Figura 2A muestra que el Compuesto 1 inhibe el crecimiento tumoral de xenoinjerto de TT que se correlaciona con la reducción en suero de calcitonina en ratones *nu/nu* que portan tumores TT a los que se les administró por vía oral vehículo de agua una vez al día (□) o cabozantinib a 3 mg/kg (▽), 10 mg/kg (○), 30 mg/kg (◆), o 60 mg/kg (◇) durante 21 días.

65 La Figura 2B muestra los niveles circulantes de calcitonina determinados en preparaciones de suero de la sangre

entera extraída después de las dosis indicadas finales.

La figura 3 representa la respuesta de un paciente con NCSLC con fusión positiva a *KIF5B-RET* al Compuesto 1. Se obtuvieron resultados de tomografía computarizada de tórax en la línea base (Figura 1A) y después de 9 semanas (Figura 1B) del Compuesto 1.

5 La Figura 4A representa la secuenciación por PCR y Sanger del genoma de *KIF5B-RET* a partir de muestras pre-tratamiento y post-tratamiento de tumores.

La Figura 4B representa la secuenciación por RT-PCR y Sanger de *KIF5B-RET* a partir de muestras pre-tratamiento y post-tratamiento de tumores.

La Figura 4C representa "break-apart FISH" de separación por rotura en el locus *RET* en células tumorales.

10

## Descripción detallada de la invención

### Abreviaturas y definiciones

15 **[0013]** Las siguientes abreviaturas y términos tienen los significados indicados en toda esta solicitud.

Abreviatura	Significado
Ac	Acetilo
Br	Amplio
°C	Grados Celsius
c-	Ciclo
CBZ	CarboBenZoxi = benciloxicarbonilo
d	Doblete
dd	Doblete de doblete
dt	Doblete de triplete
DCM	Diclorometano
DME	1,2-dimetoxietano
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	dimetil sulfóxido
EI	Ionización por impacto de electrones
G	Gramo(s)
h	Hora(s)
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
L	Litro(s)
M	Molar o molaridad
m	Multiplete
Mg	Miligramo(s)
MHz	Megahercio (frecuencia)
Min	Minuto(s)
ml	Millitro(s)
μl	Microlitro(s)
μM	Micromol(es) o micromolar
mM	Milimolar
mmol	Milimol(es)
Mol	Mol(es)
MS	Análisis por espectrometría de masas
N	Normal o normalidad
nM	Nanomolar
RMN	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear
q	Cuarteto
RT	Temperatura ambiente
s	Singulete
t o tr	Triplete
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía en capa fina

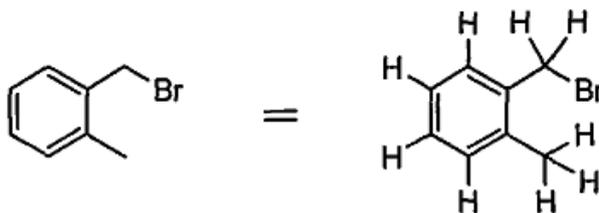
**[0014]** El símbolo "-" significa un enlace sencillo, "=" significa un doble enlace.

20 **[0015]** Cuando las estructuras químicas se representan o describen, a menos que se indique explícitamente lo contrario, todos los átomos de carbono se supone que tienen sustitución de hidrógeno para ajustarse a una valencia de cuatro. Por ejemplo, en la estructura del lado izquierdo del siguiente esquema, hay nueve hidrógenos implicados. Los nueve hidrógenos se representan en la estructura de la derecha. A veces, un átomo particular en

una estructura se describe en fórmula textual como que tiene un hidrógeno o hidrógenos como sustitución (hidrógeno expresamente definido), por ejemplo,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ . Se entiende por un experto en la técnica que las técnicas descriptivas mencionadas anteriormente son habituales en la técnica química para proporcionar brevedad y simplicidad a la descripción de estructuras por lo demás complejas.

5

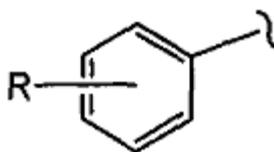
10



15

**[0016]** Si un grupo "R" se representa como "flotante" en un sistema de anillo, como por ejemplo en la fórmula:

20



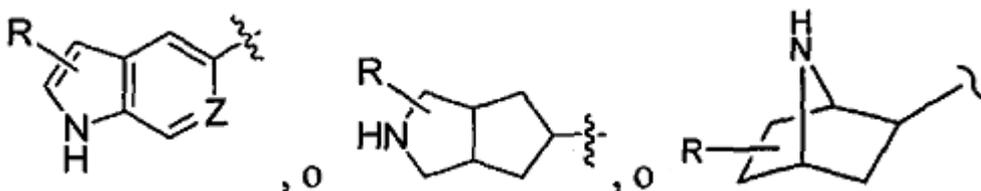
25

entonces, a menos que se defina lo contrario, un sustituyente "R" puede residir en cualquier átomo del sistema de anillos, en el supuesto de sustitución de un hidrógeno representado, implicado, o expresamente definido de uno de los átomos en el anillo, siempre que se forme una estructura estable.

30

**[0017]** Si un grupo "R" se representa como flotante en un sistema de anillos condensados, como por ejemplo en las fórmulas:

35

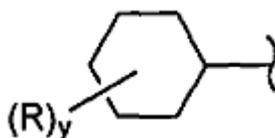


40

entonces, a menos que se defina lo contrario, un sustituyente "R" puede estar en cualquier átomo del sistema de anillos condensados, suponiendo el reemplazo de un hidrógeno representado (por ejemplo el  $-\text{NH}-$  en la fórmula anterior), un hidrógeno implicado (por ejemplo como en la fórmula anterior, donde los hidrógenos no se muestran pero se entiende que están presentes), o un hidrógeno expresamente definido (por ejemplo, cuando en la fórmula anterior, "Z" es igual a  $=\text{CH}-$ ) de uno de los átomos en el anillo, siempre que se forme una estructura estable. En el ejemplo representado, el grupo "R" puede estar en el anillo de 5 miembros o el anillo de 6 miembros del sistema de anillos condensados. Cuando un grupo "R" se representa como existente en un sistema de anillo que contiene carbonos saturados, como por ejemplo en la fórmula:

50

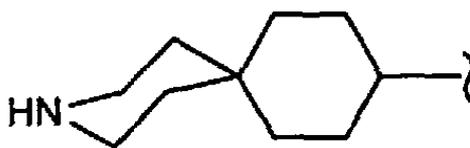
55



60

en la que, en este ejemplo, "y" puede ser más de uno, suponiendo que cada uno reemplaza un hidrógeno actualmente representado, implicado, o definido expresamente en el anillo; entonces, a menos que se defina lo contrario, cuando la estructura resultante es estable, dos "R" pueden estar en el mismo carbono. Un ejemplo simple es cuando R es un grupo metilo; no puede existir un dimetilo geminal en un carbono del anillo representado (un carbono "anular"). En otro ejemplo, dos R' están en el mismo carbono, incluyendo ese carbono, pueden formar un anillo, creando de este modo una estructura de anillo espirocíclico (un grupo "espirociclilo") con el anillo representado como por ejemplo en la fórmula:

65



5

**[0018]** "Halógeno" o "halo" se refieren a flúor, cloro, bromo o yodo.

**[0019]** "KIF5B" puede referirse a la proteína KIF5B o el gen de KIF5B. La proteína KIF5B, que también se llama cadena pesada de Kinesina-1, es una proteína codificada por el gen de KIF5B. La proteína KIF5B se puede derivar de un mamífero, tal como un ser humano. El gen de KIF5B humano que codifica la proteína KIF5B humana se localiza en el cromosoma 10 (10q11.22) y contiene 26 exones. KIF5B se describe adicionalmente en este documento.

**[0020]** "Proteína o gen de fusión KIF5B-RET" se refiere a una proteína de fusión que incluye un dominio N-terminal de una pareja de fusión, tal como KIF5B y el dominio C-terminal de la proteína RET. El dominio N-terminal de una pareja de fusión puede estar situado en N-terminal de la proteína de fusión, y el dominio C-terminal de la proteína RET puede estar situada en C-terminal de la proteína de fusión. La pareja de fusión puede ser un dominio N-terminal de la proteína KIF5B, que se coloca en N-terminal de la proteína de fusión. En este caso, la proteína de fusión puede representarse como proteína KIF5B-RET que incluye el dominio N-terminal de la proteína KIF5B en N-terminal y el dominio C-terminal de la proteína RET en C-terminal. Otra realización proporciona un gen de fusión que codifica la proteína de fusión, donde un gen que codifica el dominio N-terminal de la pareja de fusión se sitúa en el extremo 5' y un gen que codifica el dominio C-terminal de la proteína RET se sitúa en el extremo 3'.

**[0021]** "Paciente" para los fines de la presente invención incluye seres humanos y otros animales, particularmente mamíferos, y otros organismos. Así, los procedimientos son aplicables tanto a la terapia humana como a aplicaciones veterinarias. En otra realización, el paciente es un mamífero, y en otra realización el paciente es humano.

**[0022]** "Sal farmacéuticamente aceptable" de un compuesto significa una sal que es farmacéuticamente aceptable y que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto parental. Se entiende que las sales farmacéuticamente aceptables no son tóxicas. Información adicional sobre sales farmacéuticamente aceptables adecuadas se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17<sup>a</sup> ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, o SM Berge, et al., "Pharmaceutical Salts," J. Pharm. Sci, 1977; 66: 1-19.

**[0023]** Los ejemplos de sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares; así como ácidos orgánicos, tales como ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, málico ácido, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etanodisulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 4-clorobencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-toluenosulfónico, ácido alcanforsulfónico, ácido glucoheptónico, 4,4'-metilenobis-(ácido 3-hidroxi-2-eno-1-carboxílico), ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido terc-butilacético, ácido lauril sulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico, ácido p-toluenosulfónico, y ácido salicílico y similares.

**[0024]** "Profármaco" se refiere a compuestos que se transforman (típicamente rápidamente) in vivo para producir el compuesto parental de las fórmulas anteriores, por ejemplo, mediante hidrólisis en sangre. Los ejemplos más comunes incluyen, pero no se limitan a, formas de éster y amida de un compuesto que tiene una forma activa que porta un resto de ácido carboxílico. Los ejemplos de ésteres farmacéuticamente aceptables de los compuestos de esta invención incluyen, pero no se limitan a, ésteres de alquilo (por ejemplo con entre aproximadamente uno y aproximadamente seis carbonos), el grupo alquilo es una cadena lineal o ramificada. Los ésteres aceptables también incluyen ésteres de cicloalquilo y ésteres de arilalquilo, tales como, pero no limitados a, bencilo. Los ejemplos de amidas farmacéuticamente aceptables de los compuestos de esta invención incluyen, pero no se limitan a, amidas primarias, y alquilamidas secundarias y terciarias (por ejemplo con entre aproximadamente uno y aproximadamente seis carbonos). Las amidas y ésteres de los compuestos de la presente invención se pueden preparar de acuerdo con procedimientos convencionales. Una discusión a fondo de profármacos se proporciona en T. Higuchi y V. Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems," Vol. 14 de la ACS Symposium Series, y en Bioreversible Carriers in Drug Design, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association y Pergamon Press, 1987.

**[0025]** "RET" o la "proteína RET" es un receptor tirosina quinasa transmembrana, y se describe adicionalmente en este documento.

**[0026]** "Cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad de un compuesto de la invención que cuando se administra a un paciente mejora un síntoma de la enfermedad. Una cantidad terapéuticamente eficaz pretende incluir

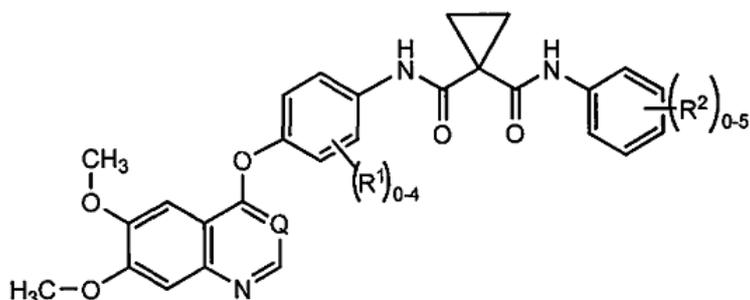
una cantidad de un compuesto solo o en combinación con otros ingredientes activos eficaces para modular c-Met, y/o VEGFR2, o para tratar o prevenir de forma efectiva el cáncer. La cantidad de un compuesto de la invención que constituye una "cantidad terapéuticamente eficaz" variará dependiendo del compuesto, el estado de la enfermedad y su gravedad, la edad del paciente a tratar, y similares. La cantidad terapéuticamente eficaz puede ser determinada por técnico teniendo en cuenta sus conocimientos y esta descripción.

**[0027]** "Tratar" o "tratamiento" de una enfermedad, trastorno, o síndrome, tal como se usa aquí, incluye (i) prevenir que se produzca la enfermedad, trastorno o síndrome en un ser humano, es decir, hacer que los síntomas clínicos de la enfermedad, trastorno o síndrome no se desarrollen en un animal que puede estar expuesto o predispuesto a la enfermedad, trastorno o síndrome, pero que todavía no experimenta o muestra síntomas de la enfermedad, trastorno o síndrome; (ii) invertir o inhibir la enfermedad, trastorno o síndrome, es decir, detener su desarrollo; y (iii) aliviar la enfermedad, trastorno o síndrome, es decir, provocar la regresión de la enfermedad, trastorno, o síndrome. Tal como se sabe en la técnica, los ajustes para la administración sistémica frente a la administración localizada, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, la interacción de fármacos y la gravedad de la afección pueden ser necesarios, y serán determinables con experiencia de rutina.

**[0028]** "Rendimiento" para cada una de las reacciones descritas en el presente documento se expresa como un porcentaje del rendimiento teórico.

## Realizaciones

**[0029]** En una realización, el compuesto de Fórmula I es el compuesto de Fórmula Ia:

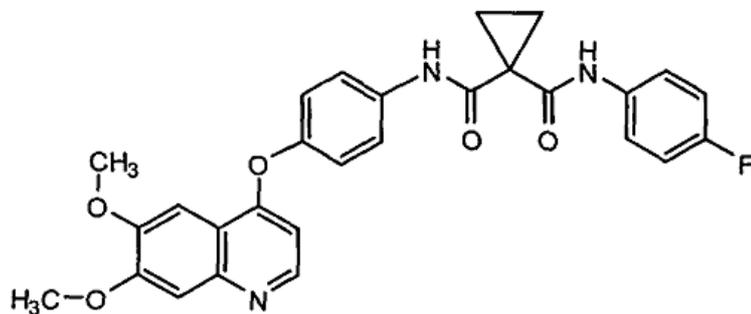


Fórmula Ia

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que:

R<sup>1</sup> es halo;  
R<sup>2</sup> es halo; y  
Q es CH o N.

**[0030]** En otra realización, el compuesto de fórmula I es el compuesto 1:



Compuesto 1

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Tal como se indicó anteriormente, el compuesto 1 se denomina aquí como N-(4-[[6,7-bis(metiloxi)quinolin-4-il]oxi]fenil)-N'-(4-fluorofenil) ciclopropano-1,1-dicarboxamida. WO2005/030140 da a conocer el compuesto 1 y describe cómo se fabrica (Ejemplos 12, 37, 38, y 48) y también da a conocer la actividad terapéutica de este compuesto para inhibir, regular y/o modular la transducción de señales de quinasas, (ensayos, tabla 4, entrada 289). El ejemplo 48 está en el párrafo [0353] en el documento WO 2005/030140.

- 5 [0031] En otras realizaciones, el compuesto de Fórmula I, la, o el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se administran como una composición farmacéutica, en el que la composición farmacéutica comprende adicionalmente un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, el Compuesto de Fórmula I es el Compuesto 1.
- 10 [0032] El compuesto de Fórmula I, Fórmula la y el Compuesto I, tal como se describen en el presente documento, incluye los compuestos citados, así como los isómeros individuales y mezclas de isómeros. En cada caso, el compuesto de Fórmula I incluye las sales farmacéuticamente aceptables, hidratos y/o solvatos de los compuestos citados y cualquiera de los isómeros individuales o mezcla de isómeros de los mismos.
- 15 [0033] En otras realizaciones, el compuesto de Fórmula I, la, o el Compuesto 1 pueden ser la sal de (L)-malato. La sal de malato del compuesto de fórmula I y del compuesto 1 se describen en los documentos PCT/US2010/021194 y USSN 61/325095.
- [0034] En otras realizaciones, el compuesto de fórmula I es la sal de (D)-malato.
- [0035] En otras realizaciones, el compuesto de fórmula la es la sal de malato.
- 20 [0036] En otras realizaciones, el compuesto de la fórmula la es la sal de (L)-malato.
- [0037] En otras realizaciones, el Compuesto 1 es la sal de (D)-malato.
- [0038] En otras realizaciones, el Compuesto 1 es la sal de malato.
- 25 [0039] En otras realizaciones, el Compuesto 1 es la sal de (L)-malato.
- [0040] En otra realización, la sal de malato está en forma cristalina N-1 o la forma N-2 de la sal de (L)-malato y/o la sal de (D)-malato del Compuesto 1 como se describe en la solicitud de patente Estados Unidos Ser. No. 61/325095. Véase también el documento WO2008/083319 para las propiedades de los enantiómeros cristalinos, incluyendo las formas cristalinas N-1 y/o N-2 de la sal de malato del compuesto 1. Los procedimientos de preparación y caracterización de tales formas se describen completamente en el documento PCT/US10/021194.
- 30 [0041] En otra realización, la invención está dirigida a un procedimiento para invertir o inhibir NSCLC, que comprende administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I en cualquiera de las realizaciones descritas en este documento. En una realización específica, el Compuesto de Fórmula I es el Compuesto 1.
- 35 [0042] En otra realización, la invención está dirigida a un procedimiento para invertir o inhibir NSCLC positiva de la fusión *KIF5B-RET*, que comprende administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I en cualquiera de las realizaciones descritas en este documento. En una realización específica, el Compuesto de Fórmula I es el Compuesto 1.
- 40 [0043] En otra realización, el compuesto de fórmula I se administra antes, simultáneamente, o después de uno o más de otros tratamientos. En otra realización, el compuesto de fórmula I se administra posterior a uno o más tratamientos. "Tratamiento" significa cualquiera de las opciones de tratamiento que están disponibles para el experto en la técnica, incluyendo la cirugía, agentes quimioterapéuticos, terapias hormonales, anticuerpos, inmunoterapias, terapia con yodo radiactivo, y la radiación. En particular, "tratamiento" significa otro agente quimioterapéutico o anticuerpo.
- 45 [0044] Por lo tanto, en otra realización, el compuesto de fórmula I se administra posterior al tratamiento con cisplatino y/o gemcitabina.
- [0045] En otra realización, el compuesto de fórmula I se administra posterior al tratamiento con docetaxel.
- 50 [0046] En otra realización, el compuesto de fórmula I se administra posterior al tratamiento con anticuerpos HER-2. En otra realización, el anticuerpo HER-2 es trastuzumab.
- [0047] En otra realización, el compuesto de fórmula I se administra posterior al tratamiento con cisplatino y/o gemcitabina y/o docetaxel.
- 55 [0048] En otra realización, el Compuesto de Fórmula I, la, o el Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos se administra por vía oral una vez al día como un comprimido o cápsula. En estas y otras realizaciones, el compuesto de Fórmula I es el Compuesto 1.
- 60 [0049] En otra realización, el Compuesto 1 se administra por vía oral como su base libre o la sal de malato como una cápsula o comprimido.
- 65

## ES 2 726 605 T3

- [0050]** En otra realización, el Compuesto 1 se administra por vía oral una vez al día como su base libre o como la sal de malato como una cápsula o comprimido que contiene hasta 100 mg de Compuesto 1.
- 5 **[0051]** En otra realización, el Compuesto 1 se administra por vía oral una vez al día como su base libre o como la sal de malato como una cápsula o comprimido que contiene 100 mg del Compuesto 1.
- [0052]** En otra realización, el Compuesto 1 se administra por vía oral una vez al día como su base libre o como la sal de malato como una cápsula o comprimido que contiene 95 mg del Compuesto 1.
- 10 **[0053]** En otra realización, el Compuesto 1 se administra por vía oral una vez al día como su base libre o como la sal de malato como una cápsula o comprimido que contiene 90 mg del Compuesto 1.
- [0054]** En otra realización, el Compuesto 1 se administra por vía oral una vez al día como su base libre o como la sal de malato como una cápsula o comprimido que contiene 85 mg del Compuesto 1.
- 15 **[0055]** En otra realización, el Compuesto 1 se administra por vía oral una vez al día como su base libre o como la sal de malato como una cápsula o comprimido que contiene 80 mg del Compuesto 1.
- [0056]** En otra realización, el Compuesto 1 se administra por vía oral una vez al día como su base libre o como la sal de malato como una cápsula o comprimido que contiene 75 mg del Compuesto 1.
- 20 **[0057]** En otra realización, el Compuesto 1 se administra por vía oral una vez al día como su base libre o como la sal de malato como una cápsula o comprimido que contiene 70 mg del Compuesto 1.
- 25 **[0058]** En otra realización, el Compuesto 1 se administra por vía oral una vez al día como su base libre o como la sal de malato como una cápsula o comprimido que contiene 65 mg del Compuesto 1.
- [0059]** En otra realización, el Compuesto 1 se administra por vía oral una vez al día como su base libre o como la sal de malato como una cápsula o comprimido que contiene 60 mg del Compuesto 1.
- 30 **[0060]** En otra realización, el Compuesto 1 se administra por vía oral una vez al día como su base libre o como la sal de malato como una cápsula o comprimido que contiene 55 mg del Compuesto 1.
- [0061]** En otra realización, el Compuesto 1 se administra por vía oral una vez al día como su base libre o como la sal de malato como una cápsula o comprimido que contiene 50 mg del Compuesto 1.
- 35 **[0062]** En otra realización, el Compuesto 1 se administra por vía oral una vez al día como su base libre o como la sal de malato como una cápsula o comprimido que contiene 45 mg del Compuesto 1.
- 40 **[0063]** En otra realización, el Compuesto 1 se administra por vía oral una vez al día como su base libre o como la sal de malato como una cápsula o comprimido que contiene 40 mg del Compuesto 1.
- [0064]** En otra realización, el Compuesto 1 se administra por vía oral una vez al día como su base libre o como la sal de malato como una cápsula o comprimido que contiene 30 mg del Compuesto 1.
- 45 **[0065]** En otra realización, el Compuesto 1 se administra por vía oral una vez al día como su base libre o como la sal de malato como una cápsula o comprimido que contiene 25 mg del Compuesto 1.
- [0066]** En otra realización, el Compuesto 1 se administra por vía oral una vez al día como su base libre o como la sal de malato como una cápsula o comprimido que contiene 20 mg del Compuesto 1.
- 50 **[0067]** En otra realización, el Compuesto 1 se administra por vía oral una vez al día como su base libre o como la sal de malato como una cápsula o comprimido que contiene 15 mg del Compuesto 1.
- 55 **[0068]** En otra realización, el Compuesto 1 se administra por vía oral una vez al día como su base libre o como la sal de malato como una cápsula o comprimido que contiene 10 mg del Compuesto 1.
- [0069]** En otra realización, el Compuesto 1 se administra por vía oral una vez al día como su base libre o como la sal de malato como una cápsula o comprimido que contiene 5 mg del Compuesto 1.
- 60 **[0070]** En otra realización, el Compuesto 1 se administra como su base libre o de sal de malato por vía oral una vez al día como un comprimido conforme a lo dispuesto en la tabla siguiente.

Ingrediente	(% p/p)
Compuesto 1	31,68

Celulosa microcristalina	38,85
Lactosa anhidra	19,42
Hidroxiopropil celulosa	3,00
Croscarmelosa sódica	3,00
<b>Intragranular total</b>	<b>95,95</b>
Dióxido de silicio, coloidal	0,30
Croscarmelosa sódica	3,00
Estearato de magnesio	0,75
<b>Total</b>	<b>100,00</b>

[0071] En otra realización, el Compuesto 1 se administra por vía oral como su base libre o la sal de malato una vez al día como un comprimido conforme a lo dispuesto en la tabla siguiente.

<b>Ingrediente</b>	<b>(% p/p)</b>
Compuesto 1	25,0-33,3
Celulosa microcristalina	c.s.
Hidroxiopropil celulosa	3
Poloxámero	0-3
Croscarmelosa sódica	6,0
Dióxido de silicio, coloidal	0,5
Estearato de magnesio	0,5-1,0
Total	100

5

[0072] En otra realización, el Compuesto 1 se administra por vía oral como su base libre o la sal de malato una vez al día como un comprimido conforme a lo dispuesto en la tabla siguiente.

<b>Ingrediente</b>	<b>cantidad teórica (mg/dosis unitaria)</b>
Compuesto 1	100,0
Celulosa microcristalina PH-102	155,4
Lactosa anhidra 60M	77,7
Hidroxiopropil celulosa, EXF	12,0
Croscarmelosa sódica	24
Dióxido de silicio coloidal	1,2
Estearato de magnesio (no bovino)	3,0
Opadry amarillo	16,0
<b>Total</b>	<b>416</b>

10 [0073] Cualquiera de las formulaciones de comprimidos proporcionadas anteriormente se puede ajustar de acuerdo con la dosis de compuesto 1 deseada. Por lo tanto, la cantidad de cada uno de los ingredientes de la formulación puede ajustarse proporcionalmente para proporcionar una formulación de comprimido que contiene diversas cantidades de Compuesto 1 según lo previsto en los párrafos anteriores. En otra realización, las formulaciones pueden contener 20, 40, 60, o 80 mg de Compuesto 1.

15 [0074] En estas y otras realizaciones, la invención proporciona un procedimiento para inhibir o invertir el progreso del crecimiento celular anormal en un mamífero, que comprende administrar el Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el crecimiento celular anormal es cáncer mediado por *KIF5B-RET*. En una realización, el cáncer es adenocarcinoma de pulmón. En otra, el adenocarcinoma de pulmón es el cáncer de pulmón no microcítico. En otra, el adenocarcinoma de pulmón es cáncer de pulmón no microcítico positivo de la fusión *KIF5B-RET*. En otra realización, el Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra como una composición farmacéutica que comprende el Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos un portador farmacéuticamente aceptable. En otra realización, el compuesto de fórmula I se administra después de otra forma de tratamiento. En otra realización, el Compuesto 1 se administra después de tratamiento con cisplatino y/o gemcitabina. En otra realización, el Compuesto 1 se administra después del tratamiento con docetaxel. En otra realización, el Compuesto 1 se administra después del tratamiento con cisplatino y/o gemcitabina y/o docetaxel.

### Administración

30 [0075] La administración del compuesto de Fórmula I, Fórmula Ia, o el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en forma pura o en una composición farmacéutica apropiada, puede llevarse a cabo a través de cualquiera de los modos aceptados de administración o agentes para atender a utilidades similares. Así, la administración puede ser, por ejemplo, por vía oral, nasal, parenteral (intravenosa, intramuscular o subcutánea),  
35 tópica, transdérmica, intravaginal, intravesical, intracisternal, o rectal, en forma de semisólido, polvo sólido, liofilizado,

o formas de dosificación líquidas, tales como por ejemplo, dosis en comprimidos, supositorios, píldoras, gelatina elástica blanda y dura (que puede ser en cápsulas o comprimidos), polvos, soluciones, suspensiones, o aerosoles, o similares, específicamente en formas de dosificación unitaria adecuadas para la administración simple de dosis precisas.

5 [0076] Las composiciones incluirán un portador o excipiente farmacéutico convencional y un compuesto de Fórmula I como el/un agente activo, y, además, pueden incluir portadores y adyuvantes, etc.

10 [0077] Los adyuvantes incluyen agentes conservantes, humectantes, de suspensión, edulcorantes, aromatizantes, perfumantes, emulsionantes, y dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos se puede asegurar mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, cloruro de sodio, y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede ser provocada por el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

15 [0078] Si se desea, una composición farmacéutica del compuesto de Fórmula I también puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH, antioxidantes, y similares, tales como, por ejemplo, ácido cítrico, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, hidroxitolueno butilado, etc.

20 [0079] La elección de la composición depende de varios factores, tales como el modo de administración del fármaco (por ejemplo, para la administración oral, las composiciones en forma de comprimidos, píldoras o cápsulas) y la biodisponibilidad de la sustancia fármaco. Recientemente, se han desarrollado composiciones farmacéuticas especialmente para fármacos que muestran una pobre biodisponibilidad basado en el principio de que la biodisponibilidad puede aumentar incrementando el área superficial, es decir, disminuyendo el tamaño de partícula. Por ejemplo, la patente de los Estados Unidos. No. 4.107.288 describe una composición farmacéutica que tiene partículas en el intervalo de tamaño de 10 a 1.000 nm en que el material activo se soporta en una matriz reticulada de macromoléculas. La patente de Estados Unidos. No. 5.145.684 describe la producción de una composición farmacéutica en la que la sustancia de fármaco se pulveriza en nanopartículas (tamaño medio de partícula de 400 nm) en presencia de un modificador de superficie y a continuación se dispersa en un medio líquido para dar una composición farmacéutica que presenta una biodisponibilidad notablemente alta.

25 [0080] Las composiciones adecuadas para inyección parenteral pueden comprender soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones estériles acuosas o no acuosas, fisiológicamente aceptables, y polvos estériles para reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles. Los ejemplos de portadores, diluyentes, disolventes o vehículos acuosos y no acuosos, incluyen agua, etanol, polioles (propilenglicol, polietilenglicol, glicerol, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (tales como aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

35 [0081] Una vía específica de administración es la oral utilizando un régimen de dosificación diaria conveniente que puede ajustarse de acuerdo con el grado de gravedad del estado patológico.

40 [0082] Las formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos, y gránulos. En tales formas de dosificación sólidas, el compuesto activo se mezcla con al menos un excipiente (o portador) inerte habitual, tal como citrato sódico o fosfato dicálcico o (a) cargas o extendedores, como por ejemplo, almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, (b) aglutinantes, como por ejemplo, derivados de celulosa, almidón, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma de acacia, (c) humectantes, como por ejemplo, glicerol, (d) agentes disgregantes, como por ejemplo, agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido alginico, croscarmelosa sódica, silicatos complejos y carbonato sódico, (e) retardadores de la solución, como por ejemplo parafina, (f) aceleradores de la absorción, como por ejemplo, compuestos de amonio cuaternario, (g) agentes humectantes, como por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, estearato de magnesio y similares (h) adsorbentes como por ejemplo, caolín y bentonita, y (i) lubricantes, como por ejemplo, talco, calcio estearato, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio, o mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, comprimidos, y píldoras, las formas de dosificación también pueden comprender agentes tamponantes.

50 [0083] Las formas farmacéuticas sólidas como las descritas anteriormente se pueden preparar con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros bien conocidos en la técnica. Pueden contener agentes opacificantes y también pueden ser de una composición tal que liberen el compuesto o compuestos activos en una cierta parte del tracto intestinal de una manera retardada. Ejemplos de composiciones incluidas que pueden usarse son sustancias poliméricas y ceras. Los compuestos activos también pueden estar en forma microencapsulada, si es apropiada, con uno o más de los excipientes mencionados anteriormente.

55 [0084] Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones, soluciones, suspensiones,

jarabes, y elixires farmacéuticamente aceptables. Tales formas de dosificación se preparan, por ejemplo, disolviendo, dispersando, etc., el compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y adyuvantes farmacéuticos opcionales en un portador, tal como, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol y similares; agentes solubilizantes y emulsionantes, como por ejemplo, alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida; aceites, en particular, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de germen de maíz, aceite de oliva, aceite de ricino y aceite de sésamo, glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán; o mezclas de estas sustancias, y similares, para formar de este modo una solución o suspensión.

**[0085]** Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión, como por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, ésteres de sorbitol y sorbitán con polioxietileno, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, o mezclas de estas sustancias, y similares.

**[0086]** Las composiciones para administración rectal son, por ejemplo, supositorios que pueden prepararse mezclando el compuesto de Fórmula I con, por ejemplo, excipientes o portadores no irritantes adecuados, tales como manteca de cacao, polietilenglicol o cera de supositorio, que son sólidos a temperaturas ordinarias, pero líquidos a la temperatura corporal y por lo tanto, se funden mientras están en una cavidad corporal adecuada y liberan el componente activo de las mismas.

**[0087]** Las formas de dosificación para la administración tópica del compuesto de Fórmula I incluyen pomadas, polvos, pulverizaciones, e inhalantes. El componente activo se mezcla en condiciones estériles con un portador fisiológicamente aceptable y cualquier conservante, tampones, o propelentes, según se pueda requerir. Las composiciones oftálmicas, pomadas oculares, polvos y soluciones también se contemplan dentro del alcance de esta descripción.

**[0088]** Los gases comprimidos pueden utilizarse para dispersar el compuesto de Fórmula I en forma de aerosol. Los gases inertes adecuados para este propósito son nitrógeno, dióxido de carbono, etc.

**[0089]** Generalmente, dependiendo del modo pretendido de administración, las composiciones farmacéuticamente aceptables contendrán de aproximadamente 1% a aproximadamente 99% en peso de un compuesto o compuestos de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y del 99% a 1 % en peso de un excipiente farmacéutico adecuado. En un ejemplo, la composición estará entre aproximadamente 5% y aproximadamente 75% en peso de un compuesto o compuestos de fórmula I, fórmula Ia, o el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, siendo el resto excipientes farmacéuticos adecuados.

**[0090]** Los procedimientos reales para preparar tales formas de dosificación son conocidos, o serán evidentes, para los expertos en esta técnica; por ejemplo, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 18a Ed., (Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990). La composición a administrar contendrá, en cualquier caso, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para el tratamiento de un estado patológico de acuerdo con las enseñanzas de esta descripción.

**[0091]** Los compuestos de esta descripción, o sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz que variará dependiendo de una variedad de factores, que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de acción del compuesto, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, modo y tiempo de administración, velocidad de excreción, combinación de fármacos, la gravedad de los estados patológicos particulares, y el huésped sometido a terapia. El compuesto de Fórmula I, Fórmula Ia, o el Compuesto 1, se puede administrar a un paciente a niveles de dosificación en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1000 mg por día. Para un adulto humano normal que tiene un peso corporal de aproximadamente 70 kilogramos, un ejemplo es una dosificación en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal por día. La dosificación específica usada, sin embargo, puede variar. Por ejemplo, la dosificación puede depender de un número de factores que incluyen los requisitos del paciente, la gravedad de la afección a tratar, y la actividad farmacológica del compuesto que se utiliza. La determinación de las dosificaciones óptimas para un paciente particular es bien conocida para un experto ordinario en la técnica.

**[0092]** En otras realizaciones, el compuesto de fórmula I, fórmula Ia, o el Compuesto 1, se puede administrar al paciente simultáneamente con otros tratamientos contra el cáncer. Tales tratamientos incluyen otros agentes quimioterapéuticos contra el cáncer, terapia de reemplazo hormonal, terapia de radiación o inmunoterapia, entre otros. La elección de otra terapia dependerá de un número de factores que incluyen la estabilidad metabólica y la duración de acción del compuesto, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, modo y tiempo de administración, velocidad de excreción, combinación de fármacos, la gravedad de los estados patológicos particulares, y del huésped sometido a terapia.

**[0093]** En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para detectar, diagnosticar y tratar una

enfermedad relacionada con fusiones RET, tales como NSCLC positiva en la fusión *KIF5B-RET*. Se describe con más detalle aquí procedimientos para la detección y diagnóstico de estos trastornos. El tratamiento de estos trastornos puede llevarse a cabo mejor con la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I o la sal de malato de un compuesto de Fórmula I u otra sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de Fórmula I, incluyendo, en una realización específica, el Compuesto de Fórmula I es el Compuesto 1 o la sal de malato del Compuesto 1 a un paciente que ha sido identificado o diagnosticado que tiene una enfermedad relacionada con fusiones RET, tales como NSCLC positiva en la fusión *KIF5B-RET*. A continuación, se describen fusiones de RET.

## 10 RET y KIF5B

15 **[0094]** La proteína RET, la proteína KIF5B, la fusión KIF5B-RET o, a veces llamados simplemente la "proteína y ácidos nucleicos de fusión", incluyendo los procedimientos de detección, diagnóstico, kits para la detección y el diagnóstico, procedimientos de cribado, procedimientos de tratamiento y prevención y diversas terapias para pacientes con cáncer de pulmón, procedimientos para medir la efectividad de los tratamientos y otros ingredientes farmacéuticos puede utilizarse en combinación con los diversos tratamientos, se describen a continuación.

20 **[0095]** La proteína RET es un receptor tirosina quinasa transmembrana. La RET consiste en región extracelular (que contiene dominios de tipo Cadherina), un dominio transmembrana y una región intracelular que contiene un dominio tirosina quinasa. Cuando la proteína RET se dimeriza mediante la unión de coreceptores y ligandos, tales como el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), se activa mediante autofosforilación y a continuación simula vías de señalización aguas abajo.

25 **[0096]** La proteína RET se puede derivar de un mamífero, tal como un humano. El gen de RET humano que codifica la proteína RET humana se localiza en el cromosoma 10 (10q11.2) y contiene 19-21 exones dependiendo de variantes. La proteína RET humana puede ser codificada por un gen de RET humano. El dominio C-terminal de la proteína RET puede incluir una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido del 12º exón al último exón (por ejemplo, 20º exón) del gen de RET. El dominio C-terminal de la proteína RET puede incluir al menos aproximadamente 300 aminoácidos consecutivos desde la posición de inicio del 12º exón. Por ejemplo, el dominio C-terminal de la proteína RET puede incluir de aproximadamente 300 a aproximadamente 450 aminoácidos consecutivos, de aproximadamente 300 a aproximadamente 420 aminoácidos consecutivos, o de aproximadamente 300 a aproximadamente 402 aminoácidos consecutivos desde la posición de inicio del 12º exón (por ejemplo, la 713ª posición) hacia C-terminal de la proteína RET (20 exones).

35 **[0097]** La proteína KIF5B, que también se llama como cadena pesada de Kinesina-1, es una proteína codificada por el gen de KIF5B. La proteína KIF5B puede derivar de un mamífero, tal como un humano. El gen de KIF5B humano que codifica la proteína KIF5B humana se localiza en el cromosoma 10 (10q11.22) y contiene 26 exones. El dominio N-terminal de la proteína KIF5B puede incluir una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido desde el primer exón al 16º exón, o desde el primer exón al 15º exón, o desde el primer exón al 23º exón del gen de KIF5B. El dominio N-terminal de la proteína KIF5B puede incluir al menos aproximadamente 329 aminoácidos consecutivos desde la 1ª posición (es decir, al menos una secuencia de aminoácidos desde la 1ª a la 329ª posición) de la proteína KIF5B. El dominio N-terminal de la proteína KIF5B puede incluir además al menos dos dominios en espiral enrollados que se inician desde el aminoácido de la 329ª posición de la proteína KIF5B. Por ejemplo, el dominio de dos espirales enrolladas incluido adicionalmente puede tener una secuencia de aminoácidos de la 329ª a 638ª posición de la proteína KIF5B. El dominio N-terminal de la proteína KIF5B puede incluir de aproximadamente 329 a 900 aminoácidos consecutivos, de aproximadamente 329 a 700 aminoácidos consecutivos, de aproximadamente 329 a 650 aminoácidos consecutivos, o de aproximadamente 329 a 638 aminoácidos consecutivos desde la 1ª posición de la proteína KIF5B.

40 **[0098]** La fusión KIF5B-RET es un reordenamiento cromosómico implicado en con la inversión o translocación en el cromosoma 10. Se detecta la proteína de fusión y se valida utilizando diversos procedimientos conocidos para un experto en la técnica y o como se describe en el presente documento. Una composición de Fórmula I se describe entonces para prevenir o tratar un cáncer de pulmón, que comprende al menos un inhibidor contra la proteína de fusión, al menos un inhibidor contra el gen de fusión que codifica la proteína de fusión, al menos un inhibidor contra un gen que codifica RET, o una combinación de los mismos, como un ingrediente activo.

45 **[0099]** En la proteína de fusión, la fusión o región de fusión pueden producirse entre diferentes exones del gen de KIF5B y el gen de RET. Muchas fusiones son conocidas para un experto en la técnica. Ejemplos de tales fusiones incluyen el 20º o 16º exón del gen de KIF5B y el 12º exón del gen de RET, que se denomina como un punto de fusión o punto de interrupción. Otros puntos de fusión o puntos de interrupción de RET y KIF5B son conocidos. El término "una región de fusión" puede referirse a un fragmento de polinucleótido (aproximadamente -30 nucleótidos) o fragmento de polipéptido (aproximadamente -30 aminoácidos) alrededor del punto de fusión.

50 **[0100]** En otras variantes de la proteína de fusión se describen cualquiera de los siguientes: cuando el dominio N-terminal de la proteína KIF5B consiste esencialmente en al menos aproximadamente 329 aminoácidos consecutivos desde la 1ª posición de la proteína KIF5B como se describe por NCBI. La proteína de fusión en la que el dominio N-

terminal de la proteína KIF5B comprende al menos dos dominios en espiral enrollados de KIF5B que comienza a partir del aminoácido de la 329ª posición de la proteína KIF5B. La proteína de fusión en la que el dominio N-terminal 20 de la proteína KIF5B consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido desde el primer exón al 16º exón, o desde el primer exón al 15º exón, o desde el primer exón al 23º exón del polinucleótido tal como se describe por NCBI. Otras fusiones de RET conocidos en el cromosoma 10 incluyen KIF5B en los exones 15, 16, 22, 23, 24, todas con el exón 12 de RET, y KIF5B en el exón 24 con exón 11 y el exón 8 de RET. CCDC6 en el exón 1 y RET en el exón 12; NCOA4 en el exón 6 y RET en el exón 12 y TRIM33 en el exón 14 con RET en el exón 12; todo en el cromosoma 10 son fusiones de RET conocidas. TRIM33 en el exón 14 con RET en el exón 12 están implicados en cáncer de pulmón y los cánceres de este tipo son conocidos por responder bien a la administración de cabozantinib. Véase, Cancer discovery, Alexander Delong, Lu Wang, Adnan Hasanovic, et al, publicada OnlineFirst el 26 de marzo de 2013.; DOI: 10.1158/2159-8290.CD-13-0035, en referencia a la Asociación Americana para la Investigación del Cáncer, junio de 2013.

**[0101]** En una realización, la proteína de fusión en la que el dominio C-terminal de la proteína RET consiste esencialmente en aproximadamente 300 a 450 aminoácidos consecutivos a partir de un aminoácido que corresponde a la posición de inicio del 12º exón de la proteína de fusión y a continuación hacia C-terminal de la proteína RET.

**[0102]** Como se usa en el presente documento, el número de exón está numerado de acuerdo con el número de exón asignado por NCBI. La proteína de fusión KIF5B-RET puede tener cualquiera de las secuencias de aminoácidos identificadas como tal por el NCBI. Las secuencias de nucleótidos de moléculas de ADN y las secuencias de aminoácidos de las proteínas codificadas por las moléculas de ADN pueden ser determinadas por un secuenciador de ADN automatizado o un secuenciador de péptidos automatizado. Las secuencias (de nucleótidos o aminoácidos) determinadas por dichos medios secuenciadores automatizados pueden incluir error parcial en comparación con secuencias reales. Generalmente las secuencias determinadas mediante secuenciación automatizada pueden tener una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 99%, o al menos aproximadamente 99,9% en comparación con secuencias reales. Por lo tanto, la proteína de fusión, el gen de fusión o de la región de fusión pueden tener una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 99%, o al menos aproximadamente 99,9 % en comparación con las secuencias de identificadas como tales por el NCBI.

**[0103]** La proteína de fusión, en algunas realizaciones, puede consistir en 638 residuos N-terminales de KIF5B y 402 residuos C-terminal de RET. El gen de fusión tiene un dominio de proteína tirosina quinasa junto con un dominio de espiral enrollada. El dominio de espiral enrollada induce la homodimerización que activará el dominio de la proteína tirosina quinasa oncogénica por auto-fosforilación. KIF5B es una proteína motora a base de microtúbulos, expresada de forma ubicua debido a su promotor activo y que participa en el transporte de orgánulos en células eucariotas. Tomados en conjunto, el gen de fusión KIF5B-RET puede ser altamente expresado y a continuación dimerizado después de la traducción debido a KIF5B. A conyinuación, el dominio de la proteína tirosina quinasa RET dimerizado puede ser estimulada anormalmente, facilitando así la estimulación de una vía oncogénica.

**[0104]** Una vez que se detecta una fusión se conocerá como un gen de fusión de KIF5B-RET que codifica la proteína de fusión de KIF5B-RET. Un procedimiento para proporcionar información para el diagnóstico de un cáncer de pulmón, que comprende la etapa de detectar, en una muestra de ensayo obtenida de un sujeto, una fusión como se describe en el presente documento. El diagnóstico compararía un gen de fusión que codifica la proteína de fusión; y una sobreexpresión de RET en comparación con una muestra estándar de un individuo sin cáncer, en el que cuando se selecciona al menos un elemento y se detecta en la muestra de ensayo, permitiendo que el sujeto sea identificado como cualquiera o todos de los siguientes: un paciente de cáncer, un paciente de cáncer de pulmón, paciente de cáncer de pulmón NSCLC, paciente con cáncer NSCLC relacionado con fusión de RET, y/o paciente con cáncer NSCLC relacionado con fusión de KIF5B-RET.

**[0105]** La inversión del cromosoma 10 se puede detectar mediante el uso de un polinucleótido (una sonda) capaz de hibridarse con (unión complementaria a) la región de inversión en el cromosoma 10 y/o un par de cebadores capaces de detectar la inversión del cromosoma 10, por ejemplo, capaces de producir un fragmento de polinucleótido que tiene 100 a 200 nucleótidos consecutivos, incluyendo la región de inversión en el cromosoma 10. La proteína de fusión, el gen de fusión, y la región de fusión se describen en este documento. En una realización concreta, la proteína de fusión también puede detectarse mediante la detección de la presencia de la proteína de fusión o el gen de fusión o ARNm correspondiente al gen de fusión.

**[0106]** La presencia de la proteína de fusión puede detectarse en un ensayo general de que mide la interacción entre la proteína de fusión y un material (por ejemplo, un anticuerpo o un aptámero) que se unen específicamente a la proteína de fusión. El ensayo general puede ser inmunocromatografía, tinción inmunohistoquímica, ensayo inmunoenzimático unido a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayo enzimático (EIA), inmunoensayo por fluorescencia (FIA), inmunoensayo de luminiscencia (LIA), transferencia Western, FACS, y similares.

**[0107]** Además, la presencia del gen de fusión o el ARNm puede detectarse mediante un ensayo general, tal como PCR, FISH (hibridación fluorescente in situ), y similares, usando un polinucleótido capaz de hibridar con (unir complementariamente a) el gen de fusión o el ARNm. FISH se describe con más detalle a continuación. El gen de fusión se puede detectar y/o validar mediante el uso de las técnicas de integración del transcriptoma completo (ARN) y/o secuenciación de ADN de todo el genoma a través de tecnologías de secuenciación masivamente paralelas. El polinucleótido capaz de hibridar con el gen de fusión o el ARNm puede ser un ARNsi, un oligonucleótido, sonda de ADN, o cebador de ADN, que puede detectar el gen de fusión o el ARNm mediante una hibridación directa con el gen o transcrito fusionado o truncado en la muestra de prueba.

**[0108]** Un ensayo de FISH se puede realizar usando uno o más conjuntos de sondas, las realizaciones se proporcionan, tales como: (1) Un primer conjunto de sonda, que es una primera sonda conjunto dirigidas a un sitio cromosómico que contiene el gen RET (primera sitio cromosómico) ; Se compone de una 1A sonda marcada con una primera sustancia fluorescente y un 1B sonda marcada con una segunda sustancia fluorescente; sonda 1A es complementaria a la primera región, que es la región 5' en el primer sitio cromosómico antes mencionado, la sonda 1B es complementaria a la segunda región, que está presente a una distancia de la primera región mencionada anteriormente y es la región 3' en el mencionada primera sitio cromosómico, y el punto de interrupción en el gen RET cuando el gen de fusión KIF5B-RET es producido por una translocación entre los genes KIF5B y RET se encuentra en la cola 3' de la primera región mencionada anteriormente, entre las regiones primera y segunda antes mencionadas , o en el cuento 5' de la segunda región antes mencionada; (2) El segundo conjunto de sonda, que es un segundo conjunto de sondas dirigidas a un sitio cromosómico que contiene el gen KIF5B (segundo sitio cromosómico); Se compone de una 2A sonda marcada con una primera sustancia fluorescente y un 2B sonda marcada con una segunda sustancia fluorescente; sonda 2A es complementaria a la primera región, que es la región 5' en el segundo sitio cromosómico antes mencionado, la sonda 2B es complementaria a la segunda región, que está presente a una distancia de la primera región mencionada anteriormente y es la región 3' en el mencionado segundo sitio cromosómico, y el punto de interrupción en el gen KIF5B cuando el gen de fusión KIF5B-RET es producido por una translocación entre los genes KIF5B y RET se encuentra en la cola 3' de la primera región mencionada anteriormente, entre las regiones primera y segunda antes mencionadas , o en el cuento 5' de la segunda región antes mencionada; (3) un tercer conjunto de sondas que consiste en la 2A sonda anteriormente mencionada y la 1B sonda antes mencionada; y (4) un cuarto conjunto de sondas que consiste en un 4A sonda que es complementaria al sitio cromosómico que contiene el gen RET (el tercer sitio cromosómico), y una 4B sonda que es complementaria al sitio cromosómico que contiene el gen KIF5B (la cuarta cromosómico sitio).

**[0109]** La longitud del primera sitio cromosómico anteriormente mencionado puede ser 0,5-2,0 Mb. La longitud del segunda sitio cromosómico antes mencionado puede ser 0,5-2,0 Mb. La longitud del tercer sitio cromosómico antes mencionado puede ser 0,5-2,0 Mb. La longitud del cuarto sitio cromosómico antes mencionado puede ser 0,5-2,0 Mb.

**[0110]** Un kit para detectar translocaciones entre KIF5B y genes RET puede incluir uno o más conjuntos de sondas. (1) Un primer conjunto de sonda incluye un 1A sonda marcada con una primera sustancia fluorescente y un 1B sonda marcada con una segunda sustancia fluorescente; Sonda 1A es complementaria a la primera región, que es la región 5' en el primer sitio cromosómico antes mencionado, la sonda 1B es complementaria a la segunda región, que está presente a una distancia de la primera región mencionada anteriormente y es la región 3' en el mencionada primera sitio cromosómico, y el punto de interrupción en el gen RET cuando el gen de fusión KIF5B-RET es producido por una translocación entre los genes KIF5B y RET se encuentra en la cola 3' de la primera región mencionada anteriormente, entre las regiones primera y segunda antes mencionadas , o en el cuento 5' de la segunda región antes mencionada; (2) El segundo conjunto de sonda, que es un segundo conjunto de sondas dirigidas a un sitio cromosómico que contiene el gen KIF5B (segundo sitio cromosómico); Se compone de una 2A sonda marcada con una primera sustancia fluorescente y un 2B sonda marcada con una segunda sustancia fluorescente; sonda 2A es complementaria a la primera región, que es la región 5' en el segundo sitio cromosómico antes mencionado, la sonda 2B es complementaria a la segunda región, que está presente a una distancia de la primera región mencionada anteriormente y es la región 3' en el mencionado segundo sitio cromosómico, y el punto de interrupción en el gen KIF5B cuando el gen de fusión KIF5B-RET es producido por una translocación entre los genes KIF5B y RET se encuentra en la cola 3' de la primera región mencionada anteriormente, entre las regiones primera y segunda antes mencionadas , o en el cuento 5' de la segunda región antes mencionada; (3) Un tercer conjunto de sondas que consiste en la 2A sonda anteriormente mencionada y la 1B sonda antes mencionada; y un cuarto conjunto de sondas que consiste en un 4A sonda que es complementaria al sitio cromosómico que contiene el gen RET (el tercer sitio cromosómico) y una 4B sonda que es complementaria al sitio cromosómico que contiene el gen KIF5B (el cuarto sitio cromosómico).

**[0111]** Un kit útil para la identificación de pacientes susceptibles a RET-KIF5B translocación incluye uno o más elementos seleccionados de un grupo que comprende una explicación del uso de las sondas, un contraste de manchas de ADN, un tampón para uso de hibridación, un encapsulante, y una corredera de control. El kit hace que sea posible implementar convenientemente y eficientemente el procedimiento de detección de esta invención. El kit puede incluir como elementos requeridos (ingredientes esenciales) la mencionada primera sonda conjunto, segundo conjunto de sondas, tercera sonda conjunto o cuarto conjunto de sondas. Dos o más tipos de conjuntos de sonda también pueden ser incluidos en el kit. Por ejemplo, el kit puede incorporar primer conjunto de sonda y tercera sonda

conjunto. Desde los detalles de cada sonda conjunto se han descrito anteriormente, no se repetirán aquí.

**[0112]** "Detección de la presencia o ausencia de un polinucleótido de fusión KIF5B-RET" en se puede realizar directamente usando ADN genómico que codifica el polipéptido de fusión antes mencionada o una transcripción de que el ADN del genoma, pero puede también llevarse a cabo indirectamente utilizando una traducción producto de esa transcripción (el polipéptido de fusión mencionado anteriormente).

**[0113]** Debido a que el ADN genómico que codifica el polipéptido de fusión está formada por inversión entre las regiones de 10p11.2 y 10q11.2, el fenómeno de la presente invención se puede detectar en el "detección de la presencia o ausencia de una fusión KIF5B-RET polinucleótido ". En esta detección de la inversión, por ejemplo, una división entre una región 5 'del lado de aguas arriba del dominio de quinasa región del gen RET y una región del lado 3' de codificación aguas abajo de esa región del gen RET de codificación se puede detectar, o una división entre la región que codifica la repetición cadherina y 5'-lado región aguas arriba de que la región codificadora del gen RET y la región codificante del dominio transmembrana y la región del lado 3 'corriente abajo de esa región del gen RET de codificación se puede detectar , o una división entre la región codificante de toda o parte de la región de dominio de bobina y 5'-lado en espiral aguas arriba de que la región codificadora del gen KIF5B y una región del lado 3 'corriente abajo de la región codificante del dominio espiral de la bobina de el gen KIF5B se puede detectar.

**[0114]** Las técnicas conocidas y disponibles para el experto en la materia se pueden utilizar en la "detección de la presencia o ausencia de un polinucleótido de fusión KIF5B-RET" en la presente invención. Si "DNA del genoma que codifica el polipéptido de fusión mencionado" es el objeto, por ejemplo, hibridación in situ (ISH) usando fluorescencia o similar, genoma PCR, secuenciación directa, transferencia de Southern o análisis de microarrays genoma puede ser utilizado. Si un "transcripción de la mencionada ADN genoma" es el objeto, por ejemplo, RT-PCR, secuenciación directa, transferencia Northern, transferencia de mancha, o cDNA microarray análisis puede ser utilizado.

**[0115]** El kit de esta invención también pueden incluir otros elementos. Ejemplos de estos otros elementos son la especificación para el uso de las sondas, una contratención de ADN tales como DAPI, un tampón de hibridación, un tampón de lavado, los disolventes, medios de montaje, portaobjetos de control, recipientes de reacción, y otros equipos. Especificaciones para fines de diagnóstico también pueden ser incluidos. Además, las especificaciones, etc., también pueden ser incluidos que muestran cómo la detección (identificación positiva) de la translocación KIF5B-RET en muestras de cromosomas de pacientes con cáncer se debe crear en estos pacientes usando un inhibidor de RET quinasa. Por otra parte, también se puede incluir un plan para la determinación del curso de tratamiento y una explicación de este plan.

**[0116]** Las sondas relativamente largo (aproximadamente 200 kb (sonda 1A) a aproximadamente 1370 kb (sonda 4B) se contemplan. Por lo tanto, la complementación entre las sondas y las secuencias diana no necesitan ser altamente restrictiva, en la medida en que la hibridación específica destinados en se logra esta invención. Un ejemplo de similitud entre secuencias diana es al menos 90%, preferiblemente al menos 95%, y más preferiblemente al menos 98%.

**[0117]** En el caso en el que se utilizan un primer conjunto de sondas y un segundo conjunto de sondas, las dos señales de fluorescencia se separan y detectan individualmente en muestras cromosómicas en las que se produjo la translocación entre el gen de KIF5B y el gen de RET; en muestras cromosómicas en las que no se produjo la translocación, típicamente se observa que las dos señales de fluorescencia están al lado una de la otra, o se observa una señal (amarillo) que es una combinación de las dos señales de fluorescencia. Así, la presencia o ausencia de una translocación entre el gen de KIF5B y el gen de RET se refleja en el patrón de la señal de fluorescencia. En consecuencia, una translocación entre el gen de KIF5B y el gen de RET se puede determinar a partir del patrón de la señal de fluorescencia.

**[0118]** El juicio alcanzado anteriormente es preferentemente y típicamente se ha hecho sobre la base de una comparación de un resultado con un control (muestra de ensayo). Aquí, el control es una muestra cromosómica derivada de un paciente con cáncer de pulmón no microcítico o una muestra cromosómico derivada de un paciente que presenta lesiones precancerosas. Además, las muestras cromosómicas de un paciente sin lesiones precancerosas, muestras cromosómicas de los pacientes que no tienen cáncer, o muestras cromosómicas tomadas de los sujetos normales y sanos también pueden ser utilizadas como control. Las muestras cromosómicas derivadas de cepas de células también se pueden utilizar como control.

**[0119]** Cuando el gen de fusión es un gen de fusión KIF5B-RET que codifica la proteína de fusión KIF5B-RET, el gen de fusión KIF5B-RET se puede detectar mediante el uso de un polinucleótido (una sonda) capaz de hibridarse con (se une complementariamente a) la región de fusión y/o un par de cebadores capaces de producir un fragmento de polinucleótido que tiene 100 a 200 nucleótidos consecutivos, incluyendo la región de fusión. Además, la proteína de fusión KIF5B-RET puede detectarse utilizando un anticuerpo o aptámero que se une específicamente a la región de fusión de la proteína de fusión KIF5B-RET.

**[0120]** Además, la detección se puede realizar mediante un ensayo de fusión que es una combinación de procedimiento de hibridación cromogénica in situ (CISH) y procedimiento de hibridación in situ con plata (SISH). El

"punto de fusión" en la presente memoria descriptiva se refiere a un punto donde una porción derivada de los respectivos genes de KIF5B se fusiona con una parte derivada del gen de RET.

**[0121]** El término "capaz de hibridarse con la región de fusión (o la región de inversión)" puede referirse a que tiene una secuencia complementaria o una identidad de secuencia que tiene la secuencia de al menos 90% con la de la región de fusión (o la región de inversión). Otra realización proporciona una composición para el diagnóstico de un cáncer, incluyendo uno o más seleccionados del grupo que consiste de un polinucleótido capaz de hibridar con la región de fusión, un par de cebadores capaz de producir un fragmento de polinucleótido que tiene consecutivos 100 a 200 nucleótidos, incluyendo la región de fusión. También un polinucleótido capaz de hibridar con la región de inversión en el cromosoma 10, un par de cebadores capaz de producir un fragmento de polinucleótido que tiene consecutivo 100 a 200 nucleótidos, incluyendo la región de inversión del cromosoma 10, y un anticuerpo o aptámero de unión a la región de fusión. Otra realización proporciona un uso de la proteína de fusión y/o el gen de fusión para el diagnóstico de un cáncer. El paciente puede ser cualquier mamífero, por ejemplo, un primate tal como un humano o un mono, un roedor tal como un ratón o una rata, en particular un humano. La muestra de ensayo, adecuado para uso en cualquier ensayo mencionados, puede ser una célula (por ejemplo, una célula de pulmón); un tejido (por ejemplo, un tejido de pulmón); fluido corporal (por ejemplo, sangre); ADN circulante tumor, las células tumorales circulantes. Las muestras pueden recogerse de cualquier manera conocida para un experto en la técnica, incluyendo la recolección de la biopsia quirúrgica de tumor, una biopsia de núcleo de tumor, un aspirado de aguja fina de tumor, derrame pleural, y otros procedimientos conocidos de células y tejidos que separan de los pacientes. Por ejemplo, un ensayo de FISH (descrito en el presente documento) se podría realizar en las células tumorales circulantes.

**[0122]** El paciente puede estar recibiendo tratamientos o tener planes para ser tratado con un inhibidor de quinasa. La muestra de ensayo puede incluir una célula derivada de una célula de cáncer humano o un extracto de la misma.

**[0123]** Otra realización proporciona un gen de fusión que codifica la proteína de fusión, donde un gen que codifica el dominio N-terminal de la pareja de fusión se sitúa en el extremo 5' y un gen que codifica el dominio C-terminal de la proteína RET se sitúa en el extremo 3'. En una realización concreta, cuando la proteína de fusión es la proteína KIF5B-RET, el gen de fusión puede ser representado como gen de KIF5B-RET, donde un gen que codifica el dominio N-terminal de KIF5B se sitúa en el extremo 5' y un gen que codifica el dominio C-terminal de la proteína RET se sitúa en el extremo 3'.

**[0124]** Otra realización proporciona un vector de expresión que incluye el gen de fusión y opcionalmente elementos de transcripción (por ejemplo, un promotor y similares) unidos operativamente al gen de fusión. Otra realización proporciona una célula transformante transformada con el vector de expresión.

**[0125]** Las muestras biológicas obtenidas en el curso del tratamiento o el diagnóstico (muestras de biopsia, etc.) a menudo están fijadas con formalina, pero en este caso, el uso de la hibridación in situ es ventajoso porque el genoma de ADN que es el objeto de detección es estable bajo fijación de formalina y porque la sensibilidad de detección es alta.

**[0126]** En la hibridación in situ, el ADN del genoma que codifica un polipéptido de fusión KIF5B-RET en la muestra biológica se puede detectar por hibridación del polinucleótido de (a) o (b) se indica a continuación que tiene una longitud de cadena de al menos 15 bases:

- (a) un polinucleótido que es al menos una sonda seleccionada del grupo que consiste en sondas que hibridan con un polinucleótido que codifica la proteína KIF5B y sondas que hibridan con un polinucleótido que codifica la proteína RET
- (b) un polinucleótido que es una sonda que se hibrida con un sitio de fusión de un polinucleótido que codifica la proteína KIF5B y un polinucleótido que codifica la proteína RET.

**[0127]** Sin embargo, la secuencia de ADN de un gen puede mutar en el mundo natural (es decir, no artificialmente). Por consiguiente, dichas variantes naturales también pueden ser el objeto de la presente invención (de manera similar en lo sucesivo).

**[0128]** El polinucleótido se indica en (a) de la presente invención puede ser cualquier, siempre que se pueda detectar la presencia de ADN del genoma que codifica el polipéptido de fusión KIF5B-RET mencionada en la muestra biológica mediante la hibridación a un polinucleótido que codifica la KIF5B proteína o un polinucleótido que codifica la proteína RET, que son las secuencias de bases diana de ese polinucleótido. El mismo es preferiblemente un polinucleótido que se indica en (a1) a (a4) a continuación.

(a1) Una combinación de un polinucleótido que se hibrida con la región codificante de parte o la totalidad del dominio espiral de la bobina y de la región 5' del lado de aguas arriba de la región del gen KIF5B codificación (también referido como "sonda KIF5B 5' 1" de aquí en adelante) y un polinucleótido que se hibrida con la región de codificación del dominio quinasa y la región del lado 3' corriente abajo de esa región del gen RET (también referido como "3' de la sonda RET 1" en lo sucesivo, la codificación.)

(a2) una combinación de un polinucleótido que se hibrida con la región 5' del lado corriente arriba de la región codificante del dominio quinasa del gen RET (también referido como "5' de la sonda RET 1" en lo sucesivo) y un

polinucleótido que se hibrida con la región de codificación de la quinasa dominio y la región del lado 3 'corriente abajo de esa región del gen RET codificación (también referido como "3' de la sonda RET 1" en adelante).

(a3) una combinación de un polinucleótido que se hibrida con la región de codificación de la repetición cadherina y región 5 'del lado de aguas arriba de la región del gen RET (también se refiere como "5' de la sonda RET 2" en lo sucesivo) y un polinucleótido que se hibrida con la región de codificación del dominio transmembrana y la región del lado 3 'corriente abajo de esa región de codificación del gen RET (también referido como "3' de la sonda RET 2" en adelante).

(a4) una combinación de un polinucleótido que se hibrida con la región codificante de toda o parte de la región de dominio de bobina y 5'-lado en espiral aguas arriba de esa región del gen KIF5B codificación (también referido como "5' sonda KIF5B 1" en lo sucesivo) y un polinucleótido que se hibrida con la región de codificación del dominio espiral de la bobina y de la región del lado 3' corriente abajo de esa región del gen KIF5B codificación (también referido como "3' de la sonda KIF5B 1" en lo sucesivo.)

**[0129]** La región (secuencia base de destino) a la que el polinucleótido de (a1) usado en la hibridación in situ se hibrida es preferiblemente una región dentro de 1.000.000 de bases desde el sitio de fusión del gen gen KIF5B y RET, por razones de especificidad a la diana secuencia de bases y la sensibilidad de detección, y la región a la que los polinucleótidos de (a2) a (a4) utilizados en en hibridan hibridación in situ es preferiblemente una región dentro de 1.000.000 de bases desde el punto de interrupción en el gen gen KIF5B o RET, por las mismas razones.

**[0130]** El polinucleótido se indica en (a) o (b) anterior se utiliza en la hibridación in situ es preferiblemente una colección compuesta de una pluralidad de tipos de polipéptido que puede cubrir la totalidad de las secuencias de bases objetivo mencionada, por razones de especificidad a la orientar secuencia de bases y la sensibilidad de detección. En este caso, la longitud de los polinucleótidos que constituyen la colección es al menos 15 bases, y preferiblemente de 100 a 1000 bases.

**[0131]** El polinucleótido se indica en (a) o (b) anterior se utiliza en la hibridación in situ se marca preferiblemente por colorante fluorescente o similar para la detección. Ejemplos de un colorante tal fluorescente incluyen DEAC, FITC, R6G, TexRed y Cy5, pero no se limitan a estos. Aparte de un colorante fluorescente, el polinucleótido mencionado anteriormente también puede ser marcado con un colorante (cromógeno), tales como DAB, o de plata y similares sobre la base de la deposición del metal enzimática.

**[0132]** En la hibridación in situ, si se utilizan 5' KIF1B sonda 1 y 3' de la sonda RET 1, o si se utilizan 5' de la sonda RET 1 y 3' RET sonda 1, o si 5' RET sonda 2 y 3' RET la sonda 2 se utilizan, o si se utilizan 5' de la sonda KIF1B 1 y 3' de la sonda KIF1B 1, se prefiere que estas sondas están marcadas con diferentes colorantes mutuamente. Cuando la hibridación in situ se realiza usando una combinación de sondas marcadas con diferentes colorantes de esta manera, cuando la señal producida por la etiqueta de 5' de la sonda KIF1B 1 (por ejemplo, fluorescencia) y la señal producida por la etiqueta de 3' de la sonda RET 1 se solapan, se puede determinar que el ADN del genoma que codifica se ha detectado un polipéptido de fusión KIF5B-RET. Por otro lado, cuando la señal producida por la etiqueta de 5' de la sonda RET 1 y la señal producida por la etiqueta de 3' de la sonda RET 1 están divididos, o la señal producida por la etiqueta de 5' de la sonda RET 2 y la señal de producida por la etiqueta de 3' de la sonda RET 2 están divididos, o la señal producida por la etiqueta de 5' KIF1B sonda 1 y la señal producida por la etiqueta de 3' de la sonda KIF1B 1 están divididos, se puede determinar que el ADN del genoma que codifica se ha detectado un polipéptido de fusión KIF5B-RET.

**[0133]** El etiquetado de polinucleótido puede ser realizado por una técnica conocida. Por ejemplo, una base de sustrato marcado con colorante fluorescente o similar por la traducción de nick o cebado aleatorio puede estar integrado en un polinucleótido, etiquetando con ello que polinucleótido. En la hibridación in situ, las condiciones utilizadas cuando hibridar el polinucleótido indicado en (a) o (b) anterior y el espécimen biológico antes mencionados se pueden variar dependiendo de varios factores tales como la longitud del polinucleótido relevante, pero un ejemplo de alta rigurosidad condiciones de hibridación es 0,2 x SSC, 65°C, y un ejemplo de condiciones de hibridación de baja rigurosidad es 2.0xSSC, 50°C. Tenga en cuenta que las condiciones de hibridación de la misma rigurosidad como las condiciones mencionadas anteriormente se pueden conseguir por un experto en la técnica la selección apropiada de las diversas condiciones tales como la concentración de sal (relación de dilución de SSC) y la temperatura, así como la concentración de tensioactivo (NP-40 , etc.), la concentración de formamida, y el pH.

**[0134]** Ejemplos de procedimientos para la detección de ADN del genoma que codifica un polipéptido de fusión KIF5B-RET usando el polinucleótido indicado en (a) o (b) por encima de otra de la mencionada hibridación in situ son transferencia de Southern, transferencia de Northern y transferencia de puntos. En estos procedimientos, el gen de fusión anteriormente mencionada se detecta mediante la hibridación del polinucleótido especificado en (a) o (b) anterior a una membrana sobre la que se ha transcrito un extracto de ácido nucleico obtenida a partir de la muestra biológica antes mencionados. Cuando se usa el polinucleótido de (a), se puede determinar que el ADN del genoma que codifica un polipéptido de fusión KIF5B-RET se ha detectado cuando un polipéptido que se hibrida a un polinucleótido que codifica la proteína KIF5B y un polipéptido que se hibrida con un polinucleótido que codifica la proteína RET reconoce la misma banda desarrollado sobre la membrana.

**[0135]** El análisis del genoma de microarrays y el análisis de microarrays de ADN son procedimientos adicionales

para la detección de ADN del genoma que codifica un polipéptido de fusión KIF5B-RET usando el polinucleótido de (b) anterior. En estos procedimientos, una matriz de polinucleótidos de (b) están fijados sobre un sustrato, y el ADN del genoma relevante se detecta poniendo la muestra biológica en contacto con los polinucleótidos de la matriz. En la PCR o la secuenciación, el polinucleótido de (c) que a continuación se puede utilizar para amplificar específicamente toda o parte de un polinucleótido de fusión KIF5B-RET, utilizando ADN (DNA del genoma, ADNc) o ARN preparado a partir de la muestra biológica como una plantilla. (c) un polinucleótido que es un par de cebadores diseñados para intercalar un sitio de fusión de un polinucleótido que codifica la proteína KIF5B y un polinucleótido que codifica la proteína RET. El "polinucleótido que es un par de cebadores" es un conjunto de cebadores de los cuales un cebador se hibrida con un polinucleótido que codifica la proteína KIF5B y el otro cebador hibrida con un polinucleótido que codifica la proteína RET en una secuencia de bases como el polinucleótido de fusión antes mencionada que sirve como un objetivo. La longitud de estos polinucleótidos es normalmente de 15 a 100 bases, y preferiblemente 17 a 30 bases.

**[0136]** A partir de los puntos de vista de la precisión y la sensibilidad de la detección por PCR, el polinucleótido declaró en (c) de la presente invención es preferiblemente una secuencia complementaria a la secuencia de bases del polinucleótido de fusión antes mencionada dentro de 5000 bases desde el sitio de fusión del polinucleótido que codifica la proteína KIF5B y el polinucleótido que codifica la proteína RET.

**[0137]** El "polinucleótido que es un par de cebadores" pueden ser diseñados apropiadamente mediante técnicas conocidas basadas en la secuencia de bases del polinucleótido de fusión KIF5B-RET que sirve como un objetivo. Ejemplos ventajosos de la "polinucleótido que es un par de cebadores" son conjuntos de cebadores constituidos por un cebador seleccionado del grupo que componen de KIF5B-RET-F1, KIF5B-int15-F1, KIF5B-int15-F2, KIF5B-ex16-F1, KIF5B-EX23-F1, KIF5B-EX24-F1, KIF5B-F-orf2438 y KIF5B-int15-F3.5, y un cebador seleccionado del grupo que consiste en KIF5B-RET-R1, RET-int1 1-R3, RET-INT7-R1, RET-int1 1-R0.5, RET-int1 1-R1, RET-INT7-R2 y RET-R-orf2364. Más preferiblemente, es KIF5B-RET-F1 y KIF5B-RET-R1, KIF5B-int15-F1 y KIF5B-RET-R1, KIF5B-int15-F2 y RET-int1 1-R3, KIF5B-ex16-F1 y KIF5B-RET-R1, KIF5B-EX23-F1 y KIF5B-RET-R1, o cebador KIF5B-EX24-F1 y el cebador RET-INT7-R1.

**[0138]** La invención proporciona, los procedimientos de: identificación, evaluación o la detección de una fusión KIF5B-RET; procedimientos de identificación, evaluación, evaluación y/o el tratamiento de un sujeto que tiene un cáncer, por ejemplo, un cáncer que tiene una fusión KIF5B-RET; moléculas aisladas KIF5B-RET de ácido nucleico, construcciones de ácido nucleico, células huésped que contienen las moléculas de ácido nucleico; polipéptidos KIF5B-RET purificadas y agentes de unión; reactivos de detección (por ejemplo, sondas, cebadores, anticuerpos, kits, capaz, por ejemplo, de la detección específica de un ácido nucleico KIF5B-RET o proteína); ensayos de cribado para identificar moléculas que interactúan con, por ejemplo, inhibir, fusiones 5'KIF5B-3'RET, por ejemplo, nuevos inhibidores de quinasa; así como ensayos y kits para la evaluación, identificación, evaluación y/o el tratamiento de un sujeto que tiene un cáncer, por ejemplo, un cáncer que tiene una fusión KIF5B-RET. Las composiciones y procedimientos identificados en el presente documento se pueden utilizar, por ejemplo, para identificar nuevos inhibidores de KIF5B-RET; para evaluar, identificar o seleccionar sujeto, por ejemplo, un paciente, que tiene un cáncer; y para tratar o prevenir un cáncer.

**[0139]** Moléculas de ácido nucleico de KIF5B-RET. En un aspecto, la invención presenta una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un aislado o purificado) molécula de ácido nucleico que incluye un fragmento de un gen KIF5B y un fragmento de un protooncogén RET. En una realización, la molécula de ácido nucleico incluye una fusión, por ejemplo, una fusión en marco, de un exón de KIF5B (por ejemplo, uno exones más que codifican un dominio motor de cinesina o un fragmento del mismo), y un exón de RET (por ejemplo, uno o más exones que codifican un dominio de quinasa RET tirosina o un fragmento del mismo).

**[0140]** En una realización, la molécula de ácido nucleico 5'KIF5B-3'RET comprende suficiente KIF5B y la secuencia de RET suficiente tal que la fusión 5'KIF5B-3'RET codificado tiene actividad quinasa, la actividad de por ejemplo, ha elevado, por ejemplo, actividad quinasa, en comparación con RET de tipo salvaje, por ejemplo, en una célula de un cáncer denominado en este documento. En una realización de la fusión 5'KIF5B-3'RET codificada comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, o 11 exones de KIF5B y al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, o 10, los exones RET. En una realización, el polipéptido de fusión 5'KIF5B-3'RET codificada incluye un dominio motor de cinesina, un dominio de espiral de la bobina, o un fragmento funcional del mismo, y un dominio de tirosina quinasa RET o un fragmento funcional de la misma.

**[0141]** En una realización, la molécula de ácido nucleico incluye una secuencia de nucleótidos que tiene una fusión en marco del exón 15 de KIF5B con el exón 12 de RET (por ejemplo, una secuencia dentro de una inversión pericéntrica 11MB en el cromosoma 10). En otras realizaciones, las moléculas de ácido nucleico incluye una secuencia de nucleótidos en la región de 32,316,376-32,316,416 del cromosoma 10 acoplado a (por ejemplo, yuxtapuesta a) nucleótidos en la región de los nucleótidos 43,611,042-43,611,118 del cromosoma 10. En otra realización, el ácido nucleico molécula incluye una secuencia de nucleótidos que incluye un punto de interrupción. Por ejemplo, la fusión KIF5B-RET puede incluir una fusión en el marco de al menos el exón 15 de KIF5B o un fragmento del mismo (por ejemplo, exones 1-15 de KIF5B o un fragmento del mismo) con al menos el exón 12 de RET o un fragmento mismo (por ejemplo, los exones 12-20 de RET o un fragmento del mismo). En

ciertas realizaciones, la fusión KIF5B-RET está en un extremo 5 'KIF5B a la configuración 3' RET. En una realización, la molécula de ácido nucleico incluye la secuencia de nucleótidos de los exones 1-15 del gen KIF5B, o un fragmento del mismo, o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma. En otra realización, la molécula de ácido nucleico incluye la secuencia de nucleótidos de los exones 12-20 del gen RET, o un fragmento del mismo, o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma.

**[0142]** En otras realizaciones, la molécula de ácido nucleico incluye una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de fusión KIF5B-RET que incluye un fragmento de un gen KIF5B y un fragmento de un protooncogén RET. En una realización, la secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido de fusión KIF5B-RET que incluye un dominio motor de cinesina o un fragmento funcional del mismo, y un dominio de tirosina quinasa RET o un fragmento funcional de la misma.

**[0143]** En otra realización, la molécula de ácido nucleico incluye una fusión KIF5B-RET que incluyen una unión de fusión entre el transcrito de RET y la transcripción KIF5B. En otra realización, la molécula de ácido nucleico incluye una fusión, por ejemplo, una fusión en marco, de al menos el exón 11 de RET o un fragmento del mismo (por ejemplo, exones 1-11 de RET o un fragmento del mismo), y al menos el exón 16 o un fragmento del mismo (por ejemplo, los exones 16-25 de KIF5B o un fragmento del mismo). En ciertas realizaciones, la fusión KIF5B-RET está en un RET 5 'a 3' de configuración KIF5B. En una realización, la molécula de ácido nucleico incluye los nucleótidos correspondientes a los exones 1-11 de un gen RET, o un fragmento del mismo, o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma.

**[0144]** En un aspecto relacionado, la invención presenta construcciones de ácido nucleico que incluyen las moléculas de ácido nucleico KIF5B-RET descritos en este documento. En ciertas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico están unidas operativamente a una nativa o una secuencia reguladora heteróloga. También se incluyen vectores y células huésped que incluyen las moléculas de ácido nucleico KIF5B-RET descritos en este documento, por ejemplo, vectores y células huésped adecuadas para la producción de las moléculas de ácidos nucleicos y polipéptidos descritos en el presente documento.

**[0145]** En otro aspecto, la invención presenta moléculas de ácido nucleico que reduce o inhibe la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica una fusión KIF5B-RET descrito en este documento. Ejemplos de tales moléculas de ácido nucleico incluyen, por ejemplo, moléculas antisentido, ribozimas, ARNi, moléculas de triple hélice que se hibridan con un ácido nucleico que codifica KIF5B-RET o de una región reguladora de la transcripción de KIF5B-RET, y los bloques o reduce la expresión de ARNm de KIF5B -RET.

**[0146]** La invención también ofrece una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, fragmento de ácido nucleico, adecuado como sonda, cebador, cebo o miembro de la biblioteca que incluye, flancos, se hibrida con, que son útiles para la identificación, o se basa lo contrario en, el KIF5B fusiones -RET descritos en este documento. En ciertas realizaciones, la molécula de sonda, cebador o cebo es un oligonucleótido que permite la captura, la detección o el aislamiento de una molécula de ácido nucleico de fusión KIF5B-RET descrito en este documento. El oligonucleótido puede comprender una secuencia de nucleótidos sustancialmente complementaria a un fragmento de las moléculas de ácido nucleico de fusión KIF5B-RET descritos en este documento. La identidad de secuencia entre el fragmento de ácido nucleico, por ejemplo, el oligonucleótido y la secuencia KIF5B-RET objetivo no tiene que ser exacta, siempre que las secuencias son suficientemente complementaria para permitir la captura, la detección o el aislamiento de la secuencia diana. En una realización, el fragmento de ácido nucleico es una sonda o cebador que incluye un oligonucleótido entre aproximadamente 5 y 25, por ejemplo, entre 10 y 20, o 10 y 15 nucleótidos de longitud. En otras realizaciones, el fragmento de ácido nucleico es un cebo que incluye un oligonucleótido entre aproximadamente 100 a 300 nucleótidos, 130 a 230 nucleótidos, 150 a 200 nucleótidos, 200 a 350, 350 a 950, 300 a 600, 500- 1000, 750- 2000, los nucleótidos 00 nucleótidos, de longitud y no necesariamente incluyen los ácidos nucleicos de fusión KIF5B-RET.

**[0147]** En una realización, el fragmento de ácido nucleico se puede utilizar para identificar o de captura, por ejemplo, por hibridación, una fusión KIF5B-RET. Por ejemplo, el fragmento de ácido nucleico puede ser una sonda, un cebador, para uso en la identificación o la captura, por ejemplo, por hibridación, una fusión KIF5B-RET descrito en este documento. En una realización, el fragmento de ácido nucleico puede ser útil para la identificación o la captura de un punto de interrupción KIF5B-RET .. 1. En una realización, el fragmento de ácido nucleico se hibrida con una secuencia de nucleótidos dentro de un reordenamiento cromosómico que crea una fusión en el marco del exón 15 de KIF5B con el exón 12 de RET (por ejemplo, una secuencia dentro de una inversión pericéntrica 11MB en el cromosoma 10). En una realización, el fragmento de ácido nucleico se hibrida con una secuencia de nucleótidos en la región de 32,316,376-32,316,416 del cromosoma 10 acoplado a (por ejemplo, yuxtapuesta a) nucleótidos en la región de los nucleótidos 43,611,042-43,611,118 del cromosoma 10.

**[0148]** Las sondas o cebadores descritos aquí se pueden utilizar, por ejemplo, para la detección por FISH o amplificación por PCR. En una realización ejemplar donde la detección se basa en PCR, la amplificación de la unión de fusión KIF5B-RET se puede realizar utilizando un cebador o un par de cebadores, por ejemplo, para amplificar una secuencia que flanquea las uniones de fusión KIF5B-RET descritas en el presente documento, por ejemplo, las mutaciones o la unión de un reordenamiento cromosómico descrito en este documento. En una realización, un par

de cebadores de oligonucleótidos aislados puede amplificar una región que contiene o es adyacente a una posición en la fusión KIF5B-RET. Por ejemplo, pueden diseñarse cebadores directos para hibridarse con una secuencia de nucleótidos dentro de la secuencia genómica o de ARNm de KIF5B.

5 **[0149]** El fragmento de ácido nucleico puede ser marcado de forma detectable con, por ejemplo, un radiomarcador, un marcador fluorescente, un marcador bioluminiscente, un marcador quimioluminiscente, un marcador enzimático, un marcador de parejas de unión, o puede incluir una etiqueta de afinidad; una etiqueta o identificador (por ejemplo, un adaptador, código de barras u otro identificador de secuencias).

10 **[0150]** Un procedimiento para determinar la presencia de una fusión KIF5B-RET que comprende: adquirir directamente el conocimiento de que una molécula de ácido nucleico o polipéptido de fusión KIF5B-RET está presente en una muestra de un sujeto. La muestra puede ser una muestra compuesta de fluido, células, tejido, por ejemplo, un tejido tumoral, puede incluir una muestra de ácido nucleico, una muestra de proteína, una biopsia de tumor o una célula de tumor circulante o ácido nucleico, que puede ser elegida de un cáncer de pulmón, incluyendo un NSCLC, un SCLC, un SCC, o una combinación de los mismos y un adenocarcinoma o un melanoma.

15 **[0151]** El procedimiento de detección de la fusión KIF5B-RET en una molécula de ácido nucleico, y mediante el uso de cualquiera de los procedimientos siguientes: ensayo de hibridación de ácidos nucleicos, ensayos basados en la amplificación, ensayo PCR-RFLP, PCR en tiempo real, secuenciación, análisis FISH, cariotipo espectral o MFISH, hibridación genómica comparativa), hibridación in situ, SSP, HPLC o genotipado por espectrometría de masas.

20 **[0152]** Se describe el procedimiento de detección de un polipéptido de fusión KIF5B-RET incluyendo el procedimiento de poner en contacto una muestra de proteína con un reactivo que se une específicamente a un polipéptido de fusión KIF5B-RET; y detectar la formación de un complejo del polipéptido de fusión KIF5B-RET y el reactivo. Los procedimientos de detección del polipéptido incluyen el uso de un reactivo marcado con un grupo detectable para facilitar la detección del reactivo unido y no unido, en el que el reactivo es una molécula de anticuerpo, en el que se evalúa el nivel o actividad de la fusión KIF5B-RET, en el que la fusión KIF5B-RET se detecta antes de iniciar, durante, o después de, un tratamiento en un sujeto, en el que la fusión KIF5B-RET se detecta en el momento del diagnóstico de un cáncer, en el que la fusión KIF5B-RET se detecta en un intervalo predeterminado, por ejemplo, un primer punto en el tiempo y al menos en un punto posterior en el tiempo.

25 **[0153]** También se incluyen las respuestas al tratamiento, específicamente cuando, en respuesta a una determinación de la presencia de la fusión KIF5B-RET, se usan uno o más de los siguientes: (1) estratificar una población de pacientes; (2) identificar o seleccionar el sujeto como probable o improbable para responder a un tratamiento; (3) seleccionar una opción de tratamiento; y/o (4) pronosticar el transcurso temporal de la enfermedad en el sujeto.

30 **[0154]** Una molécula de ácido nucleico aislada o purificada que codifica una fusión KIF5B-RET o un punto de ruptura que comprende un fragmento de la misma. Una molécula de ácido nucleico de KIF5B-RET aislada o purificada unido operativamente a una nativa o una secuencia reguladora heteróloga. Un vector aislado o purificado que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una fusión KIF5B-RET o un punto de ruptura que comprende un fragmento del mismo. Una célula huésped que comprende un vector. Una molécula de ácido nucleico que reduce específicamente o inhibe la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica una fusión KIF5B-RET, que puede ser seleccionado a partir de una molécula antisentido, ribozima, siRNA, o molécula de triple hélice. Un polipéptido de fusión KIF5B-RET aislado o purificado o punto de interrupción que contiene un fragmento del mismo. El polipéptido aislado o purificado KIF5B-RET de fusión que tiene una actividad quinasa RET, y/o una de dimerización o actividad multimerizante. Una molécula de anticuerpo aislado o purificado que se une específicamente un polipéptido de fusión KIF5B-RET. La molécula de anticuerpo, en el que dicha molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo monoespecífico para el polipéptido de fusión KIF5B-RET.

35 **[0155]** Los ejemplos del procedimiento para detectar el producto de la traducción del polinucleótido KIF5B-RET en la presente invención se inmunotinción, inmunotransferencia de tipo Western, ELISA, citometría de flujo, inmunoprecipitación y análisis de anticuerpos matriz. En estos procedimientos, se utiliza un anticuerpo que se une a un polipéptido de fusión KIF5B-RET. Ejemplos de un anticuerpo tal son un anticuerpo específico para un polipéptido que contiene un sitio de fusión de la proteína KIF5B y la proteína RET (también referido como "fusión de anticuerpo específica de sitio" en adelante), un anticuerpo que se une a un polipéptido compuesto por una región en el lado del terminal C del sitio de fusión antes mencionada de la proteína RET (también referido como "RET-C anticuerpo terminal" en adelante), y un anticuerpo que se une a un polipéptido compuesto de una región en el lado del terminal N de la mencionada sitio de fusión de la proteína KIF5B (también denominado en lo sucesivo como "KIF5B-N anticuerpo terminal"). Aquí, "fusión específica de sitio anticuerpo" significa un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que contiene el sitio de fusión antes mencionada, pero no se une a cualquiera de los dos de tipo salvaje (tipo normal) proteína KIF5B o de tipo salvaje (tipo normal) proteína RET.

40 **[0156]** Un polipéptido de fusión KIF5B-RET puede ser detectado por el anticuerpo específico del sitio de fusión antes mencionada o una combinación de los antes mencionados anticuerpo terminal de RET-C y el anticuerpo terminal de KIF5B-N. Sin embargo, ya que casi ninguna expresión de la proteína RET, por ejemplo, se detecta en las

células pulmonares normales, la presencia de un polipéptido de fusión KIF5B-RET en el tejido de adenocarcinoma de pulmón se puede detectar incluso si el anticuerpo terminal de RET-C solo se utiliza en la inmunotinción.

- 5 **[0157]** El "anticuerpo que se une a un polipéptido de fusión KIF5B-RET" se puede preparar por un experto en la técnica la selección de un procedimiento apropiado conocido. Un ejemplo de tales procedimientos conocidos es un procedimiento en el que un animal inmune se inocula con el polipéptido antes mencionado compuesto de una parte terminal C de la proteína RET, un polipéptido de fusión KIF5B-RET, el polipéptido anteriormente mencionado compuesto de una porción terminal de N de la proteína KIF5B, etc. activando así el sistema inmune del animal, y luego se recupera el suero de la sangre del animal (anticuerpo policlonal), y procedimientos para producir anticuerpos monoclonales tales como el procedimiento de hibridoma, el procedimiento de ADN recombinante y el procedimiento de presentación en fagos. Si se utiliza un anticuerpo a la que se une una sustancia marcada, la proteína diana se puede detectar directamente mediante la detección de la etiqueta. La sustancia marcada no está particularmente limitado siempre que pueda unirse al anticuerpo y puede ser detectado. Los ejemplos incluyen peroxidasa,  $\beta$ -D-galactosidasa, microperoxidasa, peroxidasa de rábano picante (HRP), isotiocianato de fluoresceína (FITC), isotiocianato de rodamina (RITC), fosfatasa alcalina, biotina, y sustancias radiactivas. Por otra parte, además de los procedimientos que detectan directamente una proteína diana utilizando un anticuerpo para la que se une una sustancia marcada, los procedimientos que detectan indirectamente la proteína diana utilizando proteína G, proteína A o un anticuerpo secundario a la que una sustancia marcada está unido puede ser también usado.
- 10
- 15
- 20 **[0158]** Si se detecta la presencia de un polinucleótido de fusión KIF5B-RET en una muestra aislada de un sujeto mediante los procedimientos mencionados anteriormente, se determina que la eficacia del tratamiento del cáncer por un inhibidor de tirosina quinasa RET, tales como la Fórmula I, la o el Compuesto 1, será alta en ese paciente, mientras que si no se detecta la presencia de un polinucleótido de fusión KIF5B-RET, se determina que la eficacia del tratamiento del cáncer por un inhibidor de tirosina quinasa RET será baja en ese paciente.
- 25
- 30 **[0159]** Como se ha descrito anteriormente, cualquiera de los polinucleótidos indicados en (a) a (c) a continuación que tiene una longitud de cadena de al menos 15 bases pueden usarse ventajosamente en la detección de la presencia o ausencia de un polinucleótido de fusión KIF5B-RET; (a) un polinucleótido que es al menos una sonda seleccionada del grupo que consiste en sondas que hibridan con un polinucleótido que codifica la proteína KIF5B y sondas que hibridan con un polinucleótido que codifica la proteína RET; (b) un polinucleótido que es una sonda que se hibrida con un sitio de fusión de un polinucleótido que codifica la proteína KIF5B y un polinucleótido que codifica la proteína RET; (c) un polinucleótido que es una pareja de cebadores diseñados para intercalar un sitio de fusión de un polinucleótido que codifica la proteína KIF5B y un polinucleótido que codifica la proteína RET.
- 35 **[0160]** Estos polinucleótidos tienen una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases específica del gen diana. Aquí, "complementaria" puede significar no completamente complementarias, siempre que se hibride. Por ejemplo, estos polipéptidos tienen 80% o más, preferiblemente 90% o más, más preferiblemente 95% o mayor, y lo más preferiblemente 100% de homología con la secuencia de bases especificada.
- 40 **[0161]** En los polinucleótidos de (a) a (c), en parte o la totalidad de ADN o ARN, los nucleótidos pueden estar sustituidos por ácidos nucleicos artificiales, tales como PNA (ácido nucleico poliamida, ácido nucleico peptídico), LNA (marca registrada, ácido nucleico bloqueado, ácido nucleico puenteado), ENA (marca registrada, ácidos nucleicos con puentes 2'-O, 4'-C-etileno), GNA (ácido nucleico con glicerol) y TNA (ácido nucleico con treosa).
- 45 **[0162]** Además, como se ha descrito anteriormente, un anticuerpo que se une a un polipéptido de fusión KIF5B-RET se utiliza ventajosamente en la detección del producto de la traducción de un polinucleótido de fusión KIF5B-RET. Por consiguiente, la presente invención proporciona un medicamento para determinar la eficacia del tratamiento del cáncer por un inhibidor de tirosina quinasa RET, que comprende este anticuerpo.
- 50 **[0163]** El procedimiento de detección de un gen de fusión de la presente invención incluye una etapa de detectar la presencia de polinucleótidos de la presente memoria en una muestra obtenida de un sujeto de prueba. Como muestra obtenida de un sujeto de prueba, se usan sustancias recogidas de un sujeto de prueba (muestras aisladas de un cuerpo vivo), específicamente, cualquier tipo de fluido corporal (preferiblemente sangre) recogido, lavados alveolares y lavados bronquiales, muestras que han experimentado una biopsia y las muestras de
- 55 flema. Preferiblemente, se usa una muestra de biopsia o una muestra de flema de una zona afectada en el pulmón de un sujeto de prueba. De la muestra, se puede extraer y utilizar el ADN del genoma. Además, se pueden utilizar los transcritos de los mismos (productos producidos como resultado de la transcripción y traducción de un genoma, por ejemplo, ARNm, ADNc y de las proteínas). Particularmente, es preferible preparar y utilizar ARNm o ADNc.
- 60 **[0164]** El ADN genómico puede extraerse mediante procedimientos conocidos, y la extracción se puede realizar fácilmente utilizando un kit de extracción de ADN disponible en el mercado.
- 65 **[0165]** La etapa de detección puede llevarse a cabo de acuerdo con los procedimientos de análisis de genes conocidos (por ejemplo, los procedimientos conocidos que se utilizan comúnmente como procedimientos de detección de genes tales como la PCR, LCR (reacción en cadena de la ligasa), SDA (amplificación por desplazamiento de Strand), NASBA (amplificación de ácido nucleico basada en la secuencia), el procedimiento de

ICAN (isotérmica y de amplificación de cebador-iniciado quimérica de los ácidos nucleicos), LAMP (amplificación isotérmica mediada por bucle), el sistema de TMA (Gen-Probe' s TMA) procedimiento, en el procedimiento de hibridación in situ, y microar rayos). Por ejemplo, una tecnología de hibridación en la que un ácido nucleico hibridado con un polinucleótido a ser detectado es utilizado como una sonda, una tecnología de amplificación génica en la que el ADN se hibridó con un polinucleótido a ser detectado se utiliza como una imprimación, o se utiliza similares.

**[0166]** Específicamente, la detección se realiza usando ácidos nucleicos derivados de una muestra obtenida de un sujeto de prueba, por ejemplo, ARNm y similares. La cantidad de ARNm se midió mediante un procedimiento de reacción de amplificación de genes mediante el uso de cebadores que se diseñan de manera que sea capaz de amplificar específicamente la secuencia de un polinucleótido a ser detectado. Los cebadores usados en el procedimiento de detección de la presente invención, o los cebadores incluidos en el kit de detección no están particularmente limitados, siempre que los cebadores pueden amplificar específicamente la secuencia de un polinucleótido a ser detectado, y diseñados en base a la secuencia de bases de una polinucleótido a ser detectado. Los cebadores usados en el procedimiento de supervisión de la amplificación por PCR se pueden diseñar usando software de diseño de cebadores (por ejemplo, Primer Express fabricado por PE Biosystems) y similares. Además, puesto que cuanto mayor es el tamaño de un producto de PCR es, más la eficiencia de amplificación empeora, es apropiado para un cebador sentido y un cebador antisentido que ser diseñado de tal manera que el tamaño de los productos de amplificación obtenidos cuando ARNm o ADNc se amplifica convierte 1 kb o menos.

**[0167]** Más específicamente, un cebador sentido (cebador 5') está diseñada a partir de una porción que codifica KIF5B, y un cebador antisentido (cebador 3') está diseñado de una porción de codificación de RET. Es preferible usar el cebador incluido en el kit de detección de la presente invención, y es más preferible usar el cebador que está más adecuadamente incluido en el kit de detección. En el procedimiento de supervisión de la amplificación por PCR, también es posible diseñar PCR multiplex para la detección de todos los polinucleótidos de fusión en un solo líquido de reacción, mediante la mezcla de los cebadores sentido anteriores correspondientes a los respectivos genes. Por el procedimiento adecuado para cada tecnología de amplificación, es posible confirmar si o no un gen diana (gen entero o una porción específica de la misma) ha sido amplificado. Por ejemplo, en el procedimiento de PCR, los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa y se sometieron a tinción con bromuro de etidio y similares, por lo que es posible confirmar fragmentos de si o no amplificadas que tienen un tamaño de destino se han obtenido. Cuando se han obtenido los fragmentos amplificados que tienen un tamaño de destino, esto indica que un polinucleótido a ser detectado está presente en la muestra obtenida de un sujeto de prueba. La presencia de un polinucleótido a ser detectado se puede detectar de esta manera.

**[0168]** El procedimiento de detección de un gen de fusión de la presente invención incluye preferiblemente una etapa de detectar la presencia de un polinucleótido específico en una muestra obtenida de un sujeto de ensayo mediante una reacción de amplificación de genes y una etapa de detección de fragmentos de si o no amplificados que tienen se han obtenido un tamaño de destino.

**[0169]** La detección utilizando una tecnología de hibridación se lleva a cabo usando, por ejemplo, hibridación de Northern, dot procedimiento, el procedimiento de micromatrices de ADN, y el procedimiento de protección de ARN secante. Como sondas utilizadas para la hibridación, es posible utilizar una sonda que comprende a detectar secuencias que consiste en 16 bases, respectivamente, aguas arriba y aguas abajo del punto de fusión como un centro de una molécula de ácido nucleico que consiste en al menos 32 bases consecutivas que se hibridan con un polinucleótido o con una hebra complementaria de la misma en condiciones rigurosas (preferiblemente en una condición más estricta), o comprende cadenas complementarias de los mismos.

**[0170]** La hibridación puede utilizar cualquiera de "condiciones rigurosas" o "condiciones más rigurosas" conocidos por los expertos en la técnica. También es posible utilizar una tecnología de amplificación de genes, tales como RT-PCR. En el procedimiento de RT-PCR, el procedimiento de supervisión de la amplificación por PCR (PCR en tiempo real) se realiza durante el proceso de amplificación de genes, por lo que la presencia de un polinucleótido que va a detectarse puede ser analizada más cuantitativamente. PCR procedimientos controlar la amplificación pueden ser utilizados. PCR en tiempo real es un procedimiento conocido, y se puede realizar simplemente usando instrumentos y kits comercialmente disponibles para este procedimiento.

**[0171]** El procedimiento de detección de una proteína de fusión de algunas de las realizaciones de la presente invención incluye una etapa de detectar la presencia de un polipéptido específico en una muestra obtenida de un sujeto de prueba, es decir, un polipéptido codificado por un polinucleótido que sea detectado (en adelante, llamado un polipéptido para ser detectado). Dicha una etapa de detección se puede realizar por el procedimiento de inmunoensayo o procedimiento de ensayo de la actividad enzimática que se lleva a cabo mediante la preparación de un líquido solubilizado derivado de una muestra obtenida de un sujeto de prueba (por ejemplo, un tejido de cáncer o células obtenidas de un sujeto de prueba) y la combinación de una polipéptido a detectar contenido en el líquido con un anticuerpo anti-KIF5B y un anticuerpo anti-RET. Preferiblemente, es posible utilizar las técnicas que utilizan un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal específico para un polipéptido para ser detectado, tal como el procedimiento enzimático de inmunoensayo, los anticuerpos sándwich doble procedimiento ELISA, el procedimiento de inmunoensayo de fluorescencia, el procedimiento de radioinmunoensayo, y el procedimiento Western Blot.

**[0172]** Cuando el polinucleótido a ser detectado o Polypep-marea para ser detectada en el procedimiento de detección de la presente invención se detecta a partir de una muestra obtenida de un sujeto de prueba, el sujeto de prueba es un sujeto (paciente) que tiene cáncer con el polinucleótido positiva y se va a proporcionar con el tratamiento usando inhibidores de RET.

**[0173]** El kit de detección de la presente invención comprende al menos cebadores sentido y antisentido que están diseñados de manera que sea capaz de amplificar específicamente un polinucleótido a ser detectado en el procedimiento de detección de la presente invención. El conjunto de cebadores sentido y antisentido es un conjunto de polinucleótidos que funcionan como cebadores para amplificar un polinucleótido a ser detectados.

**[0174]** El conjunto de cebadores de la presente invención comprende en una realización (1) un conjunto de cebadores que comprende un cebador de sentido diseñado a partir de una porción que codifica KIF5B y un cebador antisentido diseñados a partir de una porción de codificación de RET y es para la detección de un gen de fusión de KIF5B gen y gen RET, donde el cebador anti-sentido consiste en una molécula de ácido nucleico (preferiblemente una molécula de ácido nucleico que consiste de al menos 16 bases) hibridar con un "polinucleótido a ser detectados" en condiciones estrictas (preferiblemente bajo una condición más rigurosa ), y el cebador con sentido consiste en una molécula de ácido nucleico (preferiblemente una molécula de ácido nucleico que consiste de al menos 16 bases) hibridar con una cadena complementaria de la "polinucleótido a ser detectado" en condiciones estrictas (preferiblemente bajo una condición más estricta).

**[0175]** Los siguientes conjuntos de cebadores (2) y (3) se incluyen en el conjunto de cebadores como variantes más específicas de conjunto de cebadores (1).

(2) Un conjunto de cebadores de un cebador sentido que consiste en un oligonucleótido que consiste en al menos alguna de 16 bases consecutivas.

(3) Un conjunto de cebadores de un cebador sentido que consiste en un oligonucleótido que consiste en al menos alguna de 16 bases consecutivas.

**[0176]** En estos conjuntos de cebadores (1) a (3), un intervalo entre las posiciones donde se seleccionan el cebador sentido y el cebador anti-sentido es preferentemente de 1 kb o menos, o el tamaño de un producto de amplificación amplificado por el cebador sentido y el cebador antisentido es preferiblemente de 1 kb o menos.

**[0177]** Además, el cebador tiene una longitud de cadena que consiste en 15 a 40 bases en general, que consiste preferentemente en 16 a 24 bases, más preferiblemente que consiste en 18 a 24 bases, y con preferencia especial que consiste en 20 a 24 bases.

**[0178]** El conjunto de cebadores puede usarse para amplificar y detectar un polinucleótido a ser detectado. Por otra parte, aunque no está particularmente limitado, los cebadores respectivos incluidos en el conjunto de cebadores de la presente invención se pueden preparar mediante, por ejemplo, síntesis química.

**[0179]** Un procedimiento de cribado de un fármaco anticáncer incluye: poner en contacto un compuesto de muestra con una célula que expresa la proteína de fusión; y medir el nivel de expresión de proteína de fusión en la célula, en el que el nivel de expresión de la proteína de fusión en la célula tratada con el compuesto de muestra se disminuye en comparación con la de antes del tratamiento con el compuesto de la muestra o que, en una célula no tratada, el compuesto de la muestra se determina como un compuesto candidato para el medicamento contra el cáncer.

**[0180]** El procedimiento de cribado de un fármaco contra el cáncer puede incluir además la etapa de medir el nivel de expresión de la proteína de fusión en la célula antes del tratamiento del compuesto de muestra. En este caso el compuesto de muestra puede determinarse como un compuesto candidato para el fármaco anticancerígeno cuando el nivel de expresión de la proteína de fusión después del tratamiento del compuesto de muestra se disminuyó en comparación con el de antes del tratamiento con el compuesto de la muestra en la misma célula. Alternativamente, el procedimiento de cribado de un fármaco contra el cáncer puede incluir proporcionar células que expresan la proteína de fusión, y poner en contacto un compuesto de muestra con una parte de las células proporcionadas. En este caso el compuesto de muestra puede determinarse como un compuesto candidato para el fármaco anticancerígeno cuando el nivel de expresión de la proteína de fusión en la célula en contacto con el compuesto de muestra se disminuyó en comparación con el de las células que no están en contacto con el compuesto de la muestra.

**[0181]** La célula usada en el procedimiento de cribado puede ser una célula derivada de una célula de cáncer, donde se expresa y/o activa el gen de fusión o la proteína de fusión, un extracto de la célula, o un cultivo de la célula. La célula de cáncer puede ser una célula de cáncer sólido, en particular un cáncer de pulmón, por ejemplo un cáncer de pulmón no microcítico, tal como un adenocarcinoma de pulmón, como se describe anteriormente.

**[0182]** Aún otra realización proporciona un procedimiento de cribado de un fármaco contra el cáncer contra el cáncer de pulmón que incluye: el tratamiento de una célula que expresa la proteína de fusión con un compuesto de

la muestra; medir el nivel de expresión de la proteína de fusión en la célula, en el que el nivel de expresión proteína de fusión en la célula tratada con el compuesto de muestra se disminuyó en comparación con que antes del tratamiento con el compuesto de la muestra o que, en una célula no tratada, se determina el compuesto de muestra como un compuesto candidato para el medicamento contra el cáncer de pulmón.

5 **[0183]** La proteína de fusión KIF5B-RET se puede usar como un marcador para el diagnóstico de un cáncer de pulmón o para el tratamiento o la prevención o el tratamiento de un cáncer de pulmón. El tratamiento o la prevención de cáncer de pulmón comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un inhibidor contra la proteína de fusión, al menos un inhibidor contra el gen de fusión que codifica la proteína de fusión, al menos un inhibidor contra un RET gen que codifica, o una combinación de los mismos, a un paciente en necesidad del mismo. El inhibidor puede ser tal como la Fórmula I, la o el Compuesto 1.

10 **[0184]** Otra realización proporciona un procedimiento para prevenir y/o tratar un cáncer, que comprende administrar una farmacéuticamente (terapéuticamente) cantidad eficaz de al menos un inhibidor contra la proteína de fusión, al menos un inhibidor contra el gen de fusión que codifica la proteína de fusión, en menos un inhibidor contra un gen de codificación RET, o una combinación de los mismos, a un paciente en necesidad del mismo, cualquiera de los cuales pueden ser los compuestos de Fórmula 1 y los otros compuestos específicos descritos en este documento. El procedimiento puede comprender además la etapa de identificación de la paciente que necesita la prevención y/o tratamiento de un cáncer, antes de la etapa de administrar dicho tratamiento. Otra realización proporciona una composición para prevenir y/o tratar un cáncer, que comprende administrar al menos un inhibidor contra la proteína de fusión, incluyendo la Fórmula 1, ya sea solo o con al menos un inhibidor contra el gen de fusión que codifica la proteína de fusión, al menos un inhibidor contra un gen de codificación de RET, o una combinación de los mismos. Otra realización proporciona un uso de un inhibidor contra la proteína de fusión, un inhibidor contra el gen de fusión que codifica la proteína de fusión, un inhibidor contra un gen de codificación de RET, o una combinación de los mismos, para prevenir y/o tratar un cáncer. El inhibidor puede ser tal como la Fórmula I, la o el Compuesto 1.

20 **[0185]** En la presente invención, el cáncer puede ser un cáncer de pulmón, en particular un cáncer de pulmón microcítico (SCLC) o un cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), tal como un adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células escamosas, o un carcinoma de pulmón de células grandes.

25 **[0186]** La composición en la que el inhibidor contra la proteína de fusión es al menos una seleccionada del grupo que consiste en un aptámero que se une específicamente a la proteína de fusión, un anticuerpo que se une específicamente a la proteína de fusión y el inhibidor contra el gen de fusión o el gen de codificación de RET es al menos uno seleccionado del grupo que consiste de siRNA, shRNA, miARN, y un aptámero, que son capaces de unirse específicamente al gen de fusión o el gen de codificación de RET.

30 **[0187]** Cualquier inhibidor de la quinasa RET que inhibe la expresión de RET y/o la actividad quinasa de RET (por ejemplo, transcripción, traducción o estabilidad) puede usarse solo o en combinación con el compuesto de Fórmula I, la, o 1.

35 **[0188]** El agente inhibidor puede ser específico de RET, o puede ser no específico (por ejemplo, inhibidores no específicos de quinasa, inhibidores multidiaria). Se han desarrollado varios inhibidores de la quinasa de RET y se están investigando sus aplicaciones clínicas. Aguas abajo de la actividad quinasa de RET, hay quinasas, tales como fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y quinasas de señal extracelular 1/2 (ERK) (Wixted JH et al. J Biol Chem 2011), y STAT3 (Hwang JH et al. Mol Endocrinol 2003; 17: 1155-1166). Un fármaco que inhibe tales rutas de transmisión de señales aguas abajo también se puede utilizar como una alternativa a un inhibidor de quinasa RET o como adyuvante, solo o en combinación con los compuestos de la Fórmula 1.

40 **[0189]** En un modo, los sujetos se considera que tienen una translocación KIF5B-RET están también determinados como teniendo una mutación RET en un sitio más allá del sitio de translocación. Un ejemplo de una mutación RET es una mutación activadora. La mutación RET activador es una mutación arbitraria que provoca un aumento en la activación en comparación con la mutación de tipo salvaje. Por ejemplo, una mutación activadora RET puede provocar la activación de RET permanente. Puede haber incluso una variante mutación RET de activación secundario que está asociado con o es debido al uso de un inhibidor de RET. Las mutaciones que dan lugar a un aumento de la actividad de la señal RET se producen debido a, por ejemplo, una mutación puntual de dominio quinasa, delección, inserción, duplicación, o inversión, o combinación de dos o más de aquellos, que dan lugar a un aumento de la señal de RET. Para los sujetos que se considera que tienen tanto una translocación KIF5B-RET y una mutación RET, la decisión también se puede hacer para tratar con un inhibidor de la quinasa RET. Además, el tratamiento/terapia puede llevarse a cabo en ellos basada en dicha decisión.

45 **[0190]** Como se describió anteriormente, la eficacia del tratamiento del cáncer por un inhibidor de tirosina quinasa RET se considera que es alta en un paciente en el que un polinucleótido de fusión KIF5B-RET es detectado por el procedimiento de la presente invención. Por esta razón, el tratamiento del cáncer se puede realizar de manera eficiente mediante la administración de un inhibidor de la tirosina quinasa RET selectivamente a aquellos pacientes con cáncer que poseen el gen KIF5B y el gen RET. Por consiguiente, la presente invención proporciona un

procedimiento para tratar el cáncer, que comprende una etapa de administrar un inhibidor de quinasa RET tirosina que es la Fórmula I, la o el Compuesto 1 a una paciente en el que se determinó la eficacia del tratamiento del cáncer por que el inhibidor de tirosina quinasa Ret para ser alta por el procedimiento de diagnóstico anteriormente mencionado se describe en el presente documento.

5 **[0191]** En la presente invención, una "muestra" no es sólo una muestra biológica (por ejemplo, células, tejido, órgano, fluido (sangre, líquido linfático, etc.), fluido digestivo, esputo, fluido de lavado alveolar/bronquial, orina, heces), pero también incluye extractos de ácido nucleico (extracto de ADN del genoma, extracto de ARNm o la preparación de ADNc o preparación de ARNc preparadas a partir de extracto de ARNm) o extractos de proteínas obtenidos a partir de estas muestras biológicas. Esta muestra también puede ser una que se ha sometido a tratamiento de fijación con formalina, tratamiento de fijación con alcohol, tratamiento de congelación o tratamiento de inclusión con parafina.

10 **[0192]** Además, el ADN genómico, ARNm, ADNc o proteína pueden prepararse por una persona experta en la técnica después de seleccionar una técnica conocida adecuada teniendo en cuenta el tipo, estado y así sucesivamente de la muestra.

15 **[0193]** Además de las sustancias antes citadas (polinucleótidos, anticuerpos) como ingredientes activos, el medicamento de la presente invención pueden contener otros ingredientes farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de tales ingredientes incluyen agentes tamponantes, emulsionantes, agentes de suspensión, estabilizantes, conservantes, solución salina fisiológica y así sucesivamente. Como agentes de tamponamiento, fosfatos, citratos, acetatos y así sucesivamente pueden ser utilizados. Como emulsionantes, goma árabe, alginato de sodio, goma de tragacanto y así sucesivamente pueden ser utilizados. Como agentes de suspensión, monoestearato de glicerol, monoestearato de aluminio, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroximetilcelulosa, lauril sulfato de sodio y así sucesivamente pueden ser utilizados. Como estabilizadores, propilenglicol, sulfito de dietilo, ácido ascórbico y así sucesivamente pueden ser utilizados. Como conservantes, azida de sodio, cloruro de benzalconio, ácido paraoxibenzoico, clorobutanol y así sucesivamente pueden ser utilizados.

20 **[0194]** Por otra parte, además de la preparación que contiene polinucleótidos y anticuerpos, preparaciones tales como un sustrato, un control positivo (por ejemplo, polinucleótidos de fusión KIF5B-RET, polipéptidos de fusión KIF5B-Ret, o células que las poseen, etc.) y un control negativo necesario para la detección de la etiqueta adjunta a los polinucleótidos y anticuerpos, un reactivo de contraindicación (DAPI, etc.) utilizados en la hibridación in situ o similares, una molécula requiere en la detección de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo secundario, solución de proteína G, proteína a), y el tampón utilizado en la dilución o de lavado del anticuerpo se puede combinar como un kit para su uso en el procedimiento de la presente invención. Este kit puede incluir instrucciones para uso del kit. La presente invención también proporciona el kit mencionado anteriormente para uso en el procedimiento de la presente invención.

25 **[0195]** Los procedimientos de detección descritos en este documento son particularmente útiles cuando se detecta una proteína de fusión que consiste esencialmente en el dominio N-terminal de una pareja de fusión y el dominio C-terminal de la proteína RET. La proteína de fusión puede ser proteína de fusión KIF5B-RET que consiste esencialmente en el dominio N-terminal de la proteína KIF5B y el dominio C-terminal de la proteína RET. El procedimiento se puede utilizar para diagnosticar un cáncer de pulmón, particularmente cáncer de pulmón no microcítico e incluye: detectar al menos una de reordenación cromosómica implicada-Aret incluyendo inversión o translocación en el cromosoma 10; una proteína de fusión en la que la proteína RET se fusiona con otra proteína; un gen de fusión que codifica la proteína de fusión; y la sobreexpresión de RET en comparación con una muestra estándar de un individuo sin un cáncer. Cuando uno de los reordenamientos descritos anteriormente seleccionados del grupo anteriormente se detecta en la muestra de ensayo, el individuo para el tratamiento de un inhibidor de RET, tales como una fórmula I, la o el Compuesto 1.

30 **Preparación del compuesto 1**

35 **[0196]** Preparación de N-(4-{{6,7-bis(metiloxi)quinolin-4-il}oxi}fenil)-N'-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida y la sal (L)-malato de la misma.

40 **[0197]** La ruta sintética usada para la preparación de N-(4-{{6,7-bis(metiloxi)quinolin-4-il}oxi}fenil)-N'-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida y la sal (L)-malato de la misma se representa en el Esquema 1:

45

50



**Preparación de ácido 1-(4-fluoro-fenilcarbamoil) ciclopropanocarboxílico**

5 **[0201]** Se añadió trietilamina (8,0 kg) a una solución enfriada (aproximadamente 4°C) de ácido ciclopropano-1,1-dicarboxílico disponible comercialmente (2 1, 10,0 kg) en THF (63,0 kg) a una velocidad tal que la temperatura del lote no excediera de 10°C. La solución se agitó durante aproximadamente 30 minutos, y después se añadió cloruro de tionilo (9,0 kg), manteniendo la temperatura del lote por debajo de 10°C. Cuando la adición fue completa, se añadió una solución de 4-fluoroanilina (9,0 kg) en THF (25,0 kg) a una velocidad tal que la temperatura del lote no excediera de 10°C. La mezcla se agitó durante aproximadamente 4 horas y después se diluyó con acetato de isopropilo (87,0 kg). Esta solución se lavó secuencialmente con hidróxido sódico acuoso (2,0 kg disueltos en 50,0 L de agua), agua (40,0 L), y cloruro de sodio acuoso (10,0 kg disueltos en 40,0 L de agua). La solución orgánica se concentra por destilación al vacío seguido de la adición de heptano, que dio como resultado la precipitación de un sólido. El sólido se recuperó por centrifugación y luego se secó a aproximadamente 35°C bajo vacío para proporcionar el compuesto del título. (10,0 kg).

**Preparación de cloruro de 1-(4-fluoro-fenilcarbamoil)-ciclopropanocarbonil**

20 **[0202]** Se añadió cloruro de oxalilo (1,0 kg) a una solución de ácido 1-(4-fluoro-fenilcarbamoil) ciclopropanocarboxílico (2,0 kg) en una mezcla de THF (11 kg) y N, N-dimetilformamida (DMF; 0,02 kg) a una velocidad tal que la temperatura del lote no excediera de 30°C. Esta solución se usó en la siguiente etapa sin más procesamiento.

**Preparación de N-(4-{{6,7-bis(metiloxi)quinolin-4-il}oxi}fenil)-N'-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida**

25 **[0203]** La solución de la etapa anterior que contenía cloruro de 1-(4-fluoro-fenilcarbamoil)-ciclopropanocarbonilo se añadió a una mezcla de 4-(6,7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenilamina (3,0 kg) y carbonato de potasio (4,0 kg) en THF (27,0 kg) y agua (13,0 kg) a una velocidad tal que la temperatura del lote no excediera de 30°C. Cuando la reacción fue completa (en típicamente 10 minutos), se añadió agua (74,0 kg). La mezcla se agitó a 15-30°C durante aproximadamente 10 horas, lo que resultó en la precipitación del producto. El producto se recuperó por filtración, se lavó con una solución pre-hechos de THF (11,0 kg) y agua (24,0 kg), y se secó a aproximadamente 65°C bajo vacío durante aproximadamente 12 horas para proporcionar el compuesto del título (base libre, 5,0 kg). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ 10,2 (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 + 502.

**Preparación de N-(4 - {{6,7-bis(metiloxi)quinolin-4-il}oxi}fenil)-N'-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida, sal de (L)-malato**

40 **[0204]** Se añadió una solución de ácido L-málico (2,0 kg) en agua (2,0 kg) a una solución de [4-(6,7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenil]-amida (4-fluoro-fenil)-amida base libre del ácido ciclopropano-1,1-dicarboxílico (1 5, 5,0 kg) en etanol, manteniendo una temperatura de lote de aproximadamente 25°C. Se añadieron entonces carbono (0,5 kg) y sílice tior (0,1 kg) y la mezcla resultante se calentó a aproximadamente 78°C, a la que se añadió agua punto (6,0 kg). Se filtró entonces la mezcla de reacción, seguido de la adición de isopropanol (38,0 kg), y se dejó enfriar a aproximadamente 25°C. El producto se recuperó por filtración y se lavó con isopropanol (20,0 kg), y se secó a aproximadamente 65°C para proporcionar el compuesto del título (5,0 kg).

**Preparación alternativa de N-(4-{{6,7-bis(metiloxi)quinolin-4-il}oxi}fenil)-N'-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida y la sal de (L)-malato de la misma.**

50 **[0205]** Una ruta sintética alternativa que se puede utilizar para la preparación de N-(4-{{6,7-bis(metiloxi)quinolin-4-il}oxi}fenil)-N'-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida y la sal de (L)-malato de la misma se representa en el Esquema 2, tal como se describe en el documento PCT/US2012/024591.

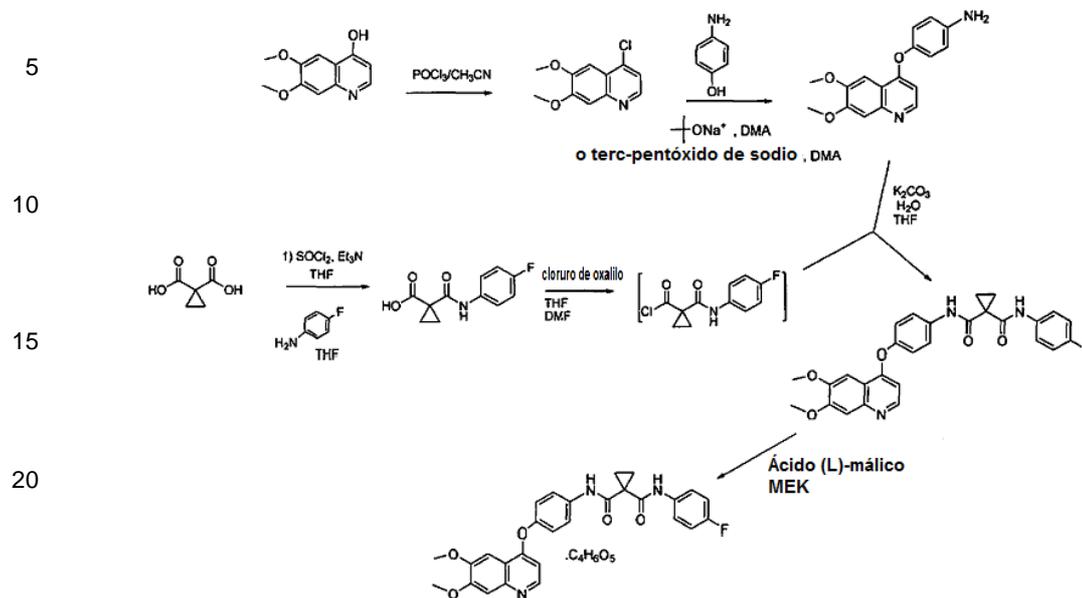
**Preparación de 4-cloro-6,7-dimetoxi-quinolina**

55

60

65

## Esquema 2



[0206] En un reactor se cargó secuencialmente con 6,7-dimetoxi-quinolina-4-ol (47,0 kg) y acetonitrilo (318,8 kg). La mezcla resultante se calentó a aproximadamente 60°C y oxloruro de fósforo (POCl<sub>3</sub>, 130,6 kg) se añadió. Después de la adición de POCl<sub>3</sub>, la temperatura de la mezcla de reacción se elevó a aproximadamente 77°C. La reacción se consideró completa (aproximadamente 13 horas) cuando menos del 3% del material de partida permaneció (análisis en proceso de alto rendimiento de cromatografía líquida [HPLC]). La mezcla de reacción se enfrió a aproximadamente 2-7°C y después se inactivó en una solución enfriada de diclorometano (DCM, 482,8 kg), 26 por ciento NH<sub>4</sub>OH (251,3 kg), y agua (900 L). La mezcla resultante se calentó a aproximadamente 20-25°C, y las fases se separaron. La fase orgánica se filtró a través de un lecho de Hyflo AW NF super-cel (Celite; 5,4 kg) y el lecho del filtro se lavó con DCM (118,9 kg). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (282,9 kg) y se mezcló con agua (120 L). Las fases se separaron y la fase orgánica se concentró por destilación al vacío con la eliminación del disolvente (aproximadamente 95 L de volumen residual). DCM (686,5 kg) se cargó en el reactor que contiene la fase orgánica y se concentra por destilación al vacío con la eliminación del disolvente (aproximadamente 90 L de volumen residual). A continuación, metil t-butil éter (MTBE, 226,0 kg) se cargó y la temperatura de la mezcla se ajustó hasta -20 a -25°C y se mantuvo durante 2,5 horas dando como resultado precipitado sólido que luego se filtró y lavó con n-heptano (92,0 kg), y se secaron en un filtro de aproximadamente 25°C en atmósfera de nitrógeno para proporcionar el compuesto del título. (35,6 kg).

## Preparación de 4-(6,7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenilamina

[0207] 4-aminofenol (24,4 kg) disuelto en N, N-dimetilacetamida (DMA, 184,3 kg) se cargó a un reactor que contiene 4-cloro-6,7-dimetoxiquinolona (35,3 kg), t-butóxido sódico (21,4 kg) y DMA (167,2 kg) a 20-25°C. A continuación se calentó esta mezcla a 100-105°C durante aproximadamente 13 horas. Después de la reacción se consideró completa como se determina usando análisis de HPLC en proceso (menos de 2 por ciento quedaba material de partida), los contenidos del reactor se enfrió a 15-20°C y agua (pre-enfriado, 2-7°C, 587 L) cargada a una velocidad para mantener la temperatura de 15-30°C. El precipitado sólido resultante se filtró, se lavó con una mezcla de agua (47 l) y DMA (89,1 kg) y finalmente con agua (214 L). La torta de filtración se secó a aproximadamente 25°C en el filtro para producir 4-(6, 7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenilamina (59,4 kg húmedo, 41,6 kg seca calculada basan en LOD). 4-(6, 7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenilamina se calentó a reflujo (aproximadamente 75°C) en una mezcla de tetrahidrofurano (THF, 211,4 kg) y DMA (108,8 kg) durante aproximadamente 1 hora y después se enfrió a 0-5°C y se envejeció durante aproximadamente 1 hora después de lo cual se filtró el sólido, se lavó con THF (147,6 kg) y se secó sobre un filtro a vacío a aproximadamente 25°C para dar 4-(6,7-dimetoxi-quinolina -4-iloxi)-fenilamina (34,0 kg).

## Preparación alternativa de 4-(6, 7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenilamina

[0208] 4-cloro-6,7-dimetoxiquinolona (34,8 kg) y 4-aminofenol (30,8 kg) y terc-pentóxido de sodio (1,8 equivalentes) 88,7 kg, 35 por ciento en peso en THF) se cargaron en un reactor, seguido por N,N-dimetilacetamida (DMA, 293,3 kg). A continuación se calentó esta mezcla a 105-115°C durante aproximadamente 9 horas. Después de la reacción se consideró completa como se determina usando análisis de HPLC en proceso (menos de 2 por ciento quedaba material de partida), los contenidos del reactor se enfrió a 15-25°C y se añadió durante un período de dos horas de

agua (315 kg) mientras se mantiene la temperatura entre 20-30°C. La mezcla de reacción se agitó durante una hora adicional a 20-25°C. El producto bruto se recogió por filtración y se lavó con una mezcla de 88kg agua y 82,1 kg de DMA, seguido por 175 kg de agua. El producto se secó en un secador de filtro durante 53 horas. El LOD mostró menos de 1 por ciento p/p.

[0209] En un procedimiento alternativo, se utilizaron 1,6 equivalentes de terc-pentóxido de sodio y la temperatura de reacción se aumentó de 110-120°C. Además, la temperatura de enfriamiento aumentó a 35-40°C y la temperatura de inicio de la adición de agua se ajustó a 35-40°C, con una exoterma permitida hasta 45°C.

#### Preparación de ácido 1-(4-fluoro-fenilcarbamoil)ciclopropanocarboxílico

[0210] Se añadió trietilamina (19,5 kg) se añadió a una solución enfriada (aproximadamente 5°C) de ciclopropano-1,1-dicarboxílico (24,7 kg) en THF (89,6 kg) a una velocidad tal que la temperatura del lote no excediera 5°C. La solución se agitó durante aproximadamente 1,3 horas, y después se añadió cloruro de tionilo (23,1 kg), manteniendo la temperatura del lote por debajo de 10°C. Cuando la adición fue completa, la solución se agitó durante aproximadamente 4 horas manteniendo la temperatura por debajo de 10°C. Una solución de 4-fluoroanilina (18,0 kg) en THF (33,1 kg) se añadió luego a una velocidad tal que la temperatura del lote no excediera de 10°C. La mezcla se agitó durante aproximadamente 10 horas después de lo cual la reacción se consideró completa. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de isopropilo (218,1 kg). Esta solución se lavó secuencialmente con hidróxido sódico acuoso (10,4 kg, 50 por ciento disuelto en 119 l de agua) se diluyó adicionalmente con agua (415 L), después con agua (100 L) y finalmente con cloruro de sodio acuoso (20,0 kg disueltos en 100 L de agua). La solución orgánica se concentró por destilación a vacío (100 L de volumen residual) por debajo de 40°C seguido de la adición de n-heptano (171,4 kg), lo que dio como resultado la precipitación de un sólido. El sólido se recuperó por filtración y se lavó con n-heptano (102,4 kg), lo que resulta en húmedo, 1-(4-fluoro-fenilcarbamoil) ciclopropanocarboxílico (29,0 kg). El producto en bruto, 1-(4-fluoro-fenilcarbamoil) ciclopropanocarboxílico se disolvió en metanol (139,7 kg) a aproximadamente 25°C seguido de la adición de agua (320 L), resultando en suspensión que se recuperó por filtración, se lavó secuencialmente con agua (20 L) y n-heptano (103,1 kg) y después se secó en el filtro en aproximadamente 25°C en atmósfera de nitrógeno para proporcionar el compuesto del título (25,4 kg).

#### Preparación de cloruro de 1-(4-fluoro-fenilcarbamoil)-ciclopropanocarbonilo

[0211] Se añadió cloruro de oxalilo (12,6 kg) a una solución de ácido 1-(4-fluoro-fenilcarbamoil) ciclopropanocarboxílico (22,8 kg) en una mezcla de THF (96,1 kg) y N, N-dimetilformamida (DMF; 0,23 kg) a una velocidad tal que la temperatura del lote no excediera de 25°C. Esta solución se usó en la siguiente etapa sin más procesamiento.

#### Preparación alternativa de cloruro de 1-(4-fluoro-fenilcarbamoil)-ciclopropanocarbonilo

[0212] Se cargó un reactor con ácido 1-(4-fluoro-fenilcarbamoil) ciclopropanocarboxílico (35 kg), 344 g de DMF, y THF 175kg. La mezcla de reacción se ajustó a 12-17°C y a continuación a la mezcla de reacción se cargaron 19,9 kg de cloruro de oxalilo durante un período de 1 hora. La mezcla de reacción se dejó agitando a 12-17°C durante 3 a 8 horas. Esta solución se usó en la siguiente etapa sin más procesamiento.

#### Preparación de [4-(6,7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenil]-amida (4-fluoro-fenil)-amida del ácido ciclopropano-1,1-dicarboxílico

[0213] Se añadió la solución de la etapa anterior que contenía cloruro de 1-(4-fluoro-fenilcarbamoil)ciclopropanocarbonilo a una mezcla del compuesto 4-(6,7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenilamina (23,5 kg) y carbonato de potasio (31,9 kg) en THF (245,7 kg) y agua (116 L) a una velocidad tal que la temperatura del lote no exceden 30°C. Cuando la reacción fue completa (en aproximadamente 20 minutos), se añadió agua (653 L). La mezcla se agitó a 20-25°C durante aproximadamente 10 horas, lo que resultó en la precipitación del producto. El producto se recuperó por filtración, se lavó con una solución pre-hechos de THF (68,6 kg) y agua (256 L), y se secó primero en un filtro bajo nitrógeno a aproximadamente 25°C y luego a aproximadamente 45°C bajo vacío para proporcionar el compuesto del título (41,0 kg, 38,1 kg, calculado sobre la base de LOD).

#### Preparación alternativa de [4-(6,7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenil]-amida (4-fluoro-fenil)-amida del ácido ciclopropano-1,1-dicarboxílico

[0214] Un reactor se cargó con 4-(6,7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenilamina (35,7 kg, 1 equivalente), seguido por 412,9 kg de THF. A la mezcla de reacción se cargó una solución de 48,3 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 169 kg de agua. La solución de cloruro de ácido de describe en la Preparación alternativa de 1-(4-fluoro-fenilcarbamoil) cloruro de -ciclopropanocarbonil anterior fue transferido al reactor que contiene 4-(6,7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenilamina mientras se mantiene la temperatura entre 20-30°C durante un mínimo de dos horas. La mezcla de reacción se agitó a 20-25°C durante un mínimo de tres horas. A continuación, la temperatura de reacción se ajustó a 30-25°C y la mezcla se agitó. La agitación se detuvo y se dejó que las fases de la mezcla a separar. La fase acuosa inferior se retira y se desecha. A la fase orgánica superior remanente se añadió 804 kg de agua. La reacción se dejó en

agitación a 15-25°C durante un mínimo de 16 horas.

[0215] El producto precipitó. El producto se filtró y se lavó con una mezcla de 179 kg de agua y 157,9 kg de THF en dos porciones. El producto crudo se secó bajo vacío durante al menos dos horas. A continuación, el producto seco se recogió en 285,1 kg de THF. La suspensión resultante se transfirió al recipiente de reacción y se agitó hasta que la suspensión se convirtió en una solución clara (disuelto), que requiere calentamiento a 30-35°C durante aproximadamente 30 minutos. Se añadió entonces 456 kg de agua a la solución, así como 20 kg SDAG-1 etanol (etanol desnaturalizado con metanol durante dos horas. La mezcla se agitó a 15-25°C abeto al menos 16 horas. El producto se filtró y se lavó con una mezcla de 143 kg de agua y 126,7 THF en dos porciones. El producto se secó en un punto de ajuste de temperatura máxima de 40°C.

[0216] En un procedimiento alternativo, la temperatura de reacción durante la formación de cloruro de ácido se ajustó a 10-15°C. La temperatura de recristalización se cambió de 15-25°C a 45-50°C durante 1 hora y después se enfrió a 15-25°C durante 2 horas.

**Preparación de [4-(6,7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenil] -amida (4-fluoro-fenil)-amida del ácido ciclopropano-1,1-dicarboxílico, la sal de malato**

[0217] El [4-(6,7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenil]-amida (4-fluoro-fenil)-amida del ácido ciclopropano-1,1-dicarboxílico (1-5; 13,3 kg), ácido L-málico (4,96 kg), metil etil cetona (MEK; 188,6 kg) y agua (37,3 kg) se cargaron en un reactor y la mezcla se calentó a reflujo (aproximadamente 74°C) durante aproximadamente 2 horas. La temperatura del reactor se redujo a 50 a 55°C y se filtraron los contenidos del reactor. Estos pasos secuenciales descritos anteriormente se repitieron dos veces más a partir de cantidades similares de material de partida (13,3 kg), ácido L-málico (4,96 kg), MEK (198,6 kg) y agua (37,2 kg). El filtrado combinado se secó azeotrópicamente a presión atmosférica usando MEK (1133,2 kg) (volumen residual aproximada 711 L; KF ≤ 0,5% p/p) aproximadamente a 74°C. La temperatura del contenido del reactor se redujo a 20 a 25°C y se mantuvo durante aproximadamente 4 horas resultantes en precipitado sólido que se filtró, se lavó con MEK (448 kg) y se secó bajo vacío a 50°C para proporcionar el compuesto del título (45,5 kg).

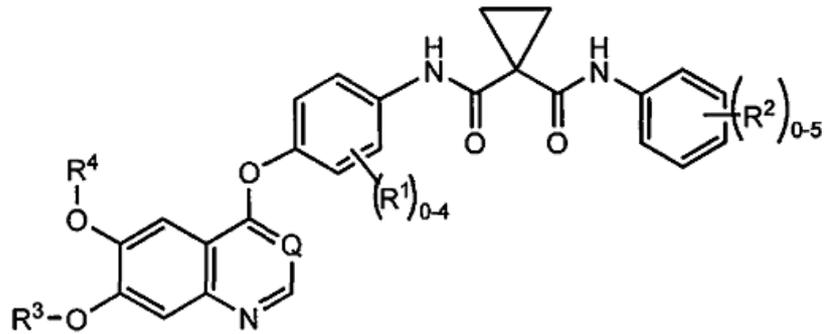
**Preparación alternativa de [4-(6,7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenil] -amida (4-fluoro-fenil)-amida del ácido ciclopropano-1,1-dicarboxílico, sal de (L)-malato**

[0218] El ciclopropano-1,1-dicarboxílico [4-(6,7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenil] -amida (-fluoro-fenil 4)-amida (47,9 kg), ácido L-málico (17.2), 658.2 kg metil etil cetona, y 129,1 kg de agua (37,3 kg) se cargaron en un reactor y la mezcla se calentó 50-55°C durante aproximadamente 1-3 horas, y luego a 55-60°C para una Además horas al 4-5. La mezcla se clarificó por filtración a través de un cartucho de 1 m. La temperatura del reactor se ajustó a 20-25°C y el vacío destilada con un vacío a 150-200 mm Hg con una temperatura máxima de la chaqueta de 55°C a la gama de volumen de 558 a 731 L.

[0219] La destilación al vacío se llevó a cabo dos veces más con la carga de 380 kg y 380,2 kg de metil etil cetona, respectivamente. Después de la tercera destilación, el volumen del lote se ajustó a 18 v/w de ciclopropano-1,1 dicarboxílico-ácido [4-(6,7-dimetoxi-quinolina-4-iloxi)-fenil] -amida del ácido (4- fluoro-fenil)-amida mediante el cobro de 159,9 kg de metil etil cetona para dar un volumen total de 880L. Una destilación de adición al vacío se llevó a cabo mediante el ajuste de 245,7 metil etil cetona. La mezcla de reacción se dejó con agitación moderada a 20-25°C durante al menos 24 horas. El producto se filtró y se lavó con 415,1 kg metil etil cetona en tres porciones. El producto se secó bajo un vacío con el punto de ajuste de temperatura de la camisa a 45°C.

[0220] En un procedimiento alternativo, el orden de adición se cambió de modo que se añadió una solución de 17,7 kg de ácido L-málico disuelto en 129,9 kg de agua a [4-(6,7-dimetoxi quinolina-4-iloxi)-fenil]-amida (4-fluoro-fenil)-amida del ácido ciclopropano-1,1-dicarboxílico (48,7 kg) en etil metil cetona (673,3 kg).

[0221] La invención incluye las siguientes realizaciones específicas.  
Realización 1. Un procedimiento para el tratamiento de adenocarcinoma de pulmón, que comprende administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento un compuesto de Fórmula I:



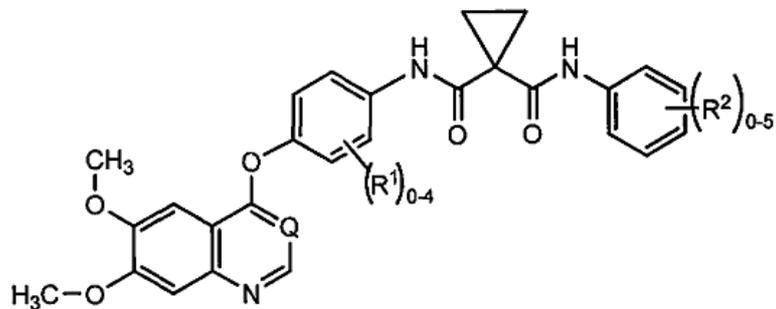
I

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde: R<sup>1</sup> es halo;  
 R<sup>2</sup> es halo;  
 R<sup>3</sup> es alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>);  
 R<sup>4</sup> es alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>); y  
 Q es CH o N.

Realización 2. El procedimiento de la realización 1, en el que el adenocarcinoma de pulmón es el cáncer de pulmón no microcítico.

Realización 3. El procedimiento de la realización 1, en el que el adenocarcinoma de pulmón es cáncer de pulmón no microcítico positivo en la fusión KIF5B-RET.

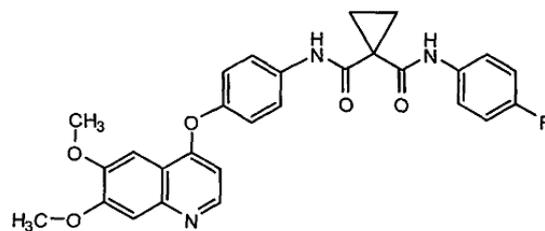
Realización 4. El procedimiento de la realización 1-3, en el que el doble modulador MET y VEGF es un compuesto de Fórmula Ia



Fórmula Ia

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:  
 R<sup>1</sup> es halo;  
 R<sup>2</sup> es halo; y  
 Q es CH o N.

Realización 5. El procedimiento de la realización 1-4, en el que el compuesto de Fórmula I es el compuesto 1:



Compuesto 1

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- Realización 6. El procedimiento de la realización 5, que es N-(4-[[6,7-bis(metiloxi)quinolin-4-il]oxi]fenil)-N'-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida.
- 5 Realización 7. El procedimiento de las realizaciones 1-6, en el que el compuesto de Fórmula (I), Fórmula I (a) y el Compuesto I es la sal de (L)- o (D)-malato.
- Realización 8. El procedimiento de las realizaciones 1-7, en el que el compuesto de Fórmula (I) está en la forma cristalina N-1 o N-2 de la sal de (L)-malato y/o la sal de (D)-malato.
- 10 Realización 9. El procedimiento de las realizaciones 1-8, en el que el compuesto de Fórmula I, I (a), o el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se administra como una composición farmacéutica que comprende adicionalmente un portador, excipiente, o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 15 Realización 10. El procedimiento de las realizaciones 1-9, en el que el compuesto de fórmula I se administra después de otra forma de tratamiento.
- Realización 11. El procedimiento de las realizaciones 1-9, en el que el compuesto de fórmula I se administra después del tratamiento con cisplatino y/o gemcitabina.
- 20 Realización 12. El procedimiento de las realizaciones 1-9, en el que el compuesto de Fórmula I se administra después del tratamiento con docetaxel.
- Realización 13. El procedimiento de las realizaciones 1-9, en el que el compuesto de Fórmula I se administra después del tratamiento con platino (cisplatino o carboplatino) y/o paclitaxel, y/o gemcitabina, y/o docetaxel, y/o vinorelbina, y/o irinotecan y y/o pemetrexed.
- 25 Realización 14. Un procedimiento para el tratamiento de adenocarcinoma de pulmón es cáncer de pulmón no microcítico positivo en la fusión *KIF5B-RET* en un paciente en necesidad de tal tratamiento que comprende administrar un compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 30 Realización 15. Un procedimiento para inhibir o invertir el progreso del crecimiento celular anormal en un mamífero, que comprende administrar el Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el crecimiento celular anormal es cáncer mediado por *KIF5B-RET*.
- 35 Realización 16. El procedimiento de la realización 15, en el que el cáncer es el adenocarcinoma de pulmón.
17. El procedimiento de la realización 15, en el que el adenocarcinoma de pulmón es el cáncer de pulmón microcítico.
- 40 Realización 18. El procedimiento de la realización 15, en el que el adenocarcinoma de pulmón es cáncer de pulmón no microcítico positivo en la fusión *KIF5B-RET*.
- Realización 19. El procedimiento de la realización 18, en el que el Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra como una composición farmacéutica que comprende el Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos un portador farmacéuticamente aceptable.
- 45 Realización 20. El procedimiento de la realización 18, en el que el Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra como una composición farmacéutica que comprende el Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos un portador farmacéuticamente aceptable; donde la composición farmacéutica se administra diariamente durante más de 3 meses.
- 50 Realización 21. El procedimiento de la realización 18, en el que el Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra como una composición farmacéutica que comprende el Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos un portador farmacéuticamente aceptable; en donde la composición farmacéutica se administra a una dosis de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 65, 70, 75, 80, 85, 90, o 95 mg/día.
- 55 Realización 22. El procedimiento de la realización 18, en el que la detección de cáncer de pulmón no microcítico positivo en la fusión *KIF5B-RET* se realiza mediante un ensayo FISH, CISH o SISH.
- 60 Realización 23. El procedimiento de la realización 18, en el que la detección del cáncer de pulmón no microcítico positivo en la fusión *KIF5B-RET* se realiza usando cualquier forma de PCR de genoma, secuenciación directa, secuenciación por PCR, RT-PCR o un ensayo similar.
- 65 Realización 24. Un procedimiento de diagnóstico y tratamiento de un paciente en el que el paciente tiene un tumor de NSCLC y el tumor se identifica como NSCLC positivo en la fusión *KIF5B-RET* y el tratamiento comprende la

administración de cualquiera de los compuestos de Fórmula I, incluyendo el compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

5 Realización 25. Un procedimiento para el tratamiento de un adenocarcinoma de pulmón que es cáncer de pulmón no microcítico positivo en la fusión *KIF5B-RET* en un paciente en necesidad de tal tratamiento, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz del compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 Realización 26. El procedimiento de las realizaciones 1-25, en el que la cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I, la, o 1 produce al menos un efecto terapéutico seleccionado del grupo que consiste en reducción en el tamaño de un tumor, la reducción en la metástasis, remisión completa, remisión parcial, enfermedad estable, aumento de la tasa de respuesta global, o una respuesta patológica completa.

### Ejemplo biológico

#### 15 **Compuesto 1 es un inhibidor potente de RET en Vitro**

[0222] El compuesto 1 ha sido previamente demostrado ser un inhibidor de la ATP-competitiva de MET ( $IC_{50} = 1,3$  nmol/L) y VEGFR2 ( $IC_{50} = 0,035$  nmol/L) cuando perfilada contra un panel de la proteína quinasa de 270 quinasas humanos. Ver Yakes, *Mol Ther* cáncer. 2011 Dec; 10 (12): 2298-308. Compuesto 1 también es un potente inhibidor de RET con una bioquímica  $IC_{50}$  valor de 5,2 nmol/L. Mutaciones de RET-activación de la quinasa de dominio M918T y Y791F - conocidos por estar asociados con carcinoma medular de tiroides hereditario y esporádico - también fueron inhibidos por el Compuesto 1 con  $IC_{50}$  valores de 27 y 1,173 nmol/L, respectivamente. Además, el compuesto 1 no era activo contra el mutante RET V804L ( $IC_{50} > 5000$  nmol/L), que se conoce para hacer resistencia a RET inhibidores. En ensayos celulares, el Compuesto 1 inhibe la autofosforilación de RET en células TT, una calcitonina-expresión de línea celular de carcinoma medular de tiroides humano, que alberga una C634W mutante de activación de RET, con una  $CI_{50}$  valor de 85 nmol/L. El efecto del compuesto 1 sobre el crecimiento de células TT que fueron cultivadas en 10% de suero durante 72 horas (3 días) también se investigó. Compuesto 1 tratamiento resultó en una inhibición dependiente de la dosis de la proliferación con una  $CI_{50}$  valor de 94 nmol/L.

#### 30 **Ejemplo biológico**

##### **Compuesto 1 inhibe la fosforilación independiente de ligando de RET In Vivo**

[0223] A los animales portadores de tumores TT se administraron una sola dosis crecientes de Compuesto 1 o el agua del vehículo, y los tumores se recogieron después de la dosis 4 h. Los niveles de RET fosforilado y total y se determinaron en lisados agrupados por análisis de inmunotransferencia Western. En un estudio separado, los ratones portadores de tumores TT se les administró una dosis oral única de cabozantinib (100 mg/kg) o vehículo de agua, y los niveles de RET fosforilado y total, AKT y ERK en lisados tumorales se determinaron en el indicado puesto puntos de tiempo dosis. La cuantificación densitométrica de la duración de la inhibición de la fosforilación de RET frente a las concentraciones plasmáticas de cabozantinib. Se muestran imágenes representativas de Western blot.

[0224] La administración de dosis únicas oral crecientes de Compuesto 1 dio como resultado la inhibición dependiente de la dosis de la fosforilación de RET en ausencia de la reducción de los niveles de proteína RET en los tumores de xenoinjerto de TT como se representa en la Figura 1A. Este resultado es consistente con los datos que demuestran la sensibilidad de múltiples líneas celulares de carcinoma medular de tiroides a los inhibidores farmacológicos selectivos para RET y knockdown RET por siRNA. Basado en la relación dosis-respuesta de la concentración predicha de plasma que resulta en una inhibición del 50% ( $IC_{50}$ ) de la fosforilación de RET en este modelo de xenoinjerto es de aproximadamente 7 mol/L. En un estudio posterior, una sola dosis oral de 100 mg/kg dio como resultado la inhibición de la fosforilación de RET 4 a 24 horas después de la dosis en los tumores de xenoinjerto de TT, tal como se representa en la Figura 1B. Este efecto fue reversible como fosforilación RET volvió a los niveles basales a las 48 horas después del tratamiento como se representa en la Figura 1C. Además, el Compuesto 1 redujo los niveles de fosforilación de Akt y ERK 4 a 24 horas después de la dosis, lo que es consistente con la inhibición de la activación de RET-mediada de la vía RAS/RAF/MAPK. Las concentraciones en plasma del Compuesto 1 asociados con la máxima y la inhibición sostenida de RET (15  $\mu$ mol/L), AKT y ERK (42  $\mu$ mol/L), respectivamente.

### Ejemplo biológico

#### 60 **Compuesto 1 inhibe el crecimiento del tumor TT**

[0225] La capacidad del compuesto 1 para inhibir el crecimiento de tumores de xenoinjerto TT se evaluó en ratones nu/nu durante un período de tiempo correspondiente al crecimiento del tumor exponencial. Los ratones nu/nu que portan tumores TT fueron administrados por vía oral una vez al día con vehículo agua ( $\square$ ) o cabozantinib a 3 mg/kg ( $\nabla$ ), 10 mg/kg ( $\circ$ ), 30 mg/kg ( $\blacklozenge$ ), o 60 mg/kg ( $\blacklozenge$ ) durante 21 días. Los pesos del tumor se determinaron dos veces por semana. Los puntos de datos representan el peso medio del tumor (en miligramos) y SE para cada grupo

de tratamiento. Los niveles circulantes de calcitonina se determinaron en las preparaciones de suero de la sangre entera extraída después de las dosis indicadas finales (\* indica una reducción significativa,  $P < 0,05$ , en la calcitonina en circulación en comparación con muestras de suero de los animales de control tratados con vehículo).

5 **[0226]** El compuesto 1 inhibe el crecimiento tumoral de xenoinjerto de TT que se correlaciona con la reducción en suero de la calcitonina, tal como se representa en la figura 2A con la inhibición dependiente de la dosis lograda para las dosis de 10 y 30 mg/kg. Además, se observó enfermedad estable en las dosis de 30 y 60 mg/kg que estaba asociado con las concentraciones plasmáticas cíclicas máximas de 3.000 a 45.000 nmol/L. La administración subcrónica del Compuesto 1 fue bien tolerada, tal como se determina por los pesos corporales estables recogidos durante todo el periodo de dosificación. Dado que los tumores de xenoinjerto de TT se sabe que secretan altas cantidades de calcitonina humana que se correlacionan con el tamaño del tumor, las concentraciones séricas de calcitonina circulante se determinaron al final del período de dosificación. El suero de los animales de control tratados con vehículo mostraron altos niveles de calcitonina circulante que se redujeron notablemente (75%;  $P < 0,005$ ), a las dosis de 30 y 60 mg/kg cuando se compara con los animales de control del vehículo, como se representa en la figura 2B. Además, esta reducción en la calcitonina circulante de plasma se correlacionó con la inhibición del crecimiento del tumor TT descrito anteriormente. El análisis inmunohistoquímico de los tumores reveló disminuciones significativas y dependientes de dosis en los niveles de RET fosforilado y MET como se representa en la figura 2C, en ausencia de niveles reducidos de proteína total. Además, el tratamiento con compuesto 1 también dio lugar a reducciones dependientes de la dosis en Ki67 y CD31 en tejido tumoral viable que indican un impacto negativo sobre los marcadores de proliferación celular y la vascularización, tal como se resume en la Tabla 1.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 1. Resumen de análisis histoquímico de tumores de xenoinjertos TT

Dosis de cabozantinib (mg/kg)	RET <sup>(Y1062)</sup>		MET <sup>(Y1230/4F5)</sup>		CD31		Ki67	
	Área relativa	Inhibición (%) <sup>a</sup>	Área relativa	Inhibición (%) <sup>a</sup>	Células positivas (%)	Reducción (%) <sup>a</sup>	Células positivas (%)	Reducción (%) <sup>a</sup>
Vehículo	32,7 ± 2,6	nd	27,4 ± 2,6	nd	55,3 ± 6,9	nd	26,6 ± 3,9	nd
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

<sup>a</sup>P<0,05 a menos que se indique lo contrario

**Caso de estudio**

[0227] Una mujer japonesa de 51 años de edad que era una exfumadora se presentó en abril de 2009 para la evaluación de un derrame pleural derecho. La tomografía computarizada (TC) de tórax reveló una masa en el lóbulo medio derecho y un derrame pleural derecho. El examen citológico del derrame pleural reveló adenocarcinoma y se determinó que *EGFR* era de tipo salvaje usando el análisis de fusión de alta resolución. Un trabajo final sistémico no mostró evidencias de metástasis a distancia. Tampoco hubo tumor en el cuello o la tiroides en la TC. El paciente fue diagnosticado que tenía adenocarcinoma de pulmón en fase IIIB (cT4N0M0, sexta edición del Sistema Internacional para la estadificación del cáncer de pulmón). Fue tratada con 4 ciclos de cisplatino y gemcitabina, y el tumor primario mostró una respuesta parcial. El recrescimiento del tumor primario fue, sin embargo, descrito 8 meses después del final de la terapia. El paciente recibió posteriormente 13 ciclos de docetaxel como tratamiento de segunda línea y 2 ciclos de un fármaco en investigación (anticuerpo anti-HER2 ([receptor del factor de crecimiento epidérmico humano de tipo 2]) como tratamiento de tercera línea. En mayo de 2011, accedió a participar en el estudio de fase 1 de la monoterapia del Compuesto 1 y recibió cabozantinib a una dosis inicial de 40 mg una vez al día. Yamamoto, N., Nokihara, H., Wakui, H., Yamada, Y., Frye, J., Decillis, A., y Tamura, T. A phase 1 multiple ascending dose study of cabozantinib (XL184) monotherapy in Japanese patients with advanced solid tumors. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2011 10 Supl- 1 (resumen C26) y Nokihara, H., Yamamoto, N., Nakamichi, S., Wakui, H., Yamada, Y., Frye, J., Decillis, A., y Tamura, T. en *Annals of Oncology*, Vol. 23, suplemento 9, publicado el 17 de septiembre de 2012.

[0228] Las exploraciones CT de tórax a las 9 semanas demostraron una respuesta parcial (reducción del tumor 40,1%) de su tumor primario de pulmón (Figura 3), que se confirmó posteriormente a las 17 semanas. Durante los 10 ciclos (meses) de la terapia con cabozantinib, se emplearon las interrupciones del fármaco debido a elevaciones de lipasa de grado 3 en suero sin síntomas clínicos de la pancreatitis o hallazgos anormales en la ecografía abdominal. En febrero de 2012, terminó lamonoterapia con cabozantinib debido a la progresión de la enfermedad.

**Detección de fusión *KIF5B-RET***

[0229] La presencia de la fusión *KIF5B-RET* en este paciente se evaluó retrospectivamente utilizando muestras de pretratamiento y posttratamiento. El ADN genómico fue extraído de células de derrame pleural en el diagnóstico como una muestra de pretratamiento, y el ADN genómico y el ARN total se extrajeron de células de derrame pleural en progresión como muestra de posttratamiento. El ADN genómico se aisló utilizando un kit QIAamp DNA Mini (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.). Se usó TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) para la extracción de ARN total de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se examinó la calidad usando un bioanalizador de modelo 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.). La muestra mostró números de integridad de ARN > 6,0.

[0230] El ARN total (500 ng) se transcribió de forma inversa a ADNC utilizando Transcriptasa Inversa Superscript III (Invitrogen). El ADNc (correspondiente a 10 ng de ARN total) o 10 ng de ADN genómico se sometió a amplificación por reacción en cadena de polimerasa (PCR) utilizando Taq ADN polimerasa KAPA (KAPA Biosystems, Woburn, MA, EE.UU.). Las reacciones se llevaron a cabo en un ciclador térmico bajo las siguientes condiciones: 40 ciclos a 95°C durante 15 s, 60°C durante 15 s y 72°C durante 1 min (para la transcriptasa inversa (RT)-PCR) o 3 min (para PCR genómico), con una extensión final durante 10 min a 72°C. Se amplificó el gen que codificaba la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) para estimar la eficiencia de la síntesis de ADNc. Los productos de PCR fueron secuenciados directamente en ambas direcciones utilizando el kit BigDye Terminator y un secuenciador de ADN 3130x1 ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Este estudio fue aprobado por la junta de revisión institucional del Centro Nacional del Cáncer en Tokio, Japón. Los cebadores de PCR usados en el presente estudio se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2. Cebadores de PCR**

PCR genómico					
No.		Nombre	Localización	Secuencia	Uso
1		KIF5B-int15-F2.2	intrón 15 de KIF5B	5'-GGCATTGACTTGGTGGTAGAT-3'	PCR
2		KIF5B-RET-R1	exón 12 de RET	5'-TCCAAATTTCGCTTCTCCTA-3'	PCR
3		AD12-001Tseq-R1	intrón 11 de RET	5'-CCTGGGAACCCACAGTCAAG-3'	Secuenciación
RT-PCR					
No.		Nombre	Localización	Secuencia	Uso
3		KIF5B-867F	exón 10 de KIF5B	5'-ATTAGGTGGCAACTGTAGAACC-3'	PCR
4		RET-2381R	exón 12 de KIF5B	5'-AGCCACAGATCAGGAAAAGA-3'	PCR
5		KIF5B-RET-	exón 15 de	5'-AGGAAATGACCAACCACCAG-3'	Secuenciación

		F1	KIF5B		
6		GAPDH-F	exón 7 de GAPDH	5'-CCAAGGTCATCCATGACAAC-3'	PCR
7		GAPDH-R	exón 9 de GAPDH	5'-CACCCCTGTTGCTGTAGCCA-3'	PCR

[0231] Una fusión de la KIF5B (intrón 15) y RET (intrón 11) genes se detectó en los ADN genómicos en ambas muestras pre y post-tratamiento tal como se representa en la figura 4A, que muestra genoma KIF5B-RET PCR y secuenciación Sanger de pre- y muestras de tumor de post-tratamiento. Sanger secuenciación de los productos de RT-PCR verificó la expresión de la variante 1 transcripciones (exón KIF5B 15; RET exón 12), el tipo más común de transcritos de fusión KIF5B-RET, en las células tumorales, tal como se representa en la figura 4B, que muestra KIF5B-RET RT-PCR y secuenciación de Sanger de muestra de tumor post-tratamiento. BR0020 (variante KIF5B-RET 1 fusión positivo) y BR2001 (fusión KIF5B-RET negativo) se utilizaron como controles positivos y negativos. GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) transcripciones fueron amplificadas para estimar la cantidad y calidad de los ADNc. 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, fusiones Shibata T. KIF5B-RET en adenocarcinoma de pulmón. *Nat Med.* 2012 Feb 12; 18 (3): 375-7. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, Asaka R, Hamanaka W, Ninomiya H, Uehara H, Lim Choi Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Mano H, Ishikawa Y. RET, ROS1 y ALK fusiones en el cáncer de pulmón. *Nat Med.* 2012 Feb 12; 18 (3): 378-81. Lipson D, Capelletti M, Yelensky R, Otto G, Parker A, Jarosz M, Curran JA, Balasubramanian S, Bloom T, Brennan KW, Donahue A, SR Downing, Frampton GM, García L, Juhn F, Mitchell KC, White E, White J, Zwirko Z, Peretz, T, H Nechushtan, Soussan-Gutman L, Kim J, H Sasaki, Kim HR, Park Si, Ercan D, Sheehan CE, Ross JS, Cronin MT, Janne PA, Stephens PJ. Identificación de nuevos genes ALK y RET fusiones de cáncer colorrectal y de pulmón biopsias. *Nat Med.* 2012 Feb 12; 18 (3): 382-4. Materiales citológicos derivados de la pre-tratamiento de la muestra de efusión pleural fueron sometidos fluorescentes en análisis de hibridación in situ (FISH) usando una sonda conjunto RET de separación por rotura (cromosoma Ciencia Labo Inc, Sapporo, Japón), que se hibrida con la vecina 5' centromérica (RP11- 379D20, marcado con Spectrum verde) y 3' telomérica (RP11-875A4, marcado con Spectrum Red) secuencia del gen RET como se representa en la figura 4C, que muestra FISH de separación por rotura en el locus RET. Las células tumorales muestran señales además de las señales fusionadas split (5' verde y 3' orange) (ampliación original, 100 x). Se observó una señal dividida definido por 5' sondas y 3' observados a una distancia > 1 veces el tamaño de la señal en células tumorales. Por lo tanto, el tumor se considera que tienen un reordenamiento del gen RET, consistente con los resultados de PCR anteriores.

[0232] Este es el primer caso reportado en el que unaTKI RET ha mostrado actividad antitumoral marcada en un paciente con NSCLC positivo en la fusión *KIF5B-RET*. Hasta la fecha, los estudios in vitro revelaron que el crecimiento y las propiedades de señalización mediada por *KIF5B-RET* disminuyeron después del tratamiento con TKI, tales como vandetanib, sunitinib o sorafenib. Sin embargo, no ha habido ningún informe de que un paciente con NSCLC positivo en la fusión *KIF5B-RET* respondiera a estos fármacos. Nuestro informe sugiere que los pacientes con NSCLC avanzado que alberga la fusión *KIF5B-RET* pueden ser exquisitamente sensibles a la inhibición de RET terapéutica.

[0233] Hemos identificado que aproximadamente el 2% de los pacientes con NSCLC albergan la fusión KIF5B-RET. NSCLC positivo en la fusión KIF5B-RET comprende sólo un pequeño subconjunto de todos los cánceres de pulmón, sin embargo, el cáncer de pulmón es una enfermedad común y el número de pacientes con cáncer de pulmón está aumentando cada año, por lo que este subconjunto se traduce en un considerable número de pacientes en todo el mundo. Por lo tanto, la autores recomiendan el desarrollo de un procedimiento de detección sistemática para identificar KIF5B-RET NSCLC fusión-positivo. El descubrimiento de los reordenamientos de EML4-ALK en el CPNM se publicó en 2007 y la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos aprobó el crizotinib para esta enfermedad en 2011, seguido por la aprobación en Japón en 2012. Soda M, Choi YL, Enomoto M, S Takada, 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. identificación del gen de fusión de EML4-ALK transformar en cáncer de pulmón de células no pequeñas. *Naturaleza.* 2007 Aug 2; 448 (7153): 561-6. This paciente KIF5B-RET-positivos tenían una respuesta clínica marcada en el Compuesto 1, y este hallazgo sugiere que la fusión KIF5B-RET es un oncogén conductor en NSCLC y un objetivo terapéutico prometedor.

[0234] El compuesto 1 es un potente inhibidor de TK contra RET, una quinasa que se ha implicado en biopatología tumor. Por ejemplo, Yakes da a conocer que el compuesto 1 exhibe una fuerte inhibición de RET, con una  $CI_{50}$  de  $5,2 \pm 4,3$  nmol/L. Yakes FM, Chen J, Tan J, Yamaguchi K, Shi Y, Yu P, Qian F, Chu F, Bentzien F, Cancilla B, Orf J, Usted A, Laird AD, Engst S, Lee L, Lesch J, Chou YC, Joly AH. Cabozantinib (XL184), una novela MET y VEGFR2 inhibidor, suprime simultáneamente la metástasis, la angiogénesis y el crecimiento tumoral. *Mol Ther cáncer.* 2011 Dec; 10 (12): 2298-308. La activación de mutaciones en RET juega un papel importante en la tumorigénesis en el cáncer medular de tiroides (MTC). Sennino B, Naylor RM, Tabruyn SP, Usted WK, Aftab DT McDonald DM. La reducción de la invasividad tumoral y metástasis y prolongación de la supervivencia de los ratones RIP-Tag2 después de la inhibición de VEGFR más c-Met por XL184. *Mol Ther cáncer.* 2009 8 Suppl 1 (abstr A13). En una fase

5 I de escalada de dosis estudio de cabozantinib, 25 (68%) de 37 pacientes con MTC tuvo una respuesta parcial confirmada o enfermedad estable durante 6 meses o más. Kurzrock R, Sherman SI, la bola de DW, Forastiere AA, Cohen RB, Mehra R, Pfister DG, Cohen EE, Janisch L, Nauling F, Hong DS, Ng CS, de Ye L, Gagel RF, Frye J, Müller T, Ratain MJ, Salgia R. Actividad de XL184 (Cabozantinib), un inhibidor de la tirosina quinasa oral, en pacientes con cáncer de tiroides medular. J Clin Oncol. 2011 Jul 1; 29 (19): 2660-6. En este estudio se observó regresión del tumor en pacientes con y sin mutaciones de RET conocidos, sugiriendo que algunas respuestas fueron causadas por la inhibición de dianas distintas de RET, tales como MET y/o VEGFR2, o aberraciones todavía desconocidas en la vía de RET.

10 **[0235]** En resumen, el paciente con NSCLC con la fusión *KIF5B-RET* tuvo una respuesta clínica a cabozantinib, lo que indica que cabozantinib puede estar activo en pacientes con NSCLC avanzado que albergan la fusión *KIF5B-RET*. Se justifica la urgente evaluación clínica de RET-TKIs contra NSCLC positivo de la fusión *KIF5B-RET*.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

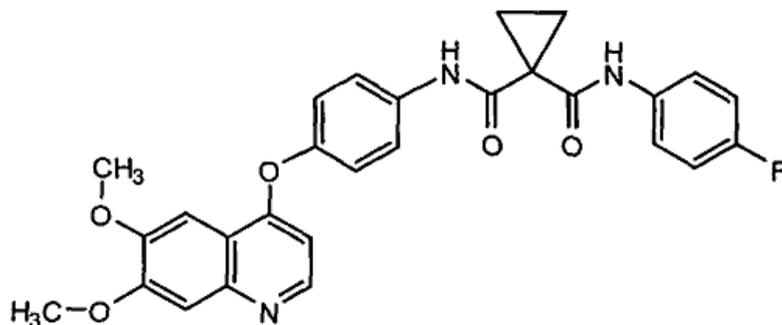
**[0236]**

<110> Exelixis, Inc.  
 <120> Procedimiento de tratamiento de adenocarcinoma de pulmón  
 20 <130> 224 990/12-001C-US/369.439  
 <140> PCT/US2013/058768  
 <141> 09/09/2013  
 <150> US 61/698.143  
 <151> 07/09/2012  
 25 <160> 8  
 <170> PatentIn versión 3.5  
 <210> 1  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 30 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> secuencia generada sintéticamente  
 <400> 1  
 ttggtgtag ggcattgac a 22  
 35 <210> 2  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 40 <223> secuencia generada sintéticamente  
 <400> 2  
 tccaaattcg ccttctccta 20  
 <210> 3  
 <211> 20  
 45 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> secuencia generada sintéticamente  
 <400> 3  
 50 cctggaacc cacagtcaag 20  
 <210> 4  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 55 <220>  
 <223> secuencia generada sintéticamente  
 <400> 4  
 attagtggc aactgtagaa cc 22  
 <210> 5  
 60 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> secuencia generada sintéticamente  
 65 <400> 5  
 agccacagat caggaaaaga 20

<210> 6  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial  
5 <220>  
<223> secuencia generada sintéticamente  
<400> 6  
aggaaa TGAC caaccaccag 20  
<210> 7  
10 <211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> secuencia generada sintéticamente  
15 <400> 7  
ccaaggtcat ccatgacaac 20  
<210> 8  
<211> 19  
<212> ADN  
20 <213 > secuencia artificial  
<220>  
<223> secuencia generada sintéticamente  
<400> 8  
caccctgttg ctgtagcca 19  
25

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto para usar en un procedimiento de tratamiento de adenocarcinoma de pulmón en un paciente, en el que el compuesto es la sal de malato del Compuesto 1:



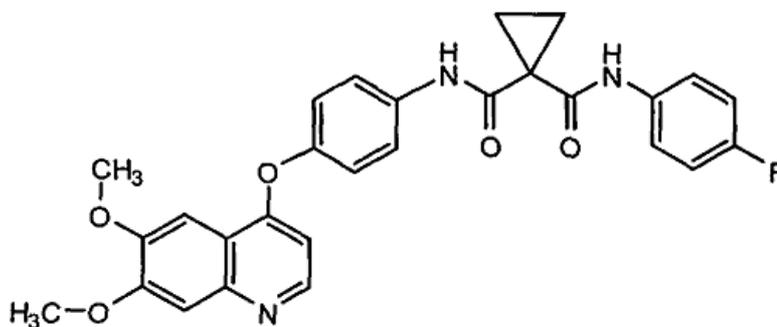
Compuesto 1

y en el que el adenocarcinoma de pulmón es cáncer de pulmón no microcítico positivo en la fusión *KIF5B-RET*.

2. Compuesto para usar, según la reivindicación 1, en el que el compuesto es la sal (L)- o (D)-malato del Compuesto 1.

3. Compuesto para usar, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el compuesto se administra posterior al tratamiento con docetaxel.

4. Compuesto para usar en un procedimiento de inhibir o invertir el progreso del cáncer mediado por *KIF5B-RET* en un mamífero, en el que el compuesto es la sal de malato del Compuesto 1:



Compuesto 1

5. Compuesto para usar, según, según la reivindicación 4, en el cáncer mediada por *KIF5B-RET* es adenocarcinoma de pulmón.

6. Compuesto para usar, según la reivindicación 5, en el que el adenocarcinoma de pulmón es cáncer de pulmón no microcítico.

7. Compuesto para usar, según la reivindicación 6, en el que el adenocarcinoma de pulmón es cáncer de pulmón no microcítico positivo en la fusión *KIF5B-RET*.

8. Compuesto para usar, según la reivindicación 4, en el que el compuesto se administra como una composición farmacéutica que comprende el compuesto y al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

9. Compuesto para usar, según la reivindicación 8, en el que la composición farmacéutica se administra diariamente durante más de 3 meses.

10. Compuesto para usar, según la reivindicación 4, en el que la detección del cáncer de pulmón no microcítico positivo en la fusión *KIF5B-RET* se realiza mediante un ensayo FISH, CISH o SISH.
- 5 11. Compuesto para usar, según la reivindicación 4, en el que la detección del cáncer de pulmón no microcítico positivo en la fusión *KIF5B-RET* se realiza usando cualquier forma de PCR de genoma, secuenciación directa, secuenciación por PCR, RT-PCR o un ensayo similar.
- 10 12. Compuesto para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el compuesto produce al menos un efecto terapéutico seleccionado del grupo que consiste en reducción en el tamaño de un tumor, la reducción en la metástasis, la remisión completa, la remisión parcial, enfermedad estable, aumento de la tasa de respuesta global y una respuesta patológica completa.
- 15 13. Compuesto para usar en un procedimiento de diagnóstico y tratamiento de un paciente en el que el paciente tiene un tumor de NSCLC y el tumor se identifica como NSCLC positivo en la fusión *KIF5B-RET*, en el que el compuesto es la sal de malato del Compuesto 1, tal como se define en la reivindicación 1, y en el que el compuesto se administra con al menos un portador farmacéuticamente aceptable.
- 20 14. Compuesto para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que el Compuesto 1 se administra por vía oral una vez al día como sal de malato como una cápsula o comprimido que contiene 20, 40 o 60 mg de Compuesto 1.
- 25 15. Compuesto para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que el compuesto se administra posterior al tratamiento con cisplatino y/o gemcitabina y/o docetaxel.

Vehículo	+	-	-	-	-	
Compuesto 1	-	3	10	30	100	mg/kg



Figura 1A

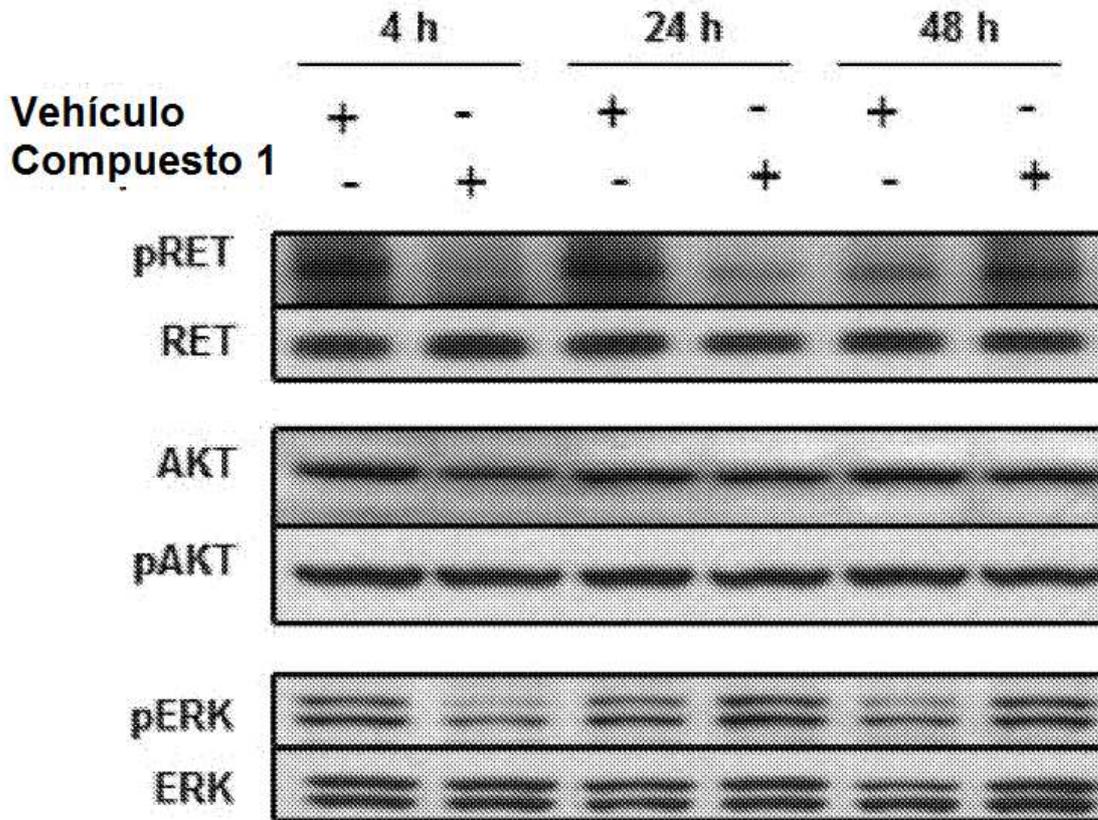


Figura 1B

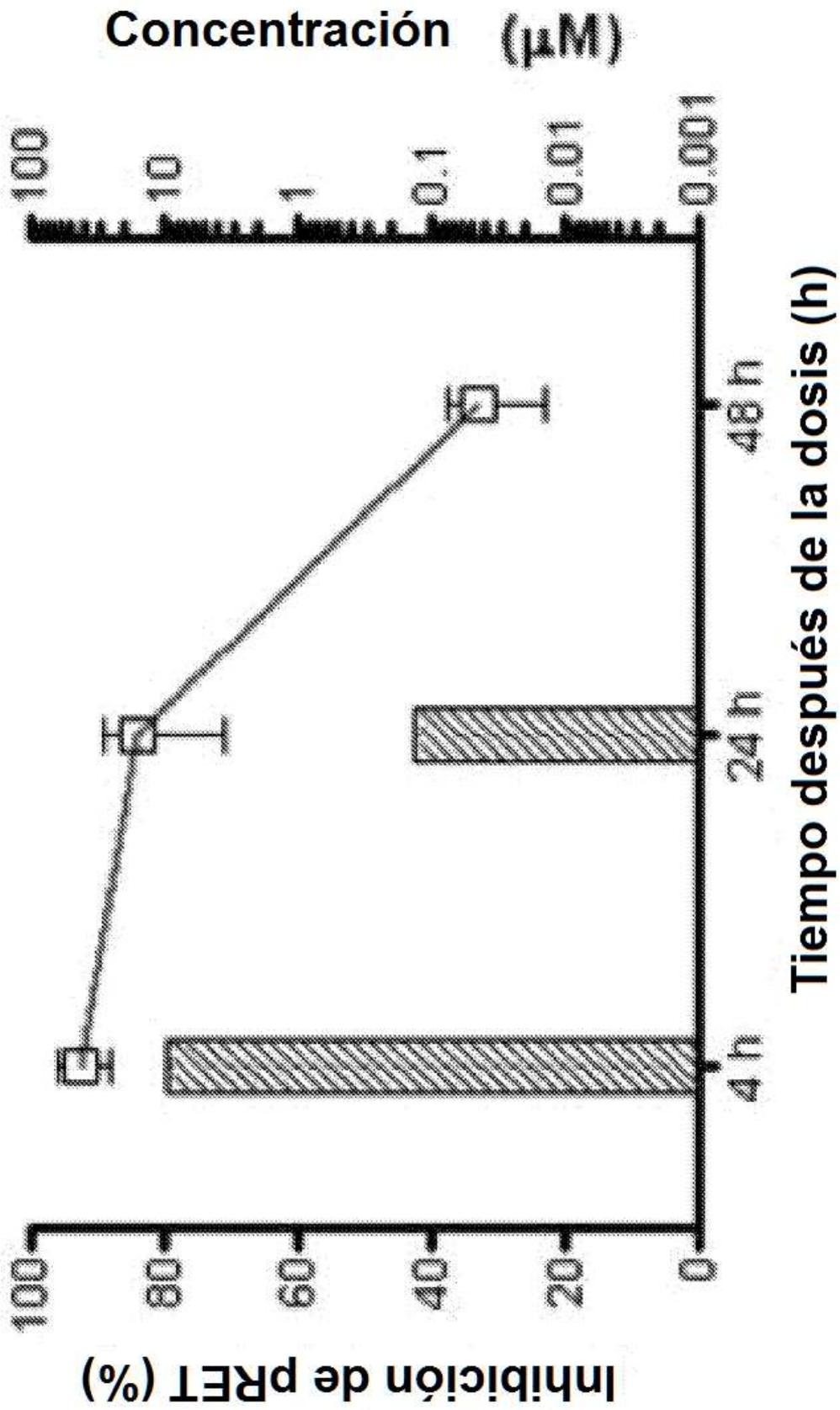


Figura 1C

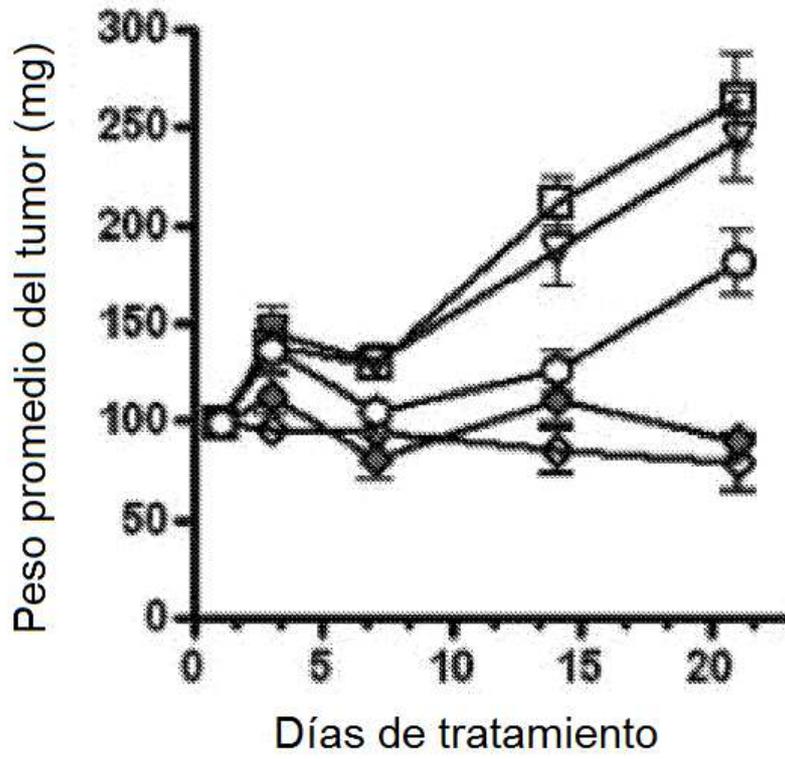


Figura 2A

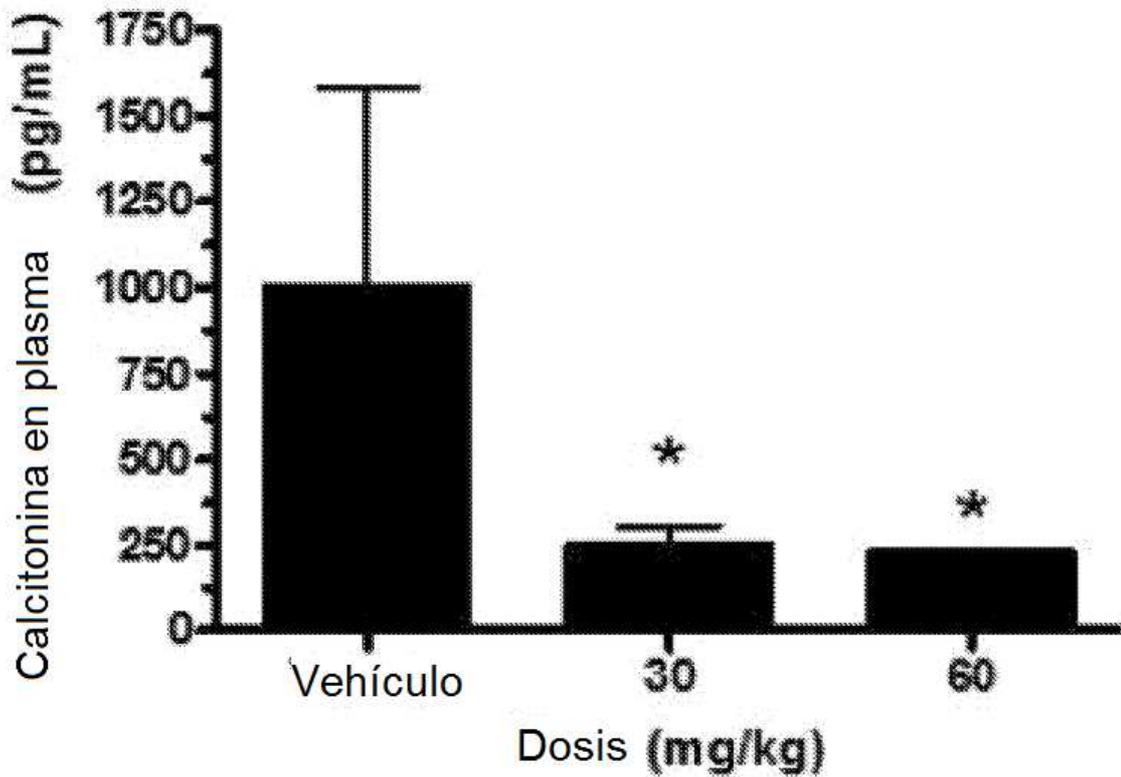


Figura 2B

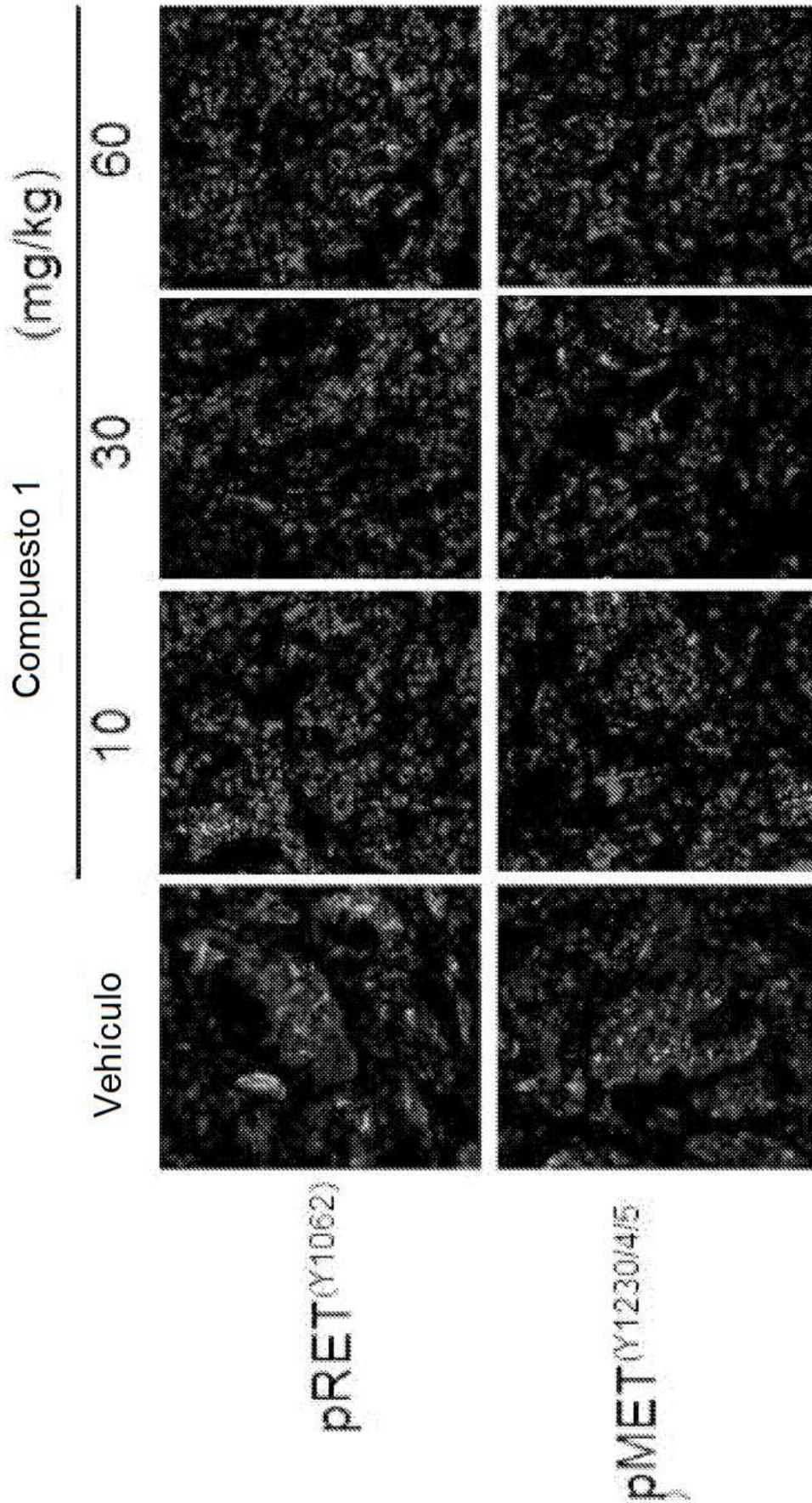


Figura 2C

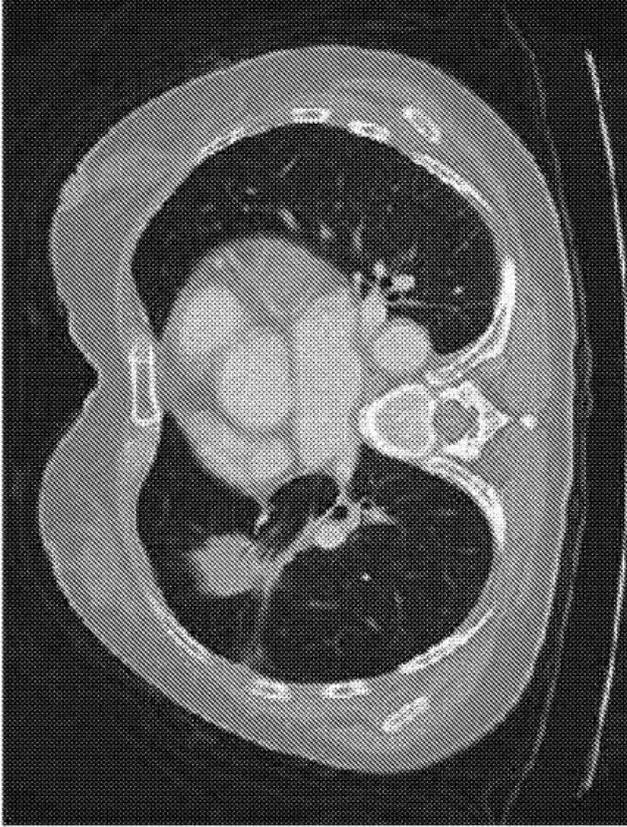


Figura 3B

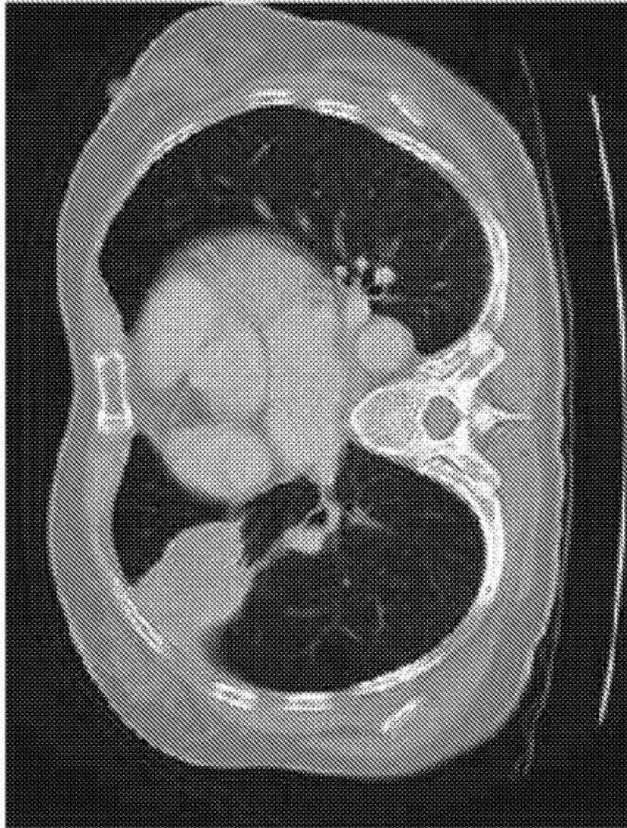


Figura 3A

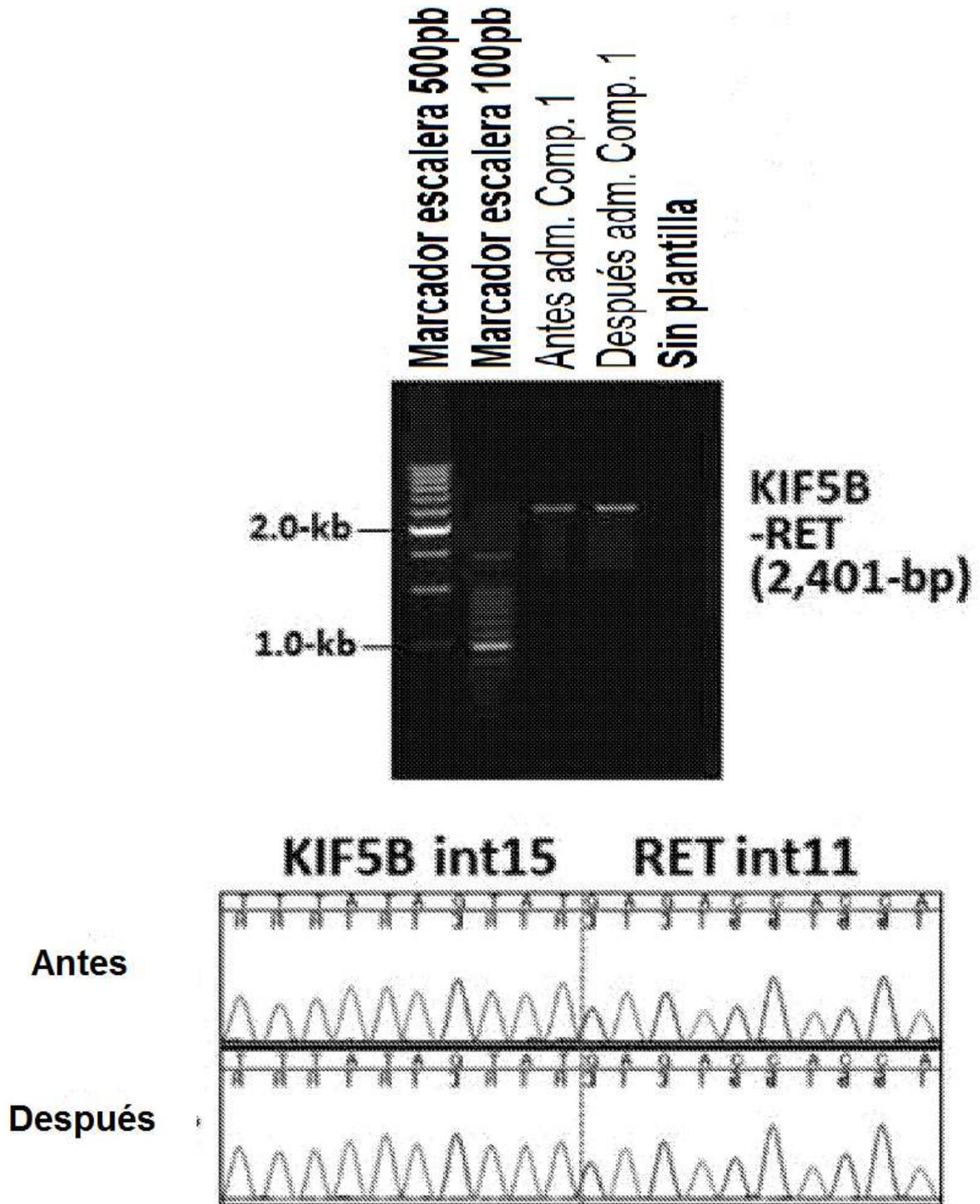


Figura 4A

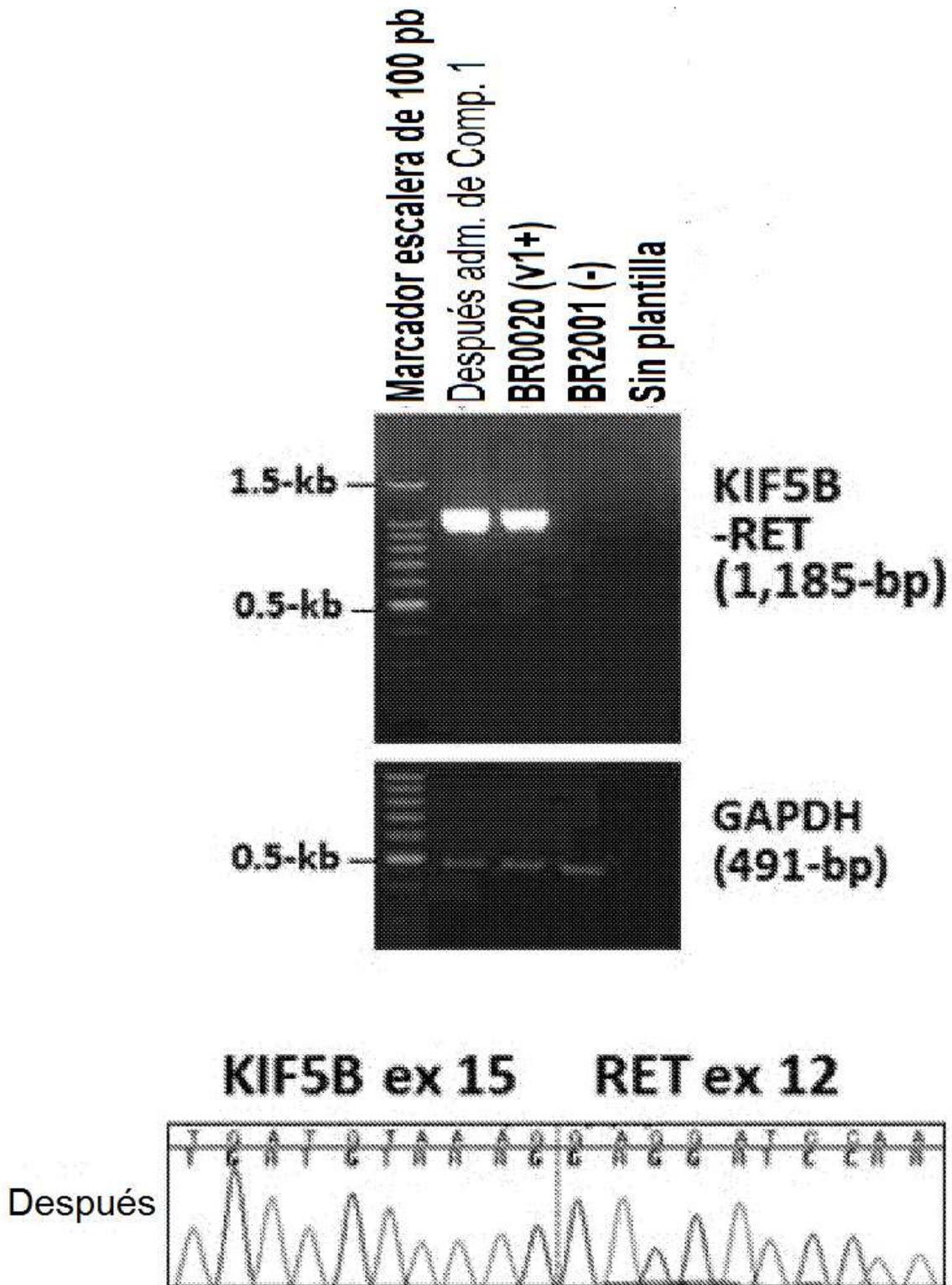


Figura 4B

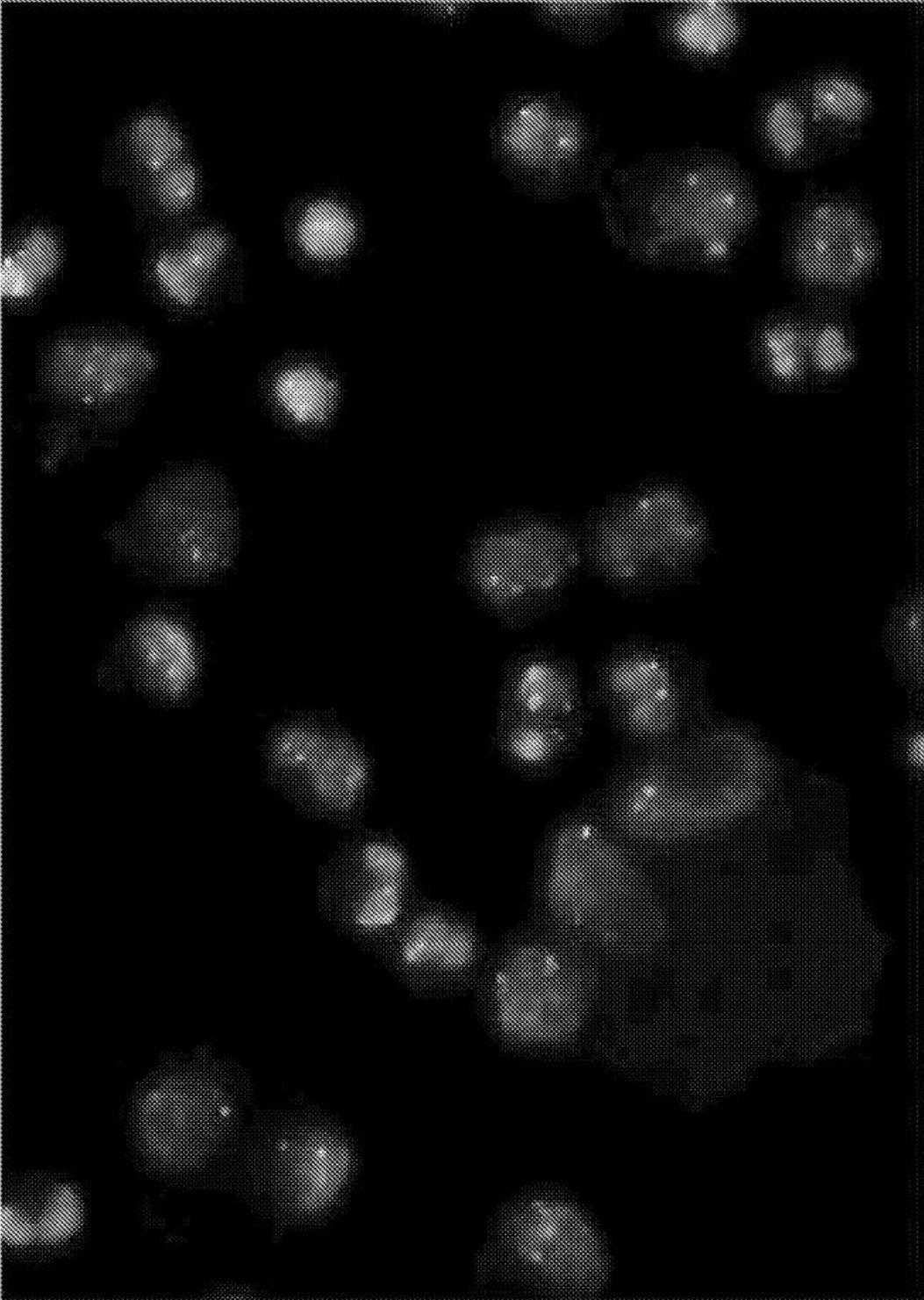


Figura 4C