



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119321** (13) **C2**  
(51) МПК (2019.01)**C07D 215/22** (2006.01)**C07C 305/24** (2006.01)**C07C 233/60** (2006.01)**A61K 31/47** (2006.01)

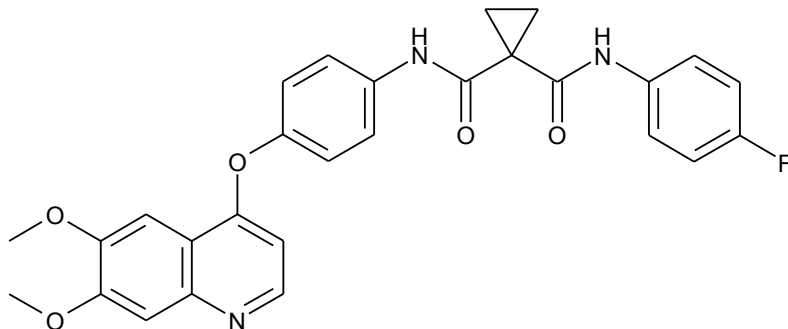
A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки:	<b>а 2015 10088</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и):	<b>Афтаб Дана Т. (US),</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки:	<b>17.03.2014</b>		<b>Наганатхан Срірам (US),</b>
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід:	<b>10.06.2019</b>		<b>Сюй Вей (US),</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>61/792,413</b>		<b>Лейсі Стівен (US),</b>
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>15.03.2013</b>	<b>(73)</b> Власник(и):	<b>ЕКСЕЛІКСІС, ІНК.,</b>
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	<b>US</b>		210 East Grand Avenue, South San Francisco, CA 94080, United States of America (US)
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку:	<b>25.02.2016, Бюл.№ 4</b>	<b>(74)</b> Представник:	<b>Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115</b>
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>10.06.2019, Бюл.№ 11</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	<b>WO 2005/030140 A2</b>
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	<b>PCT/US2014/030524, 17.03.2014</b>		

**(54) МЕТАБОЛІТИ N-(4-{[6,7-БІС(МЕТИЛОКСИ)ХІНОЛІН-4-ІЛ]ОКСИ}ФЕНІЛ)-N'-(4-ФТОРФЕНІЛ)ЦИКЛОПРОПАН-1,1-ДИКАРБОКСАМІДУ****(57)** Реферат:

Даний винахід належить до метаболітів кабозантинібу (I), а також до їхнього застосування.



(I)

UA 119321 C2



Претензія на пріоритет

Дана заявка вимагає пріоритет на основі заявки на патент США № 61/792413, поданої 15 березня 2013 року. Вміст вищезазначеної заявки повністю включений в дану заявку.

Область техніки

5 [0001] Даний опис відноситься до метаболітів N-(4-{[6,7-біс(метилокси)хінолін-4-іл]окси}феніл)-N'-(4-фторфеніл)циклопропан-1,1-дикарбоксаміду, інгібітора c-Met.

Рівень техніки

10 [0002] Традиційно значні поліпшення в лікуванні раку зв'язують із виявленням терапевтичних агентів, що діють за допомогою нових механізмів. Одним з механізмів, який можна застосовувати для лікування раку, є модулювання активності протеїнкінази, оскільки передача сигналу за допомогою активації протеїнкінази є відповідальною за багато характеристик пухлинних клітин. Передача сигналу за участю протеїнкіназ є особливо важливою, наприклад, при раку щитовидної залози, раку шлунка, раку голови і шиї, раку легенив, раку молочної залози, раку передміхурової залози і колоректальному раку, а також при

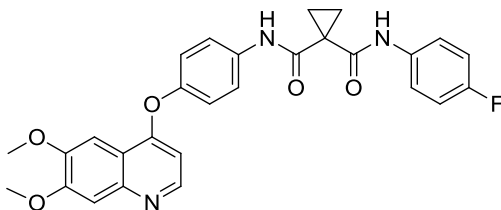
15 росту і проліферації пухлинних клітин головного мозку.  
[0003] Протеїнкінази можна розділити на рецепторний і нерецепторний тип. Тірозинкінази рецепторного типу складаються з великої кількості трансмембранних рецепторів з різноманітною біологічною активністю. Що стосується докладного обговорення тірозинкіназ рецепторного типу, див. Plowman et al., DN&P 7(6): 334-339, 1994. Оскільки протеїнкінази і їх ліганди відіграють значну роль у різних клітинних активностях, порушення регуляції ферментативної активності протеїнкіназ може приводити до змін властивостей клітини, таких як неконтрольований клітинний ріст, пов'язаний з раком. Додатково до онкологічних показань змінена кіназна передача сигналу пов'язана з іншими численними патологічними захворюваннями, включаючи, наприклад, імунологічні захворювання, серцево-судинні

20 захворювання, запальні захворювання і дегенеративні захворювання. Отже, протеїнкінази є привабливими мішенями для пошуку низькомолекулярних лікарських засобів. Особливо привабливі мішені для низькомолекулярної модуляції по відношенню до антиангіогенної і антипроліферативної активності включають тірозинкінази рецепторного типу Ret, c-Met і VEGFR2.  
[0004] Кіназа c-Met являє собою прототипний член підродини гетеродимерних рецепторних тірозинкіназ (RTK), що включає Met, Ron і Sea. Ендогенним лігандом для c-Met є фактор росту гепатоцитів (HGF), потужний індуктор ангіогенезу. Зв'язування HGF із c-Met викликає активацію рецептора за допомогою аутофосфорилування, приводячи в результаті до посилення залежної від рецептора передачі сигналу, яка сприяє росту клітини і інвазії. Показано, що анти-HGF

25 антитіла або HGF антагоністи інгібують метастазування пухлини in vivo (див. Maulik et al. Cytokine & Growth Factor Reviews 2002 13, 41-59). Надекспресія c-Met, VEGFR2 і/або Ret була продемонстрована на великому наборі типів пухлин, включаючи пухлини молочної залози, товстої кишки, нирки, легені, пласкоклітинну мієлоїдну лейкемію, гемангіоми, меланоми, астроцитарну пухлину (яка включає гліобластому, гігантоклітинну гліобластому, гліосаркому і гліобластому з олігодендрогліальними компонентами). Ret білок являє собою трансмембранний рецептор з тірозинкіназною активністю. Ret мутує в більшості спадкоємних формах медулярного раку щитовидної залози. Дані мутації активують кіназну функцію Ret і перетворюють його в онкогенний продукт.  
[0005] Відповідно, низькомолекулярні сполуки, які специфічно інгібують, регулюють та/або

45 модулюють передачу сигналу кіназ, зокрема включаючи Ret, c-Met і VEGFR2, що описані вище, являються особливо підходящими в якості засобу для лікування або запобігання хворобливого стану, пов'язаного з порушеною клітинною проліферацією і ангіогенезом. Однією такою малою молекулою є XL184, відома під різними назвами, як N-(4-{[6,7-біс(метилокси)хінолін-4-іл]окси}феніл)-N'-(4-фторфеніл)циклопропан-1,1-дикарбоксамід, а також під назвою кабозантиніб (COMETRIQ™), яка є L-малатною сіллю кабозантинібу. Кабозантиніб має хімічну

50 структуру:



В листопаді 2012 року кабозантиніб отримав нормативне затвердження в Сполучених Штатах для лікування прогресуючого метастатичного медулярного раку щитоподібної залози. Інші клінічні випробування кабозантинібу продовжуються.

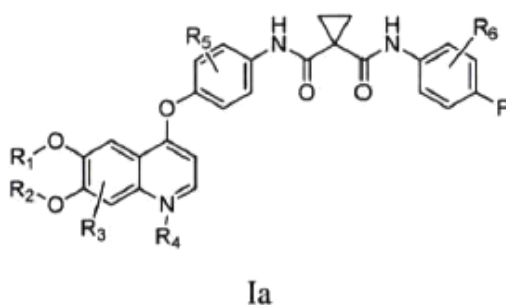
[0006] В WO 2005/030140 описаний синтез кабозантинібу (приклад 48), а також описана терапевтична активність даної молекули по інгібуванню, регулюванню та/або модулюванню передачі сигналу кіназ (аналізи, таблиця 4, строка 289). Приклад 48 знаходиться в параграфі [0353] в WO 2005/030140.

[0007] Існує потреба в ідентифікації сполук, які проявляють подібну з кабозантинібом активність.

Короткий опис винаходу

[0008] Ці та інші потреби задовільняються даним винаходом, який відноситься до метаболітів кабозантинібу.

[0009] В одному варіанті реалізації даного аспекта метаболіт являє собою сполуку формули Ia



яка має одну або більше з наступних ознак:

a) один з  $R_1$  або  $R_2$  являє собою H,  $SO_3H$  або фрагмент глюкуронової кислоти, а інший являє собою Me;

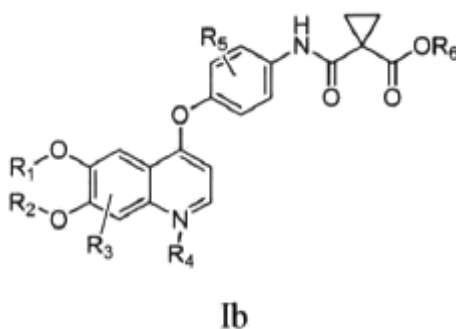
b)  $R_3$  являє собою OH або  $OSO_3H$ ;

c)  $R_4$  являє собою  $O^-$ , за умови, що коли  $R_4$  являє собою  $O^-$ , N являє собою  $N^+$ ;

d)  $R_5$  являє собою OH або  $OSO_3H$ ; і

e)  $R_6$  являє собою OH або  $OSO_3H$ .

[0010] В ще одному варіанті реалізації даного аспекта метаболіт являє собою сполуку формули Ib



де:

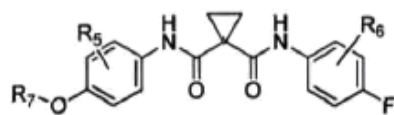
a)  $R_1$  або  $R_2$  являють собою Me; або один з  $R_1$  або  $R_2$  являє собою H,  $SO_3H$  або фрагмент глюкуронової кислоти, а інший являє собою Me;

b)  $R_3$  являє собою H, OH або  $OSO_3H$ ;

c)  $R_4$  відсутній або являє собою  $O^-$ , за умови, що коли  $R_4$  являє собою  $O^-$ , N являє собою  $N^+$ ;

d)  $R_6$  являє собою H або Me.

[0011] В ще одному варіанті реалізації даного аспекта метаболіт являє собою сполуку формули Ic



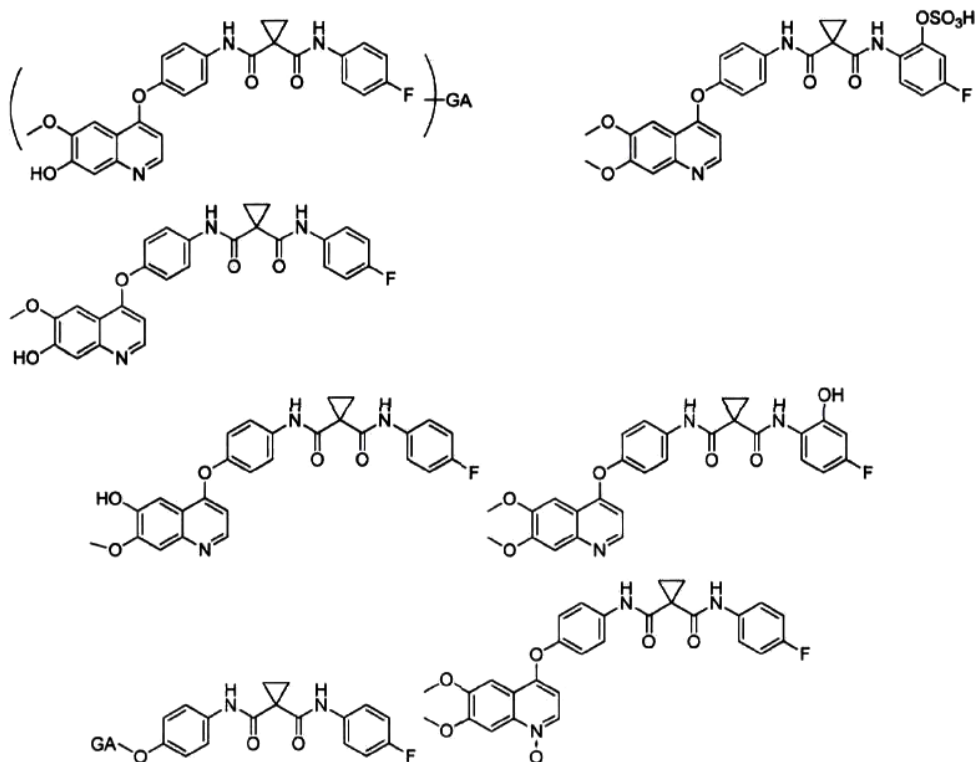
Ic

де:

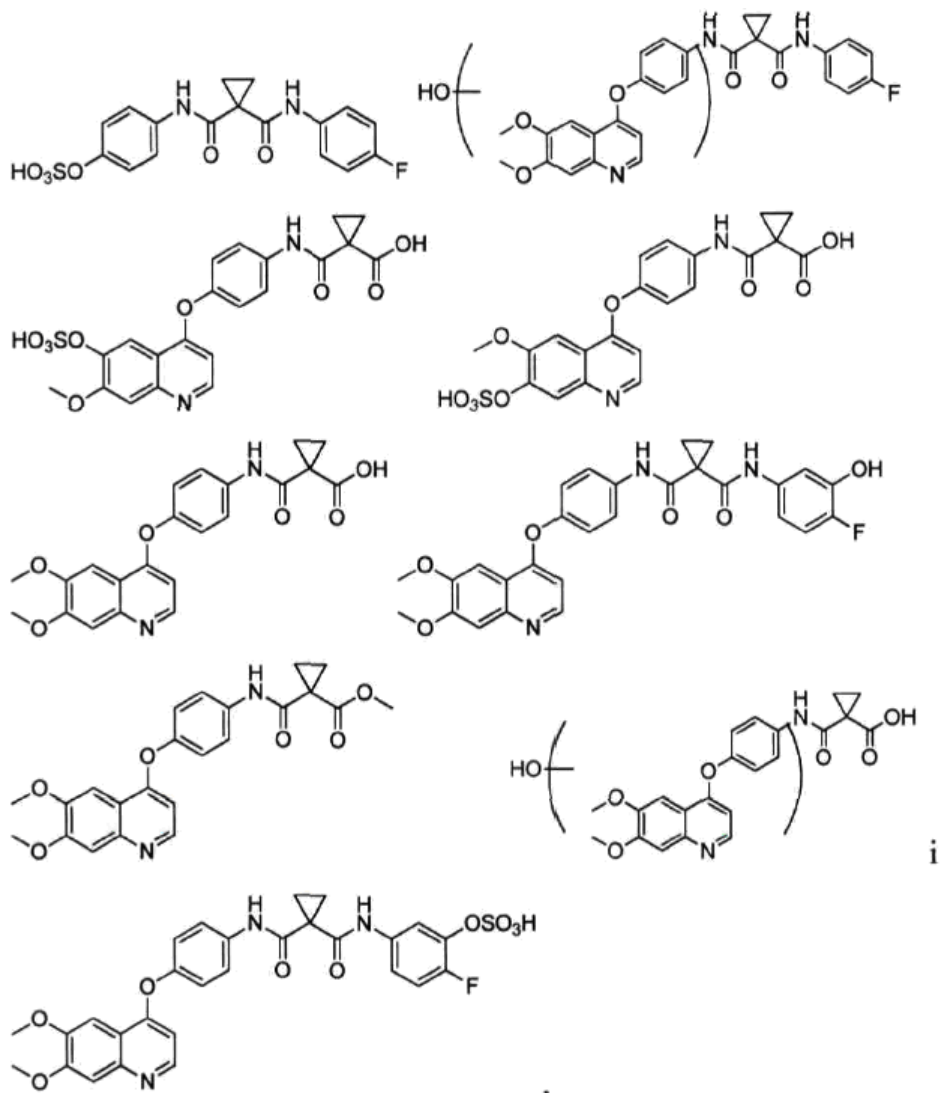
- а)  $R_5$  являє собою OH або  $OSO_3H$ ; і  
 б)  $R_6$  являє собою OH або  $OSO_3H$ ; і  
 5    в)  $R_7$  являє собою H,  $SO_3H$  або фрагмент глюкуронової кислоти.

[0012] В одному аспекті даний винахід відноситься до виділеного метаболіту кабозантинібу, що має формулу Ia, Ib або Ic.

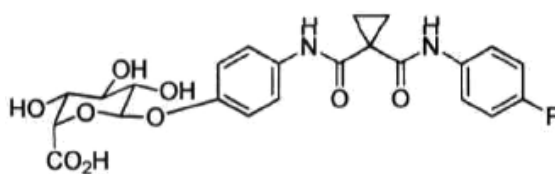
[0013] В одному варіанті реалізації метаболіт кабозантинібу обрано з:



10

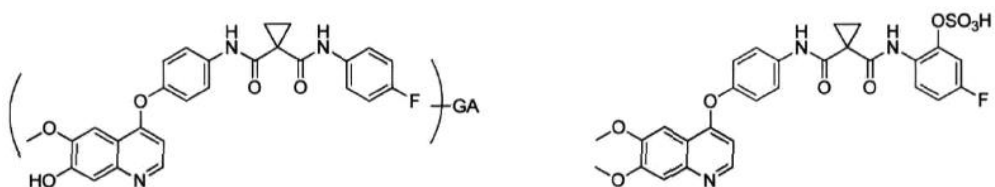


де GA являє собою фрагмент глюкуронової кислоти, такої як, наприклад,

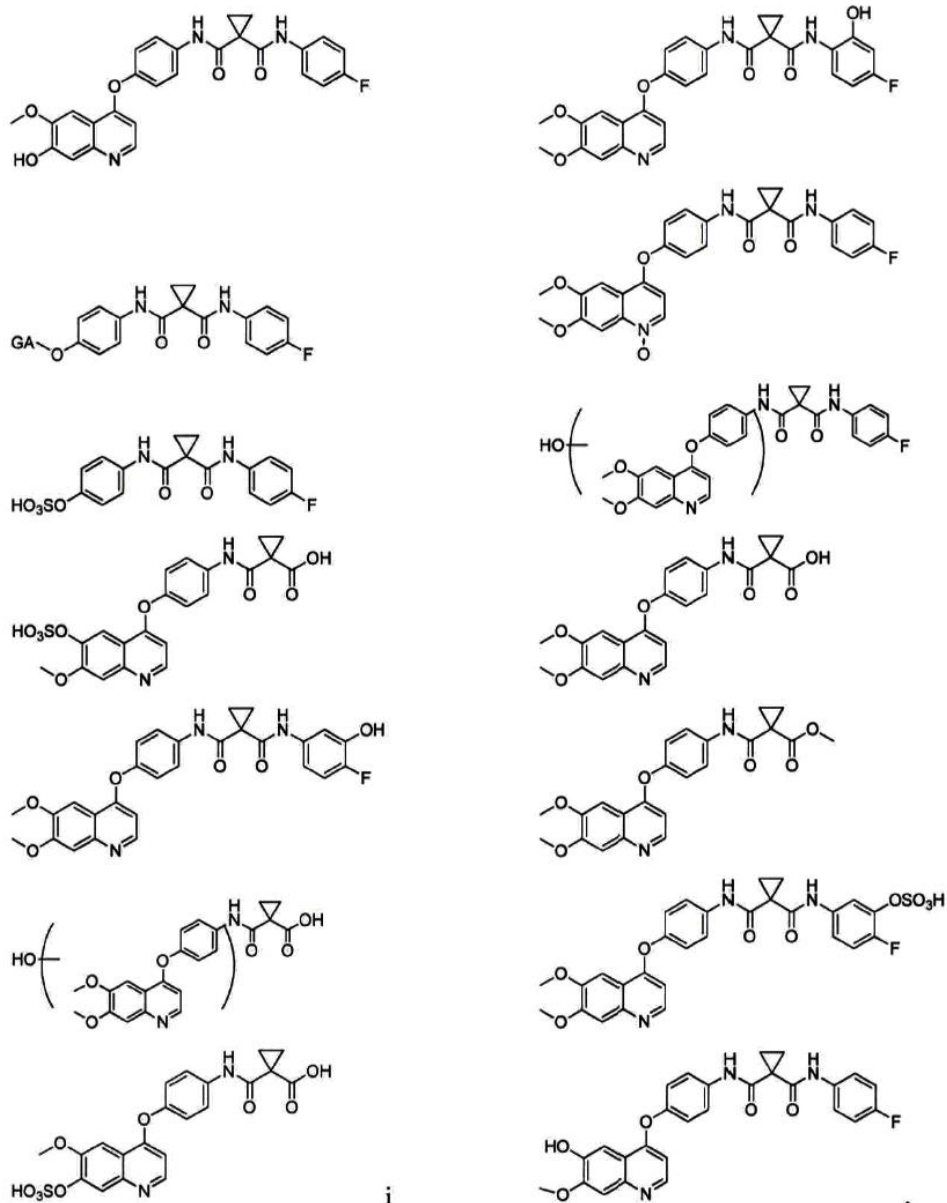


5

[0014] В ще одному аспекті даний винахід відноситься до сполуки, яка обрана з:

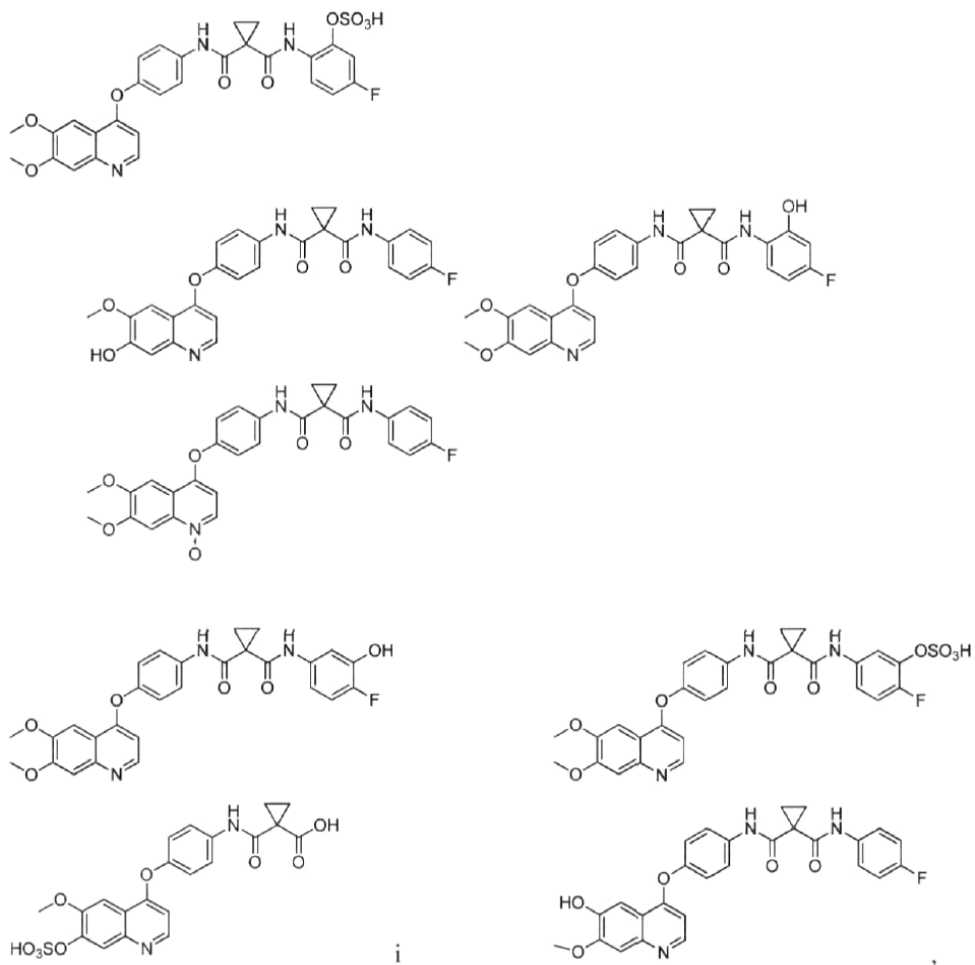


10



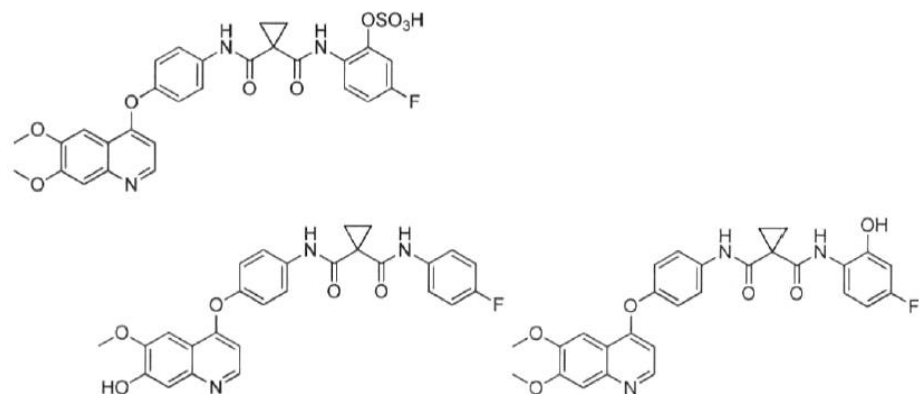
де GA являє собою фрагмент глюкуронової кислоти.

- 5 [0015] В ще одному аспекті даний винахід відноситься до способу лікування захворювань або розладів, пов'язаних з неконтрольованими, ненормальними та/або небажаними клітинними активностями, причому спосіб включає введення ссавцю, що має в цьому потребу, терапевтично ефективної кількості сполуки, яка є метаболітом кабозантіну. В одному варіанті реалізації метаболіт обрано з:

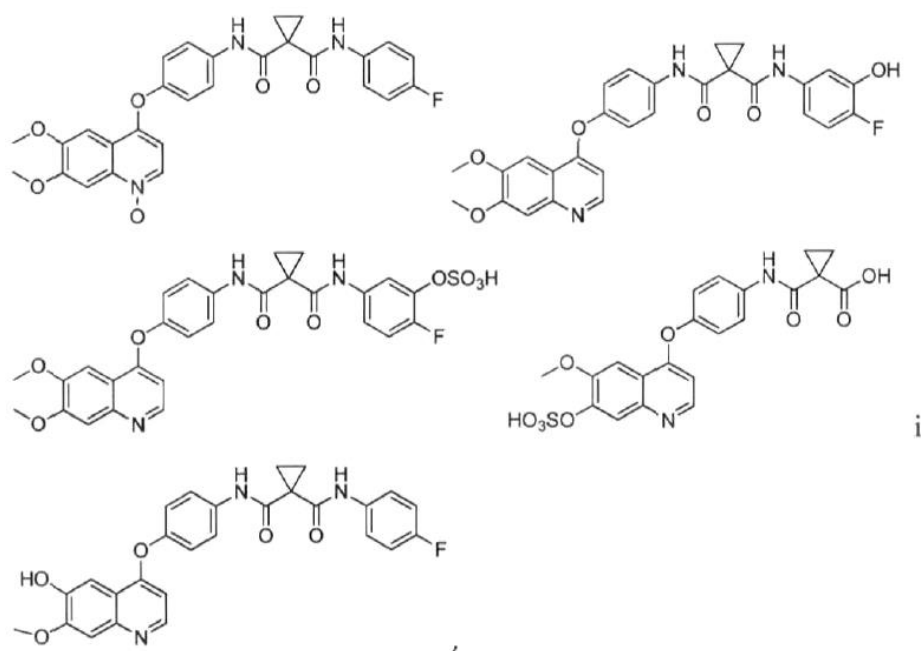


або їх фармацевтично прийнятної солі.

- [0016] В ще одному аспекті даний винахід відноситься до фармацевтичної композиції, що містить терапевтично активний метаболіт кабозантинібу і щонайменше один фармацевтично прийнятний носій. В одному варіанті реалізації метаболіт обрано з:







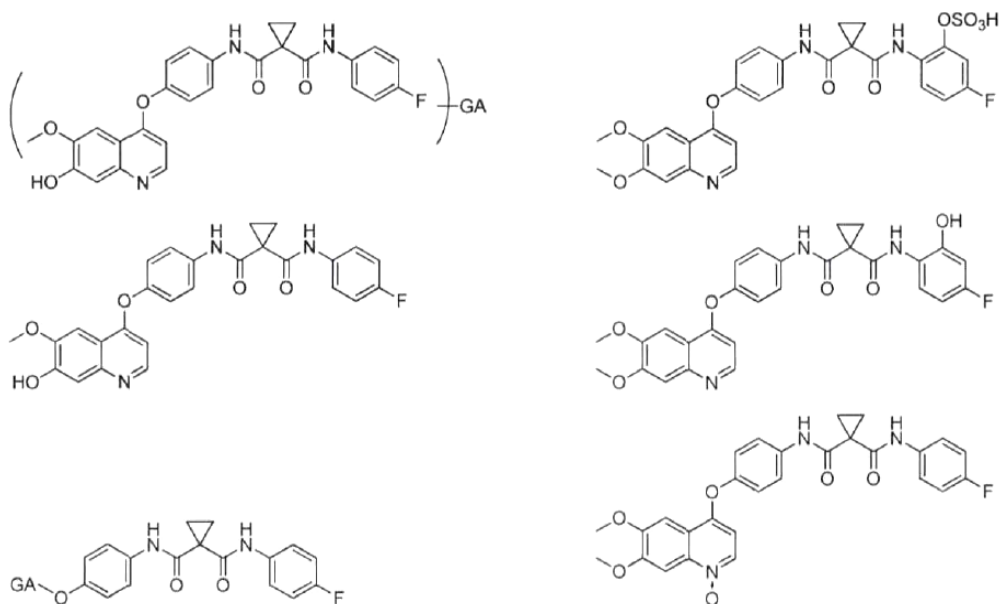
або їх фармацевтично прийнятної солі і щонайменше одного фармацевтично прийнятного носія.

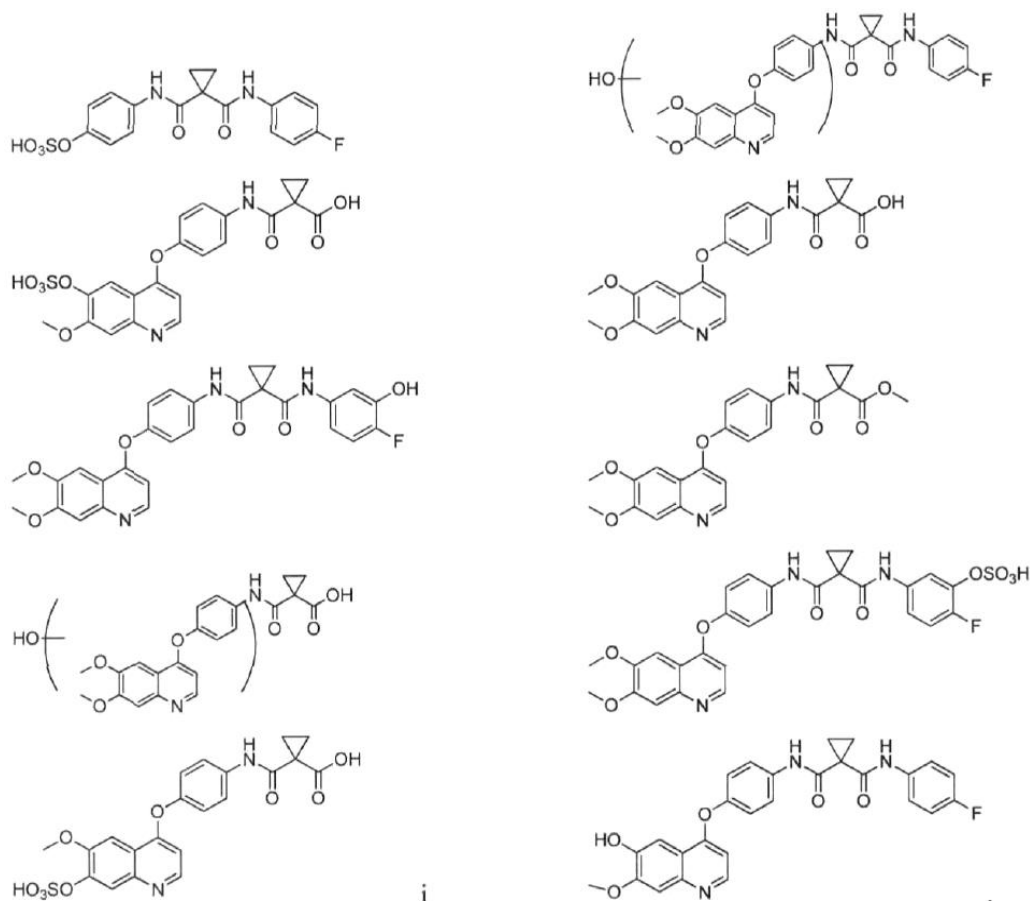
5 [0017] В ще одному аспекті даний винахід відноситься до способу ідентифікації метаболіту кабозантинібу, що включає:

уведення кабозантинібу ссавцю;

виявлення або вимірювання рівня або концентрації метаболіту кабозантинібу у ссавця в тканинах або біологічних рідинах ссавця;

10 де метаболіт обрано з групи, що складається з:





де GA являє собою фрагмент глюкуронової кислоти.

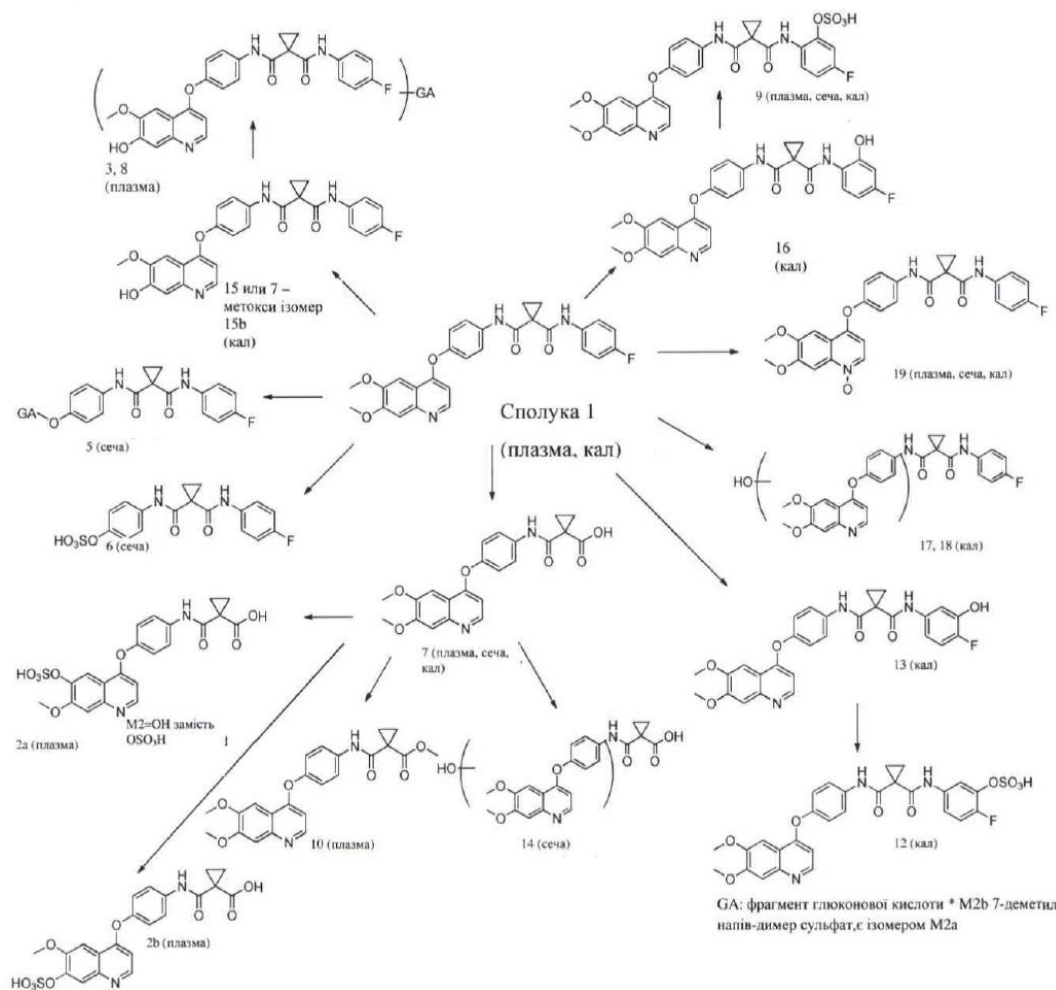
- [0018] Сполуки можуть додатково застосовуватися в інших способах; наприклад, в способах біологічних досліджень для визначення інгібуючої активності кінрази досліджуваних сполук або в якості внутрішніх стандартів в суміжних способах.

Докладний опис винаходу

- [0019] В одному аспекті даний винахід відноситься до метаболітів кабозантинібу, зокрема до метаболітів людини. Таким чином, метаболіти можуть згадуватися як "метаболіти людини". Метаболіти кабозантинібу людини включають метаболіти кабозантинібу, які були сформовані в органах людини після приймання всередину або введення кабозантинібу у відповідності з клінічними протоколами по відношенню до дозування і контролю, включаючи ті, що описані в даному документі. В різних варіантах реалізації термін охоплює молекулярні частинки, утворені *in vivo*, незалежно від того, чи точно виявлені ці частинки або проаналізовані в конкретному дослідженні. Також допускають, що деякі метаболіти являються унікальними для окремих осіб, що відображає різний генетичний склад, а також наявність і активність різних ферментів, включаючи ферменти цитохрому P450 і UGT, які залучені в метаболізм. Таким чином, метаболіти людини охоплюють всі такі метаболіти, що утворені в організмі людини.

- [0020] Деякі метаболіти людини зображені на схемі 1. Ці метаболіти людини ідентифікували в процесі клінічних досліджень кабозантинібу, який представлений в якості сполуки I на схемі 1, шляхом визначення метаболічного профілю, зокрема, з плазми крові людини, сечі і калу.

Схема 1



[0021] В різних варіантах реалізації метаболіти кабозантинібу, включаючи ті, що показані на схемі 1, виділяють з тканин і рідин організму та/або отримують синтетично у відповідності зі способами, доступними фахівцю в даній області техніки. Різні процеси поділу можуть бути виконані на тканині і рідині зразків, щоб забезпечити зразки для подальших аналізів, таких як ядерний магнітний резонанс, газова хроматографія (ГХ), рідинна хроматографія (РХ) і мас-спектрометрія. У таких зразках метаболіти містяться в композиціях, які, по суті, відсутні в присутності будь-якого іншого метаболіту. Присутність метаболітів може бути визначена кількісно за допомогою фізичних методів, таких як вимірювання ядерного розпаду радіоактивних ізотопів, вимірювання показника переломлення, іонізації полум'я, іонізації і відхилення в магнітних полях, ультрафіолет (УФ поглинання) і тому подібне.

[0022] У різних варіантах реалізації метаболіти людини представлені в кристалічних формах або у формах розчину, які мають значний ступінь чистоти. Шляхи органічного синтезу являються підходящими для одержання сполук у відносному чистому вигляді, наприклад, чистотою 80 відсотків або більше, 90 відсотків або більше, 95 відсотків або більше, або 99 відсотків або більше. Перекристалізація і інші способи очищення можуть бути здійснені з одержанням сполук, які, по суті, на 100 відсотків чисті. Такі способи синтезу і способи очищення відомі в даній області техніки.

[0023] У різних варіантах реалізації метаболіти представлені в по суті у чистому вигляді. "По суті чистий" означає, що метаболіти є досить чистими для затвердження Керуванням по нагляду за якістю продуктів харчування і лікарських засобів Уряду США (FDA) і не містять, по суті, ніяких забруднюючих домішок або інших матеріалів. З іншого боку, "по суті чистий" означає рівень домішок, що не виявляє шкідливого або неприйнятного впливу на властивості сполук щодо безпеки, ефективності, стабільності і інших бажаних властивостей.

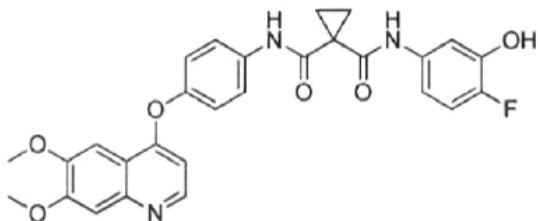
[0024] В одному варіанті реалізації даний винахід відноситься до виділених метаболітів, як показано на схемі 1. В цьому і інших варіантах реалізації метаболіт обрано з:



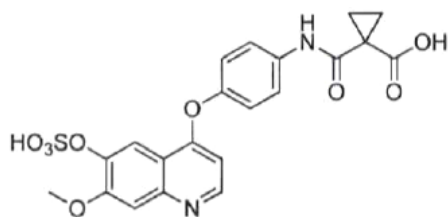
5

COc1cc2c(c1)nc3cc(OC)cc(Oc4ccc(NC(=O)C5CC5C(=O)Nc6ccc(F)c(O)c6)c4)c3

10 [0027] В ще одному конкретному варіанті реалізації виділений метаболіт являє собою

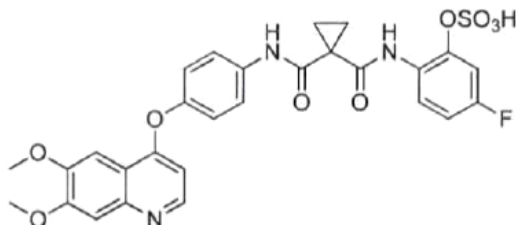


[0028] В ще одному конкретному варіанті реалізації виділений метаболіт являє собою



або її фармацевтично прийнятну сіль.

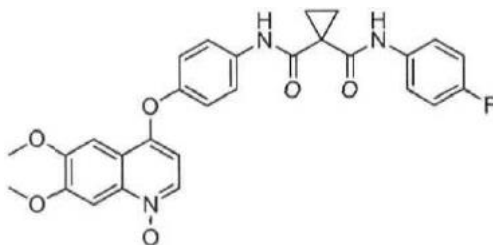
[0029] В ще одному конкретному варіанті реалізації виділений метаболіт являє собою



5

або її фармацевтично прийнятну сіль.

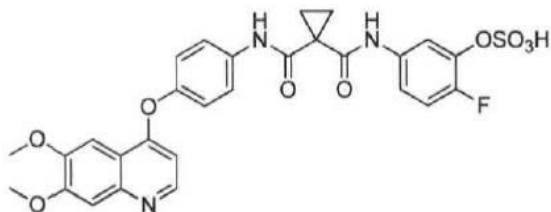
[0030] В ще одному конкретному варіанті реалізації виділений метаболіт являє собою



10

або її фармацевтично прийнятну сіль.

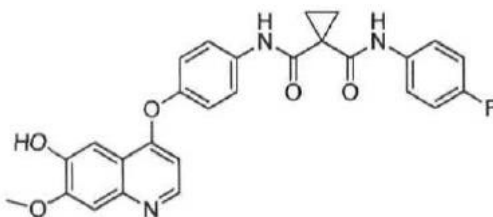
[0031] В ще одному конкретному варіанті реалізації виділений метаболіт являє собою



або її фармацевтично прийнятну сіль.

15

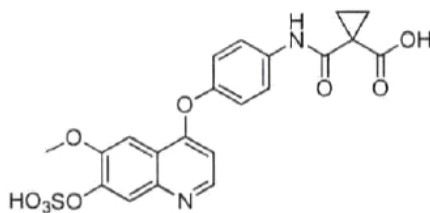
[0032] В ще одному конкретному варіанті реалізації виділений метаболіт являє собою



або її фармацевтично прийнятну сіль.

20

[0033] В ще одному конкретному варіанті реалізації виділений метаболіт являє собою



або її фармацевтично прийнятну сіль.

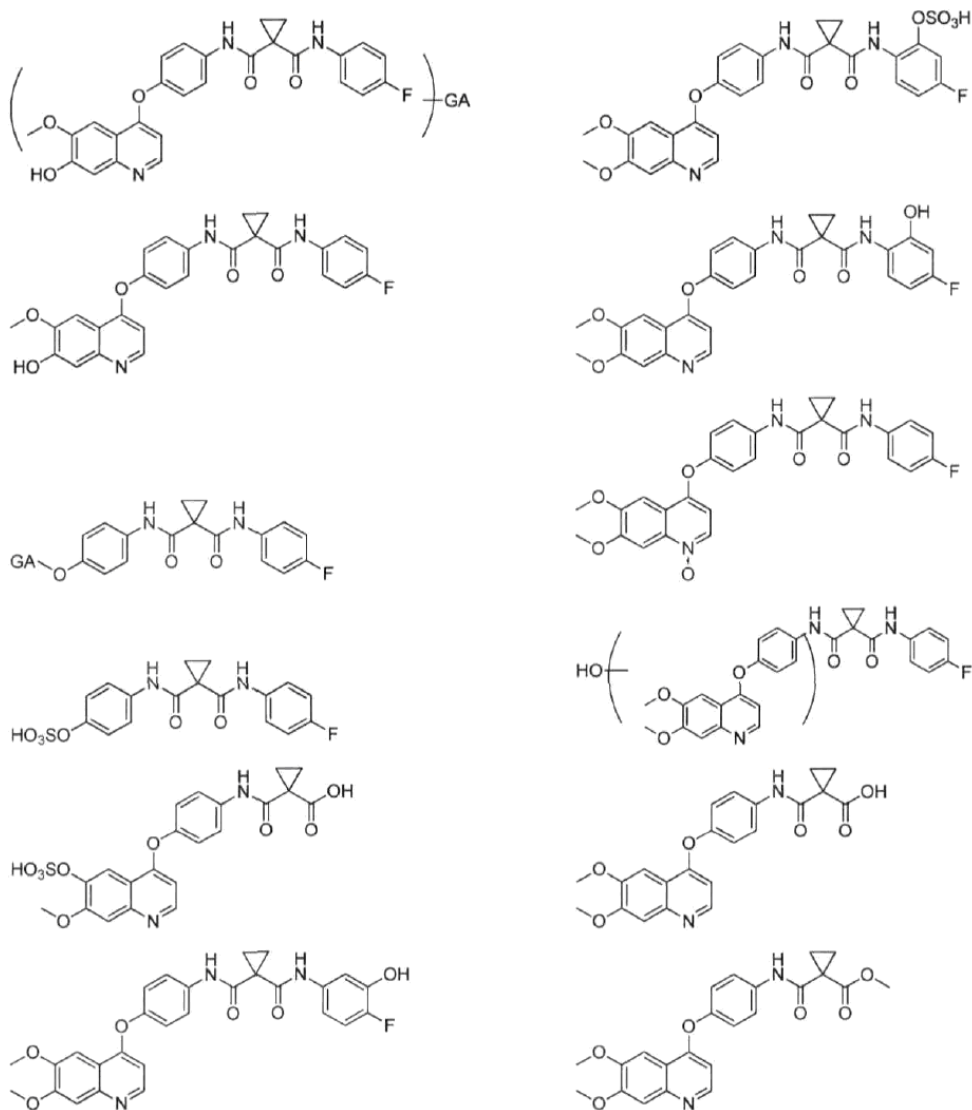
[0034] Способи згідно з даним винаходом включають уведення кабозантинібу або метаболіту кабозантинібу ссавцю, такому як людина, і виявлення метаболітів шляхом вимірювання рівня концентрації одного з метаболітів в тканинах або біологічних рідинах організму ссавця. Біологічні рідини включають, без обмеження, плазму крові, жовч, сечу і кал, в той час коли тканини включають, без обмеження, мікросоми печінки, гепатоцити і перфузуєму печінку. В різних варіантах реалізації метаболіти ізотопно позначені різними ізотопами, щоб допомогти у виявленні або кількісному визначенні метаболітів в тканинах або біологічних рідинах організму. Таким чином, метаболіти включають ті, які позначені  $^{14}\text{C}$  або  $^3\text{H}$  (третієм) з метою виявлення або визначення конкретних метаболітів з їх продуктів ядерного розпаду. Метаболіти також включають метаболіти, позначені  $^{13}\text{C}$  або  $^2\text{H}$  (дейтерієм), щоб полегшити ядерний магнітний резонанс та/або мас-спектрометричний аналіз сполук. В контексті даного документу дейтерований означає заміщений дейтерієм і тритований означає заміщений третієм. В різних інших варіантах реалізації метаболіти згідно з даним винаходом, як показано на схемі 1, також включають їх солі, таутомери і позначені ізотопами варіанти (включаючи  $^{14}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$  або  $^2\text{H}$ ).

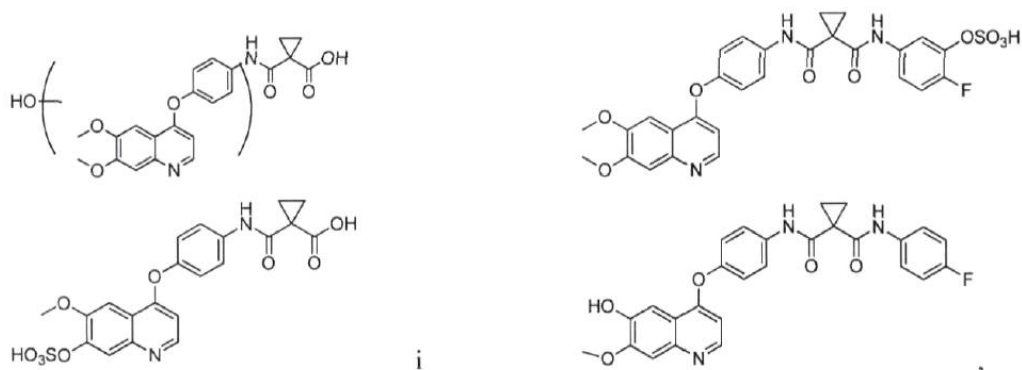
[0035] Більш конкретно, в одному варіанті реалізації даний винахід пропонує спосіб для ідентифікації метаболіту кабозантинібу, що включає:

уведення кабозантинібу ссавцю;

виявлення або вимірювання рівня або концентрації метаболіту кабозантинібу у ссавця в тканинах або біологічних рідинах організму ссавця;

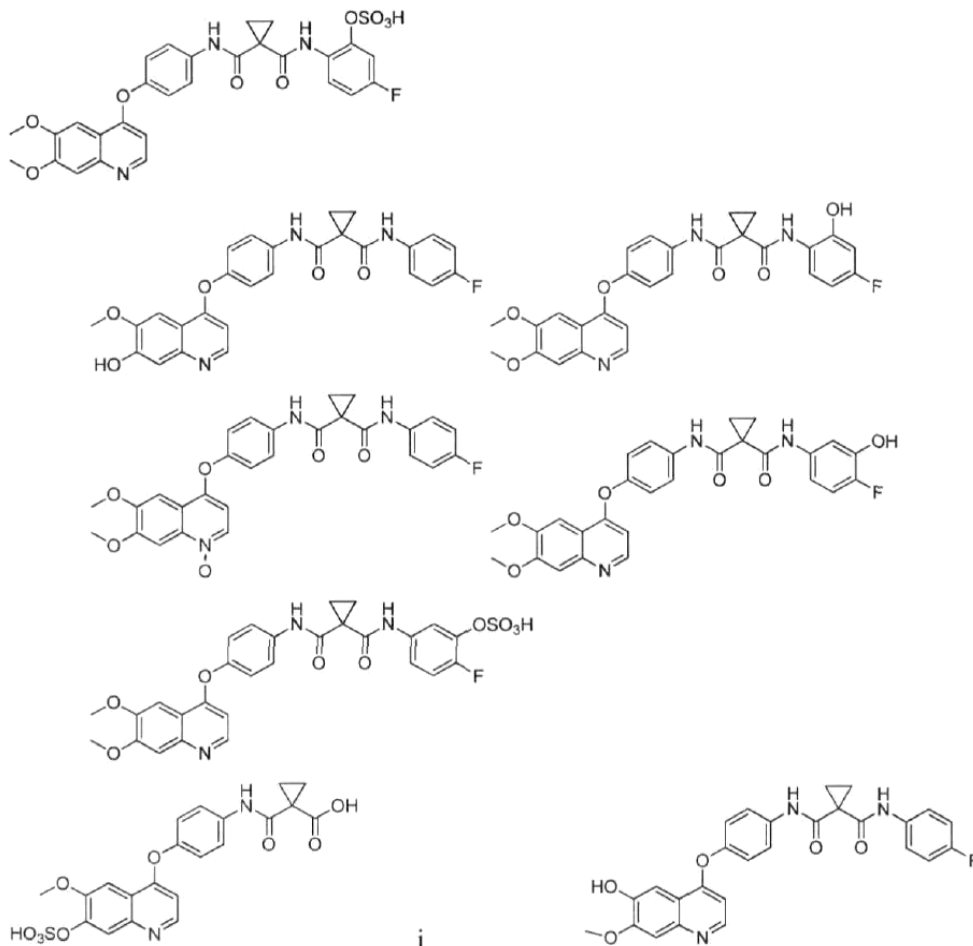
де метаболіт обрано з групи, що складається з:





де GA являє собою фрагмент глюкуронової кислоти. В даному способі біологічні рідини обрані з групи, що складається з плазми, жовчі, сечі і калу. В цьому і інших способах метаболіти ідентифікують з використанням загальноприйнятих аналітичних способів, що включають ізотопне позначення і ВЕРХ/МС.

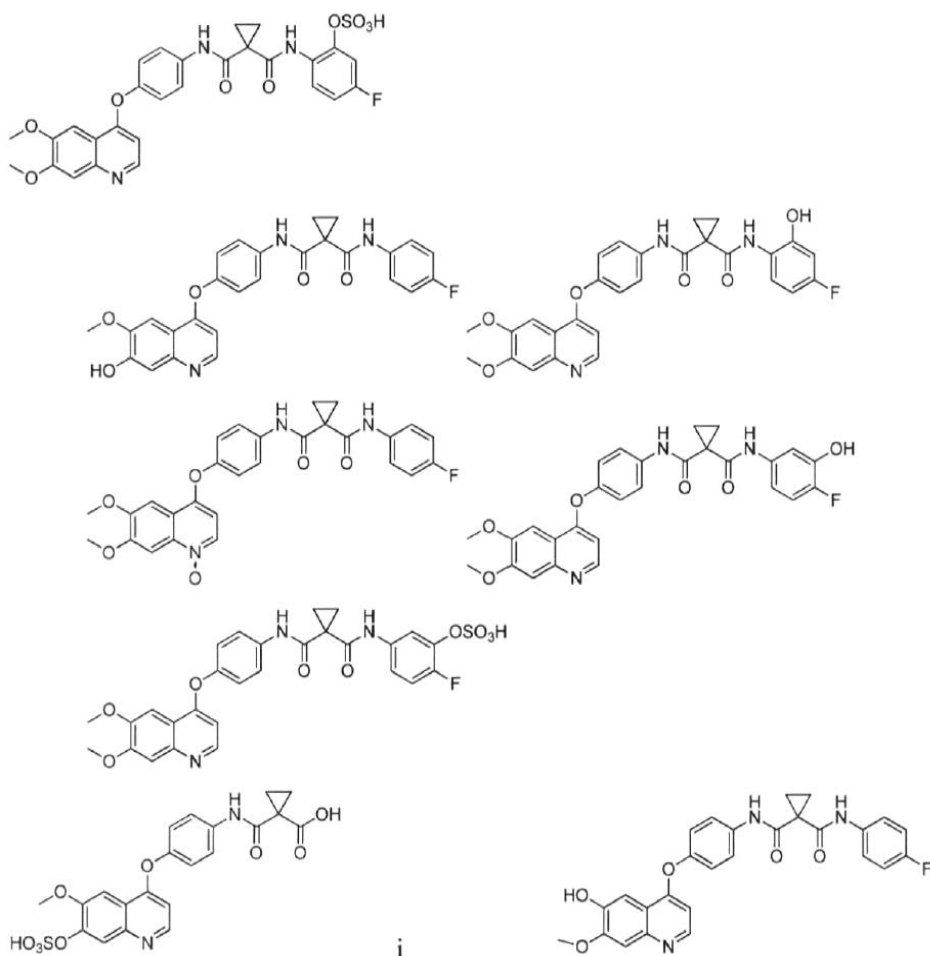
[0036] Більш конкретно, метаболіт обрано з:



10

[0037] Ще один аспект даного винаходу являє собою спосіб модулювання активності кінази in vivo, причому спосіб включає введення суб'єкт у ефективної кількості метаболіту кабозантинібу, який являє собою сполуку, що обрана з:





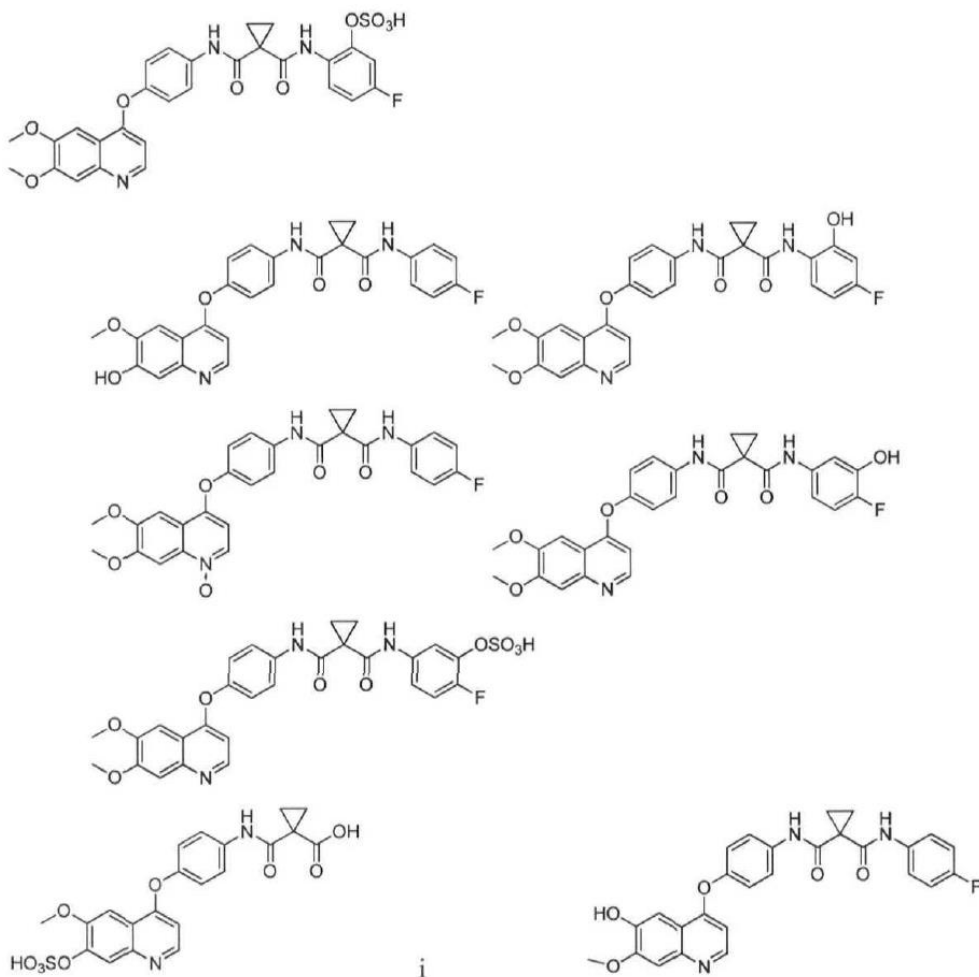
або фармацевтичну композицію, що містить таку сполуку.

5 [0038] В одному варіанті реалізації даного аспекта модулювання активності кінази *in vivo* включає інгібування зазначеної кінази.

[0039] В ще одному варіанті реалізації даного аспекта кіназа являє собою щонайменше один з c-Met, RET, KDR, c-Kit, flt-3 і flt-4.

[0040] В ще одному варіанті реалізації кіназа являє собою c-Met.

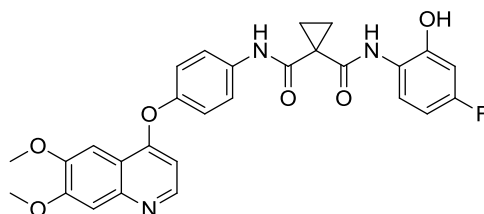
10 [0041] Ще один аспект даного винаходу відноситься до способу лікування захворювань або розладів, пов'язаних з неконтрольованими, ненормальними та/або небажаними клітинними активностями, причому спосіб включає введення ссавцю, що має в цьому потребу, терапевтично ефективної кількості метаболіту кабозантинібу, який являє собою сполуку, що обрана з:



або фармацевтичну композицію, що містить таку сполуку.

[0042] В конкретному варіанті реалізації сполука являє собою

5

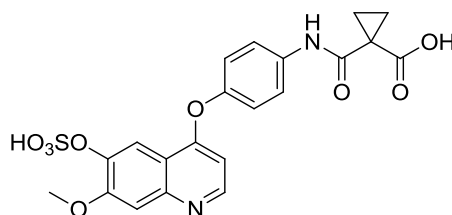


або її фармацевтично прийнятну сіль.

[0043] В ще одному конкретному варіанті реалізації сполука являє собою або її фармацевтично прийнятну сіль.

10

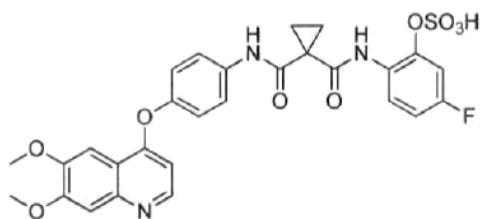
[0044] В ще одному конкретному варіанті реалізації сполука являє собою



або її фармацевтично прийнятну сіль.

[0045] В ще одному конкретному варіанті реалізації сполука являє собою

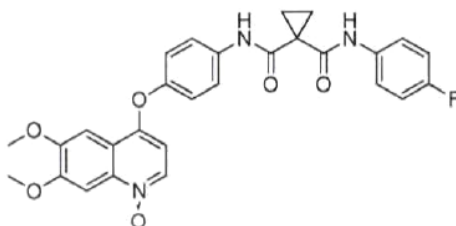
15



або її фармацевтично прийнятну сіль.

[0046] В ще одному конкретному варіанті реалізації сполука являє собою

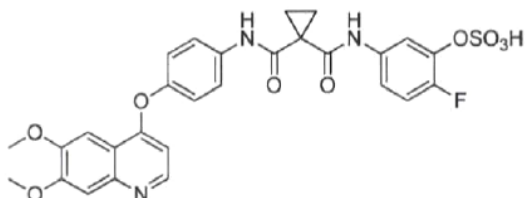
5



або її фармацевтично прийнятну сіль.

[0047] В ще одному конкретному варіанті реалізації сполука являє собою

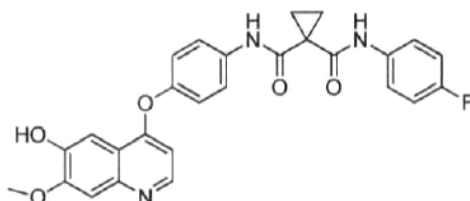
10



або її фармацевтично прийнятну сіль.

[0048] В ще одному конкретному варіанті реалізації сполука являє собою

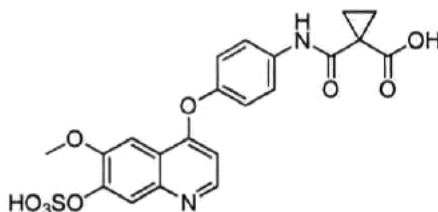
15



або її фармацевтично прийнятну сіль.

[0049] В ще одному конкретному варіанті реалізації сполука являє собою

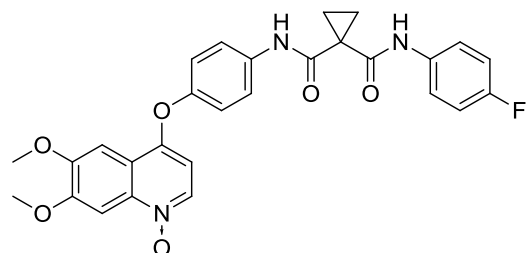
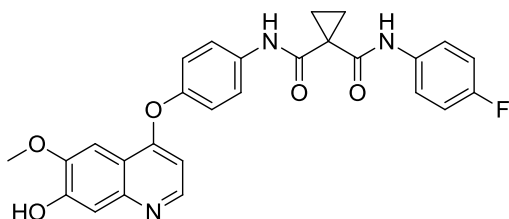
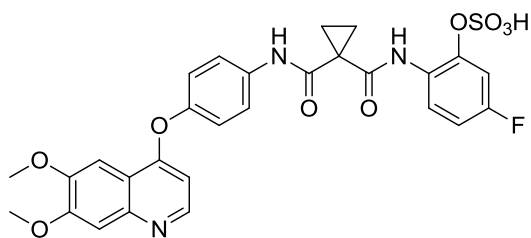
20



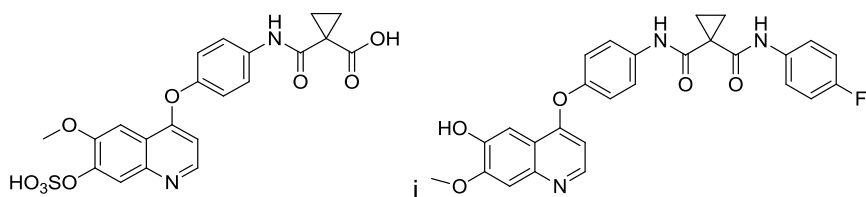
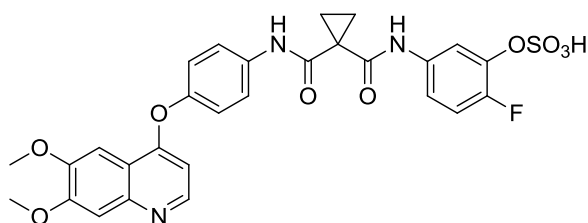
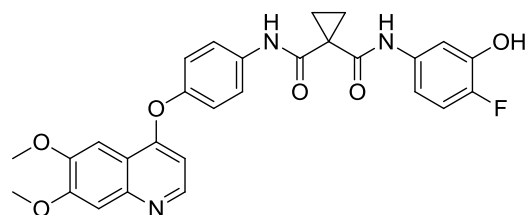
або її фармацевтично прийнятну сіль.

[0050] В іншому аспекті даний винахід відноситься до способу скринінгу на модулятор кінази, причому зазначена кіназа обрана з c-Met, KDR, RET, c-Kit, flt-3 і flt-4, причому спосіб включає комбінацію метаболіту кабозантинібу, який являє собою сполуку, що обрана з:

25



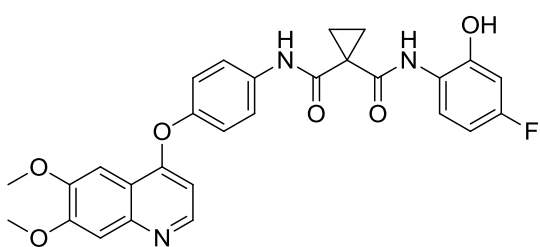
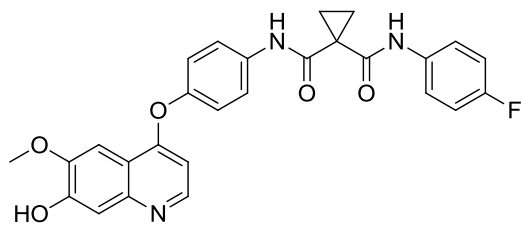
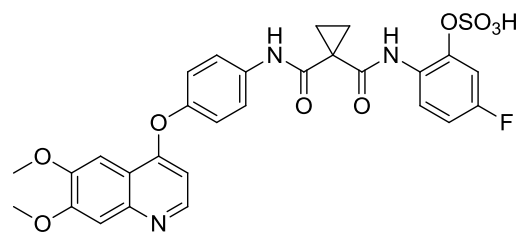
5



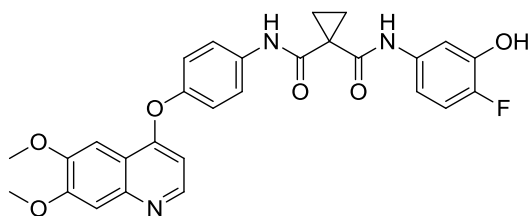
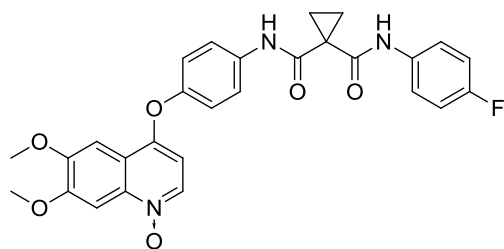
10

і щонайменше одного агента-кандидата, і визначення впливу агента-кандидата на активність зазначеної кінази.

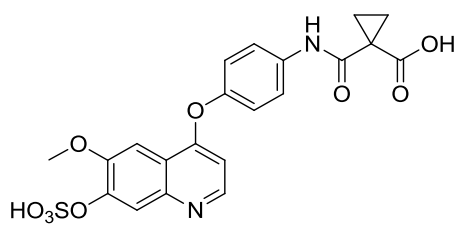
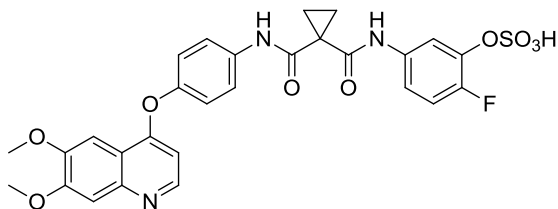
15 [0051] Інший аспект даного винаходу відноситься до способу інгібування проліферативної активності в клітині, причому спосіб включає введення ефективної кількості композиції, що містить сполуку, в клітину або численну кількість клітин, де сполука являє собою метаболіт кабозантинібу, обраний з:



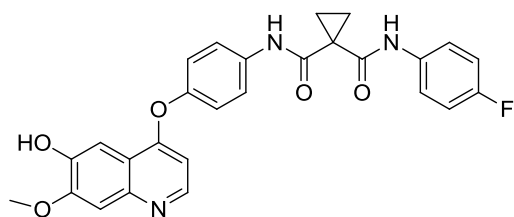
5



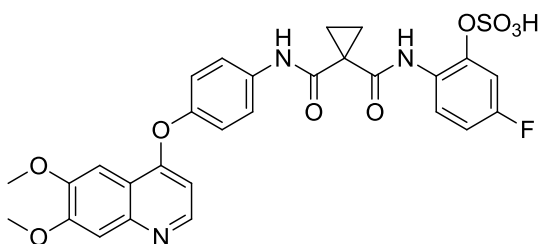
10



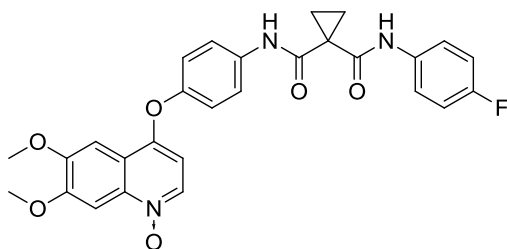
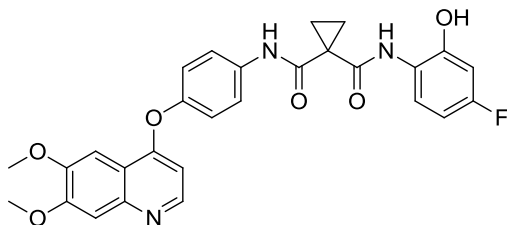
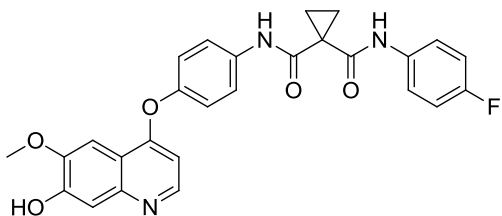
i



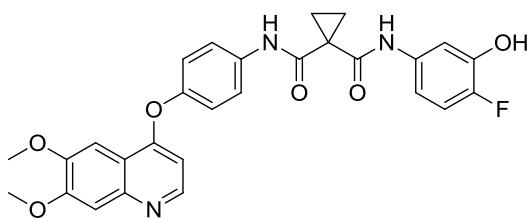
5 [0052] Ще один аспект даного винаходу являє собою спосіб скринінгу на модулятор кінази, причому зазначена кіназа обрана з c-Met, KDR, RET, c-Kit, flt-3 і flt-4, при цьому спосіб включає комбінацію сполуки і щонайменше одного агента-кандидата і визначення впливу агента-кандидата на активність зазначеної кінази, де сполука являє собою метаболіт кабозантинібу, обраний з:

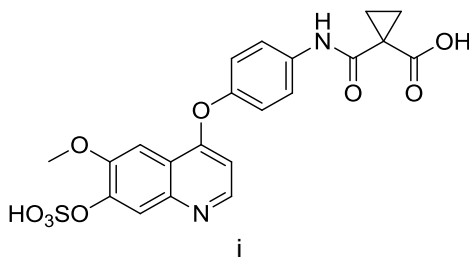
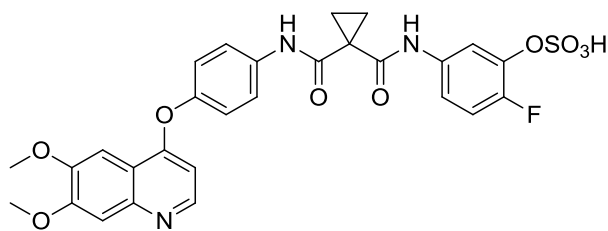


10

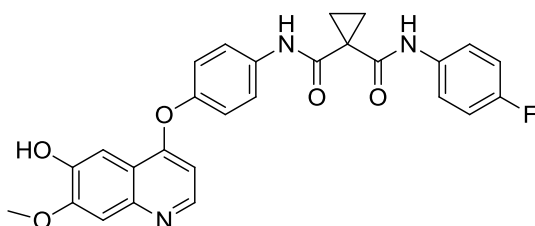


15





i



5

[0053] Виділені метаболіти, подібно описаним вище, які мають інгібуючу активність по відношенню до c-MET або інших кіназ, можуть бути приготовані в підходящих лікарських формах для введення людині або іншим ссавцям. В деяких варіантах реалізації метаболіти можуть демонструвати сприятливі токсикологічні профілі у порівнянні з традиційним лікуванням або лікуванням кабозантинібом.

[0054] В деяких варіантах реалізації метаболіти в якості інгібіторів c-MET застосовуються для лікування раку. "Рак" включає типи пухлин, такі як типи пухлин, що включають пухлину молочної залози, пухлину товстої кишки, пухлину нирок, пухлину легенів, пласкоклітинну мієлоїдну лейкемію, гемангіоми, меланіоми, астроцитоми і гліобластоми, так само як і інші клітинно-проліферативні хворобливі стани, включаючи, але не обмежуючись ними: Кардіологічні: саркома (ангіосаркома, фібросаркома, рабдоміосаркома, ліпосаркома), міксома, рабдоміома, фіброма, ліпома і тератома; Легеневі: бронхогенна карцинома (пласкоклітинна, недиференційована дрібноклітинна, недиференційована крупноклітинна, аденокарцинома), альвеолярна (бронхіолярна) карцинома, бронхіальна аденома, саркома, лімфома, хондроматозна ганглартома, інсцителіома; Шлунково-кишкові: стравоходу (пласкоклітинний рак, аденокарцинома, лейоміосаркома, лімфома), шлунку (карцинома, лімфома, лейоміосаркома), підшлункової залози (аденокарцинома протоків, інсулінома, глюкагонома, гастринома, карциноїди, випома), тонкої кишки (аденокарцинома, лімфома, карциноїди, саркома Капоші, лейоміома, гемангіома, ліпома, нейрофіброма, фіброма), товстої кишки (аденокарцинома, тубулярна аденома, ворсинчата аденома, гамартома, лейоміома); Сечостатевої системи: нирок (аденокарцинома, пухлина Вільмса [нефробластома], лімфома, лейкоз, нирковоклітинна карцинома), сечового міхура і уретри (пласкоклітинна карцинома, перехідно-клітинна карцинома, аденокарцинома), передміхурової залози (аденокарцинома, саркома, дрібноклітинна карцинома передміхурової залози), яєчок (семінома, тератома, ембріональна карцинома, тератоканцинома, хоріоканцинома, саркома, інтерстиціальна карцинома, фіброма, фіброаденома, аденоматозні пухлини, ліпома); Печінки: гепатома (гепатоцелюлярна карцинома), холангіоканцинома, гепатобластома, ангіосаркома, гепатоцелюлярна аденома, гемангіома; Кісток: остеогенічна саркома (остеосаркома), фібросаркома, злоякісна фіброзна гістіоцитома, хондросаркома, саркома Юінга, злоякісна лімфома (ретикіулоклітинна саркома), злоякісна гігантоклітинна пухлинна хондрома, остеохондрома (кістково-хрящові екзостози), доброякісна хондрома, хондробластома, хондроміксифіброма, остеоїд-остеома і гігантоклітинні пухлини; Нервової системи: черепа (остеома, гемангіома, гранулема, ксантома, деформуючий остит), мозкових оболонок (менінгіома, менінгосаркома, гліоматоз), головного мозку (астроцитом, медулобластома, гліома, епендіома, гермінома [пінеалома], поліморфна

гліобластома, олігодендрогліома, шванома, ретинобластома, уроджені пухлини), спинного мозку (нейрофіброма, менінгіома, гліома, саркома); Гінекологічні: матки (ендометриальна карцинома), шийки матки (карцинома шийки матки, передпухлинна дисплазія шийки матки), яєчників (карцинома яєчників [серозна цистаденокарцинома, слизувата цистаденокарцинома, некласифікована карцинома], гранулезотекстурні пухлини, пухлини із клітин Сертолі-Лейдига, дисгермінома, злоякісна тератома), жіночих зовнішніх статевих органів (пласкоклітинна карцинома, інтраепітеліальна карцинома, аденокарцинома, фібросаркома, меланома), піхви (світлоклітинна карцинома, пласкоклітинна карцинома, ботриоїдна саркома [ембріональна рабдоміосаркома]), фалопієвих труб (карцинома); Гематологічні: крові (мієлоїдний лейкоз [гострий і хронічний], гострий лімфобластний лейкоз, хронічний лімфоцитарний лейкоз, мієлопроліферативні захворювання, множинна мієлома, мієлодиспластичний синдром), хвороба Ходжкіна, неходжкінська лімфома [злоякісна лімфома]; Шкірні: злоякісна меланома, базально-клітинна карцинома, пласкоклітинна карцинома, саркома Капоші, диспластичні невуси, ліпома, ангіома, фіброма шкіри, келоїди, псоріаз; і Надниркова залоза: нейробластома; так само як і рак щитоподібної залози, включаючи медулярний рак щитоподібної залози. Таким чином, термін "ракова клітина", як це передбачено в даному документі, включає в себе клітину, уражену будь-яким з вищевказаних станів.

[0055] В одному варіанті реалізації рак обрано з раку яєчників, раку передміхурової залози, раку легенів, медулярного раку щитоподібної залози, раку печінки, раку шлунково-кишкового тракту, раку підшлункової залози, раку кісток, гематологічної злоякісної пухлини, раку шкіри, раку нирок, раку молочної залози, раку товстої кишки і раку фалопієвих труб.

[0056] В ще одному варіанті реалізації захворювання або розлад являє собою рак яєчників.

[0057] В ще одному варіанті реалізації захворювання або розлад являє собою рак передміхурової залози.

[0058] В ще одному варіанті реалізації захворювання або розлад являє собою рак легенів.

[0059] В ще одному варіанті реалізації захворювання або розлад являє собою медулярний рак щитоподібної залози.

[0060] В ще одному варіанті реалізації захворювання або розлад являє собою рак печінки.

[0061] В ще одному варіанті реалізації захворювання або розлад являє собою рак шлунково-кишкового тракту.

[0062] В ще одному варіанті реалізації захворювання або розлад являє собою рак підшлункової залози.

[0063] В ще одному варіанті реалізації захворювання або розлад являє собою рак кісток.

[0064] В ще одному варіанті реалізації захворювання або розлад являє собою гематологічну злоякісну пухлину.

[0065] В ще одному варіанті реалізації захворювання або розлад являє собою рак шкіри.

[0066] В ще одному варіанті реалізації захворювання або розлад являє собою рак нирок.

[0067] В ще одному варіанті реалізації захворювання або розлад являє собою рак молочної залози.

[0068] В ще одному варіанті реалізації захворювання або розлад являє собою рак товстої кишки.

[0069] В ще одному варіанті реалізації захворювання або розлад являє собою рак фалопієвих труб.

[0070] В ще одному варіанті реалізації захворювання або розлад являє собою рак печінки, де рак печінки являє собою гепатоцелюлярну карциному, холангіокарциному, гепатобластома, ангіосаркому, гепатоцелюлярну аденому або гемангіому.

[0071] В ще одному варіанті реалізації захворювання або розлад являє собою рак шлунково-кишкового тракту, де рак шлунково-кишкового тракту являє собою рак стравоходу, який являє собою пласкоклітинну саркому, аденокарциному або лейоміосаркому; рак шлунку, який являє собою карциному або лімфому; рак підшлункової залози, який являє собою протокову аденокарциному, інсуліному, глюкагоному, гастриному, карциноїдні пухлини, або випому; рак тонкої кишки, який являє собою аденокарциному, лімфому, карциноїдні пухлини, саркому Капоші, лейоміому, ліпому, гемангіому або рак товстої кишки, який являє собою аденокарциному, тубулярну аденому, ворсинчасту аденому, гамартому або лейоміому.

[0072] В ще одному варіанті реалізації захворювання або розлад являє собою рак підшлункової залози, де рак підшлункової залози являє собою протокову аденокарциному, інсуліному, глюкагоному, гастриному, карциноїдні пухлини, або випому.

[0073] В ще одному варіанті реалізації захворювання або розлад являє собою рак кісток, де рак кісток являє собою остеосаркому, фібросаркому, злоякісну фіброзну гістіоцитому, хондросаркому, саркому Юінга, злоякісну ретикулоклітинну саркому, множинну мієлому,



злоякісну гігантоклітинну пухлинну хондрому, кістково-хрящові екзостози, хондробластому, хондроміксифіброму або остеод-остеоми.

5 [0074] В ще одному варіанті реалізації захворювання або розлад являє собою гематологічну злоякісну пухлину, де гематологічна злоякісна пухлина являє собою гематологічний мієлоїдний лейкоз, гострий лімфобластний лейкоз, хронічний лімфоцитарний лейкоз, мієлопроліферативні захворювання, множинну мієлому або мієлодиспластичний синдром.

[0075] В ще одному варіанті реалізації захворювання або розлад являє собою рак шкіри, де рак шкіри являє собою злоякісну меланому, базально-клітинну карциному, пласкоклітинну карциному або саркому Капоші.

10 [0076] В ще одному варіанті реалізації захворювання або розлад являє собою ниркову пухлину або нирково-клітинну карциному.

[0077] В ще одному варіанті реалізації захворювання або розлад являє собою рак молочної залози.

15 [0078] В ще одному варіанті реалізації захворювання або розлад являє собою ракову пухлину товстої кишки.

[0079] В ще одному варіанті реалізації захворювання або розлад являє собою карциному фалопієвих труб.

20 [0080] В якості альтернативи або додатково метаболіти вводять суб'єктам або піддослідним тваринам, які не мають будь-якого із зазначених вище захворювань або станів, з метою вивчення нефармакологічних впливів, таких як побічні ефекти, токсичність, метаболізм, засвоюваність, біодоступність і шляхи екскреції.

25 [0081] У різних варіантах реалізації метаболіти вводять будь-яким підходящим способом, включаючи пероральний, ректальний, інтраназальний, внутрішньолегеневий (наприклад, за допомогою інгаляції) або парентеральний (наприклад, внутрішньошкірний, крізьшкірний, підшкірний, внутрішньом'язовий або внутрішньовенний) шляхи. Пероральне введення є переважним у деяких варіантах реалізації, і доза може бути дана з їжею або без їжі, тобто натще або не натще. Необмежуючі приклади лікарських форм включають непокриті або покриті таблетки, капсули, порошки, гранули, супозиторії, розчини, мазі, креми і спреї.

30 [0082] Сполуки у відповідності з даним винаходом, що підходять для перорального введення, отримують у вигляді дискретних одиниць, таких як капсули, саше або таблетки, кожна з яких містить заздалегідь певну кількість активного інгредієнта; у вигляді порошку або гранул; у вигляді розчину або суспензії у водній рідині або неводній рідині; або у вигляді рідкої емульсії масло-в-воді; або у вигляді рідкої емульсії вода-у-маслі. Активний інгредієнт також може бути представлений у вигляді болюса, лікарської кашки або паст.

35 [0083] Таблетку виготовляють за допомогою пресування або формування, необов'язково з одним або більше додатковими інгредієнтами. Пресовані таблетки можуть бути отримані пресуванням у відповідному обладнанні активного інгредієнта в сипучій формі, такий як порошок або гранули, необов'язково змішаного зі з'єднуючою речовиною, речовиною, що сковзає, інертним розріджувачем, консервантом, поверхнево-активним або диспергуючим агентом.

40 Формовані таблетки можуть бути виготовлені формуванням у відповідному апараті сумішшю порошкоподібного активного інгредієнта, зволоженого інертним рідким розріджувачем. Таблетки необов'язково можуть бути покриті оболонкою або позначені і, необов'язково, приготовані таким чином, щоб забезпечити повільне або контрольоване вивільнення з них активного інгредієнта. В одному варіанті реалізації кислотний гідроліз лікарського засобу усувається за допомогою застосування ентеросолюбильного покриття.

45

[0084] Энтеросолюбильне покриття являє собою засіб захисту сполуки згідно з даним винаходом, для того, щоб уникати впливу сполуки згідно з даним винаходом на частину шлунково-кишкового тракту, зазвичай верхніх відділів травного тракту, зокрема, шлунку і стравоходу. Таким чином, слизувата тканина шлунку захищена від впливу сполуки згідно з даним винаходом, який викликає побічні ефекти, такі як нудота, і, з іншого боку, сполука згідно з даним винаходом захищена від дії умов, що мають місце в одному або декількох ділянках шлунково-кишкового тракту, зазвичай верхніх відділах травного тракту.

50 [0085] Сполуки, що підходять для місцевого введення в порожнину рота, включають льодяники, що містять активний інгредієнт в ароматизованій основі, зазвичай в сахарозі, і гуміарабік або трагакант; пастилки, що містять активний інгредієнт в інертній основі, такий як желатин і гліцерин або сахароза, і гуміарабік; і рідини для полоскання рота, що містять активний інгредієнт у підходящому рідкому носії.

[0086] Сполуки для ректального введення можуть бути представлені у вигляді супозиторіїв з підходящою основою, що містять, наприклад, масло какао або саліцилат.

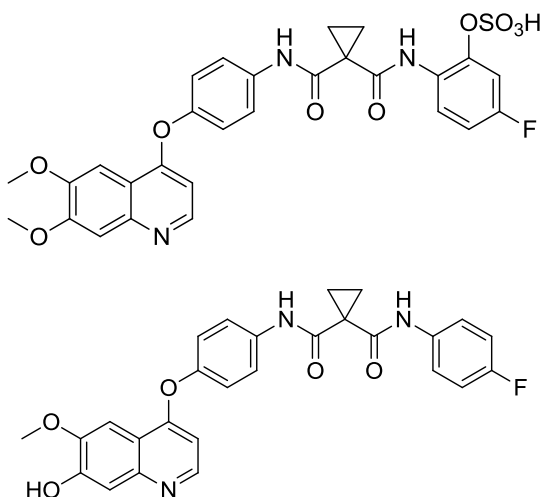
[0087] Поряд з тим, що активні інгредієнти можна вводити окремо, може бути переважним представляти їх у вигляді фармацевтичних сполук. Сполуки як для ветеринарного застосування, так і для застосування в людини, містять щонайменше один активний інгредієнт, як визначено вище, разом з одним або більше прийнятними носіями і, необов'язково, містять інші лікувальні інгредієнти. Носій (-і) повинні бути "прийнятними" у тому, що вони сумісні з іншими інгредієнтами сполуки і фізіологічно нешкідливі для реципієнта цієї сполуки.

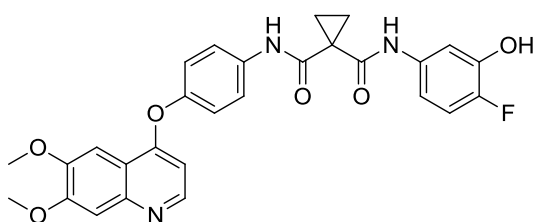
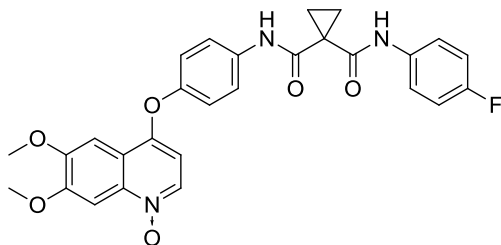
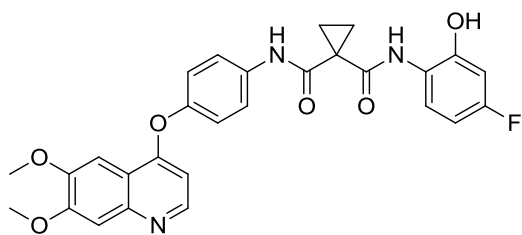
[0088] В різних варіантах реалізації сполуки готують у системі-носії. Такі системи є відомими і включають з'єднуючі речовини, наповнювачі, консерванти, дезінтегратори, регулятори потоку, пластифікатори, агенти, що змочують, емульгатори, диспергатори речовини, що скловзають, розчинники, агенти, що сповільнюють вивільнення (включаючи ентросолубильне покриття), антиоксиданти і гази пропеленти. Особливо в тих випадках, коли отримують сполуки для введення людині, активні агенти переважно комбінують щонайменше з одним фармацевтично прийнятним носієм. Такі носії являються відомими і включають, без обмеження, похідні целюлози, поліетиленгліколь і полімери N-вінілпіролідону. Лікарські форми містять терапевтично ефективну кількість сполук, яка становить від 0,1 % до приблизно 90 % за масою від маси лікарської форми.

[0089] Сполуки згідно з даним винаходом отримують із традиційними носіями і допоміжними речовинами, які вибирають у відповідності зі звичайною практикою. Таблетки будуть містити допоміжні речовини, речовини, що скловзають, наповнювачі, що зв'язують речовини і тому подібне. Водні композиції готують у стерильній формі, і вони, якщо призначені для доставки будь-яким шляхом, крім орального введення, як правило, будуть ізотонічними. Усі сполуки будуть необов'язково містити допоміжні речовини, такі як ті, які викладені в "Довідник фармацевтичних допоміжних речовин" ("Handbook of Pharmaceutical Excipients") (1986). Допоміжні речовини включають аскорбінову кислоту і інші антиоксиданти, хелатуючі агенти, такі як ЕДТА, вуглеводи, такі як декстрин, гідроксикалкілцелюлозу, гідроксикалкілметилцелюлозу, стеаринову кислоту і тому подібне.

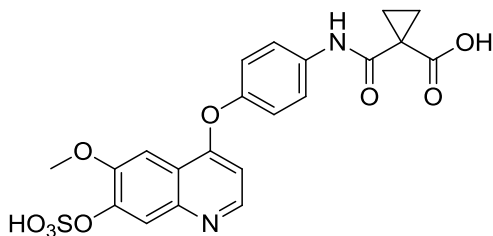
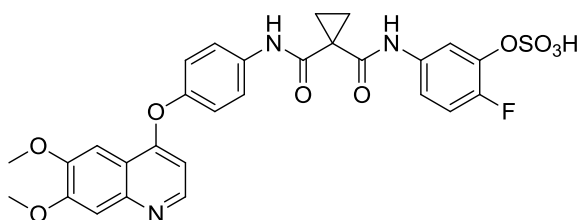
[0090] Сполуки включають такі сполуки, які підходять для вищезгаданих способів введення. Сполуки можуть бути зручно представлені в одиничній дозованій формі і можуть бути отримані будь-яким зі способів, добре відомих в області фармації. Способи і сполуки, як правило, можна знайти в Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, Pa.). Такі способи включають стадію приведення у взаємозалежність активного інгредієнта з носієм, який складається з одного або більше допоміжних інгредієнтів. У більшості випадків сполуки отримують шляхом однорідного і безпосереднього приведення у взаємозалежність активного інгредієнта з рідкими носіями, або тонко подрібненими твердими носіями, або ними обома, а потім, якщо необхідно, формуванням продукту.

[0091] В конкретному варіанті реалізації даний винахід відноситься до фармацевтичної композиції, що містить метаболіт кабозантинібу, який являє собою сполуку, що обрана з:

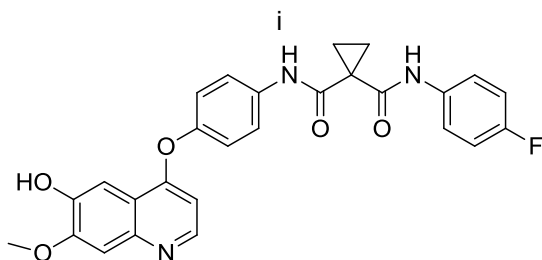




5



10

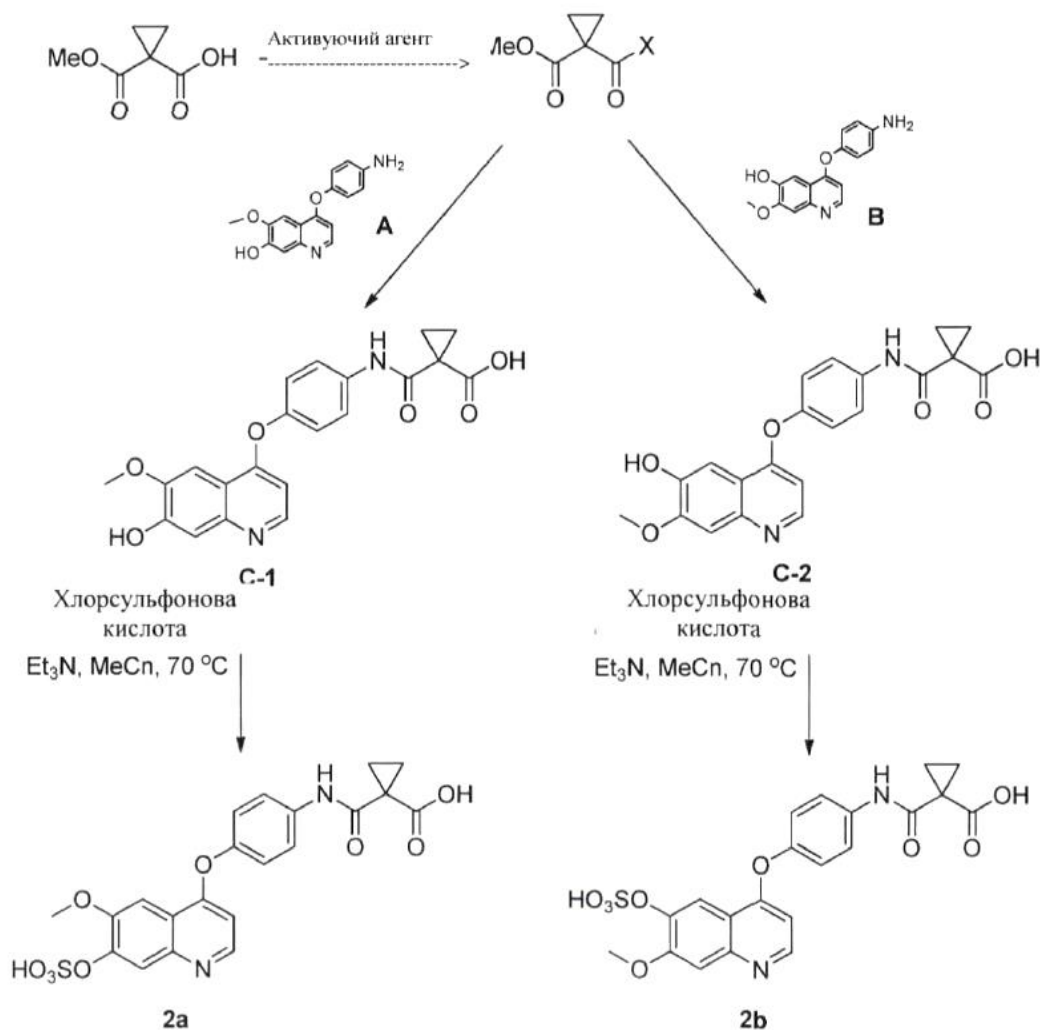


або її фармацевтично прийнятну сіль і щонайменше один фармацевтично прийнятний носій.

[0092] Сполуки, описані в даному документі, можуть бути отримані у відповідності зі способами, доступними фахівцю в даній області техніки. Наприклад, як показано на схемі 2, можна застосовувати хімію пептидів, щоб отримати феноли С-1 і С-2 із відповідних амінів і карбонових кислот. Різні процеси і реагенти придатні для досягнення таких перетворень і описані, наприклад, в Tetrahedron 61 (2005) 10827-10852. Типовий приклад зображено на схемі 2, де активуючим агентом є тіонілхлорид, оксалілхлорид або тому подібне. Відповідний хлорангідрид реагує зі сполукою А або В відповідно з отриманням фенолу С-1 або С-2. Наступна реакція фенолу С-1 або С-2 з сульфатуючим агентом, таким як хлорсульфонова кислота або

комплекс триоксиду сірки-триметиламіну, в присутності основи, такої як триетиламін, гідроксид лужного металу або тому подібне, може дати відповідний водень сульфат 2b або 2a відповідно.

Схема 2



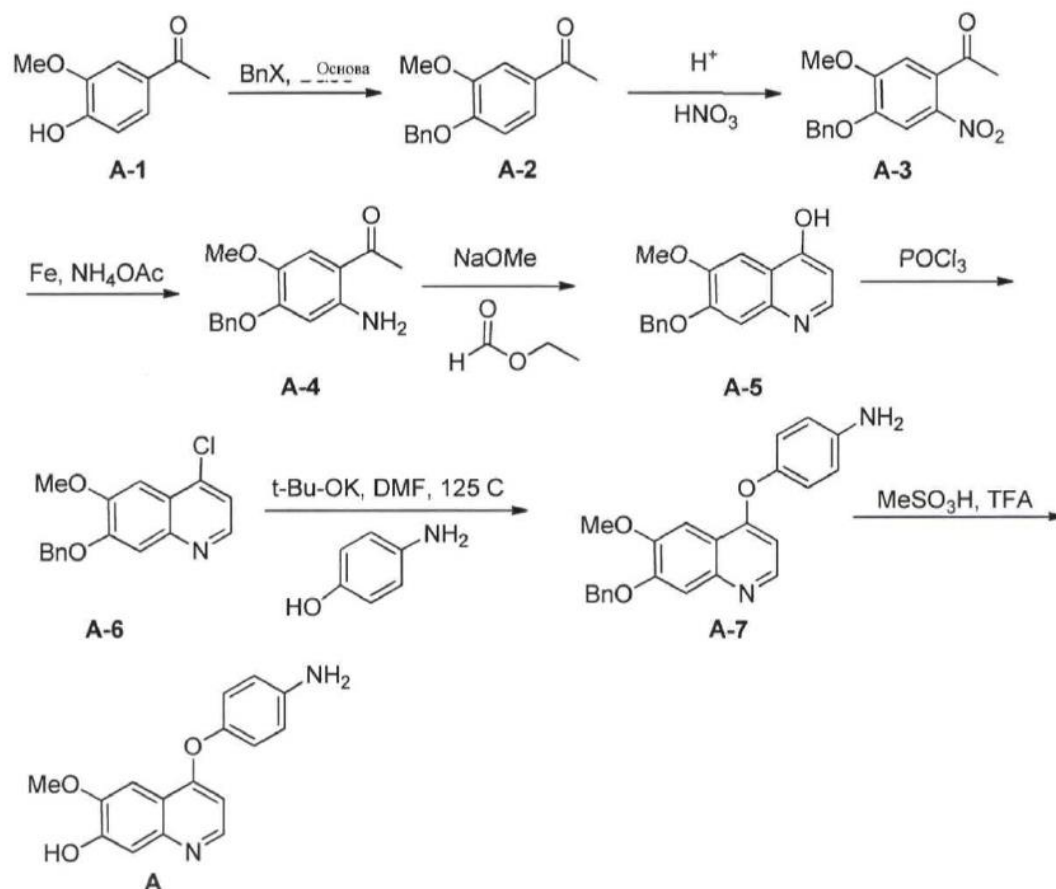
5

[0093] Сполуку А отримують у відповідності зі схемою 3. Бензилювання А-1 із застосуванням бензилгалогеніду або тому подібного приводить до отримання бензил-захищеного А-2. Азотування А-2 із застосуванням суміші азотної кислоти і сірчаної кислоти приводить до отримання А-3. Відновлення нітрогрупи в А-3 до аміну А-4 може бути реалізоване із застосуванням стандартних умов відновлення нітрогрупи, таких як залізо і ацетат амонію. Циклізація А-4 з етилформіатом і алкоксидом, таким як метоксид натрію, приводить до отримання А-5. Перетворення А-5 із відповідним хлоридом із застосуванням оксихлориду фосфору приводить до отримання А-6. Реакція А-6 з 4-амінофенолом приводить до отримання А-7, з якої було знято захист за допомогою метансульфонової кислоти, з отриманням сполуки А.

10

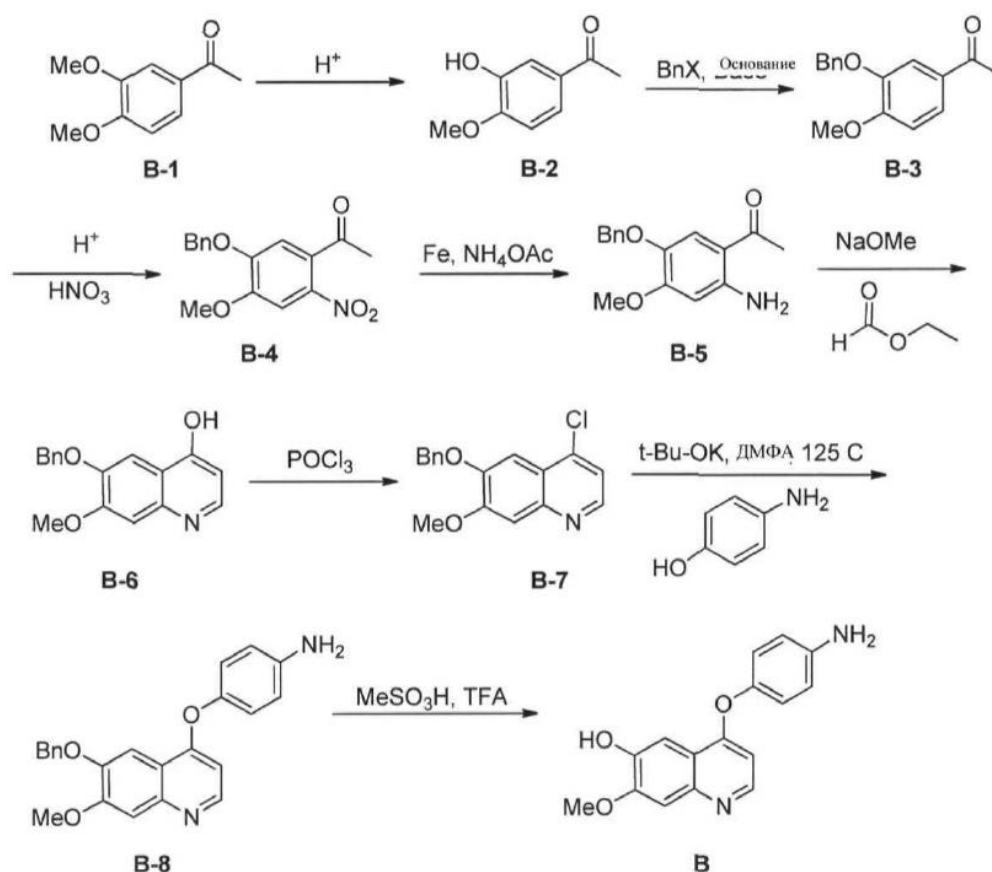
15

Схема 3



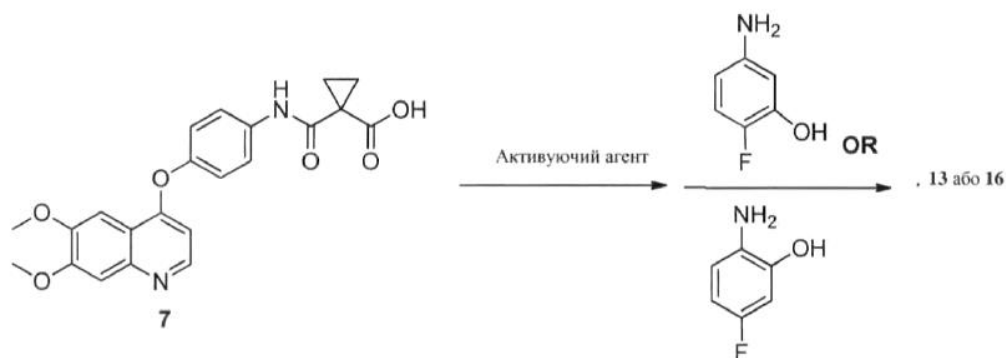
[0094] Аналогічним чином, сполуку В отримують у відповідності зі схемою 4. Деметилування В-1 приводить до отримання В-2. Бензилювання В-2 із застосуванням бензилгалогеніду  $\text{BnX}$ , де  $\text{X}$  являє собою  $\text{Br}$ ,  $\text{Cl}$ , або  $\text{I}$ , або тому подібне, приводить до отримання бензил-захищеної В-3. Азотування В-3 із застосуванням суміші азотної кислоти і сірчаної кислоти приводить до отримання В-4. Відновлення нітрогрупи в В-4 до аміну В-5 може бути здійснене із застосуванням стандартних умов відновлення нітрогрупи, таких як залізо і ацетат амонію. Циклізація В-5 із етилформіатом і алкоксидом, таким як метоксид натрію, приводить до отримання В-6. Перетворення В-6 у відповідний хлорид за допомогою оксихлориду фосфора приводить до отримання В-7. Реакція В-7 з 4-амінофенолом приводить до отримання В-8, з якої було знято захист за допомогою метансульфонової кислоти, з отриманням сполуки В.

Схема 4



- 5 [0095] Феноли 13 і 16 можуть бути аналогічним чином отримані зі сполуки 7, синтез якої описаний в WO 2005/030140 як приклад 73. Таким чином, в схемі 5, поєднання 7 з 2-аміно-5-фторфенолом (CAS Reg. No. 53981-24-1) приводить до отримання 13. Поєднання 7 з 5-аміно-2-фторфенолом (CAS Reg. No. 100367-48-4) приводить до отримання 16.

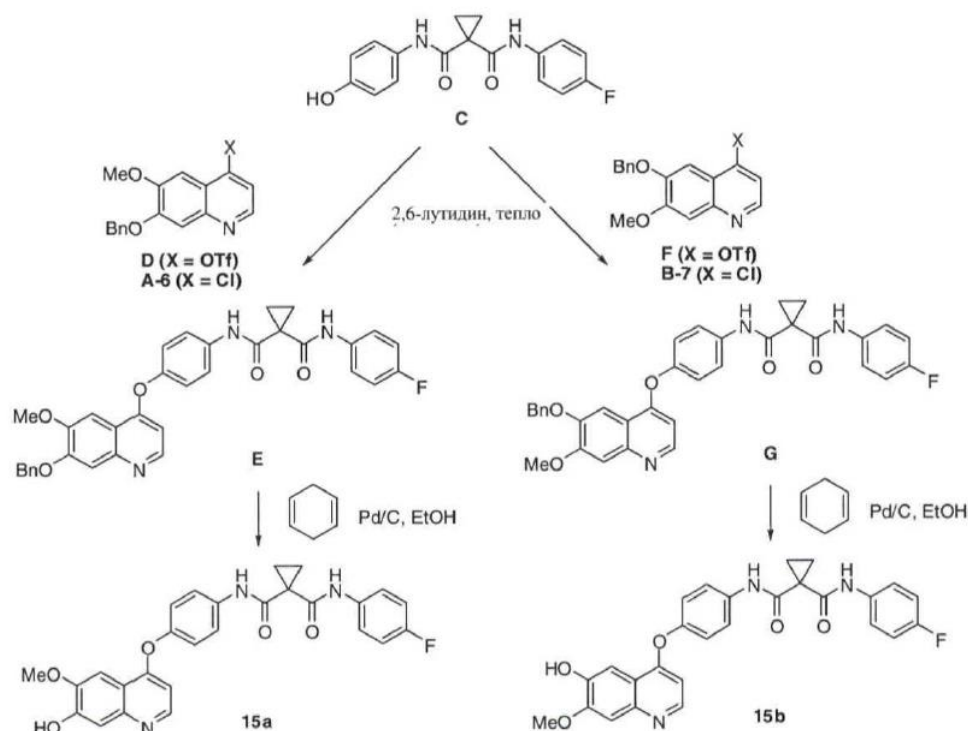
Схема 5



- 10 [0096] Феноли 13 і 16 можуть бути легко перетворені у відповідні сульфати 9 і 12, як показано на схемі 1, із застосуванням, наприклад, сульфатуючого агента, такого як комплекс триоксида сірки-триметиламіну, в присутності сильного гідроксиду, такого як гідроксид калію, гідроксид натрію і т.п., або із застосуванням хлорсульфонової кислоти в присутності амінової основи, такої як триетиламін.
- 15 [0097] Феноли 15a і 15b можуть бути отримані із застосуванням аналогічного способу, який розкритий в WO 2005/030140 для отримання прикладу 43. Таким чином, на схемі 6 поєднання фенолу С (приклад 38 в WO 2005/030140) із трифлатом D (приклад 33 в WO 2005/030140) або хлоридом A-6 (приклад 32 в WO 2005/030140) дає E, з якої потім видаляється захисна група в умовах Pd-каталізованого гідрогенлізу з отриманням сполуки 15. Аналогічним чином реакції

фенолу С з трифлатом F або хлоридом В-7 приводять до отримання G, яку піддають видаленню захисної групи О-бензилу з отриманням сполуки 15b.

Схема 6



5

[0098] N-оксид 19 може бути отриманий за допомогою реакції кабозантинібу з окиснювачем, таким як, наприклад, пероксид, перкислота або тому подібне. В одному варіанті реалізації окиснювач являє собою тетрагідрат перборату натрію.

[0099] Наступні необмежуючі приклади призначені для ілюстрації даного винаходу.

10

Приклади

Ідентифікація метаболітів кабозантинібу

[00100] Задача даного дослідження полягала в профілюванні і ідентифікації метаболітів кабозантинібу в людській плазмі, сечі і калі. Зразки плазми, сечі і калу збирали з мас-балансного дослідження кабозантинібу після одного перорального введення здоровим суб'єктам чоловічої статі 175 мг кабозантинібу (L-малатна сіль), що містить [ $^{14}\text{C}$ ]-кабозантиніб (100 мкКи).

15

План клінічного дослідження і відбір проб плазми, сечі і кала

[00101] Вісім суб'єктів чоловічої статі приймали участь в дослідженні, і кожен суб'єкт отримував одиничну пероральну дозу 175 мг кабозантинібу (L-малатна сіль), що містить [ $^{14}\text{C}$ ]-кабозантинібу (100 мкКи). Для профілювання метаболіту у 8 суб'єктів збирали зразки плазми, сечі і калу.

20

Зразки плазми збирали до введення дози, через 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 8, 14, 24, 72, 168, 336, 504 і 648 годин після введення дози; зразки сечі збирали до введення дози, в інтервалах 0-8 годин, 8-24 год., з 24-годинними інтервалами до 480 годин після введення дози і з більш ніж 48-годинними інтервалами від 504 до 1152 годин після введення дози; і зразки калу збирали до введення дози, з 24-годинними інтервалами до 480 годин після введення дози, і з більш ніж 48-годинними інтервалами від 504 до 1152 годин після введення дози. Всі зразки відправляли в QPS LLC (Newark, DE) і зберігали при  $-70^\circ\text{C}$ . ВЕРХ/тандемну МС в поєднанні з проточним радіодетектором (RFD) застосовували для профілювання і ідентифікації метаболіту для зразків з достатніми рівнями радіоактивності.

25

30

[00102] Відбір фракцій із ВЕРХ з подальшим розрахунком за допомогою TopCount NXT<sup>TM</sup> застосовували для розрахунку радіоактивності зразків плазми з достатніми рівнями радіоактивності. Щоб відділити кабозантиніб і його метаболіти, в цьому дослідженні застосовували три (3) способи ВЕРХ. Спосіб 1 ВЕРХ застосовували для аналізу об'єднаних зразків сечі і калу і окремих зразків плазми в різні моменти часу. Спосіб 2 ВЕРХ застосовували для аналізу зразків плазми, отриманих в результаті дослідження міжлікарської взаємодії, щоб

35

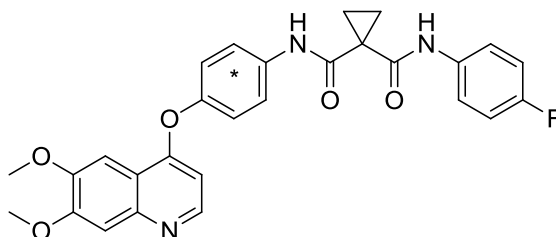
знайти можливі метаболіти, які можуть коелювати з сульфатом кабозантинібу. Спосіб 3 ВЕРХ застосовували для об'єднаних зразків плазми.

[00103] Обрані зразки плазми, сечі і калу, узяті у 6 суб'єктів, проаналізували за співвідношенням до кабозантинібу і метаболітів і зробили звіт.

5 [00104] Зразки, узяті у 2 суб'єктів, використовували для дослідження.

Об'єкт дослідження

10 [00105] Об'єкт дослідження в даному дослідженні являв собою суміш [ $^{14}\text{C}$ ] кабозантинібу і кабозантинібу. Зірочка вказує на положення [ $^{14}\text{C}$ ] мітки. Мічений [ $^{14}\text{C}$ ] кабозантиніб отримували, як це передбачено в WO 2005/030140, за винятком того, що мічений [ $^{14}\text{C}$ ] 4-амінофенол застосовували замість неміченого 4-амінофенолу. Мічений [ $^{14}\text{C}$ ] 4-амінофенол є комерційно доступним у вигляді гідрохлоридної солі, наприклад, від Hartmann Analytic, American Radiolabeled Chemicals або Fisher Scientific.



15

Використані хімічні речовини і етилові стандарти

[00106] Мурашину кислоту і ацетат амонію отримували від Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO). Ацетонітрил (бренд B&J, без карбонілу, для нанесення, чутливих до слідів альдегіду і кетону), воду (бренд B&J, для GC, ВЕРХ і спектрофотометрії) і метанол (чистоти "для ВЕРХ") діставали у Fisher Scientific (Pittsburgh, PA). Воду типу I генерували з використанням системи очищення води Elgastat UHQ PS. Непозначені радіоактивним ізотопом стандарти метаболітів (продукт розщеплення фтораніліну, сульфат кабозантинібу і N-оксид кабозантинібу) були представлені Exelixis, Inc.

Відбір біологічних зразків

25 [00107] Зразки плазми, сечі і калу збирали з мас-балансного дослідження кабозантинібу після одного перорального введення здоровим суб'єктам чоловічої статі 175 мг кабозантинібу (L-малатна сіль), що містить [ $^{14}\text{C}$ ]-кабозантиніб (100 мкКи). Зразки відправляли з Cellegion (Lincoln, NE) QPS LLC (Newark, DE) на сухому льоді і зберігали при  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  до аналізу. Зразки від 6 суб'єктів використовували для профілювання метаболіту, ідентифікації і підрахунку радіоактивності. Зразки плазми від 2 суб'єктів використовували лише в зв'язуючому дослідженні в рамках дослідження спільного елювання метаболітів.

Приготування зразків і радіоактивне відновлення плазми людини

35 [00108] Для профілювання метаболіту, ідентифікації і підрахунку радіоактивності окремі зразки плазми, зібрані через 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 8, 14, 24, 72, 168 і 336 годин після введення дози, обробляли і аналізували для 6 суб'єктів. Для дослідження сумісного елювання метаболітів непозначені радіоактивними ізотопами зразки плазми шести суб'єктів поєднували, обробляли і аналізували до введення дози, через 1-7, 8-96 і 120-336 годин після введення дози. Для того щоб поєднати дані метаболітів із немічених радіоактивними ізотопами зразків плазми з міченими радіоактивними ізотопами зразками плазми із мас-балансного дослідження у людини, зразки [ $^{14}\text{C}$ ] плазми, що зібрані в діапазоні від 0-168 годин після введення дози для кожного з шести суб'єктів також поєднували за допомогою метода поєднання Гамільтона, обробляли і аналізували за допомогою підрахунку радіоактивності. Зразки [ $^{14}\text{C}$ ] плазми, зібрані в діапазоні 1-168 годин після введення дози для двох суб'єктів, поєднували (в рівному об'ємі), обробляли і аналізували.

45 Початковий спосіб екстракції і відновлення плазми

50 [00109] Два зразки плазми від суб'єкта (4 і 72 години після введення дози) використовували для визначення початкової екстракції і відновлення. Загальна радіоактивність для кожного зразка плазми в мас-балансному дослідженні була забезпечена Exelixis, Inc. і була визначена як 100 %. після того, як зразки відтавали під біологічною витяжкою, дві 0,5 мл аліквоти кожного зразка плазми додавали до 3-х об'ємів (1,5 мл) MeOH:ACN (20:80, об'єм/об'єм) і перемішували вихровим способом (5 хв). Суміші центрифугували при 2000 обертах за хвилину протягом 10 хвилин, і супернатанти переносили в чисті пробірки. Пелети екстрагували за допомогою двох додаткових 3-х об'ємів MeOH:CAN (20:80, об'єм/об'єм). Суміші центрифугували і поєднували



супернатанти. Аліквоти аналізували за допомогою 2900 TR рідкісного сцинтиляційного лічильника (LSC) (Packard Instruments, Meridian, CT). Ефективність екстракції розраховували як:

Ефективність екстракції (%) = (число розпадів за хвилину в супернатанті/число розпадів за хвилину в зразку плазми) × 100

5 [00110] Супернатанти, отримані при екстракції, випарювали досуха в струмі азоту на водяній лазні з температурою навколишнього середовища. Потім осад відновлювали в 0,35-0,5 мл MeOH:ACN:вода (10:20:70, об'єм/об'єм/об'єм). Відновлені зразки центрифугували при 15000 обертах за хвилину протягом 10 хвилин і аналізували аліквоти за допомогою LSC для ефективності відновлення.

10 Ефективність відновлення (%) = (число розпадів за хвилину у відновленому розчині/число розпадів за хвилину в супернатанті) × 100

Приготування зразків плазми

15 [00111] Позначені радіоактивним ізотопом і непозначені радіоактивним ізотопом зразки плазми витягали з використанням того ж способу, за допомогою 1,0-2 мл зразків плазми, в залежності від доступного об'єма і рівня радіоактивності зразків. Супернатанти випарювали досуха в струмі азоту на водяній лазні з температурою навколишнього середовища, і залишок відновлювали в 0,35-0,5 мл MeOH:ACN:води (10:20:70, об'єм/об'єм/об'єм). Відновлені зразки центрифугували при 15000 обертах за хвилину протягом 10 хвилин. Аліквоти супернатантів вводили у ВЕРХ систему для аналізу.

20 Приготування зразків і радіоактивне відновлення сечі людини

[00112] Об'єднані зразки сечі, зібраної у суб'єкта (0-72, 168-192 і 312-336 годин після введення дози), ліофілізували в трьох екземплярах (кожен по 4 мл) і залишки відновлювали в 1 мл води:ACN: FA (80:20:0,1, об'єм/об'єм/об'єм). Радіоактивність об'єднаної сечі і відновленого розчину підраховували за допомогою LSC і розраховували ефективність відновлення. Для профілювання, ідентифікації і підрахунку радіоактивності метаболіту аналізували зразок сечі до

25 введення дози і 3 об'єднаних зразків сечі (0-72 години, 168-192 години і 312-336 годин після введення дози), зібрані у кожного з шести суб'єктів. Кожен зразок сечі ліофілізували, залишок відновлювали у воді:ACN:FA (80:20:0,1, об'єм/об'єм/об'єм), і відновлений зразок центрифугували при 15000 обертах за хвилину протягом 10 хв перед аналізом.

30 Приготування зразків і радіоактивне відновлення сечі людини

[00113] Для того щоб оцінити ефективність екстракції зразків калу, два зразки гомогенату калу, зібраних у суб'єкта, віддавали під біологічну витяжку. Приблизно 5,5-6 г гомогенату калу точно зважували для витягу. До гомогенатам калу додавали п'ятнадцять мл ACN:MeOH (80:20). Суміші струшували протягом 3 хвилин і центрифугували при 3000 обертах за хвилину протягом

35 10 хвилин. Супернатанти переносили в чисті пробірки. Процедуру екстракції повторювали ще два рази. Поеднували супернатанти з усіх трьох екстракцій. Радіоактивність в об'єднаних супернатантах визначали за допомогою LSC. Ефективність екстракції розраховували за допомогою наступної формули:

40 Ефективність екстракції (%) = (число розпадів за хвилину в супернатанті/число розпадів за хвилину гомогенату кала) × 100

[00114] Супернатант концентрували в струмі азоту при кімнатній температурі, а залишки відновлювали в MeOH:ACN:воді (10:20:70). Аліквоти відновлюючого розчину підраховували за допомогою LSC для ефективності відновлення.

45 Ефективність відновлення (%) = (число розпадів за хвилину у відновлюючому розчині/число розпадів за хвилину в супернатанті) × 100

Загальна ефективність (%) = Ефективність екстракції (%) × Ефективність відновлення (%) / 100

50 [00115] Для профілювання, ідентифікації і підрахунку радіоактивності метаболіту зразок калу до введення дози і 3 об'єднаних зразка калу (0-72, 168-192, 312-336 годин після введення дози), зібрані в кожного із шести суб'єктів, витягали за допомогою аналогічних процедур для ефективності екстракції. Супернатанти висушували в струмі азоту, і залишок відновлювали у воді:ACN:FA (80:20:0,1, об'єм/об'єм/об'єм). Відновлені зразки центрифугували при 15000 обертах за хвилину протягом 10 хв перед аналізом.

Визначення ефективності колонки для ВЕРХ

55 [00116] Визначення ефективності колонки для ВЕРХ проводили, щоб продемонструвати, що всі радіоактивні компоненти ефективно елюювали з колонки за допомогою способу 1 ВЕРХ. Аліквоти зразків сечі (Суб'єкт 1042, 24-48 годин після введення дози) вводили в систему ВЕРХ з або без колонки, і елюенти, зібрані в діапазоні 0-30 хв, збирали в чисті 50 мл центрифужні пробірки. Після збору одержували маси елюента з кожного введення, і дубльовані аліквоти (1

60 мл) підраховували за допомогою LSC. Середнє значення підрахунків використовували для

розрахунків загальної радіоактивності, що міститься в зібраному елюенті з або без встановленої колонки.

Ефективність колонки (%) = (число розпадів за хвилину в елюенті з колонкою/число розпадів за хвилину в елюенті без колонки) × 100

5 [00117] Спосіб 3 ВЕРХ застосовували тільки для об'єднаної плазми, і визначення ефективності колонки не було виконано через обмежений об'єм доступних зразків.

Системи ВЕРХ/MC/RFD і ВЕРХ радіо-аналізу.

10 [00118] Система профілювання і ідентифікації метаболіту (ВЕРХ/MC/RFD) складалася з автоматичного пробовідбірника HTC PAL, ВЕРХ-насосу Surveyor, лінійного мас-спектрометра з іонним уловлювачем LTQ і β-RAM моделі 3 RFD. Отримані дані мас-спектрометрії і RFD обробляли за допомогою програмного забезпечення Xcalibur і Laura Lite 3 відповідно. ВЕРХ елюент рзділяли міжу RFD і мас-спектрометром у співвідношенні 3 до 1. Нижче наведений короткий опис умов ВЕРХ, мас-спектрометра і RFD.

15

### Спосіб 1 ВЕРХ/MC/RFD

<u>ВЕРХ</u>	ВЕРХ-насос Surveyor		
• Тип колонки	Phenomenex Synergi Polar RP, 4,6 x 250 мм, 4 мкМ		
• Рухомі фази	A: H <sub>2</sub> O c 0,1% FA B: ACN c 0,1% FA		
• Градієнтна програма	Час (хв)	A%	B%
	0	80	20
	2	80	20
	22	30	70
	23	5	95
	27	5	95
	28	80	20
	34	80	20
• Витрати	800 мкл/хв		
• Час аналізу	34 хвилини		
<u>Мас-спектрометрія:</u>	Лінійний іонний уловлювач Thermo Finnigan LTQ		
• Витрати газу оболонки	50 одиниць		
• Витрати допоміжного газу	20 одиниць		
• Витрати продувального газу	10 одиниць		
• Напруга іонорозпилення	5 кВ для IEP+; 4,3 кВ для IEP-		
• Капілярна температура	300 °C		
• Капілярна напруга	22 В для IEP+; -9 В для IEP-		
• Напруга тубуса об'єктива	80 В для IEP+; -96 В для IEP-		
• Режим іонізації	IEP+, IEP-		
<u>Проточний радіодетектор:</u>	β-RAM Модель 3		
• Радіонуклід	[ <sup>14</sup> C]		
• Об'єм клітини	400 мкл		
• Сцинтиляційна суміш	Ultima-Flo M, Perkin Elmer		
• Суміш/ВЕРХ витрати	3:1		

### Спосіб 2 ВЕРХ/MC

<u>ВЕРХ</u>	ВЕРХ-насос Surveyor
• Тип колонки	Phenomenex Synergi Polar RP, 4,6 x 250 мм, 4 мкМ
• Рухомі фази	A: H <sub>2</sub> O c 0,1% FA

B: ACN з 0,1% FA

• Градієнтна програма	Час (хв)	A%	B%
	0	80	20
	2	80	20
	40	35	65
	42	5	95
	47	5	95
	48	80	20
	55	80	20
• Витрати	800 мкл/хв		
• Час аналізу	55 хвилин		

<u>Мас-спектрометрія:</u>	Лінійний іонний уловлювач Thermo Finnigan LTQ
• Витрати газу оболонки	50 одиниць
• Витрати допоміжного газу	20 одиниць
• Витрати продувального газу	10 одиниць
• Напруга іонорозпилення	5 кВ
• Капілярна температура	300 °C
• Капілярна напруга	22 В
• Напруга тубуса об'єктива	80 В
• Режим іонізації	IEP+

**Спосіб 3 ВЕРХ/МС**

<u>ВЕРХ</u>	ВЕРХ-насос Surveyor
• Тип колонки	Waters Xbridge phenyl, 4,6 x 150 мм, 3,5 мкм
• Рухомі фази	A: H <sub>2</sub> O з 0,1% FA B: ACN з 0,15% FA

• Градієнтна програма	Час (хв)	A%	B%
	0	80	20
	2	80	20
	40	30	70
	42	5	95
	47	5	95
	48	80	20
	55	80	20
• Витрати	800 мкл/хв		
• Час аналізу	55 хвилин		

<u>Мас-спектрометрія:</u>	Лінійний іонний уловлювач Thermo Finnigan LTQ
• Витрати газу оболонки	50 одиниць
• Витрати допоміжного газу	20 одиниць
• Витрати продувального газу	10 одиниць
• Напруга іонорозпилення	5 кВ
• Капілярна температура	300 °C
• Капілярна напруга	22 В
• Напруга тубуса об'єктива	80 В
<b>Режим іонізації</b>	<b>IEP+</b>

[00119] Система ВЕРХ-МС для МС високої роздільної здатності складалася з Michrom Bioresources Paradigm MS4B ВЕРХ і мас-спектрометра Thermo LTQ Orbitrap Discovery. Хроматографічні умови і параметри джерела іонів були такими самими, як і у способі 1 ВЕРХ для системи LTQ. Дані одержували з роздільною здатністю 30000 у центроїдному режимі.

[00120] Систему ВЕРХ/ TopCount NXT™ застосовували для підрахунку радіоактивності зразків плазми. Система складалася з автоматичного пробовідбірника HTC PAL, двох Shimadzu ВЕРХ насосів і колектора фракцій Foxy Jr. Fraction Collector (Isco, Lincoln, NE). ВЕРХ фракції, що зібрані до 96-лункового планшету LumaPlate™, висушували за допомогою персонального випарника EZ-2plus (Genevac, Valley Cottage, New York), і висушені зразки підраховували за допомогою TopCount NXT™ Microplate Scintillation & Luminescence Counter (PerkinElmer®). Ці дані обробляли з використанням програмного забезпечення ProFSA (PerkinElmer®). Способи ВЕРХ були такими ж, як описано вище.

Ідентифікація метаболіту

[00121] Метаболіти, які представляли більше ніж 5 % від загальної радіоактивності або 5 % від загального AUC у матриці, визначали у відповідності з наступним способом. Мас-спектри (МС, МС/МС і МС/МС/МС) кабозантинібу і стандартів його метаболіту, надані Exelixis, Inc., одержували на мас-спектрометрі з іонним уловлювачем. Були запропоновані основні фрагменти моделі. Ідентифікацію цих метаболітів підтверджували шляхом зіставлення мас-спектрів (МС і МС/МС) і часів утримання з справжніми еталонними зразками. Для інших невідомих метаболітів іони молекул шукали на хроматограмах РХ/МС, у повносканерних режимах як позитивної, так і негативної іонізації при тому ж терміні утримання, що й ті, які були виявлені на РХ-радіохроматограмі. Одержували мас-спектри іонних продуктів і мас-спектри високої розрізняльної здатності для відповідних іонів молекул. Пропонували передбачувані структури метаболіту на основі аналізу їх масових фрагментів моделі.

Кількісне визначення кабозантинібу і його метаболітів.

[00122] Кількісне визначення кабозантинібу і його метаболітів в об'єднаних або окремих зразках з кожної матриці в різні моменти часу або часові інтервали було засновано на інтеграції відповідних піків, знайдених на них радіохроматограмах. Для зразків плазми розраховували відсоток загальної радіоактивності в зразку для кожного піка в кожний момент часу і перетворювали його в нг/мл.

[00123] Для кількісного визначення кабозантинібу і його метаболітів у плазмі:

$$\text{нг/мл} = (\% \text{ від загальної радіоактивності}) \times (\text{загальне нг еквівалента/мл для часової точки})/100$$

[00124] Значення загального нг еквівалента/мл одержували з результатів мас-балансного дослідження людини.

[00125] Для об'єднаних зразків сечі відсоток загальної радіоактивності в об'єднаному зразку для кожного піка розраховували як % від загального безвихідного в об'єднаних зразках:

$$\% \text{ загального безвихідного в об'єднаних зразках} = (\text{загальна радіоактивність піка/загальна радіоактивність безвихідних піків}) \times 100$$

[00126] Для об'єднаних зразків калу відсоток загальної радіоактивності в об'єднаному зразку для кожного піка розраховували як відсоток загального безвихідного плюс вихідного в об'єднаних зразках:

$$\% \text{ загального безвихідного плюс вихідного в об'єднаних зразках} = (\text{загальна радіоактивність піка/загальна радіоактивність безвихідних і вихідних піків}) \times 100$$

[00127] Відсоток загальної радіоактивності в об'єднаних зразках для кожного піка перетворювали у відсоток вихідного в об'єднаних зразках:

$$\% \text{ вихідного в об'єднаних зразках} = (\text{загальна радіоактивність піка/загальна радіоактивність вихідного піка}) \times 100$$

[00128] Межу кількісного показника для детектора радіоактивності визначали як співвідношення сигналу до шуму (3:1) на радіохроматограмі. Низькі межі кількісного показника становили 10 і 500 розпадів за хвилину для проточних радіодетекторів Topcount і  $\beta$ -RAM відповідно.

Результати і їх обговорення

Радіоактивна ефективність

[00129] Початкову ефективність екстракції визначали з використанням зразків плазми, отриманих від суб'єкта через 4 години і через 72 години після введення дози з трьома об'ємами MeOH:ACN (20:80) екстрагованими три рази. Середні значення ефективностей екстракції радіоактивності на 4-годинних і 72-годинних зразках складали 98,43 % і 94,99 % відповідно. Після залишкового висушування і відновлення в розчині MeOH:ACN, ефективності відновлення становили 92,73 % і 85,90 % відповідно. Загальні ефективності становили 91,27 % і 81,60 % відповідно.

[00130] Ефективності центрифугування сечі, визначені з використанням зібраних у суб'єкта зразків у діапазонах 0-8, 24-48, 72-96 і 120-144 годин після введення дози, коливалися між 102 % і 104 %. Ефективність відновлення сечі після ліофілізації становила 94,7 % при використанні об'єднаних зразків від суб'єкта а.

[00131] Для об'єднаних зразків калу, зібраних у діапазоні 0-48 годин після введення дози, ефективність екстракції, ефективність відновлення і загальна ефективність становили 98,48 %, 88,80 % і 87,37 % відповідно. Для об'єднаних зразків калу, зібраних у діапазоні 120-168 часів після введення дози, ефективність екстракції, ефективність відновлення і загальна ефективність становили 85,85 %, 87,69 % і 75,24 % відповідно.

[00132] Радіоактивна ефективність колонки ВЕРХ для зразка сечі становила 97,05 %.

[00133] Для розрахунків ефективності не застосовували поправочний коефіцієнт для підрахунку радіоактивності плазми, сечі і калу.

## Профілювання метаболіту

[00134] У суб'єкта кабозантинібу, сполуку 9 (сульфат кабозантинібу) і сполуку 19 (N-оксид кабозантинібу) демонстрували основні піки на радіохроматограмах. Сполука 2 (продукт розщеплення деметильованого і сульфатованого фтораніліну) була основним метаболітом в зразках плазми після 72 годин після введення дози. Метаболіт - сполука 7 (продукт розщеплення фтораніліну) припадає на один з другорядних піків. Метаболіти - сполуки 7, 3 (деметил кабозантинібу глюкуронид В), 9 і 10 (продукт розщеплення метилового ефіру фтораніліну) спільно елюювали за допомогою способу 1 ВЕРХ.

[00135] У суб'єкта збирали представлені профілі метаболіту сечі людини, радіохроматограми (з використанням способу 1 ВЕРХ) зразків сечі людини в діапазонах 0-72 години, 144-192 години і 288-336 годин після введення дози. Метаболіт - сполука 6 була основним метаболітом об'єднаних зразків сечі в діапазонах 0-72 години, 144-192 години і 288-336 годин після введення дози. На додаток до сполуки 6, метаболіти - сполуки 1, 4, 5, 7 і 19 виявили в об'єднаному зразку в діапазоні 0-72 години після введення дози. Метаболіти - сполуки 1, 4, 5, 7 виявили в об'єднаному зразку в діапазоні 144-192 години після введення дози. Метаболіти - сполуки 1 і 5 виявили в об'єднаному зразку в діапазоні 288-336 годин після введення дози. Вихідну сполуку кабозантинібу в зразках сечі не виявили.

[00136] У суб'єкта збирали представлені профілі метаболіту калу людини, радіохроматограми (з використанням способу 1 ВЕРХ) зразків калу людини в діапазонах 0-72 години, 144-192 години і 288-336 годин після введення дози. Вихідний кабозантинібу і метаболіти - сполуки 4, 7, 11 і 15 (включаючи сполуку 16) виявили в об'єднаному зразку в діапазоні 0-72 години після введення дози. Метаболіти - сполуки 4, 7, 11, 15, 16 і 18 виявили в об'єднаному зразку в діапазоні 144-192 години після введення дози. Метаболіти - сполуки 4 і 11 виявили в об'єднаному зразку в діапазоні 288-336 години після введення дози.

## Ідентифікація метаболітів з використанням ВЕРХ/МС аналізу

[00137] ВЕРХ/МС аналіз автентичних стандартів з використанням способу 1 ВЕРХ показав, що час утримання кабозантинібу, продукту розщеплення фтораніліну (сполука 7), сульфату (сполука 9) і N-оксиду (сполука 19) становив 20,3, 14,4, 16,5 і 23,1 хвилини відповідно.

[00138] Потім зразки плазми, сечі і калу проаналізували за допомогою НОPLC/МС, і сполуки ідентифікували на основі їх протонуваних молекулярних іонів і схем фрагментації.

## Ідентифікація метаболітів кабозантинібу і його метаболітів у плазмі людини

[00139] Мас-спектр піку протягом приблизно 19,1 хвилини в ХІС показував протонувани молекулярні іони на  $m/z$  502. Його спектри іон-продуктів показували основні фрагменти на  $m/z$  391, 323 і 297, що узгоджується з тим стандартом кабозантинібу. Дані МС презентовано в таблиці 1 і 2.

Таблиця 1

ВЕРХ радіохроматограма часу утримання метаболітів  
у зразках з однією пероральною дозою [ $^{14}\text{C}$ ] кабозантинібу

Сполука	Спосіб ВЕРХ	Час утримання (хв)
Стандарти		
7	1	14,13
9	1	16,45
I	1	20,26
19	1	23,06
Плазма		
1	1	4,13
2a/2b	1	9,33
4	1	11,87
5	1	12,80
6	1	13,47
7	1	14,13
9	1	14,67
I	1	18,67
19	1	23,47
Сеча		
1	1	4,13
4	1	11,87
5	1	12,80
6	1	13,47
7	1	14,13
19	1	23,47
Кал		
4	1	12,67
7	1	13,47
11	1	16,07
15	1	17,87
I	1	19,60
18	1	21,03
Об'єднані зразки Гамільтона		
Плазма		
9	3	17,36
7	3	19,32
8	3	19,32 (плече)
19	3	25,20
I	3	37,52

Таблиця 2

Дані МС для метаболітів з використанням ВЕРХ

Сполука	Спосіб ВЕРХ	Час утримання ВЕРХ	МС (m/z)
I	1	19,10	502
19	1	21,85	518
9	1	15,29	518 (втрата SO <sub>3</sub> від m/z молекулярного іону m/z при 598)
7	1	13,36	409
2a	1	10,70 (2a)	473, 395 (втрата SO <sub>3</sub> від m/z молекулярного іону m/z при 473)
3	2	15,87	488
8	2	19,43	488
10	2	33,56	423
5	1	13,00	489
6	1	13,39	393
15	1	17,60	488
16	1	17,60	518
13	1	16,45	518
12	1	16,45	518
17	1	18,43	518

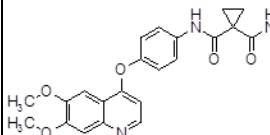
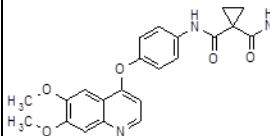
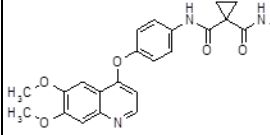
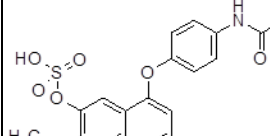
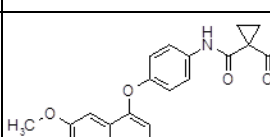
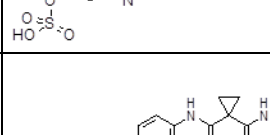
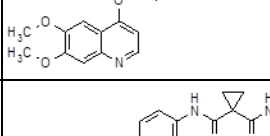
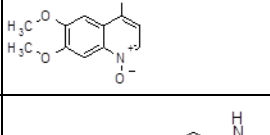
Активність кінази метаболітів кабозантинібу

Розведення кінази

- 5 [00140] Активність кінази вимірювали і профілювали за допомогою EMD Millipore у відповідності з Kinase Profiler Service Assay Protocols Protocol Guide Volume 57. Результати наведені нижче в таблиці 3. Інгибування зазначення IC<sub>50</sub> з наступним ключем: A = IC<sub>50</sub> менше 50 нМ, B = IC<sub>50</sub> більше 50 нМ, але менше 500 нМ, C = IC<sub>50</sub> більше 500 нМ, але менше 5000 нМ і D = IC<sub>50</sub> більше 5000 нМ. В залежності від функціональності хіназоліну або хіноліну, типові сполуки
- 10 згідно з даним винаходом мають селективність за будь-яким з c-Met, KDR, c-Kit, flt-3 і flt-4. Скорочення для ферментів, наведених в таблиці 3, визначали наступним чином: c-Met позначає рецепторну кіназу фактора росту гепатоцитів; RET відноситься до RET протоонкогену кінази; KDR відноситься до рецептору домена кіназої вставки тірозинкінази; flt-1 alpha, flt-3 і flt-4, fms-подібні тірозинкінази, представник сімейства FLK рецепторних тірозинкіназ і Aurora B MP
- 15 відносяться до Аулога В кіназам. Коли замість значення IC<sub>50</sub> зазначені відсотки, це вказує на відсоток інгибування при 1 мкМ. Порожні ячейки в таблицях вказують тільки на відсутність даних.

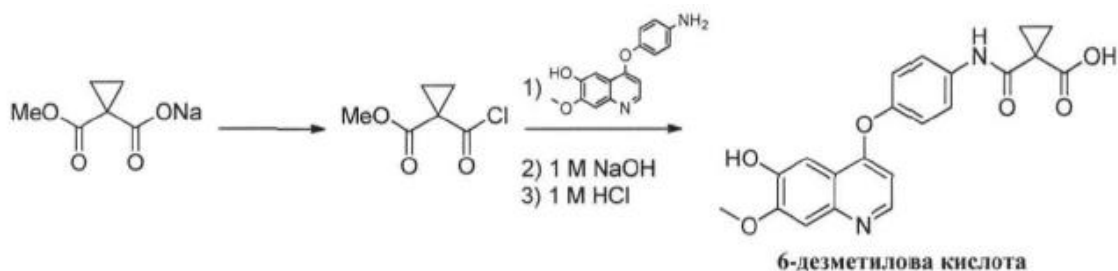
Таблиця 3

## Активність кінази

ID сполуки	МОЛЕКУЛЯРНА СТРУКТУРА	c-Met Std (IC <sub>50</sub> ) (нМ)	RET Std (IC <sub>50</sub> ) (нМ)	KDR Std (IC <sub>50</sub> ) (нМ)	Flt-1 Alpha (IC <sub>50</sub> ) (нМ)	Flt-3 Std (IC <sub>50</sub> ) (нМ)	Flt-4 Std (IC <sub>50</sub> ) (нМ)	Aurora B MP 8pt Std (IC <sub>50</sub> ) (нМ)
Кабозантині б		A	A	A	A	A	A	
16		A	A	C	A		B	
13		A	A	C	A		B	
2a		≥50 % @ мкМ	≤25 % @ мкМ	≤25 % @ мкМ	≤25 % @ мкМ	≤25 % @ мкМ	≥25 % @ мкМ	≤25 % @ мкМ
2b								
9		≥75 % @ мкМ	≥75 % @ мкМ	≤25 % @ мкМ	≥50 % @ мкМ	≥50 % @ мкМ	≥75 % @ мкМ	≥75 % @ мкМ
19		B	B	C		C		
7		D	D	C		C		

Синтез метаболіту і структурні дані  
[00141] 6-дезметилова кислота

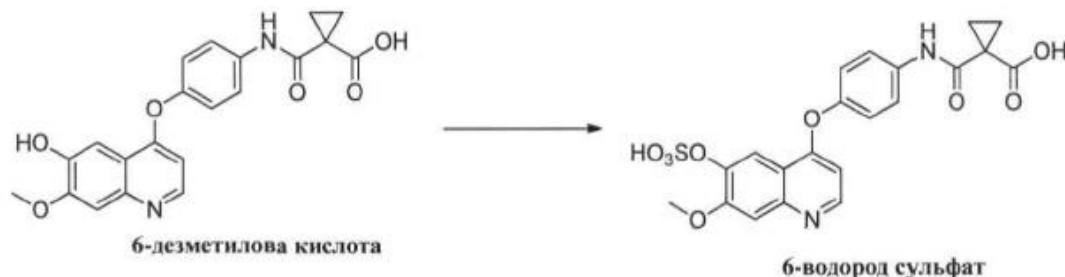




[00142] 4-(4-амінофенокси)-7-метоксихінолін-6-ол (15,0 г; 53,3 ммоль), який приготували у відповідності зі схемою 4, і карбонат калію (29,5 г; 213,3 ммоль; 4 екв) суспендували в посуді в ТГФ (210 мл; 14 об'ємів) і воді (90 мл; 6 об'ємів) при 20 °С. 1- (метоксикарбоніл)циклопропанкарбоксилат натрію (17,71 г; 106,6 ммоль; 2 екв) суспендували в окремому посуді в ТГФ (90 мл; 6 об'ємів). Додавали ДМФА (120 мкл, 3 моль %) і охолоджували до температури нижче 15 °С. Додавали оксалілхлорид (9,34 мл; 106,6 ммоль; 2 екв) протягом 90 хвилин, і реакційну суміш витримували 2 години при 10-15 °С. Додавали суспензію хлорангідриду до суспензії кабозантінібу протягом 2 год. при 20-25 °С і витримували щонайменше протягом 3 годин, після чого аналіз ВЕРХ показав більше ніж 99 % перетворення в суміш моно- і біскарбонільованого матеріалу. Реакційну суміш фільтрували через цільт (Celite®), промивали ТГФ (30 мл; 2 об'єма) і розділяли шари. 1 М NaOH (150 мл; 10 об'ємів) додавали до верхнього шару ТГФ і суміш нагрівали при 40 °С протягом 1 години, після чого аналіз ВЕРХ показав більше ніж 99 % омиленого продукту. Суміш охолоджували до 25 °С і видаляли верхній шар ТГФ. Водний шар підкисляли до рН 3-4 за допомогою 1 М HCl, об осадити продукт, і витримували протягом 1 години. Осад відфільтровували, промивали водою (90 мл, 6 об'ємів) і висушували у вакуумі (більше 20 фунтів на квадратний дюйм) з продувкою азотом при 50 °С з отриманням сірувато-коричневатого порошку.

<sup>1</sup>H ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>, 400 МГц) δ 10,8-11,0 (br s, 1H), 10,7 (s, 1H), 8,65 (d, J=6,9 Гц, 1H), 7,81 (d, J=9,3 Гц, 2H), 7,67 (s, 1H), 7,58 (s, 1H), 7,32 (d, J=9,3 Гц, 2H), 6,69 (d, J=6,9 Гц, 1H), 4,01 (s, 3H), 2,48-2,53 (m, 4H). MS (IEP-) m/z 393 [M-H]<sup>-</sup>.

[00143]



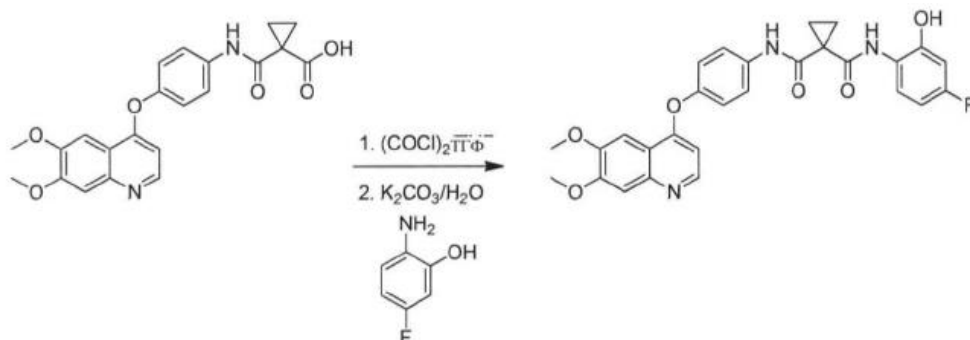
[00144] 6-дезметилу кислоту (120 мг; 0,30 ммоль), гідроксид калію (118 мг; 2,1 ммоль; 7 екв) і комплекс триоксиду сірки-триметиламіну (292 мг; 2,1 ммоль; 7 екв) розчиняли у воді (3 мл; 25 об'ємів) і нагрівали до 70 °С протягом 2 годин, після чого аналіз за допомогою ВЕРХ показав перетворення більше, ніж 99 %. Реакційну суміш потім охолоджували на льодяній бані і підкислювали по краплям 1н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> приблизно до рН 1. Суспензію витримували при 25 °С протягом 1 години, фільтрували, промивали водою (3 мл; 25 об'ємів) і зневоднювали. Вологий осад потім промивали ацетоном (3 мл; 25 об'ємів) і висушували при 35 °С в вакуумі (більше 20 фунтів на квадратний дюйм) з продувкою азотом протягом 24 годин з отриманням порошку бежевого кольору.

[00145] В альтернативному варіанті 6-дезметилу кислоту (120 мг; 0,30 ммоль) суспендували в MeCN (50 об, 6 мл) і додавали триетиламін (1,27 мл, 9,12 ммоль, 30 екв), а потім охолоджували на бані з льодом. Додавали по краплям хлорсульфонову кислоту (101 мкл, 1,52 ммоль, 5 екв) і потім реакційну суміш нагрівали до 70 °С протягом 1 години, після чого аналіз за допомогою ВЕРХ показав перетворення більше, ніж 98 відсотків. Реакційну суміш потім охолоджували на льодяній бані протягом 2 годин з утворенням осаду. Осад видаляли фільтруванням, прополіскували холодною MeCN (50 об). Розчин MeCN потім концентрували до приблизно 20 об (приблизно 2 мл) і гасили 100 об 1 н. HCl, і охолоджували на бані з льодом з отриманням рафінованого осаду, який відфільтровували, промивали 50 об води і 50 об ацетону

і висушували при 35 °С в вакуумі (більше 20 фунтів на квадратний дюйм) з продувкою азотом протягом 24 годин з отриманням порошку бежевого кольору.

<sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>, 400 МГц) δ 10,8 (s, 1H), 8,83 (d, J=5,9 Гц, 1H), 8,5 (s, 1H), 7,85 (d, J=8,5 Гц, 2H), 7,52 (s, 1H), 7,40 (d, J=8,5 Гц, 2H), 6,84 (d, J=5,9 Гц, 1H), 4,04 (s, 3H), 3,20-3,70 (br s, 1H), 1,39-1,48 (br s, 4H). МС (ІЕР-) m/z 473 [M-H]<sup>-</sup>, 236.

[00146] Орто-Гідрокси-Кабозантиніб



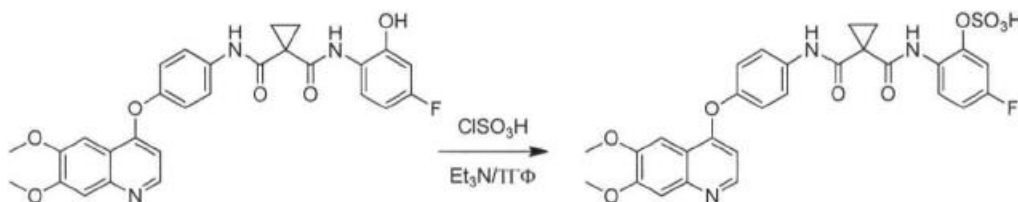
[00147] У колбу поміщали карбонову кислоту (0,84 г; 2,1 ммоль), ТГФ (1,2 мл) і ДМФА (5 мкл) і охолоджували до 15 °С. До цієї суспензії по краплям додавали оксалілхлорид (0,17 мл; 2,1 ммоль) протягом приблизно 20 хвилин. Через 2 години додавали суспензію хлорангідриду в інший посуд, що містив суспензію аніліну, яка постійно перемішувалась (0,2 г, 1,6 ммоль), карбонат калію (0,63 г, 4,6 ммоль) в ТГФ (2,8 мл) і води (1 мл) протягом приблизно 15 хвилин. Через 3 години аналіз ВЕРХ показав повне перетворення в продукт. Перемішування припиняли, нижній водний шар видаляли й додавали воду (30 мл), щоб осадити продукт. Потім продукт збирали фільтруванням і промивали сумішшю 1:1 ТГФ-вода (2×10 мл) з одержанням блідо-сірої твердої речовини. Потім її додатково очищали за допомогою флеш-хроматографії на силікагелі із застосуванням суміші метанол/дихлорметан у якості рухливої фази.

[00148] В альтернативному варіанті суспензію карбонової кислоти (4,08 г; 10 ммоль), анілін (1,52 г; 12 ммоль) і триетиламін (2,7 мл; 20 ммоль) в ацетонітрилі (100 мл) обробляли EDAC (2,30 г; 12 ммоль) і НОБт (0,5 г; 3 ммоль). Суспензію перемішували протягом ночі при кімнатній температурі, і протікання реакції контролювали за допомогою ВЕРХ. В кінці реакції додавали 150 мл води, і продукт, що випав в осад, збирали фільтруванням, промивали водою, а потім очищали за допомогою флеш-хроматографії.

<sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>, 400 МГц) δ 10,46 (br s, 1H), 10,29 (br s, 1H), 10,0 (br s, 1H), 8,47 (d, 1H), 7,92 (dd, 1H), 7,73 (dd, 2H), 7,51 (s, 1H), 7,40 (s, 1H), 7,28 (dd, 2H), 6,68 (dd, 1H), 6,62 (dt, 1H), 6,45 (d, 1H), 3,95 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 1,60-1,55 (m, 4H). <sup>13</sup>C ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>, 100 МГц) δ 169,82, 167,67, 159,91, 157,51, 152,58, 149,97, 149,35, 149,09, 148,98, 148,86, 146,49, 135,72, 123,00, 122,97, 122,91, 122,43, 121,30, 115,17, 107,86, 105,10, 104,87, 103,16, 102,43, 102,19, 99,08, 55,74, 55,71, 55,66, 30,02, 16,51.

МС (APCI+) m/z 518,3 [M+H]<sup>+</sup>, 500,3.

[00149] Кабозантиніб-Гідроксисульфат

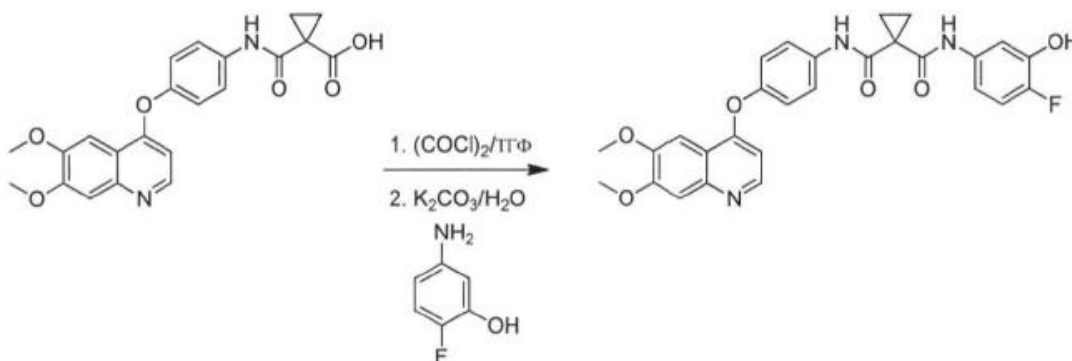


[00150] До суспензії гідрокси-кабозантинібу (0,95 г; 1,9 ммоль) в ТГФ (20 мл) додавали триетиламін (5 мл; 36 ммоль) і охолоджували до температури нижче 5 °С. Додавали по краплям хлорсульфонову кислоту (1 мл; 15 ммоль) так, щоб температура залишалась нижче 10 °С, протягом приблизно 15 хвилин. після перемішування протягом ночі при кімнатній температурі аналіз ВЕРХ показав, що залишилось приблизно 5 відсотків вихідного матеріалу. Реакційну суміш обробляли водним розчином 1 н. HCl (25 мл). Продукт, що випав в осад збирали фільтруванням, промивали водою (4 × 25 мл) і висушували у вакуумі з одержанням не зовсім білої твердої речовини (937 мг; вихід неочищеного продукту 82 відсотка). Аналіз АН-ВЕРХ

показав, що продукт був 90,8 % чистоти, основна домішка була вихідним матеріалом. Продукт очищали до більше ніж 99 відсотків (АН-ВЕРХ) за допомогою препаративної ВЕРХ на колонці С18 з використанням системи рухливої фази водний ацетат амонію/ацетонітрил.

<sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>, 400 МГц) δ 10,39 (s, 1H), 9,69 (s, 1H), 8,81 (d, 1H), 7,95 (dd, 1H), 7,85 (d, 2H), 7,77 (s, 1H), 7,51 (s, 1H), 7,11 (s, 1H), 7,08 (dd, 1H), 6,93 (dd, 1H), 6,45 (d, 1H), 4,05 (s, 3H), 4,04 (s, 3H), 1,53 (s, 4H). МС (ІЕР-) m/z 596,0 [M-H]<sup>-</sup>.

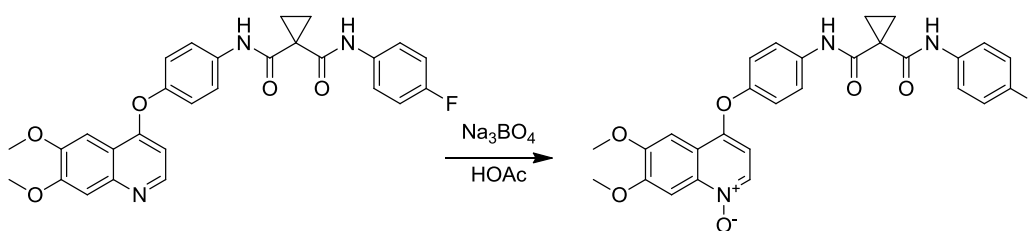
Мета-гідроксикабозантиніб



[00151] В колбу поміщали карбонову кислоту (0,84 г; 2,1 ммоль), ТГФ (1,2 мл) і ДМФА (5 мкл) і охолоджували до 15 °С. До цієї суспензії додавали по краплям оксалілхлорид (0,17 мл; 2,1 ммоль) протягом приблизно 20 хвилин. Через 2 години додавали суспензію хлорангіриду в інший посуд, що містить суспензію аніліну, що перемішується (0,2 г, 1,6 ммоль), карбонату калію (0,63 г, 4,6 ммоль) в ТГФ (2,8 мл) і води (1 мл) протягом приблизно 15 хвилин. Через 90 хвилин аналіз ВЕРХ показав повне перетворення в продукт. Перемішування припиняли і нижній водний шар видаляли і екстрагували етилацетатом (15 мл). Органічні шари поєднували, висушували над безводним MgSO<sub>4</sub>, фільтрували і концентрували з одержанням твердої речовини коричневого кольору. Тверду речовину потім додатково очищували за допомогою флеш-хроматографії на силікагелі з використанням суміші етилацетат/гептан в якості рухливої фази.

<sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>, 400 МГц) δ 10,15 (br s, 1H), 9,96 (br s, 1H), 9,89 (br s, 1H), 8,46 (d, 1H), 7,76 (d, 1H), 7,50 (s, 1H), 7,41 (d, 2H), 7,39 (s, 1H), 7,22 (d, 2H), 7,07-6,98 (m, 2H), 6,42 (d, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,93 (s, 3H), 1,46 (br s, 4H). <sup>13</sup>C ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>, 100 МГц) δ 168,27, 167,95, 160,02, 152,56, 149,48, 149,33, 148,86, 148,56, 146,46, 146,21, 144,52, 144,39, 136,45, 135,33, 135,31, 122,23, 121,22, 115,63, 115,44, 115,15, 111,29, 111,23, 110,26, 107,85, 103,04, 99,08, 55,73, 55,71, 31,66, 15,40. МС (APCI+) m/z 518,3 [M+H]<sup>+</sup>, 502,3.

[00152] N-Оксид Кабозантиніб

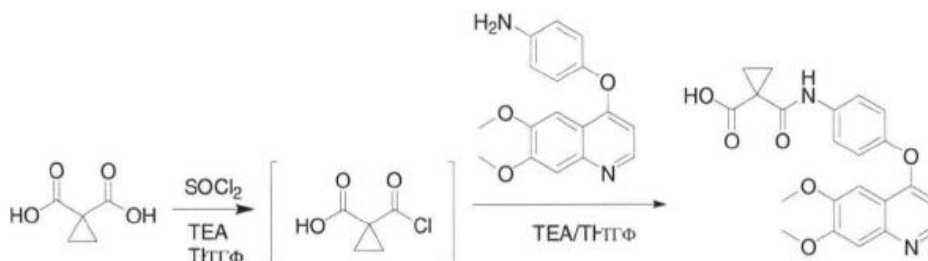


[00153] У колбу поміщали кабозантиніб (3,21 г; 6,4 ммоль), оцтову кислоту (32,1 мл) і тетрагідрат перборату натрію (1,98 г, 12,8 ммоль), і нагрівали до 65 °С і перемішували протягом ночі. Після 24 годин аналіз ВЕРХ показав приблизне співвідношення 38:62 вихідного матеріалу:продукту. Додавали ще окиснювач (1,98 г, 12,8 ммоль), і нагрівання продовжували протягом ночі. Розчинники видаляли у вакуумі, і залишок очищували за допомогою флеш-хроматографії з використанням градієнта дихлорметан-метанол (дихлорметан до 10 % у суміші метанол-дихлорметан) з одержанням 0,95 г продукту у вигляді білої твердої речовини.

<sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>, 400 МГц) δ 10,20 (br s, 1H), 10,08 (br s, 1H), 8,28 (d, 1H), 7,90 (s, 1H), 7,74 (d, 2H), 7,64 (dd, 2H), 7,48 (s, 1H), 7,23 (d, 2H), 7,15 (t, 2H), 6,45 (d, 1H), 3,97 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 1,47 (br s, 4H). <sup>13</sup>C ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>, 100 МГц) δ 172,11, 168,18, 168,13, 159,49, 157,09, 153,34, 150,72, 150,57, 149,98, 137,41, 136,32, 135,24, 135,21, 134,06, 122,44, 122,36, 122,19, 120,65, 117,23, 11,17, 114,95, 104,37, 100,34, 99,12, 56,09, 56,03, 31,59, 15,42. МС (APCI+) m/z 518,3 [M+H]<sup>+</sup>.

[00154]  
КИСЛОТА

1-[4-(6,7-Диметокси-хінолін-4-ілокси)-фенілкарбамоїл]-циклопропанкарбонова



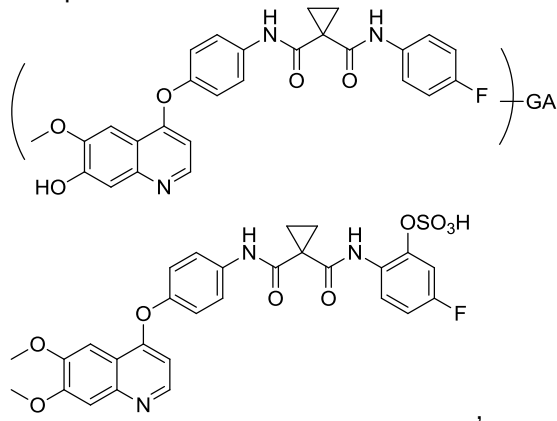
[00155] До циклопропіл-ди-карбонОВОЇ кислоти (449 мг, 3,45 ммоль) в ТГФ (3,5 мл) додавали ТЕА (485 мкл, 3,45 ммоль). Отриманий розчин перемішували при кімнатній температурі в атмосфері азоту протягом 40 хвилин перед додаванням тіонілхлориду (250 мкл, 3,44 ммоль). За ходом реакції стежили за допомогою РХМС по відношенню до утворення монохлоргідриду (зразок гасили MeOH і шукали відповідний монометилевий ефір). Через 3 год. перемішування при кімнатній температурі додавали 4-(6,7-диметокси-хінолін-4-ілокси)-феніламін (1,02 г, 3,44 ммоль) у вигляді твердої речовини, а потім додавали ще ТГФ (1,5 мл). Реакційну суміш продовжували перемішувати при кімнатній температурі протягом 16 годин. Отриману густу суспензію розбавляли етилацетатом (10 мл) і екстрагували 1N NaOH. Двофазну суспензію фільтрували і водну фазу підкисляли концентрованою соляною кислотою до pH приблизно 6 і фільтрували. Обидві тверді речовини поєднували і промивали EtOAc, потім висушували у вакуумі. Бажаний продукт, 1-[4-(6,7-диметокси-хінолін-4-ілокси)-фенілкарбамоїл]-циклопропанкарбонОВУ кислоту, одержували (962 мг, 68,7 відсотків вихід, 97 відсотків чистоти) у вигляді білої твердої речовини.

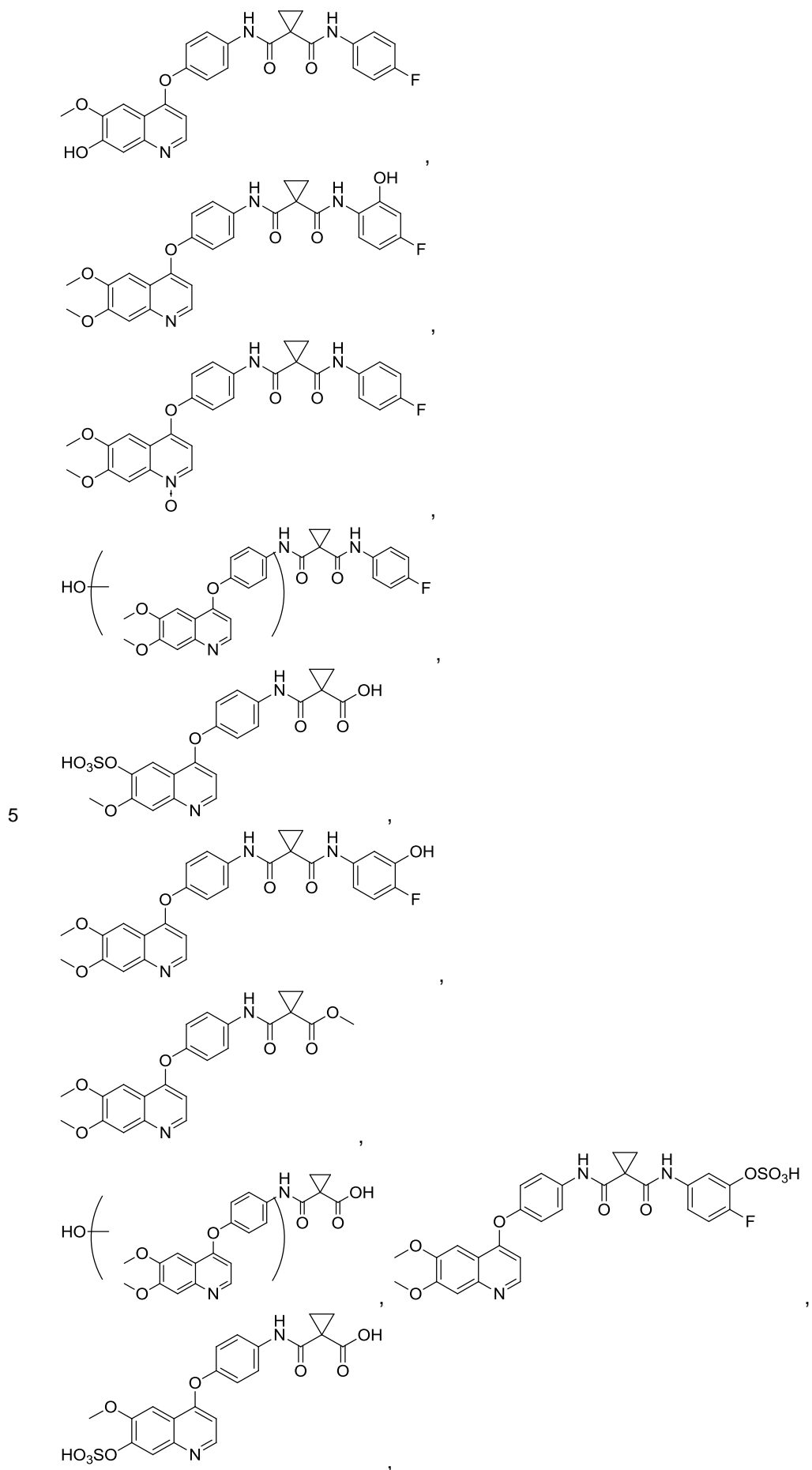
<sup>1</sup>H ЯМР (D<sub>2</sub>O/NaOH): 7,97 (d, 1H), 7,18 (d, 2H), 6,76 (m, 4H), 6,08 (d, 1H), 3,73 (s, 3H), 3,56 (s, 3H), 1,15 (d, 4H).

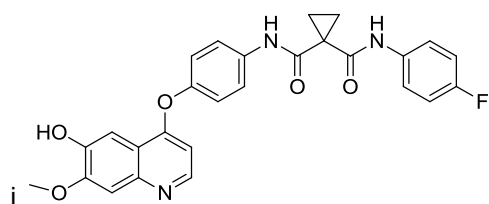
[00156] В цілях ясності і розуміння вищевикладене розкриття було достатньо докладно описане за допомогою ілюстрацій і прикладів. Даний винахід було описано з посиланням на різні конкретні і переважні варіанти реалізації і способи. Проте, слід розуміти, що багато змін і модифікацій можуть бути зроблені, залишаючись у рамках сутності і об'єму даного винаходу. Для фахівця в даній області техніки буде очевидно, що зміни і модифікації можуть бути в межах об'єма прикладеної формули винаходу. Таким чином, слід розуміти, що наведений вище опис призначений для того, щоб бути ілюстративним, а не обмежувачим. Тому об'єм винаходу має бути визначений не за допомогою посилання на наведений вище опис, а замість цього він повинен бути визначений за допомогою посилання на наступну прикладену формулу винаходу разом з повним об'ємом еквівалентів, на які поширюються претензії згідно із цією формулою винаходу.

### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Віділений метаболіт кабозантинібу або його фармацевтично прийнятна сіль, де сполуку вибирають з:

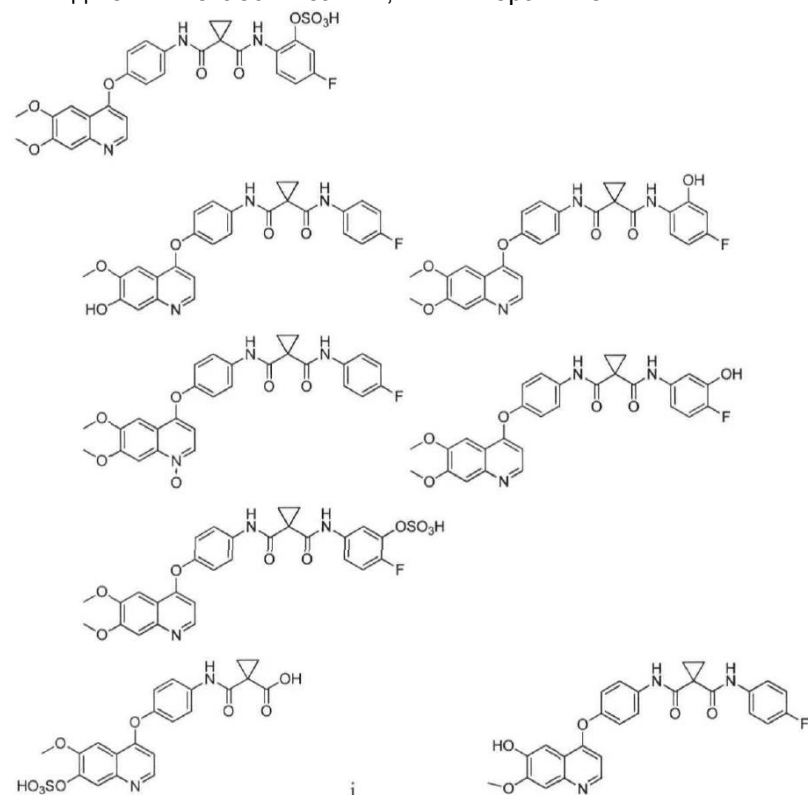






де GA являє собою фрагмент глюкуронової кислоти, або її фармацевтично прийнятну сіль.

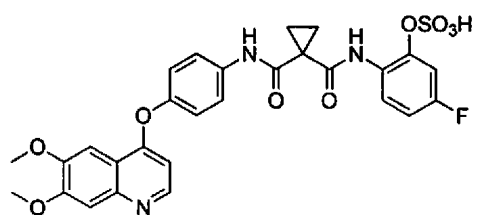
2. Виділений метаболіт за п. 1, який вибраний з:



5

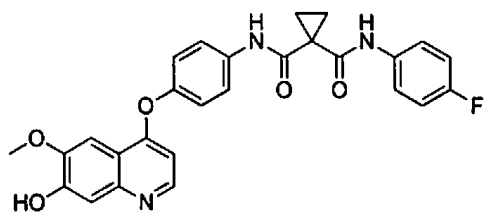
або його фармацевтично прийнятна сіль.

3. Виділений метаболіт за п. 1, який являє собою



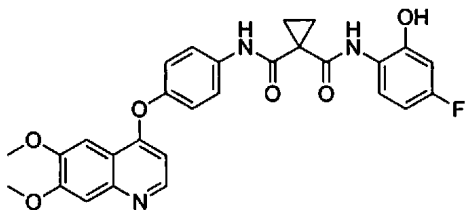
або його фармацевтично прийнятна сіль.

10 4. Виділений метаболіт за п. 1, який являє собою

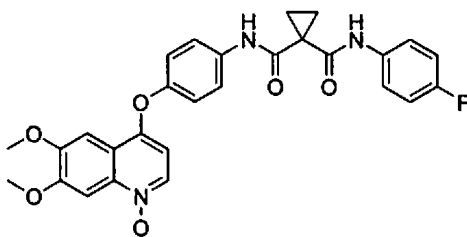


або його фармацевтично прийнятна сіль.

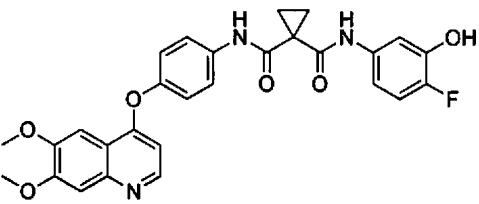
5. Виділений метаболіт за п. 1, який являє собою



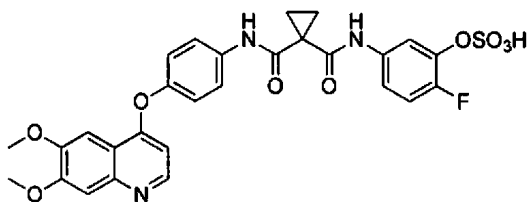
або його фармацевтично прийнятна сіль.  
6. Виділений метаболіт за п. 1, який являє собою



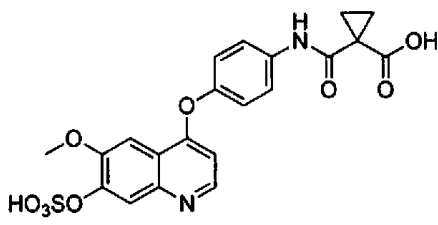
5 або його фармацевтично прийнятна сіль.  
7. Виділений метаболіт за п. 1, який являє собою



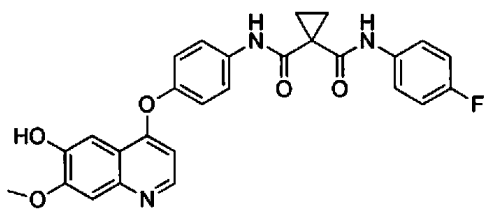
або його фармацевтично прийнятна сіль.  
8. Виділений метаболіт за п. 1, який являє собою



10 або його фармацевтично прийнятна сіль.  
9. Виділений метаболіт за п. 1, який являє собою



15 або його фармацевтично прийнятна сіль.  
10. Виділений метаболіт за п. 1, який являє собою

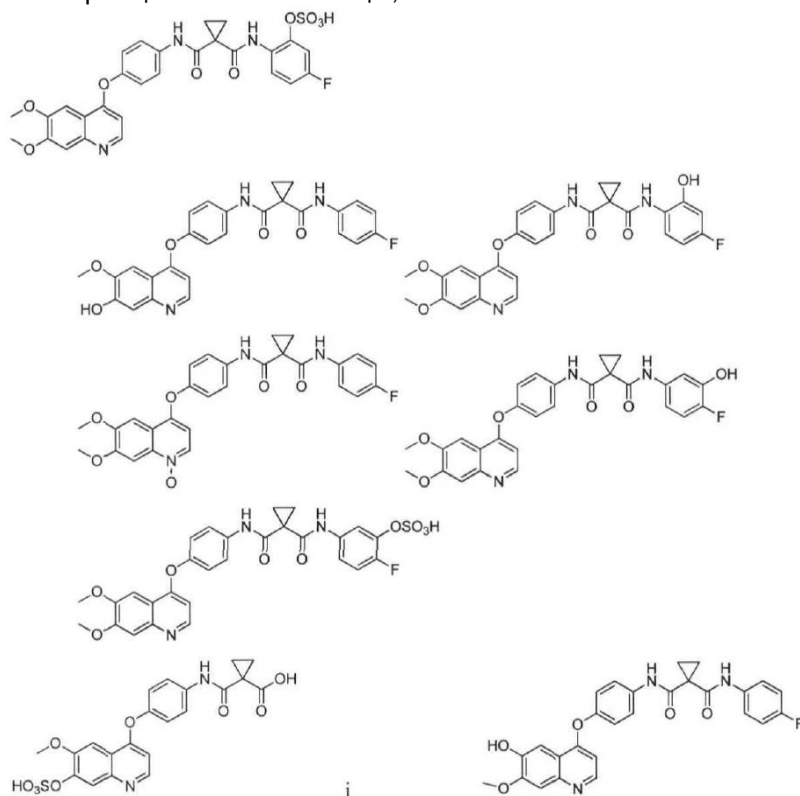


або його фармацевтично прийнятна сіль.

11. Спосіб лікування раку, який включає введення ссавцю, який потребує цього, терапевтично ефективної кількості сполуки за пп. 1-10 або її фармацевтично прийнятної солі.

5 12. Сполука для застосування в лікуванні раку, де сполука являє собою виділений метаболіт кабозантинібу або його фармацевтично прийнятної солі за будь-яким з пп. 1-10.

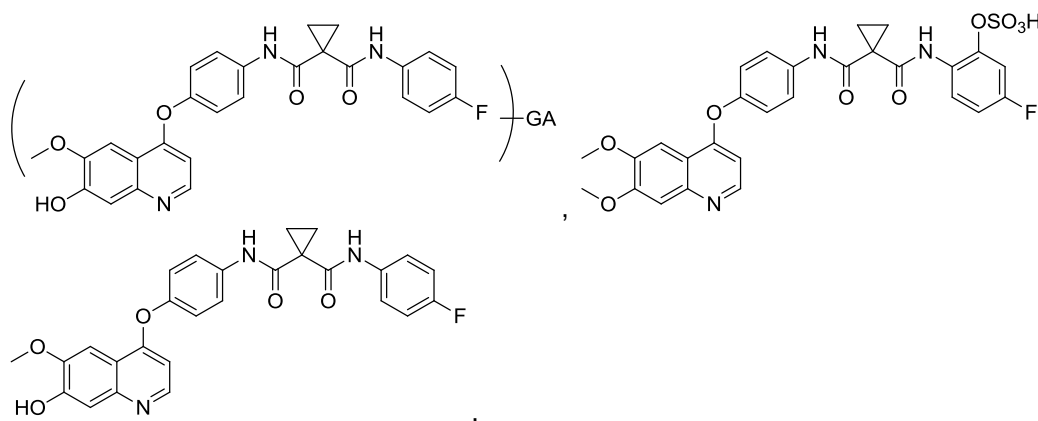
13. Фармацевтична композиція, яка містить:



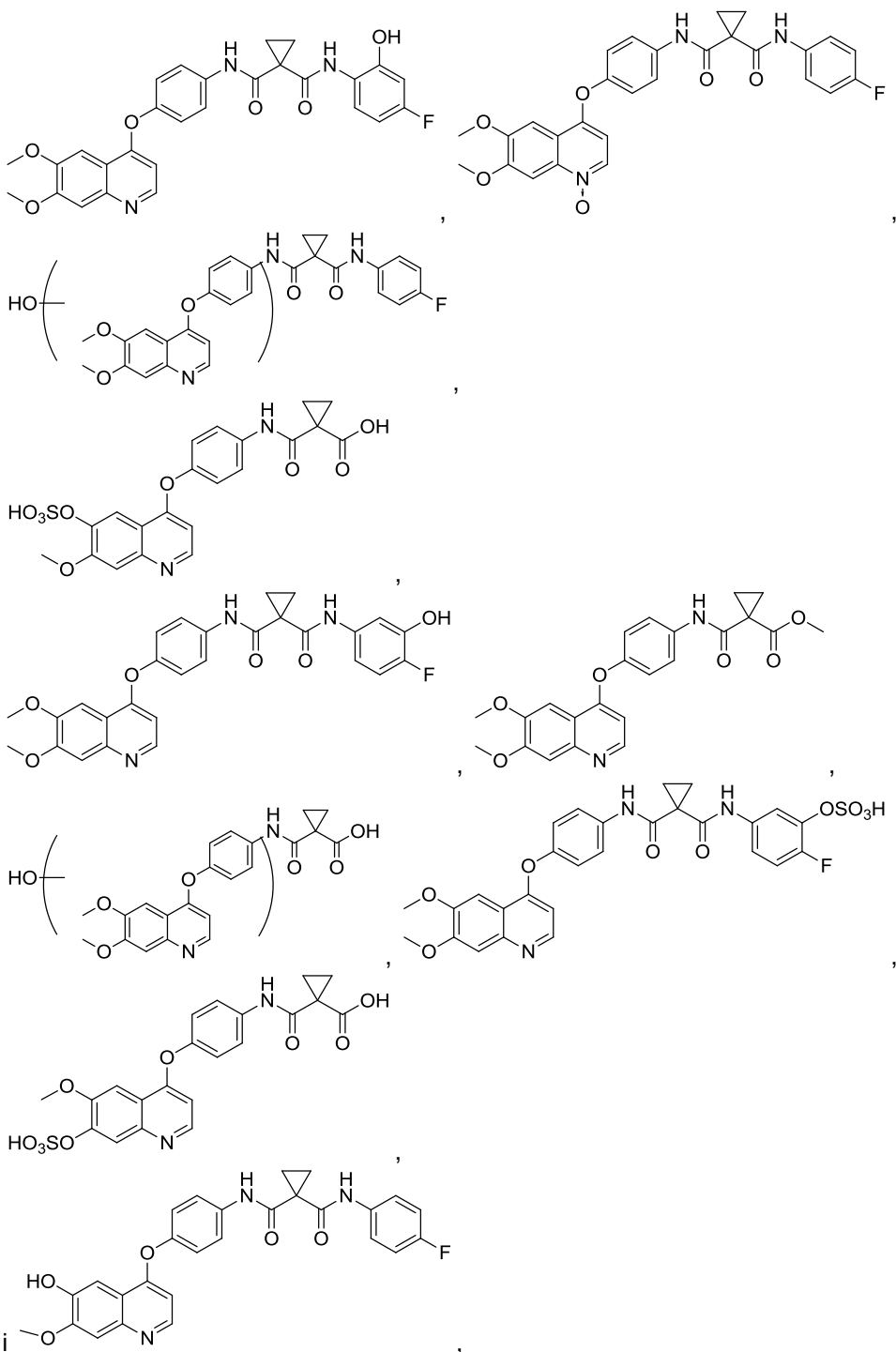
або їхню фармацевтично прийнятну сіль і щонайменше один фармацевтично прийнятний носій.

10 14. Композиція за п. 13, яка є прийнятною для перорального введення.

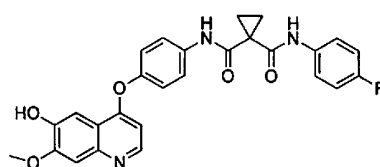
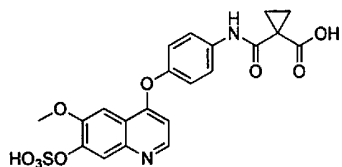
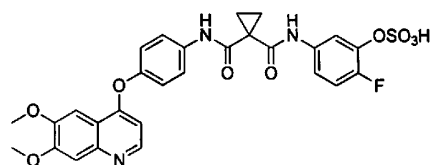
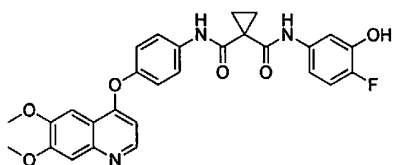
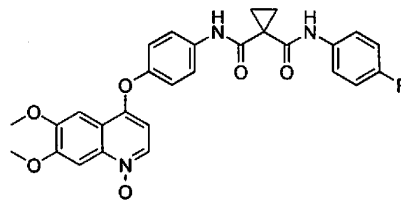
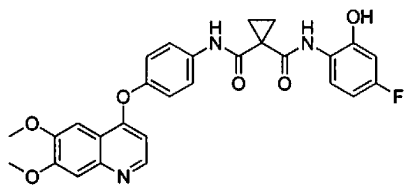
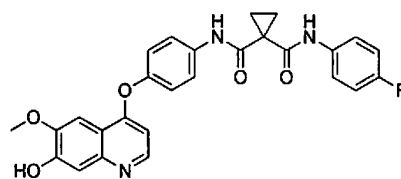
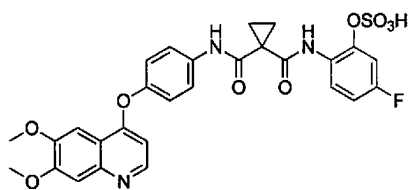
15. Сполука, вибрана з:







де GA являє собою фрагмент глюкуронової кислоти, або її фармацевтично прийнятна сіль.  
16. Сполука за п. 15, вибрана з:



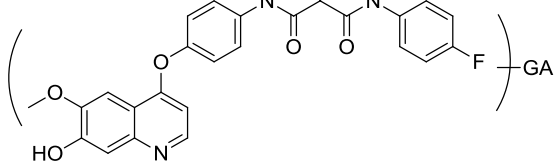
або її фармацевтично прийнятна сіль.

17. Спосіб ідентифікації метаболіту кабозантинібу, який включає:

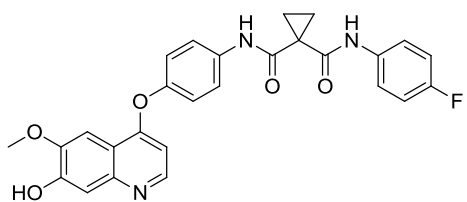
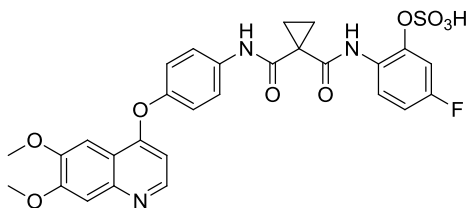
5 введення кабозантинібу ссавцю;

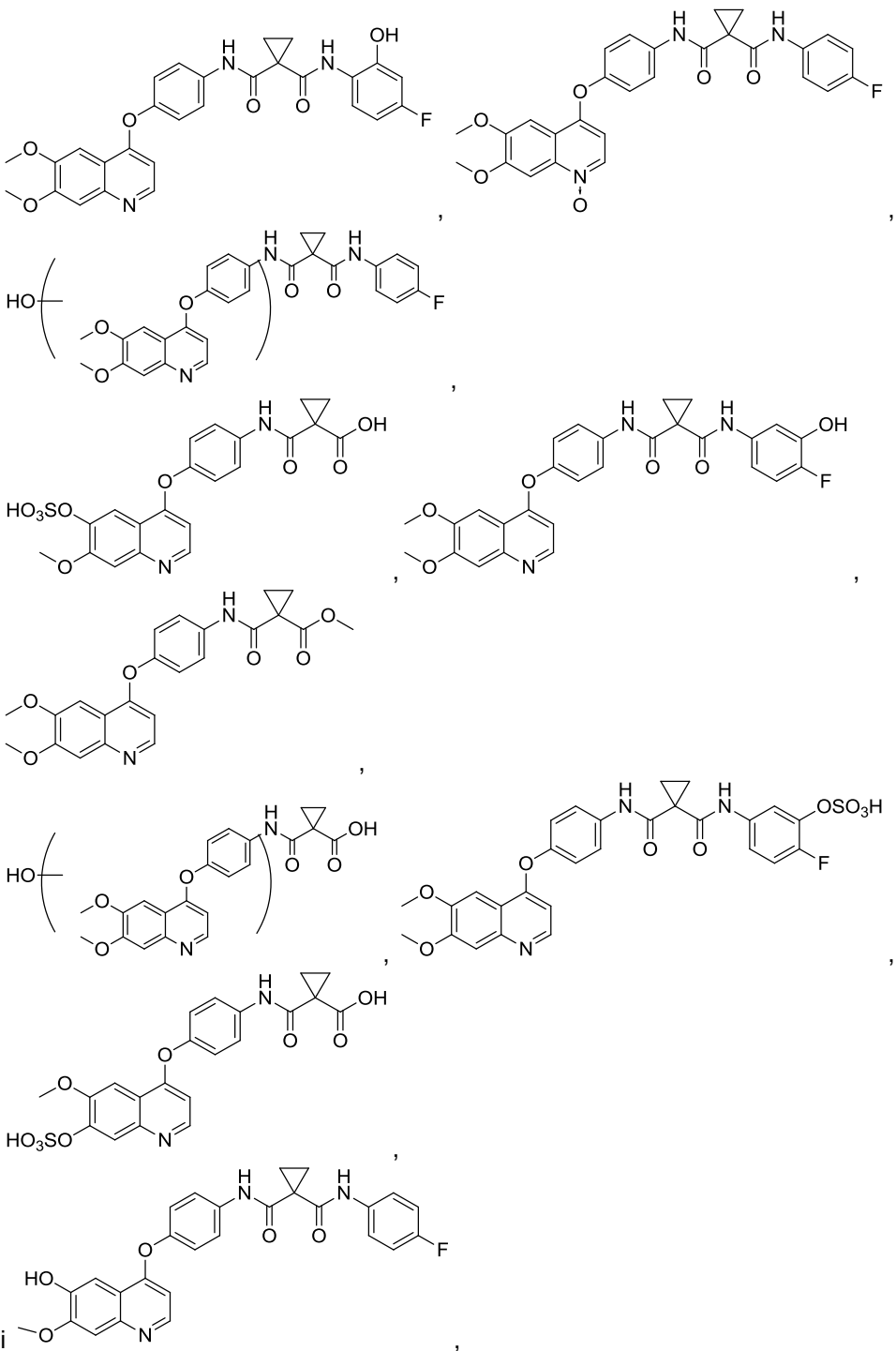
виявлення або вимірювання рівня або концентрації метаболіту N-(4-{{6,7-біс(метилокси)хінолін-4-іл}окси}феніл)-N'-(4-фторфеніл)циклопропан-1,1-дикарбоксаміду у ссавця в тканинах або зразку біологічних рідин ссавця;

який характеризується тим, що метаболіт вибраний з групи, яка складається з:



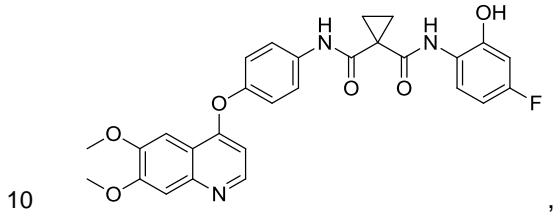
10

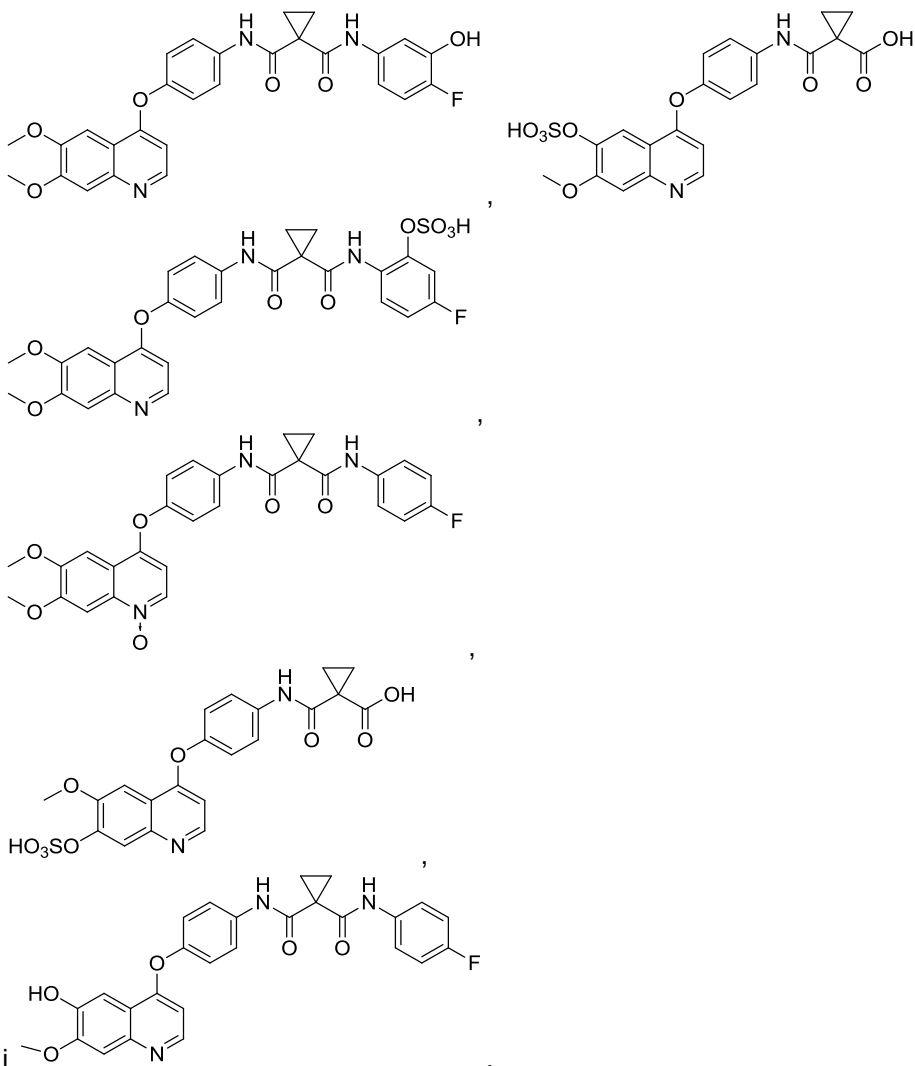




де GA являє собою фрагмент глюкуронової кислоти.

18. Спосіб за п. 17, який характеризується тим, що метаболіт вибраний з:





5

19. Спосіб за п. 17, який **відрізняється** тим, що біологічні рідини вибрані з групи, яка складається з плазми, жовчі, сечі і калу.

Комп'ютерна верстка С. Чулій

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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