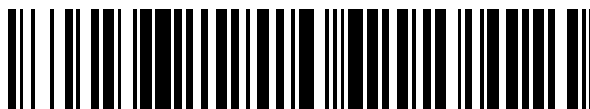


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 626**

51 Int. Cl.:

C07D 215/22 (2006.01)
C07C 305/24 (2006.01)
C07C 233/60 (2006.01)
A61K 31/47 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07D 215/60 (2006.01)
G01N 33/487 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2014** **PCT/US2014/030524**
87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014** **WO14145715**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2014** **E 14721149 (4)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019** **EP 2970126**

54 Título: **Metabolitos de N-(4-[[6,7-bis(metiloxi)quinolin-4-il]oxi]fenil)-N'-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361792413 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.11.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

AFTAB, DANA, T.;
NAGANATHAN, SRIRAM;
XU, WEI;
LACY, STEVEN y
NGUYEN, LINH

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 729 626 T3

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

DESCRIPCIÓN

Metabolitos de N-(4-[[6,7-bis(metiloxi)quinolin-4-il]oxi]fenil)-N'-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida

5 **Campo técnico**

[0001] Esta descripción se refiere a metabolitos de N-(4-[[6,7-bis(metiloxi)quinolin-4-il]oxi]fenil)-N'-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida, un inhibidor de c-Met.

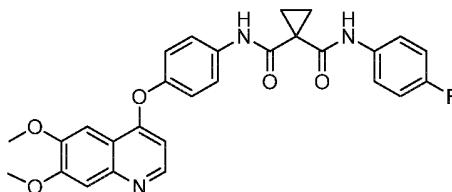
10 **Antecedentes**

[0002] Tradicionalmente, las mejoras espectaculares en el tratamiento del cáncer están asociadas con la identificación de agentes terapéuticos que actúan a través de mecanismos novedosos. Un mecanismo que puede ser explotado en el tratamiento del cáncer es la modulación de la actividad de proteína quinasa porque la transducción de señales a través de la activación de la proteína quinasa es responsable de muchas de las características de las células tumorales. La transducción de señales de proteína quinasa es de particular relevancia en, por ejemplo, cánceres de tiroides, gástrico, de cabeza y cuello, pulmón, mama, próstata y colorrectal, así como en el crecimiento y proliferación de células tumorales cerebrales.

[0003] Las proteínas quinasas se pueden clasificar como de tipo receptor o de tipo no receptor. Las tirosina quinasas de tipo receptor se componen de un gran número de receptores transmembrana con diversa actividad biológica. Para una discusión detallada de las tirosina quinasas de tipo receptor, véase Plowman et al, DN & P 7 (6): 334-339, 1994. Dado que las proteínas quinasas y sus ligandos juegan papeles críticos en diversas actividades celulares, la desregulación de la actividad enzimática de las proteínas quinasas puede conducir a propiedades celulares alteradas, tales como el crecimiento celular no controlado asociado con el cáncer. Además de las indicaciones oncológicas, la señalización de quinasa alterada está implicada en numerosas otras enfermedades patológicas, incluyendo, por ejemplo, trastornos inmunológicos, enfermedades cardiovasculares, enfermedades inflamatorias y enfermedades degenerativas. Por lo tanto, las proteínas quinasas son dianas atractivas para el descubrimiento de fármacos de molécula pequeña. Las dianas particularmente atractivas para la modulación de molécula pequeña con respecto a la actividad antiangiogénica y antiproliferativa incluyen los receptores de tirosina quinasa de tipo Ret, c-Met, y VEGFR2.

[0004] La quinasa c-Met es el miembro prototípico de una subfamilia de receptores de tirosina quinasas heterodiméricos (RTK), que incluyen Met, Ron y Sea. El ligando endógeno para c-Met es el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), un potente inductor de la angiogénesis. La unión de HGF a c-Met induce la activación del receptor a través de la autofosforilación que resulta en un aumento de la señalización dependiente del receptor, que promueve el crecimiento celular y la invasión. Los anticuerpos anti-HGF o antagonistas de HGF han demostrado que inhiben la metástasis tumoral in vivo (ver Maulik et al, Cytokine & Growth Factor Reviews, 2002, 13, 41-59). Se ha demostrado la sobreexpresión de c-Met, VEGFR2 y/o Ret en una amplia variedad de tipos de tumores, incluyendo de mama, colon, renal, pulmón, leucemia mieloide de células escamosas, hemangiomas, melanomas y tumor astrocítico (que incluye glioblastoma, glioblastoma de células gigantes, gliosarcoma y glioblastoma con componentes oligodendrogiales). La proteína Ret es un receptor transmembrana con actividad de tirosina quinasa. Ret está mutado en la mayoría de las formas familiares de cáncer medular de tiroides. Estas mutaciones activan la función quinasa de Ret y la convierten en una forma oncogénica.

[0005] Por consiguiente, los compuestos de molécula pequeña que inhiben, regulan y/o modulan específicamente la transducción de señales de quinasas, particularmente incluyendo Ret, c-Met, y VEGFR2 descritos anteriormente, son particularmente deseables como medio para tratar o prevenir estados de enfermedad asociados con la proliferación celular anormal y la angiogénesis. Una de dichas moléculas pequeñas es XL184, conocida también como N-(4-[[6,7-bis(metiloxi)quinolin-4-il]oxi]fenil)-N'-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida y por el nombre cabozantinib (COMETRIQ™), que es la sal L-malato de cabozantinib. Cabozantinib tiene la estructura química:



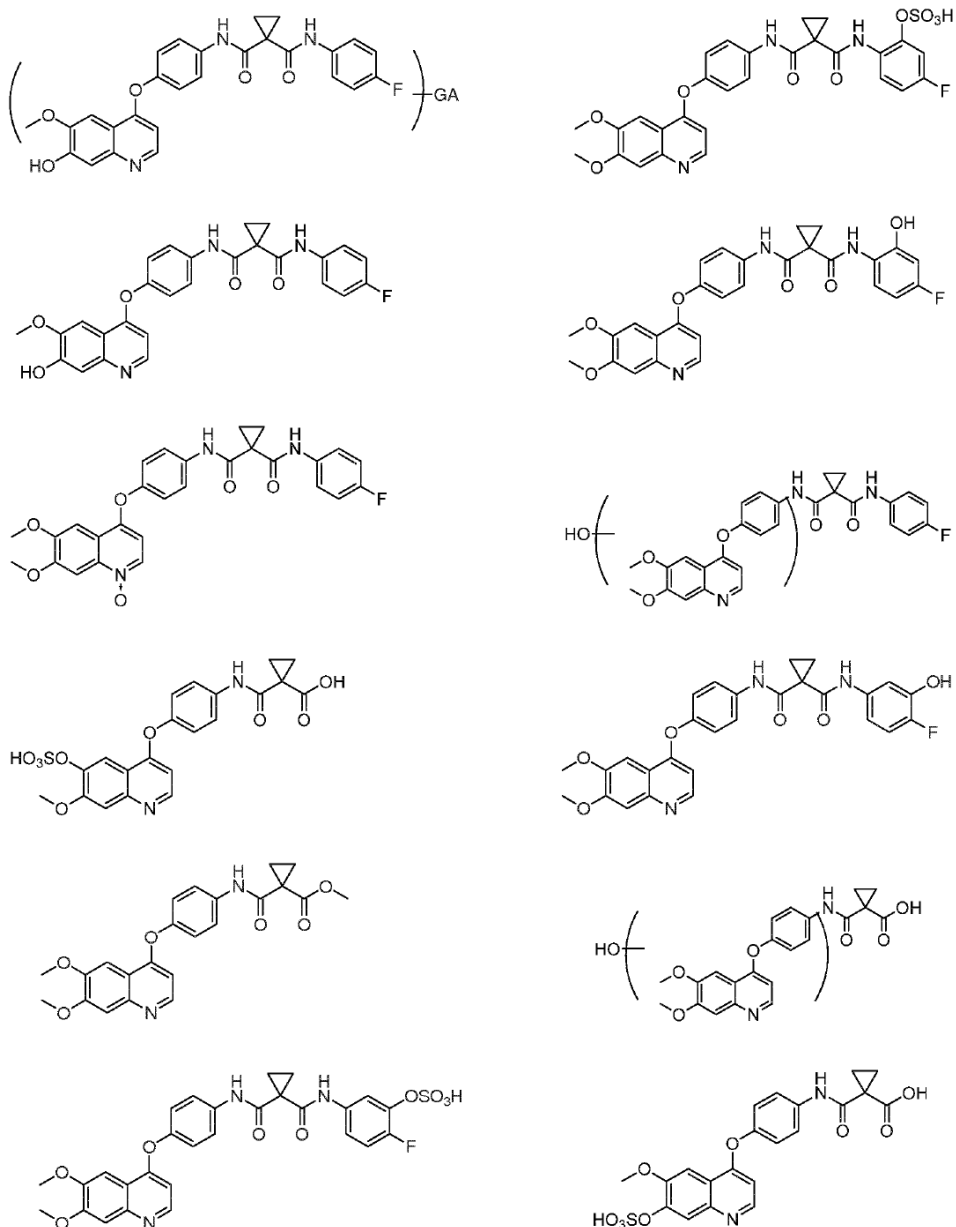
En noviembre de 2012, cabozantinib logró la aprobación regulatoria en los Estados Unidos para el tratamiento del cáncer medular de tiroides metastásico progresivo. Otros ensayos clínicos de cabozantinib están en curso.

[0006] El documento WO 2005/030140 describe la síntesis de cabozantinib (Ejemplo 48) y también da a conocer la actividad terapéutica de esta molécula para inhibir, regular y/o modular la transducción de señales de quinasas, (ensayos, la Tabla 4, entrada 289). El ejemplo 48 está en el párrafo [0353] en el documento WO 2005/030140.

[0007] Sigue habiendo una necesidad para identificar compuestos que exhiban un perfil de actividad similar a cabozantinib.

5 Características de la invención

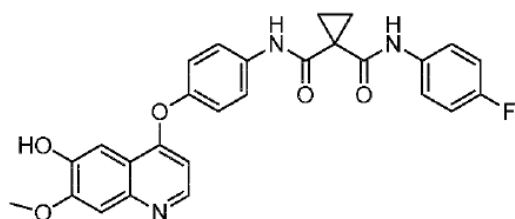
[0008] Estas y otras necesidades se satisfacen mediante la presente invención, que se dirige a los metabolitos de cabozantinib, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, que son los compuestos seleccionados de:



y

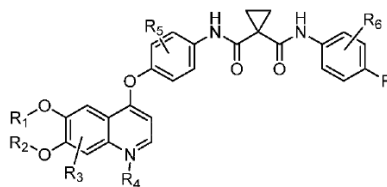
10

15



en el que GA es un resto de ácido glucurónico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0009] De manera más general, se describe en el presente documento un metabolito que es un compuesto de fórmula Ia

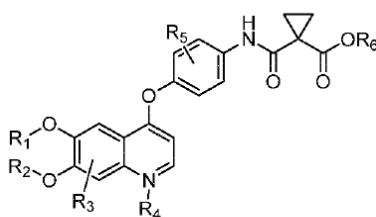


Ia

que tiene uno o más de los siguientes atributos:

- a) uno de R₁ o R₂ es H, SO₃H, o un resto de ácido glucurónico, y el otro es Me;
- b) R₃ es OH u OSO₃H;
- c) R₄ es O⁻, siempre que cuando R₄ es O⁻, N es N⁺;
- d) R₅ es OH u OSO₃H; y
- e) R₆ es OH u OSO₃H.

[0010] También se describe en el presente documento de forma más general un metabolito que es un compuesto de fórmula Ib

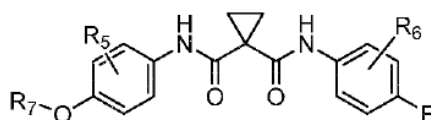


Ib

en el que:

- a) R₁ o R₂ son Me; o uno de R₁ o R₂ es H, SO₃H, o un resto de ácido glucurónico, y el otro es Me;
- b) R₃ es H, OH u OSO₃H;
- c) R₄ está ausente o es O⁻, siempre que cuando R₄ es O⁻, N es N⁺; y
- d) R₆ es H o Me.

[0011] También se describe en el presente documento de forma más general un metabolito que es un compuesto de fórmula Ic:

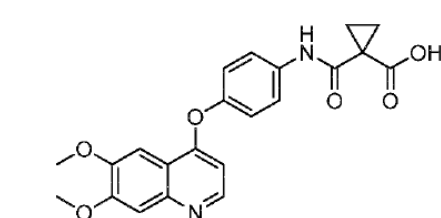
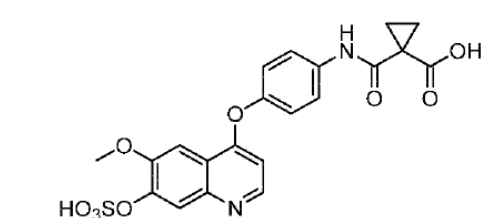
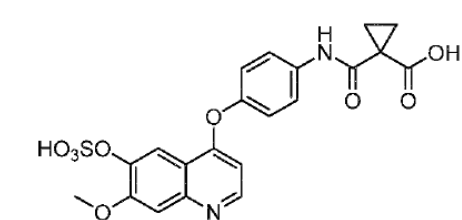
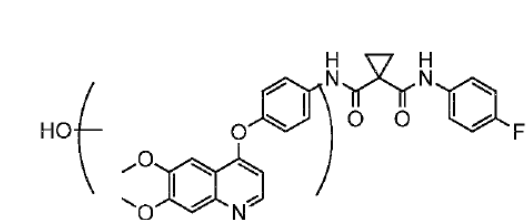
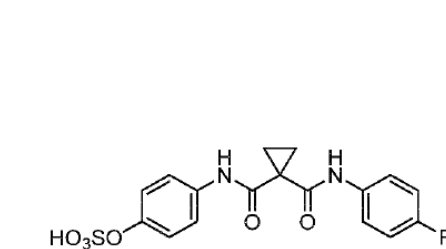
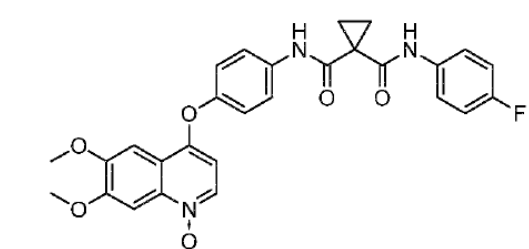
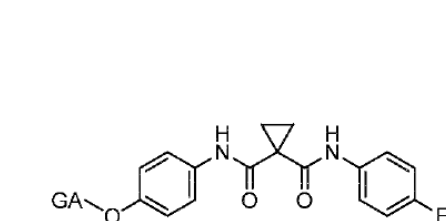
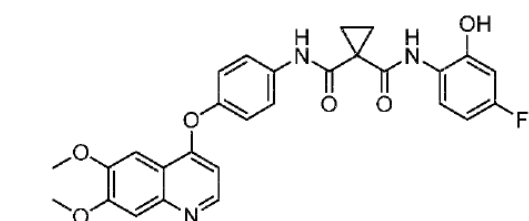
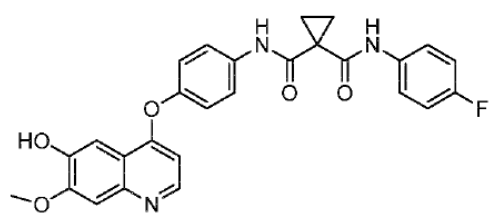
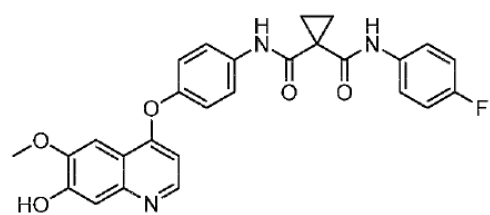
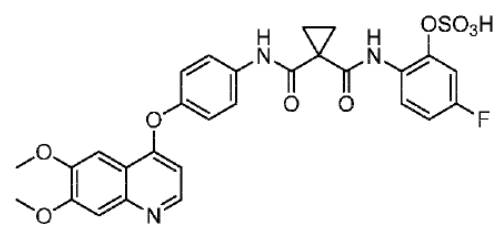
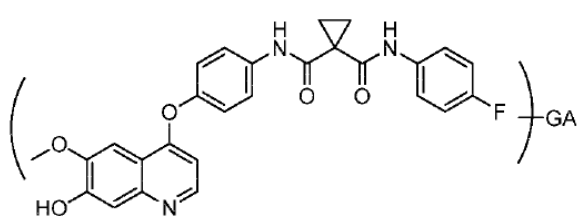


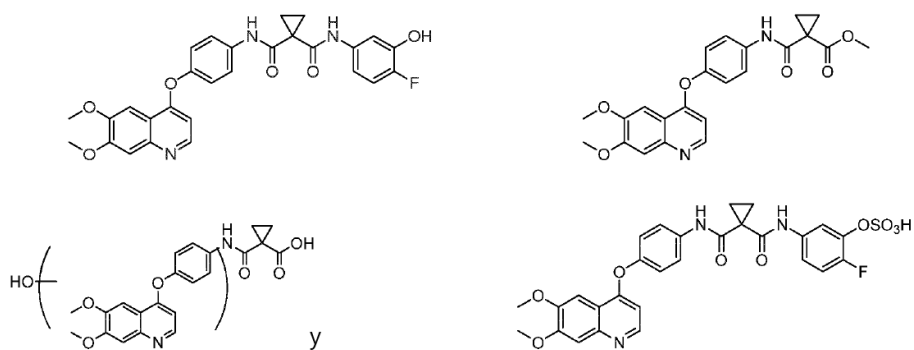
Ic

- a) R₅ es OH u OSO₃H; y
- b) R₆ es OH u OSO₃H; y
- c) R₇ es H, SO₃H, o un resto de ácido glucurónico.

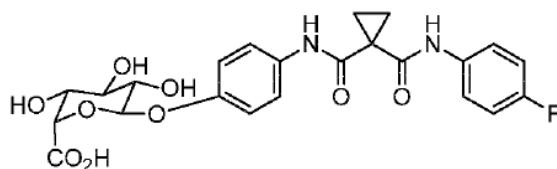
[0012] En un aspecto, la descripción se refiere a un metabolito aislado de cabozantinib que tiene la fórmula Ia, Ib, o Ic.

[0013] En un ejemplo, el metabolito de cabozantinib descrito en este documento se selecciona entre:

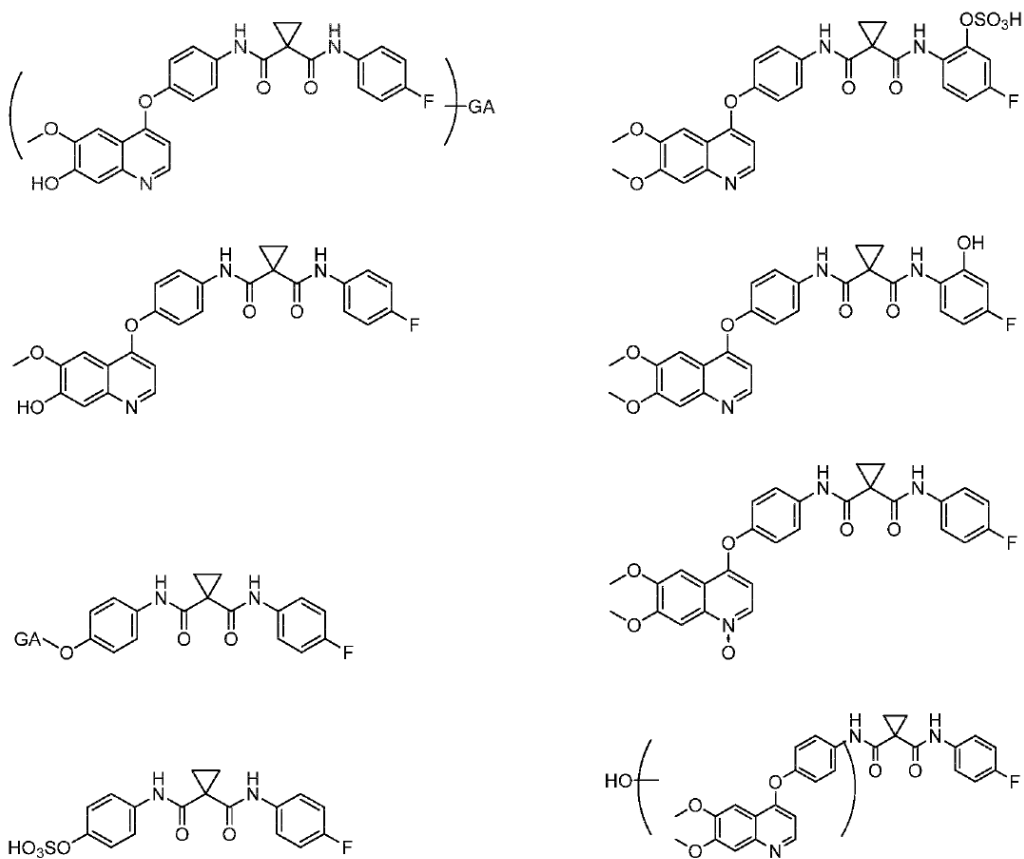




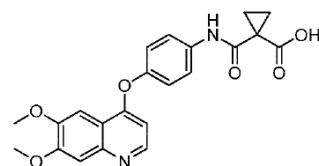
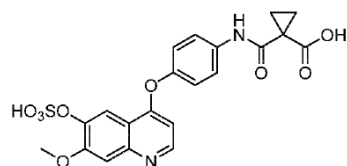
en la que GA es un resto de ácido glucurónico tal como en, por ejemplo,



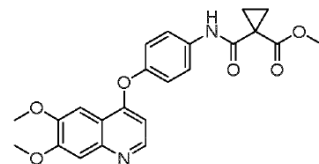
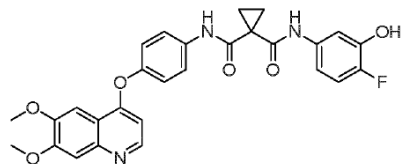
[0014] También se describe en el presente documento un compuesto que se selecciona entre:



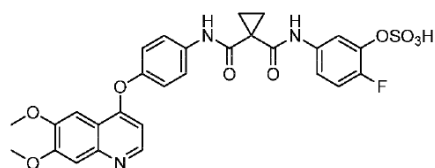
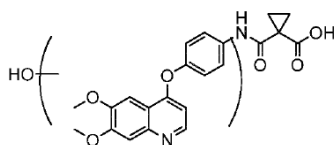
5



10

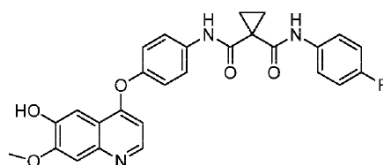
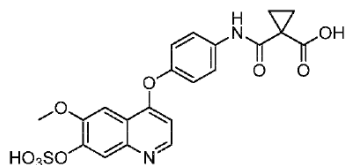


15



20

25



30

y

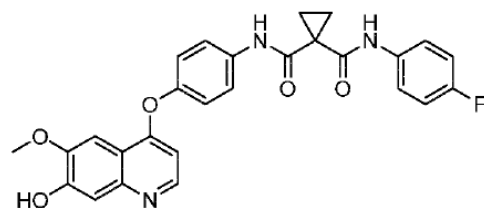
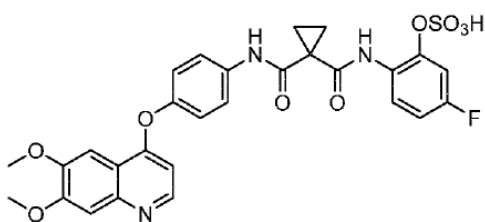
,

en la que GA es un resto de ácido glucurónico.

35

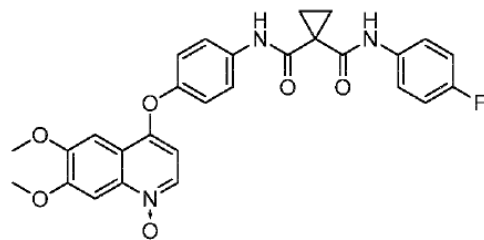
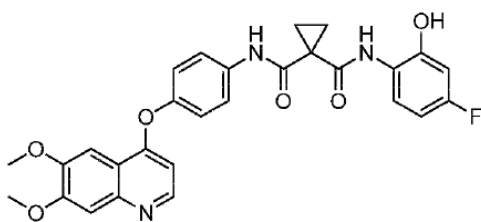
[0015] En otro aspecto, la descripción se dirige a un procedimiento de tratamiento de enfermedades o trastornos asociados con actividades celulares no controladas, anormales y/o no deseadas, comprendiendo dicho procedimiento administrar, a un mamífero en necesidad del mismo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que es un metabolito de la cabozantinib. En un ejemplo, el metabolito se selecciona entre:

40



45

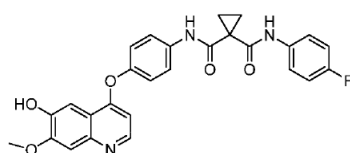
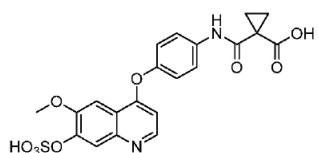
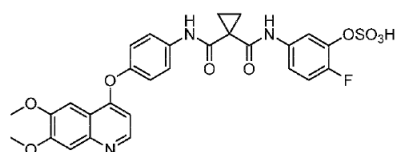
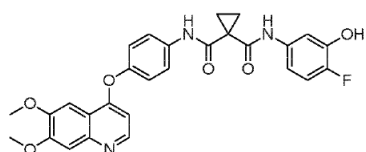
50



55

60

65

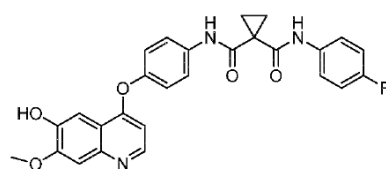
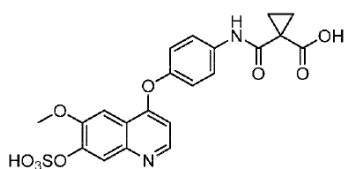
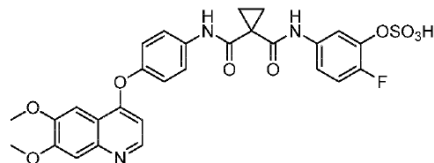
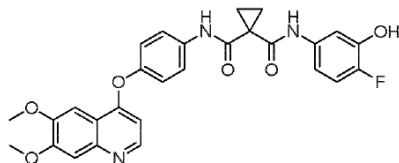
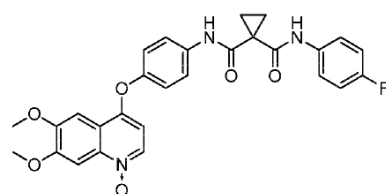
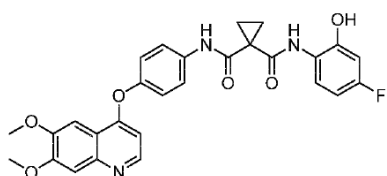
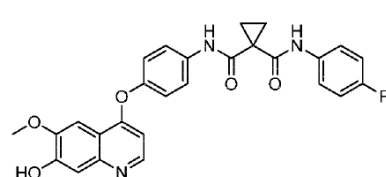
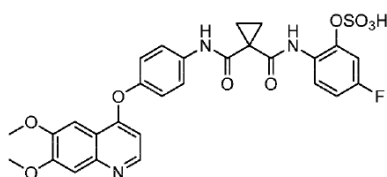


y

,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0016] En otro aspecto, la invención está dirigida a una composición farmacéutica que comprende un metabolito de cabozantinib que es un compuesto seleccionado de:



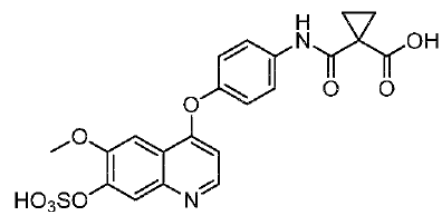
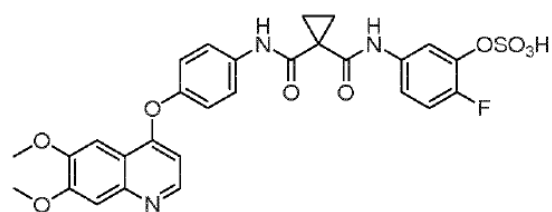
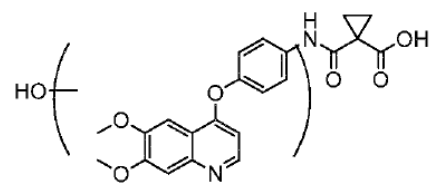
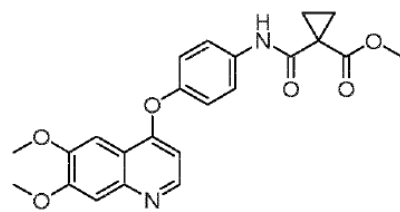
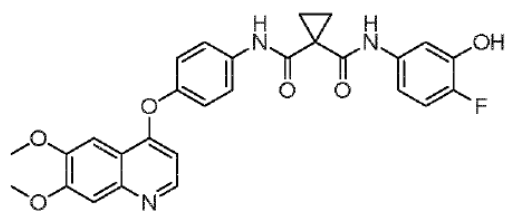
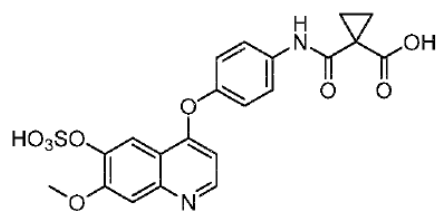
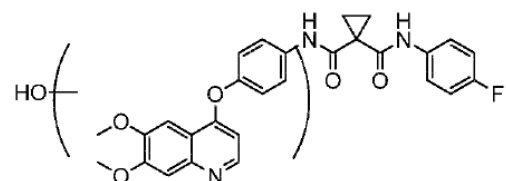
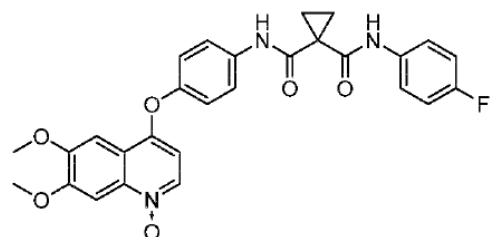
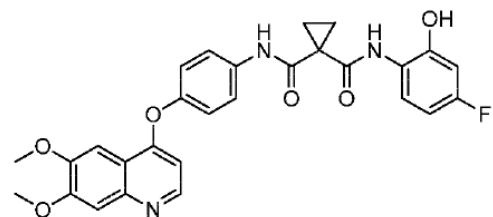
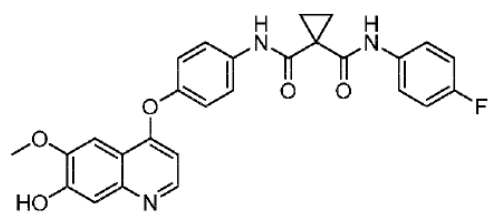
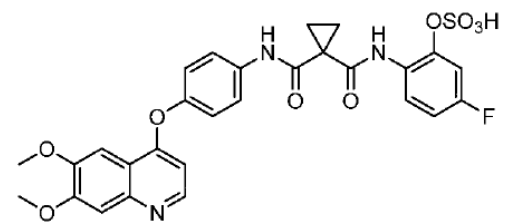
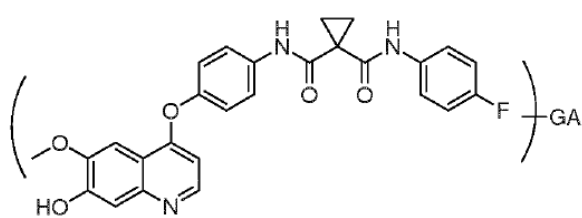
y

,

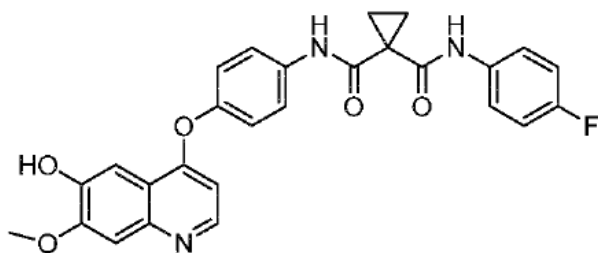
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

[0017] En otro aspecto, la invención está dirigida a un procedimiento para identificar un metabolito de cabozantinib, que comprende:
detectar o medir un nivel o concentración de un metabolito de la N-(4-[[6,7-bis(metilo)quinolin-4-il]oxi]fenil)-N'-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida en una muestra de tejido o fluido corporal de un mamífero al que se ha administrado cabozantinib;

en el que el metabolito se selecciona entre entre el grupo que consiste en:

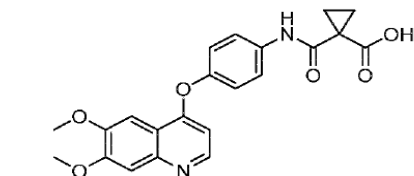
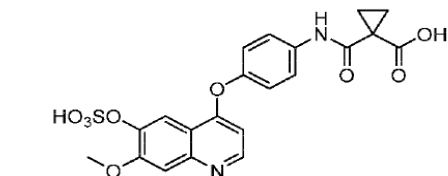
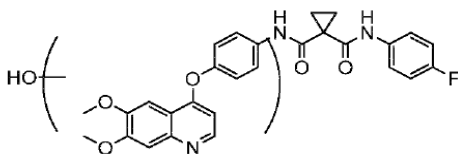
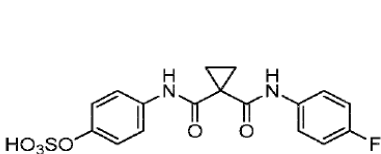
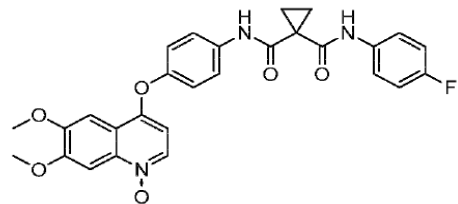
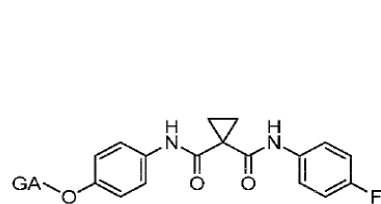
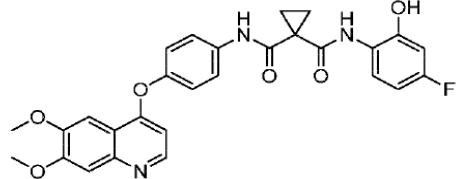
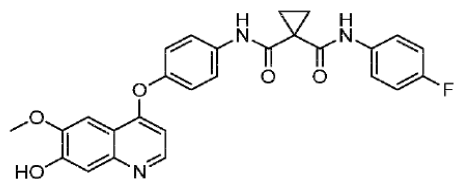
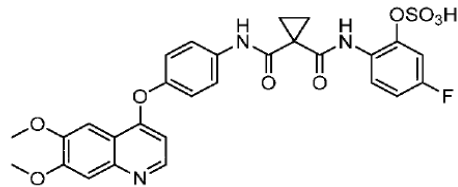
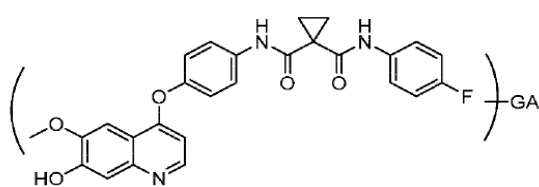


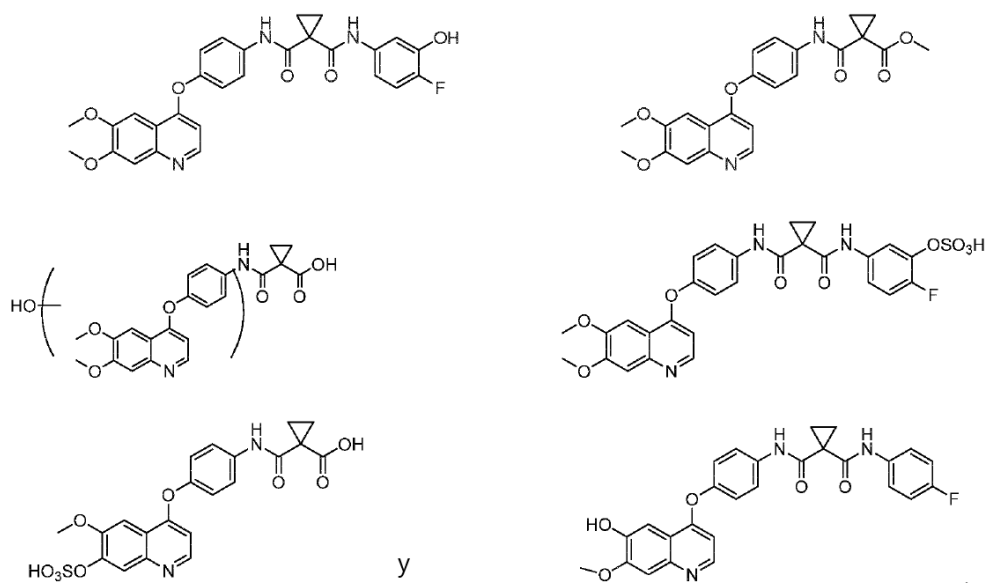
y



en la que GA es un resto de ácido glucurónico

[0018] De manera más general, en el presente documento se describe un procedimiento para identificar un metabolito de cabozantinib, que comprende:
 administrar cabozantinib a un mamífero;
 detectar o medir un nivel o concentración de un metabolito de cabozantinib en un mamífero en los tejidos o fluidos corporales del mamífero;
 en el que el metabolito se selecciona del grupo que consiste en:





en la que GA es un resto de ácido glucurónico.

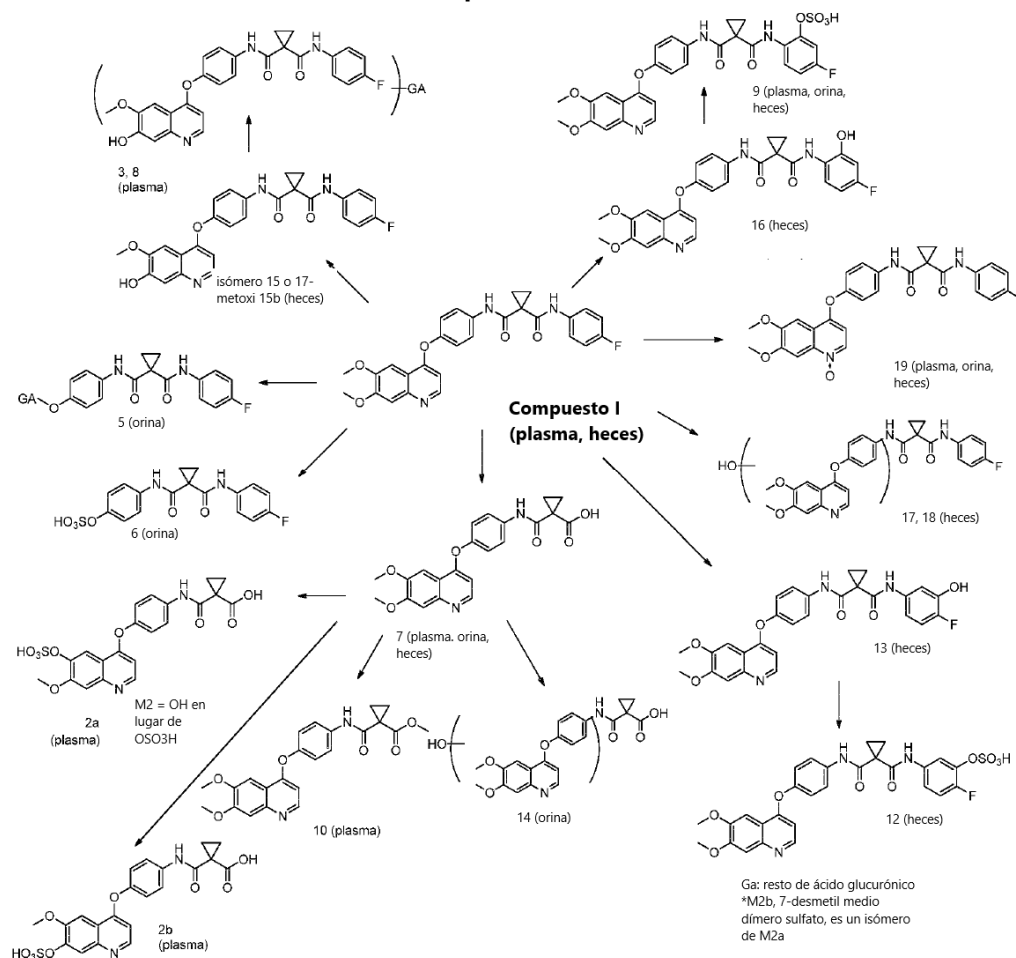
[0019] Los compuestos pueden utilizarse adicionalmente en otros procedimientos; por ejemplo, en procedimientos de bioensayo para determinar la actividad inhibidora de quinasa de los compuestos de ensayo o como patrones internos en procedimientos relacionados.

Descripción detallada de la invención

[0020] En un aspecto, la presente invención se refiere a metabolitos de cabozantinib, en particular metabolitos humanos. Por lo tanto, los metabolitos pueden ser referidos en lo sucesivo como "metabolitos humanos". Los metabolitos humanos de cabozantinib incluyen metabolitos de cabozantinib que se formaron en los cuerpos de los sujetos humanos después de la ingestión o aplicación de cabozantinib de acuerdo con los protocolos clínicos en relación con la dosificación y el seguimiento, incluyendo los descritos en el presente documento. En varios casos, el término abarca especies moleculares formadas in vivo, tanto si la especie es incluso o no detectada o analizada en un ensayo particular. También se contempla que algunos metabolitos son únicos para individuos particulares, reflejando diferente composición genética y la presencia y la actividad de diversas enzimas, incluyendo citocromo P450 y enzimas UGT, que están implicadas en el metabolismo. Por lo tanto, los metabolitos humanos abarcan todos los dichos metabolitos formados en el cuerpo humano.

[0021] Algunos metabolitos humanos se representan en el Esquema 1. Se identificaron estos metabolitos humanos durante los estudios clínicos de cabozantinib, que aparece como compuesto I en el Esquema 1, mediante perfiles metabólicos, en particular de plasma humano, orina y heces.

Esquema 1

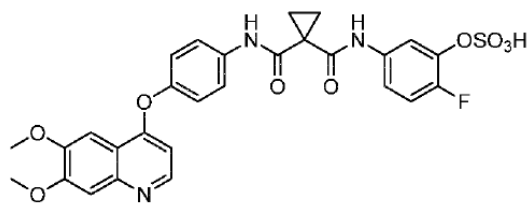
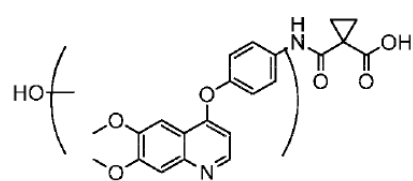
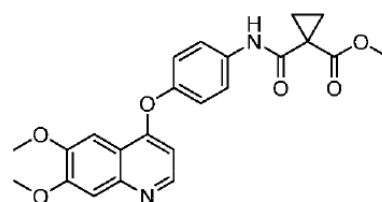
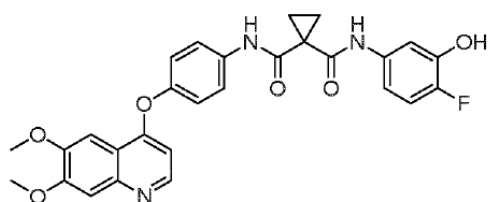
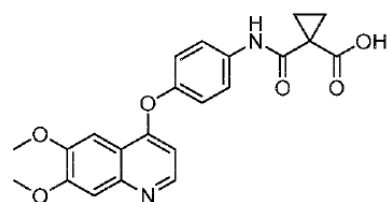
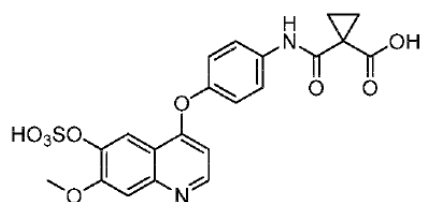
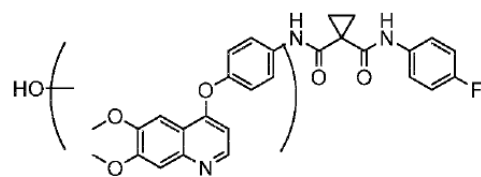
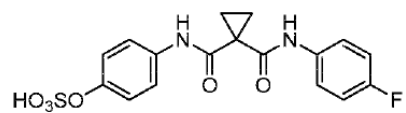
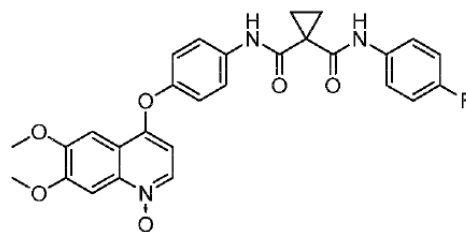
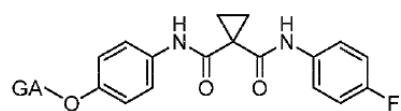
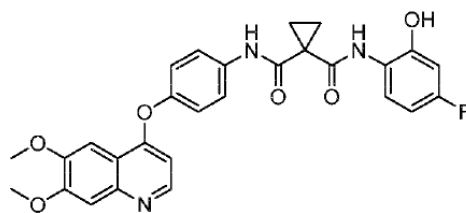
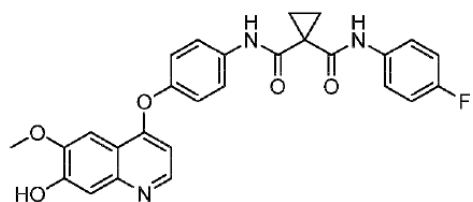
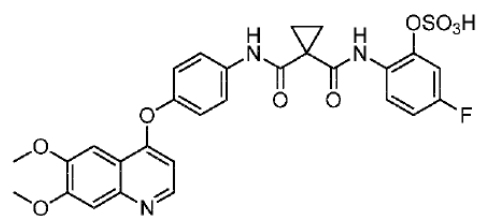
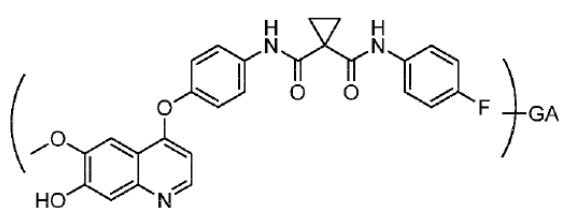


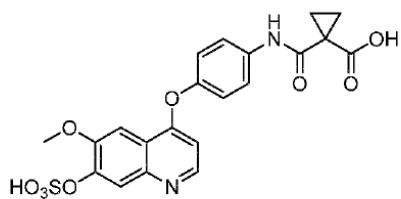
[0022] En varios casos, los metabolitos de cabozantinib, incluyendo los representados en el Esquema 1, se aíslan de tejidos y fluidos corporales, y/o se preparan sintéticamente de acuerdo con procedimientos disponibles para el experto en la materia. Puede llevarse a cabo una variedad de procesos de separación sobre muestras de tejido y de fluidos para proporcionar muestras para su posterior análisis, tales como resonancia magnética nuclear, cromatografía de gases (CG), cromatografía líquida (CL) y espectrometría de masas. En estas muestras, los metabolitos están contenidos en composiciones que carecen esencialmente de la presencia de cualquiera de los otros metabolitos. La presencia de los metabolitos se puede cuantificar mediante procedimientos físicos, tales como la medición de la desintegración nuclear de los isótopos radiactivos, la medición del índice de refracción, la ionización de llama, la ionización y la deflexión en campos magnéticos, ultravioleta (absorción UV), y similares.

[0023] En varios casos, los metabolitos humanos se proporcionan en formas cristalinas o en solución que tienen considerables grados de pureza. Están disponibles rutas sintéticas orgánicas para preparar los compuestos en forma pura relativa, por ejemplo, en purezas del 80 por ciento o superior, 90 por ciento o superior, 95 por ciento o superior, o 99 por ciento o superior. La recristalización y otros procedimientos de purificación pueden llevarse a cabo para proporcionar compuestos que son esencialmente 100 por ciento puros. Tales procedimientos de síntesis y técnicas de purificación son conocidas en la técnica.

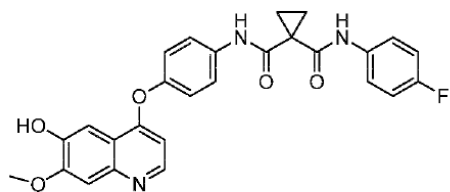
[0024] En varios casos, los metabolitos se proporcionan en forma sustancialmente pura. "Sustancialmente pura" significa que los metabolitos son suficientes puros para la aprobación de la FDA y esencialmente no contienen contaminantes u otros materiales. Alternativamente, "sustancialmente pura" significa un nivel de impureza que no afecta adversamente o inaceptablemente las propiedades de los compuestos con respecto a la seguridad, la eficacia, estabilidad y otras propiedades deseables.

[0025] En un ejemplo, en el presente documento se describen metabolitos aislados tal como se representan en el Esquema 1. En este y otros casos, el metabolito se selecciona entre:



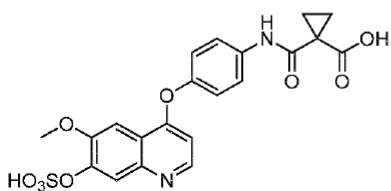
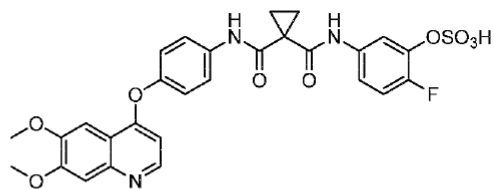
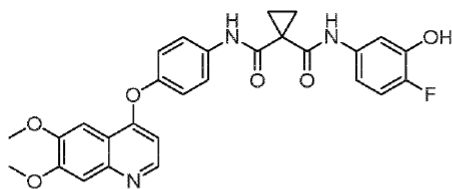
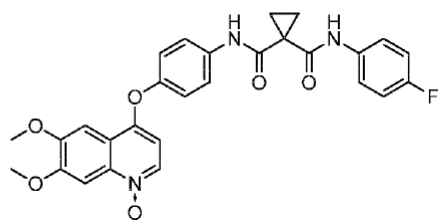
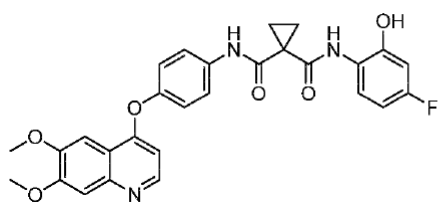
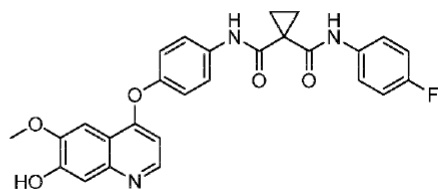
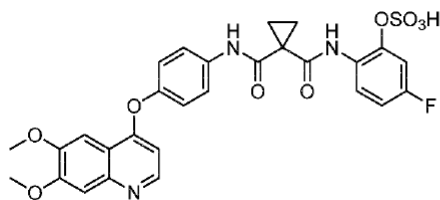


y

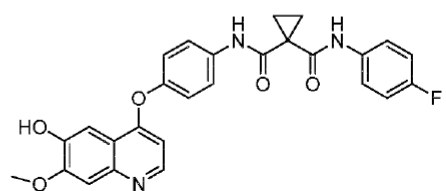


en la que GA es un resto de ácido glucurónico.

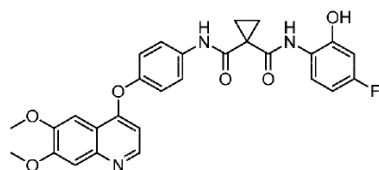
[0026] Más particularmente, el metabolito se selecciona entre:



y

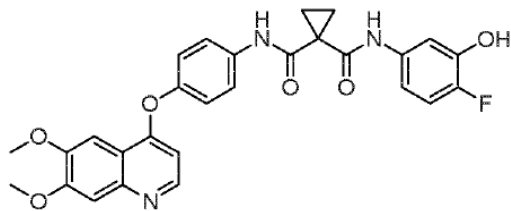


[0027] En una realización particular, el metabolito aislado es



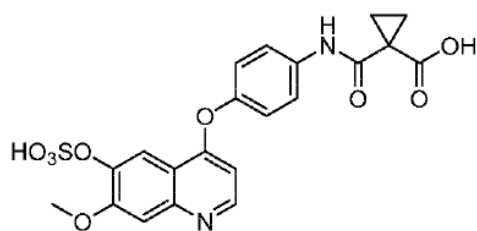
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0028] En otra realización particular, el metabolito aislado es



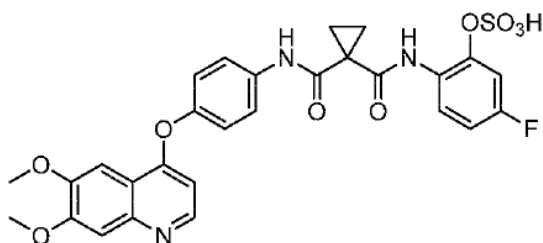
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0029] En otra realización particular, el metabolito aislado es



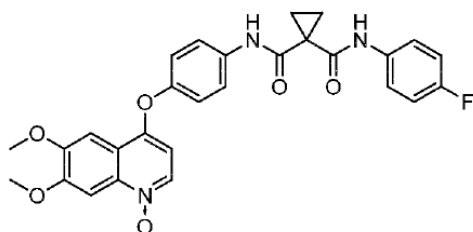
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0030] En otra realización particular, el metabolito aislado es



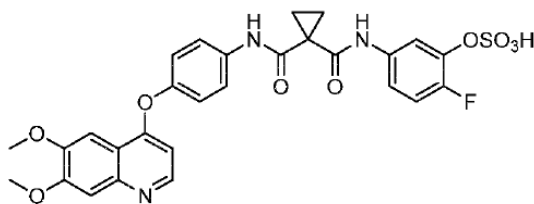
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0031] En otra realización particular, el metabolito aislado es



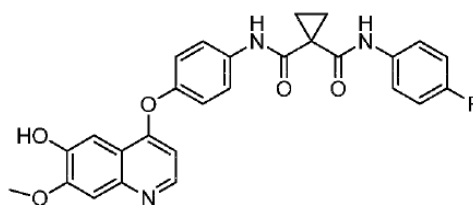
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0032] En otra realización particular, el metabolito aislado es



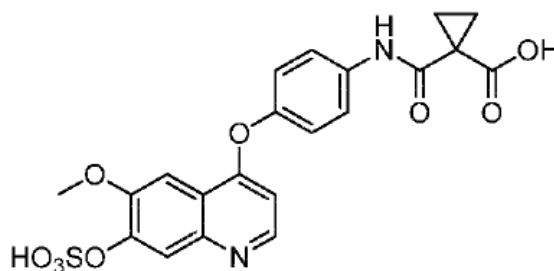
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0033] En otra realización particular, el metabolito aislado es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0034] En otra realización particular, el metabolito aislado es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

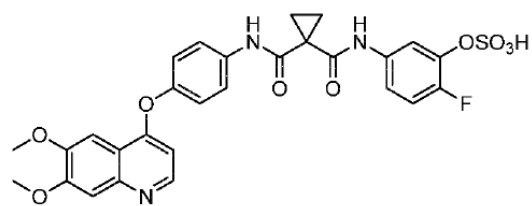
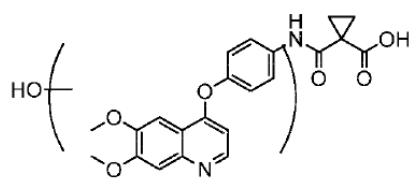
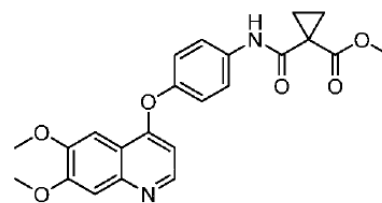
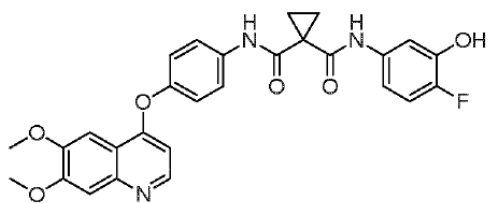
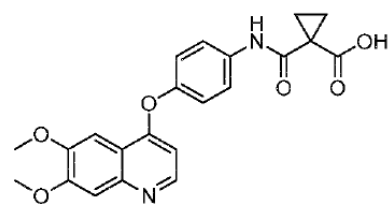
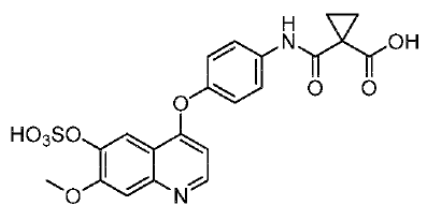
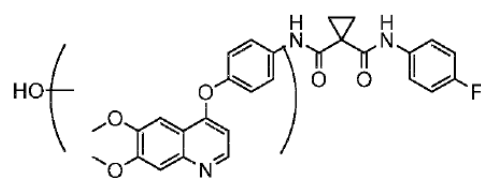
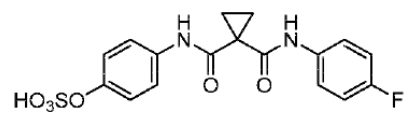
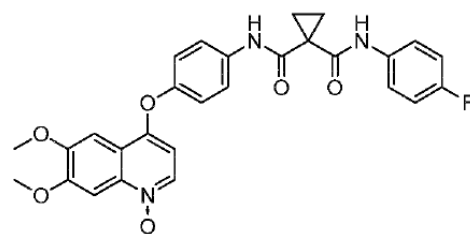
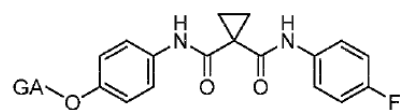
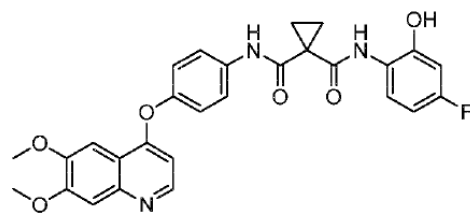
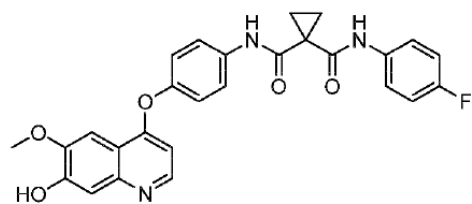
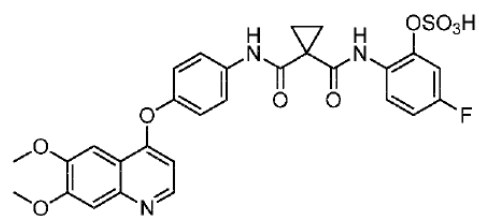
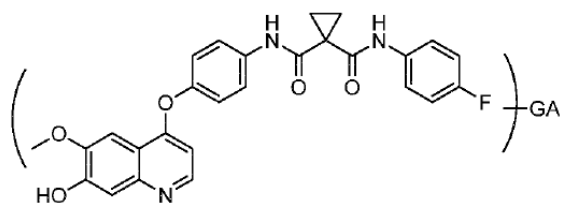
[0035] Los procedimientos descritos en este documento incluyen administrar cabozantinib o un metabolito de cabozantinib a un mamífero, tal como un ser humano, y detectar metabolitos midiendo el nivel de concentración de uno de los metabolitos en los tejidos o fluidos corporales del mamífero. Los fluidos corporales incluyen, sin limitación, plasma sanguíneo, bilis, orina y heces, mientras que los tejidos incluyen, sin limitación, microsomas del hígado, hepatocitos e hígados perfundidos. En varios casos, los metabolitos se marcan isotópicamente con varios isótopos para ayudar en la detección o cuantificación de los metabolitos en los tejidos o fluidos corporales. Por lo tanto, los metabolitos incluyen los que se marcan con ^{14}C o ^3H (tritio) con el propósito de detección o identificación de metabolitos particulares de sus productos de desintegración nuclear. Los metabolitos también incluyen metabolitos marcados con ^{13}C o ^2H (deuterio) para facilitar el análisis por resonancia magnética nuclear y/o análisis por espectrometría de masas de los compuestos. Como se usa en el presente documento, deuterado significa sustituido por deuterio y tritado significa sustituido con tritio. En varios otros casos, los metabolitos descritos en el presente documento, tal como se representan en el Esquema 1, también incluyen sus sales, tautómeros, y variantes marcadas isotópicamente (incluyendo ^{14}C , ^{13}C , ^3H o ^2H).

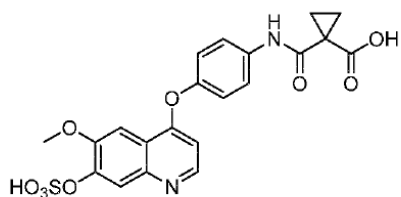
[0036] Más específicamente, en un ejemplo, la descripción proporciona un procedimiento para identificar un metabolito de cabozantinib, que comprende:

administrar cabozantinib a un mamífero;

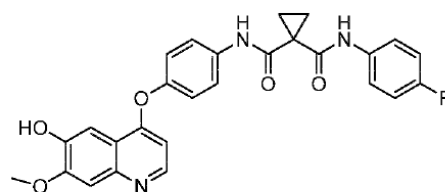
detectar o medir un nivel o concentración de un metabolito de cabozantinib en un mamífero en los tejidos o fluidos corporales del mamífero;

en el que el metabolito se selecciona del grupo que consiste en:





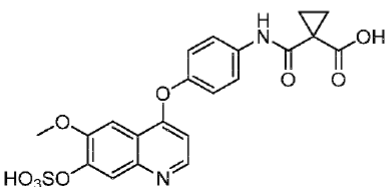
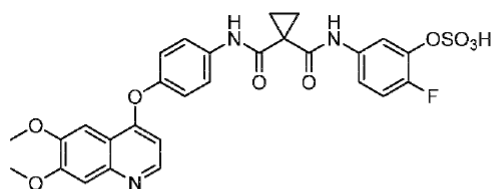
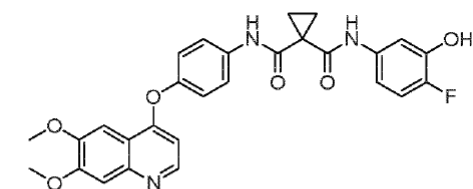
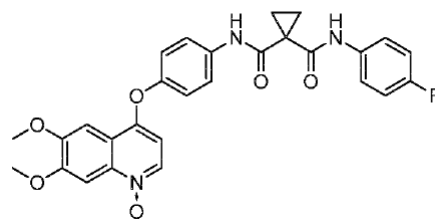
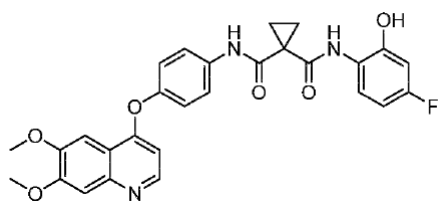
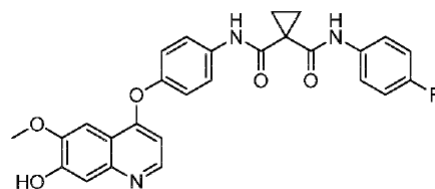
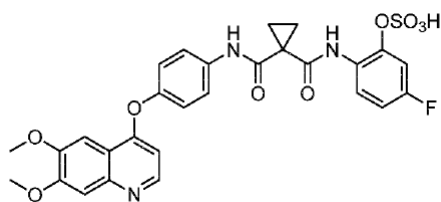
y



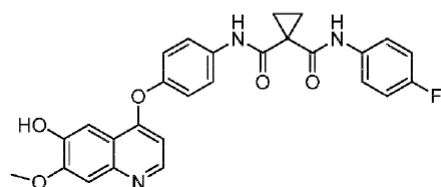
,

en la que GA es un resto de ácido glucurónico. En el procedimiento, los fluidos corporales se seleccionan del grupo que consiste en plasma, bilis, orina y heces. En estos y otros procedimientos, los metabolitos se identifican utilizando técnicas analíticas convencionales, incluyendo marcaje isotópico y HPLC/MS.

[0037] Más específicamente, el metabolito se selecciona entre:

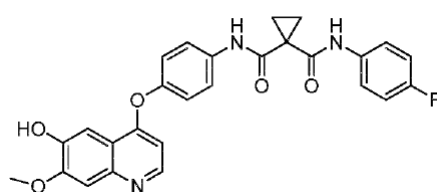
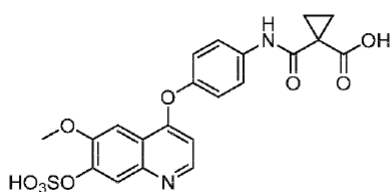
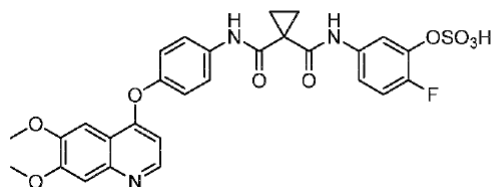
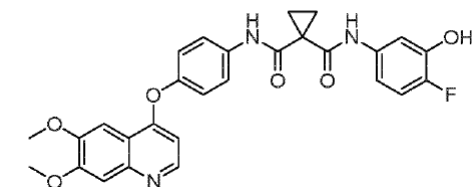
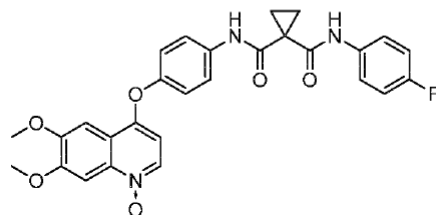
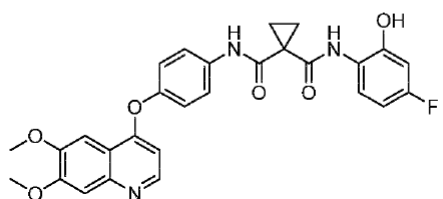
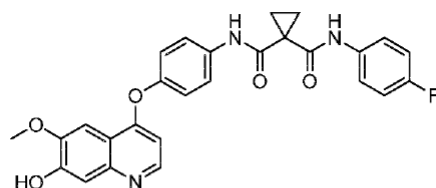
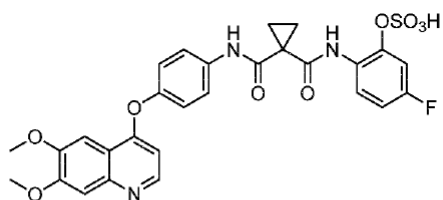


y



.

[0038] También se describe en el presente documento un procedimiento para modular la actividad in vivo de una quinasa, que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un metabolito de cabozantinib, que es un compuesto seleccionado de:



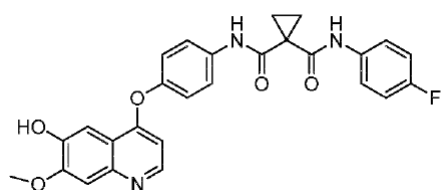
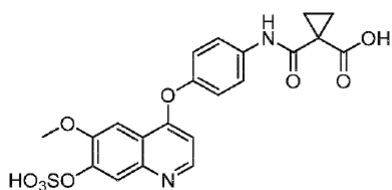
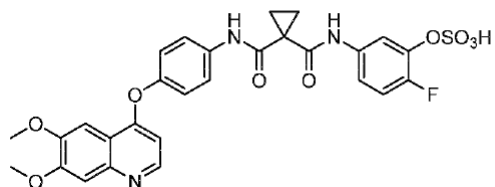
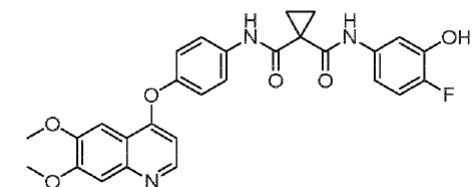
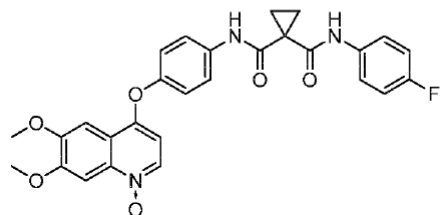
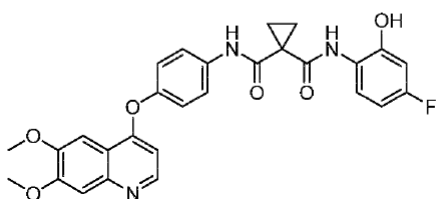
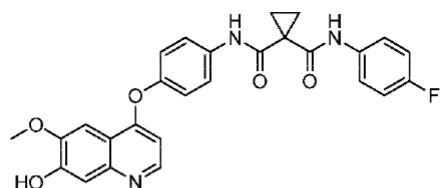
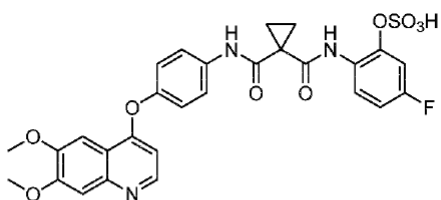
o una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto.

[0039] En un ejemplo, la modulación de la actividad in vivo de la quinasa comprende la inhibición de dicha quinasa.

[0040] En otro ejemplo, la quinasa es al menos uno de c-Met, RET, KDR, c-Kit, flt-3, y flt-4.

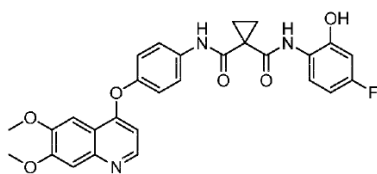
[0041] En otro ejemplo, la quinasa es c-Met.

[0042] También se describe en el presente documento un procedimiento de tratamiento de enfermedades o trastornos asociados con o actividades celulares incontroladas, anormales y/ no deseadas, comprendiendo el procedimiento administrar a un mamífero en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de un metabolito de cabozantinib, que es un compuesto seleccionado de:



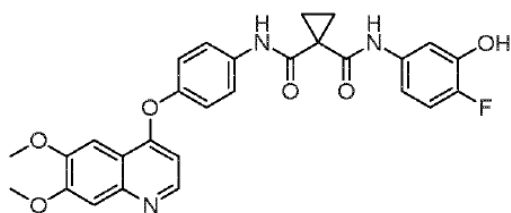
o una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto.

[0043] En un caso particular, el compuesto es



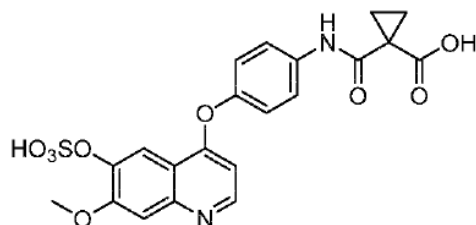
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0044] En otro caso particular, el compuesto es



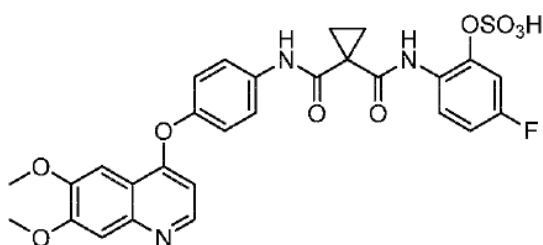
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0045] En otro caso particular, el compuesto es



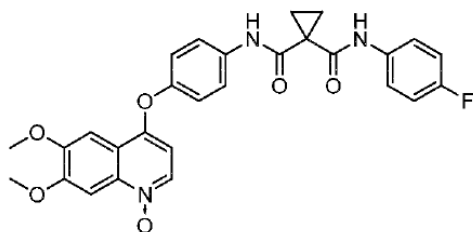
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0046] En otro caso particular, el compuesto es



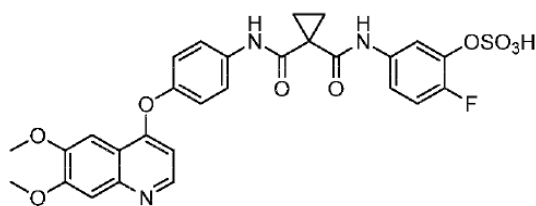
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0047] En otro caso particular, el compuesto es



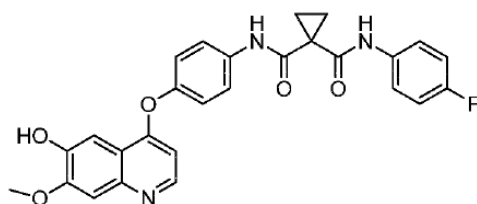
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0048] En otro caso particular, el compuesto es



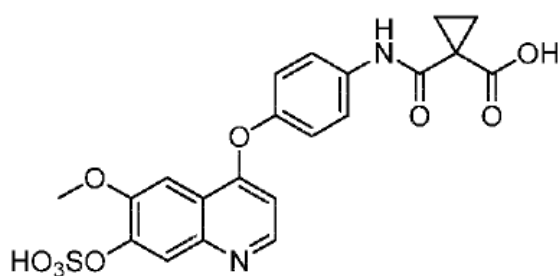
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0049] En otro caso particular, el compuesto es



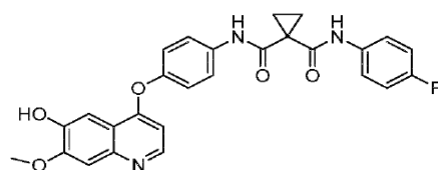
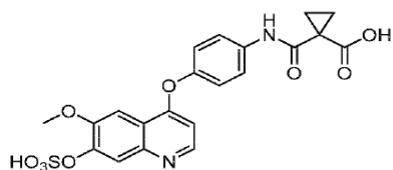
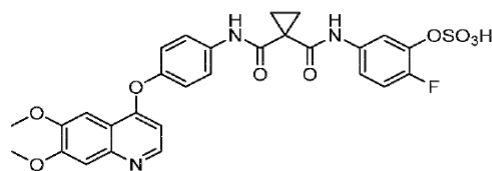
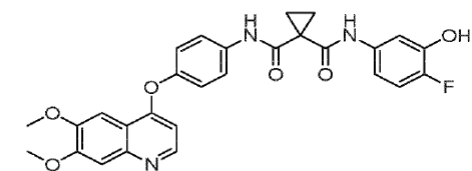
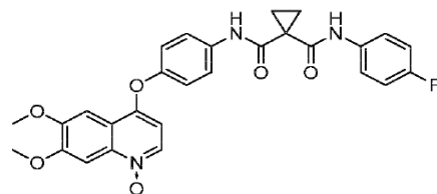
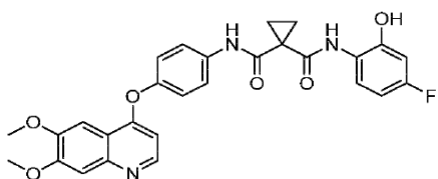
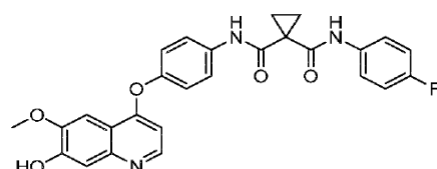
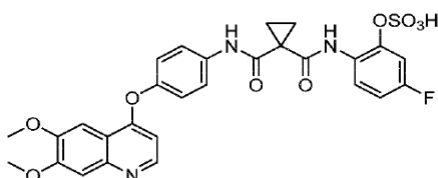
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0050] En otro caso particular, el compuesto es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

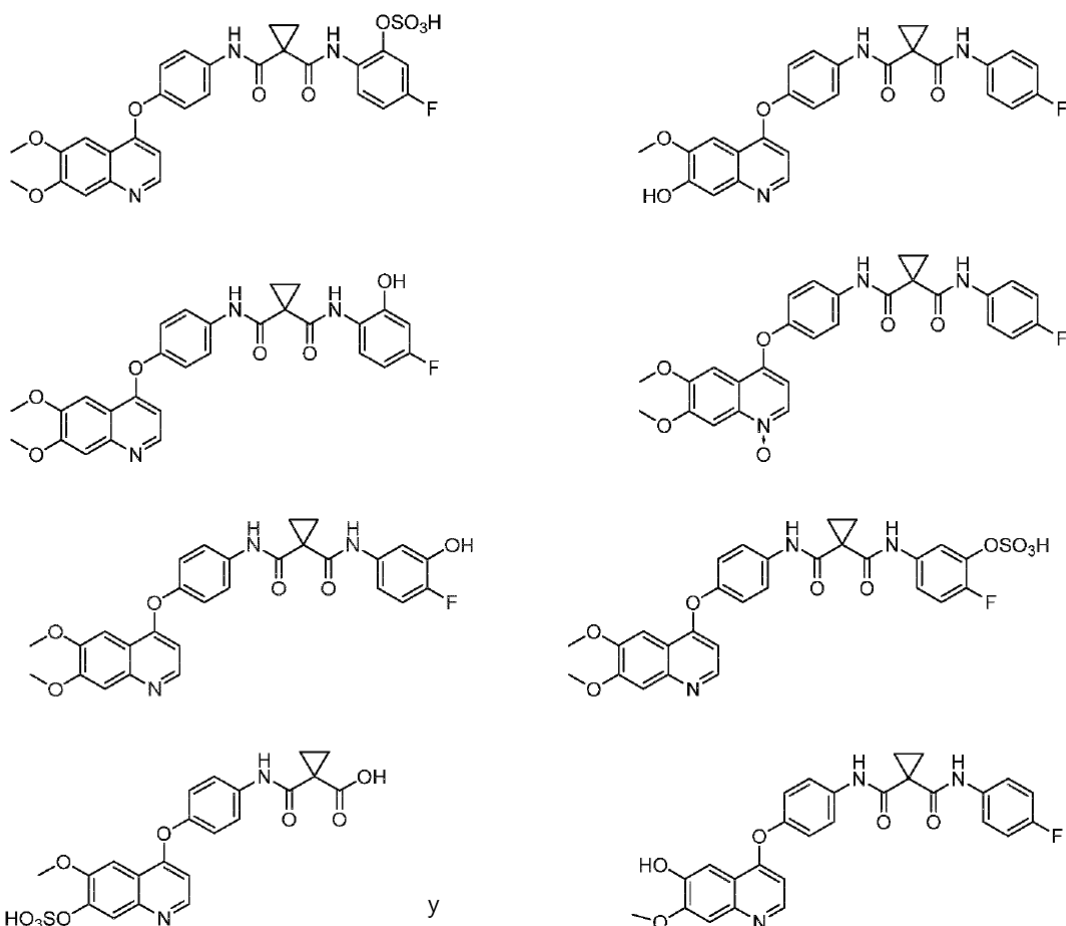
[0051] También se describe en el presente documento un procedimiento de cribado para un modulador de una quinasa, dicha quinasa seleccionada entre c-Met, KDR, RET, c-Kit, flt-3, y flt-4, comprendiendo el procedimiento combinar un metabolito de cabozantinib que es un compuesto seleccionado de:



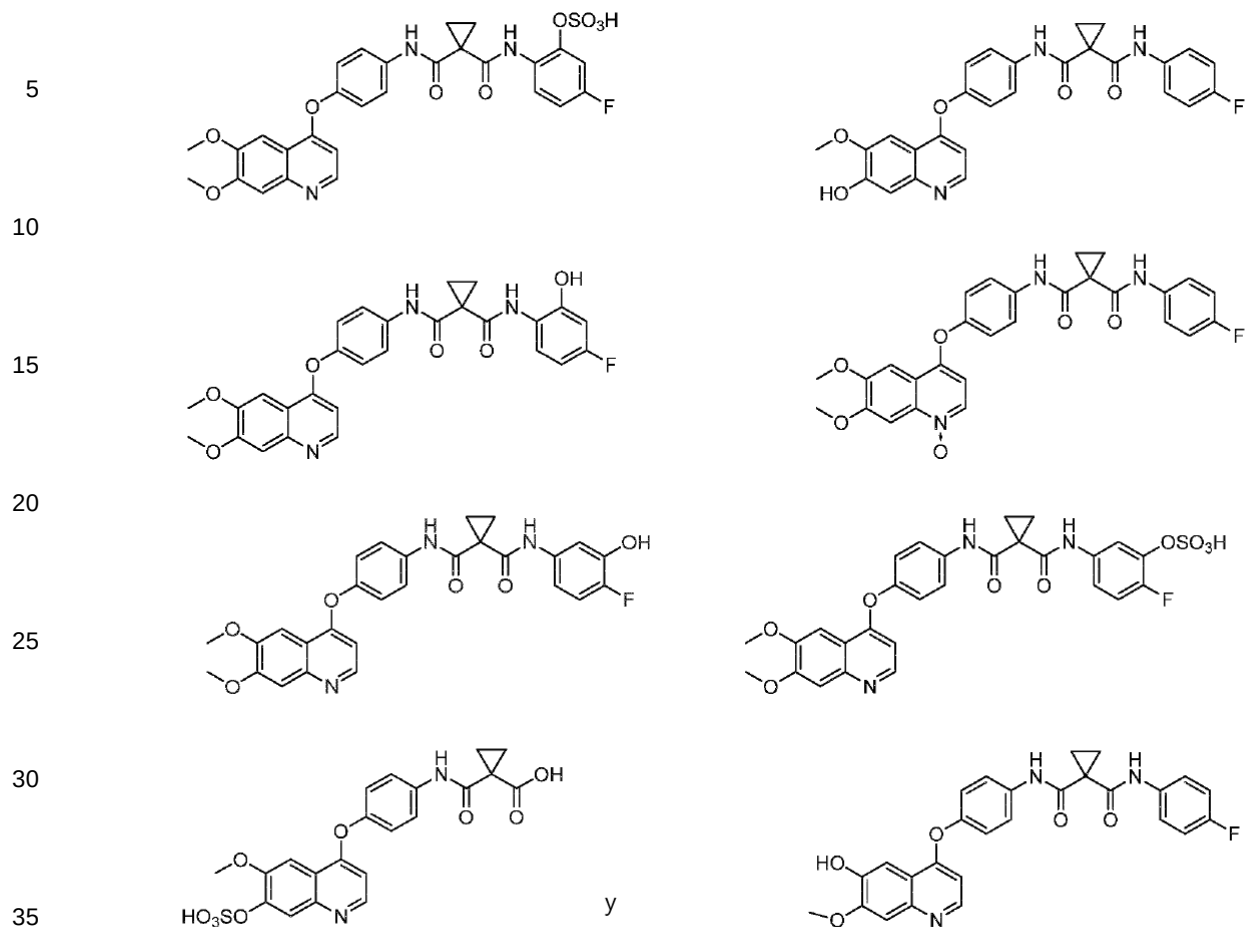
y

y al menos un agente candidato, y determinar el efecto del agente candidato sobre la actividad de dicha quinasa.

[0052] También se describe en el presente documento un procedimiento para inhibir la actividad proliferativa en una célula, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende un compuesto a una célula o una pluralidad de células, en el que el compuesto es un metabolito de cabozantinib seleccionado de:



[0053] También se describe en el presente documento un procedimiento de cribado para un modulador de una quinasa, dicha quinasa seleccionada entre c-Met, KDR, RET, c-Kit, flt-3, y flt-4, comprendiendo el procedimiento combinar un compuesto y al menos un agente candidato y determinar el efecto del agente candidato sobre la actividad de dicha quinasa, en el que el compuesto es un metabolito de cabozantinib seleccionado de:



[0054] Los metabolitos aislados, tal como se describe anteriormente, que exhiben actividad inhibidora contra c-MET u otras quinasas, se pueden formular en formas de dosificación adecuadas para la administración a seres humanos u otros mamíferos. En algunos casos, los metabolitos pueden mostrar perfiles toxicológicos favorables en comparación con la terapia convencional o terapia con cabozantinib.

[0055] Como inhibidores de c-MET, en algunos casos, los metabolitos se usan para tratar el cáncer. "Cáncer" incluye tipos de tumores, tales como los tipos de tumores, que incluyen cáncer de mama, colon, renal, de pulmón, leucemia mieloide de células escamosas, hemangiomas, melanomas, astrocitomas, y glioblastomas, así como otros estados de enfermedad proliferativos celulares, que incluyen, pero no limitado a: Cardíaco: sarcoma (angiosarcoma, fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, liposarcoma), mixoma, rabdomioma, fibroma, lipoma y teratoma; Pulmón: carcinoma broncogénico (células escamosas, células pequeñas no diferenciadas, células grandes no diferenciadas, adenocarcinoma), alveolar (bronquiolar) carcinoma, adenoma bronquial, sarcoma, linfoma, hamartoma, condromatoso, inosotelioma; Gastrointestinal: esófago (carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, leiomiomasarcoma, linfoma), estómago (carcinoma, linfoma, leiomiomasarcoma), páncreas (adenocarcinoma ductal, insulinoma, glucagonoma, gastrinoma, tumores carcinoides, vipoma), intestino delgado (adenocarcinoma, linfoma, tumores carcinoides, sarcoma de Kaposi, leiomioma, hemangioma, lipoma, neurofibroma, fibroma), intestino grueso (adenocarcinoma, adenoma tubular, adenoma vellosa, hamartoma, leiomioma); tracto genitourinario: riñón (adenocarcinoma, tumor de Wilm [nefroblastoma], linfoma, leucemia, carcinoma de células renales), vejiga y uretra (carcinoma de células escamosas, carcinoma de células de transición, adenocarcinoma), próstata (adenocarcinoma, sarcoma, carcinoma de células pequeñas de la próstata), testículos (seminoma, teratoma, carcinoma embrionario, teratocarcinoma, coriocarcinoma, sarcoma, carcinoma de células intersticiales, fibroma, fibroadenoma, tumores adenomatoides, lipoma); Hígado: hepatoma (carcinoma hepatocelular), colangiocarcinoma, hepatoblastoma, angiosarcoma, adenoma hepatocelular, hemangioma; Hueso: sarcoma osteogénico (osteosarcoma), fibrosarcoma, histiocitoma fibrosa maligna, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, linfoma maligno (sarcoma de células reticulares), cordoma tumoral de células gigantes malignas, osteocondroma (exostosis osteocartilaginosas), condroma benigno, condroblastoma, condromixofibroma, osteoma osteoide y tumores de células gigantes; Sistema nervioso: cráneo (osteoma, hemangioma, granuloma, xantoma, deformación osteitis), meninges (meningioma, meningiosarcoma, gliomatosis), cerebro (astrocitoma, meduloblastoma, glioma, ependimoma, germinoma [pinealoma], glioblastoma multiforme, oligodendroglioma, schwannoma, retinoblastoma, tumores congénitos), neurofibroma de la médula

espinal, meningioma, glioma, sarcoma); Ginecológico: útero (carcinoma endometrial), cuello uterino (carcinoma cervical, displasia cervical pretumoral), ovarios (carcinoma de ovario [cistadenocarcinoma seroso, cistadenocarcinoma mucinoso, carcinoma no clasificado], tumores de células de la granulosa y teca, tumores de células de Sertoli-Leydig, disgerminoma, teratoma maligno), vulva (carcinoma de células escamosas, carcinoma intraepitelial, adenocarcinoma, fibrosarcoma, melanoma), vagina (carcinoma de células claras, carcinoma de células escamosas, sarcoma botrioide (rhabdomyosarcoma embrionario), trompas de Falopio (carcinoma); Hematológico: sangre (leucemia mieloide [aguda y crónica], leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, enfermedades mieloproliferativas, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico), enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin [linfoma maligno]; piel: melanoma maligno, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi, nevos displásicos lunares, lipoma, angioma, dermatofibroma, queloides, psoriasis; y glándulas adrenales: neuroblastoma; así como cánceres de tiroides, que incluyen cáncer medular de tiroides. Por lo tanto, el término "célula cancerosa", como se proporciona en este documento, incluye una célula afectada por una cualquiera de las afecciones identificadas anteriormente.

[0056] En un ejemplo, el cáncer se selecciona entre cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer medular de tiroides, cáncer de hígado, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, cáncer de hueso, cáncer hematológico, cáncer de piel, cáncer de riñón, cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de trompas de Falopio.

[0057] En otro ejemplo, la enfermedad o trastorno es cáncer de ovario.

[0058] En otro ejemplo, la enfermedad o trastorno es cáncer de próstata.

[0059] En otro ejemplo, la enfermedad o trastorno es cáncer de pulmón.

[0060] En otro ejemplo, la enfermedad o trastorno es cáncer medular de tiroides.

[0061] En otro ejemplo, la enfermedad o trastorno es cáncer de hígado.

[0062] En otro ejemplo, la enfermedad o trastorno es cáncer gastrointestinal.

[0063] En otro ejemplo, la enfermedad o trastorno es cáncer de páncreas.

[0064] En otro ejemplo, la enfermedad o trastorno es cáncer de hueso.

[0065] En otro ejemplo, la enfermedad o trastorno es cáncer hematológico.

[0066] En otro ejemplo, la enfermedad o trastorno es cáncer de piel.

[0067] En otro ejemplo, la enfermedad o trastorno es cáncer de riñón.

[0068] En otro ejemplo, la enfermedad o trastorno es cáncer de mama.

[0069] En otro ejemplo, la enfermedad o trastorno es el cáncer de colon.

[0070] En otro ejemplo, la enfermedad o trastorno es cáncer de Falopio.

[0071] En otro ejemplo, la enfermedad o trastorno es cáncer de hígado, en el que el cáncer de hígado es carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, hepatoblastoma, angiosarcoma, adenoma hepatocelular o hemangioma.

[0072] En otro ejemplo, la enfermedad o trastorno es cáncer gastrointestinal, en el que el cáncer gastrointestinal es cáncer del esófago que es el carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, o leiomyosarcoma; cáncer del estómago que es carcinoma o linfoma; cáncer de páncreas que es adenocarcinoma ductal, insulinooma, gucagonoma, gastrinoma, tumores carcinoides o vipoma; cáncer del intestino delgado que es adenocarcinoma, linfoma, tumores carcinoides, sarcoma de Kaposi, leiomioma, hemangioma, lipoma; o cáncer del intestino grueso que es adenocarcinoma, adenoma tubular, adenoma vellosa, hamartoma o leiomioma.

[0073] En otro ejemplo, la enfermedad o trastorno es cáncer del páncreas, en el que el cáncer de páncreas es adenocarcinoma ductal, insulinooma, gucagonoma, gastrinoma, tumores carcinoides o vipoma.

[0074] En otro ejemplo, la enfermedad o trastorno es cáncer de hueso, en el que el cáncer de hueso es osteosarcoma, fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, sarcoma de células reticulares malignas, mieloma múltiple, cordoma de tumor de células gigantes malignas, exostosis osteocartilaginosa, condroblastoma, condromixofibroma u osteoma osteoide.

[0075] En otro ejemplo, la enfermedad o trastorno es cáncer hematológico, en el que el cáncer hematológico es la leucemia mieloide, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, enfermedades mieloproliferativas,

mieloma múltiple o síndrome mielodisplásico.

[0076] En otro ejemplo, la enfermedad o trastorno es cáncer de piel, en el que el cáncer de piel es melanoma maligno, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas o sarcoma de Kaposi.

[0077] En otro ejemplo, la enfermedad o trastorno es un tumor renal o carcinoma de células renales.

[0078] En otro ejemplo, la enfermedad o trastorno es cáncer de mama.

[0079] En otro ejemplo, la enfermedad o trastorno es un tumor de cáncer de colon.

[0080] En otro ejemplo, la enfermedad o trastorno es carcinoma de trompa de Falopio.

[0081] Alternativamente, o adicionalmente, los metabolitos pueden administrarse a sujetos o animales de ensayo que no tengan ninguno de los estados de enfermedad anteriormente mencionados con el propósito de estudiar los efectos no farmacológicos, tales como efectos secundarios, toxicidad, metabolismo, absorción, biodisponibilidad y vías de excreción.

[0082] En varios casos, los metabolitos se administran mediante cualquier vía adecuada incluyendo oral, rectal, intranasal, intrapulmonar (por ejemplo, por inhalación), o parenteral (por ejemplo, intradérmica, transdérmica, subcutánea, intramuscular o intravenosa). La administración oral se prefiere en algunas realizaciones, y la dosis puede administrarse con o sin alimentos, es decir, en el estado de ayuno o no en ayunas. Los ejemplos no limitantes de formas de dosificación incluyen comprimidos no recubiertos o recubiertos, cápsulas, polvos, gránulos, supositorios, soluciones, ungüentos, cremas y sprays.

[0083] Las formulaciones adecuadas para administración oral se preparan como unidades discretas, tales como cápsulas, píldoras o comprimidos, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del principio activo; como un polvo o gránulos; como solución o una suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite-en-agua; o una emulsión líquida agua-en-aceite. El principio activo también puede presentarse como un bolo, electuario o pasta.

[0084] Un comprimido se fabrica mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos se pueden preparar comprimiendo en una máquina adecuada el principio activo en una forma de flujo libre, tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, tensioactivo o agente dispersante. Los comprimidos moldeados pueden prepararse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del principio activo en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden estar opcionalmente recubiertos o ranurados y opcionalmente se formulan de manera que proporcionen una liberación lenta o controlada del principio activo del mismo. En un ejemplo, la hidrólisis ácida del medicamento se evita mediante el uso de un recubrimiento entérico.

[0085] Un recubrimiento entérico es un medio de protección de un compuesto de la descripción con el fin de evitar la exposición de una porción del tracto gastrointestinal, por lo general el tracto gastrointestinal superior, en particular el estómago y el esófago, al compuesto de esta descripción. De esta manera, el tejido de la mucosa gástrica está protegido contra índices de exposición a un compuesto de la descripción que producen efectos adversos, tales como náuseas; y, alternativamente, un compuesto de la descripción está protegido de las condiciones presentes en una o más partes del tracto gastrointestinal, típicamente el tracto gastrointestinal superior.

[0086] Las formulaciones adecuadas para administración tópica en la boca incluyen pastillas de chupar que comprenden el principio activo en una base aromatizada, normalmente sacarosa y acacia o tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia; y enjuagues bucales que comprenden el principio activo en un portador líquido adecuado.

[0087] Las formulaciones para administración rectal pueden presentarse como un supositorio con una base adecuada que comprende, por ejemplo, manteca de cacao o un salicilato.

[0088] Aunque es posible que los principios activos sean administrados solos, puede ser preferible presentarlos como formulaciones farmacéuticas. Las formulaciones, tanto para uso veterinario como para uso humano, comprenden al menos un principio activo, como se define anteriormente, junto con uno o más portadores aceptables y que comprenden, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos. El portador o portadores deben ser "aceptables" en que son compatibles con los otros ingredientes de la formulación y son fisiológicamente inocuos para el receptor de los mismos.

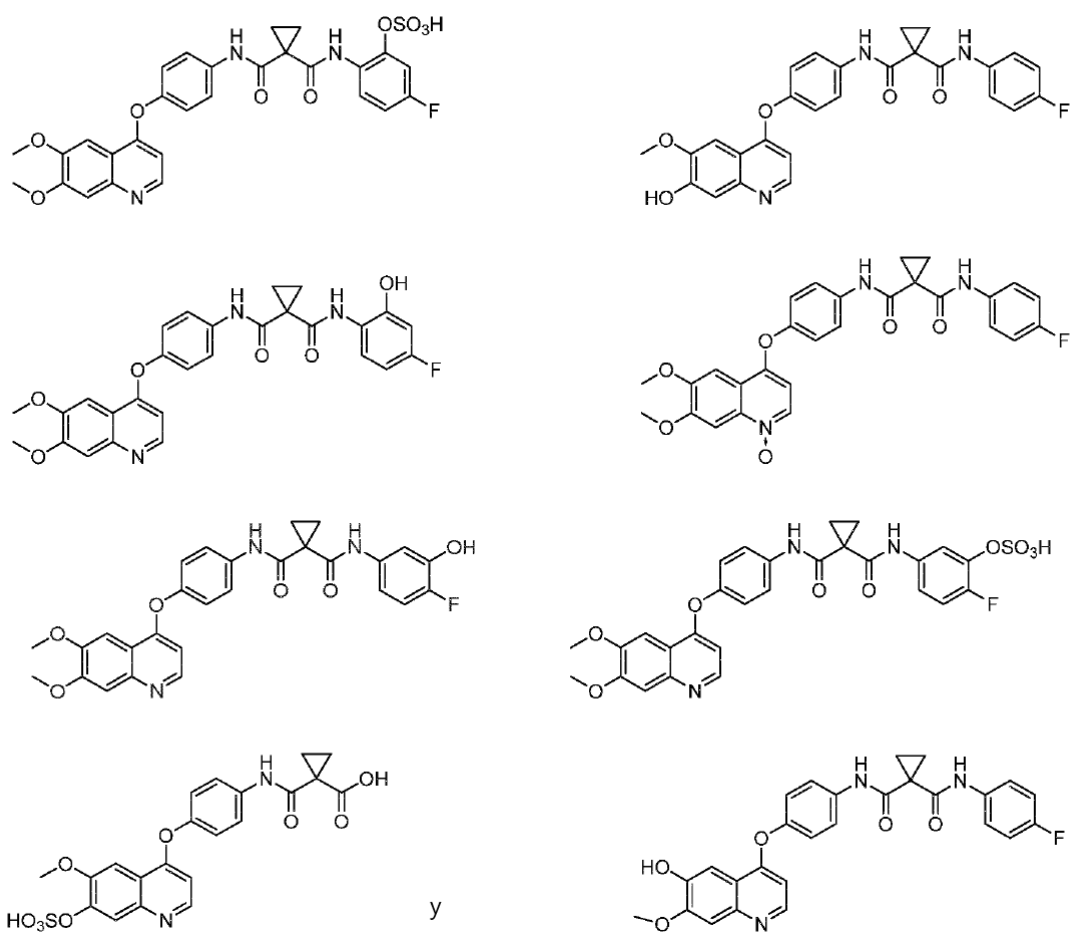
[0089] En varios casos los compuestos se formulan en un sistema portador. Tales sistemas son conocidos e incluyen aglutinantes, cargas, conservantes, disgregantes, reguladores de flujo, plastificantes, agentes humectantes, emulsionantes, dispersantes, lubricantes, disolventes, agentes retardantes de la liberación (incluyendo recubrimientos entéricos), antioxidantes y gases propulsores. Especialmente cuando se formula para la

administración a seres humanos, los agentes activos se combinan preferiblemente con al menos un portador farmacéuticamente aceptable. Tales portadores son conocidos e incluyen, sin limitación, derivados de celulosa, polietilenglicol y polímeros de N-vinilpirrolidona. Las formas de administración comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos, que constituyen desde 0,1% a aproximadamente 90% en peso de la forma de dosificación.

[0090] Los compuestos de la presente descripción se formulan con portadores y excipientes convencionales, que se seleccionarán de acuerdo con la práctica ordinaria. Los comprimidos contendrán excipientes, deslizantes, cargas, aglutinantes y similares. Las formulaciones acuosas se preparan en forma estéril y, cuando se destinen para administración diferente a la administración oral, serán generalmente isotónicas. Todas las formulaciones contendrán opcionalmente excipientes, tales como los expuestos en el "Handbook of Pharmaceutical Excipients" (1986). Los excipientes incluyen ácido ascórbico y otros antioxidantes, agentes quelantes, tales como EDTA, carbohidratos, tales como dextrina, hidroxialquilcelulosa, hidroxialquilmetilcelulosa, ácido esteárico y similares.

[0091] Las formulaciones incluyen las adecuadas para las vías de administración anteriores. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de farmacia. Las técnicas y formulaciones en general se encuentran en Remington Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, Pa.). Tales procedimientos incluyen la etapa de poner en contacto el principio activo con el portador que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan poniendo en contacto de manera uniforme e íntima el principio activo con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y después, si es necesario, dando forma al producto.

[0092] En una realización particular, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un metabolito de cabozantinib que es un compuesto seleccionado de:

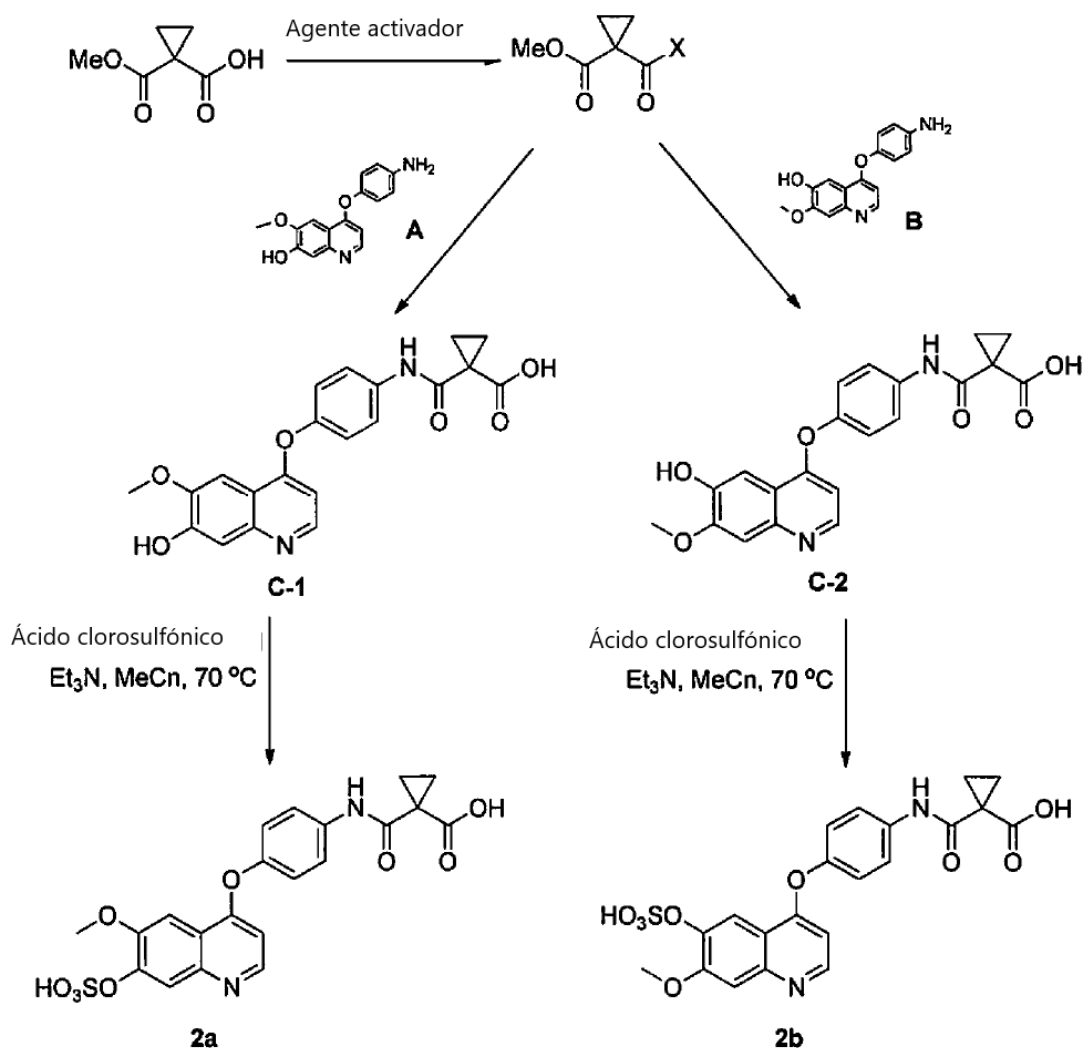


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

[0093] Los compuestos descritos en este documento pueden fabricarse de acuerdo a los procedimientos disponibles para experto. Por ejemplo, tal como se representa en el Esquema 2, se puede utilizar la química de péptidos para

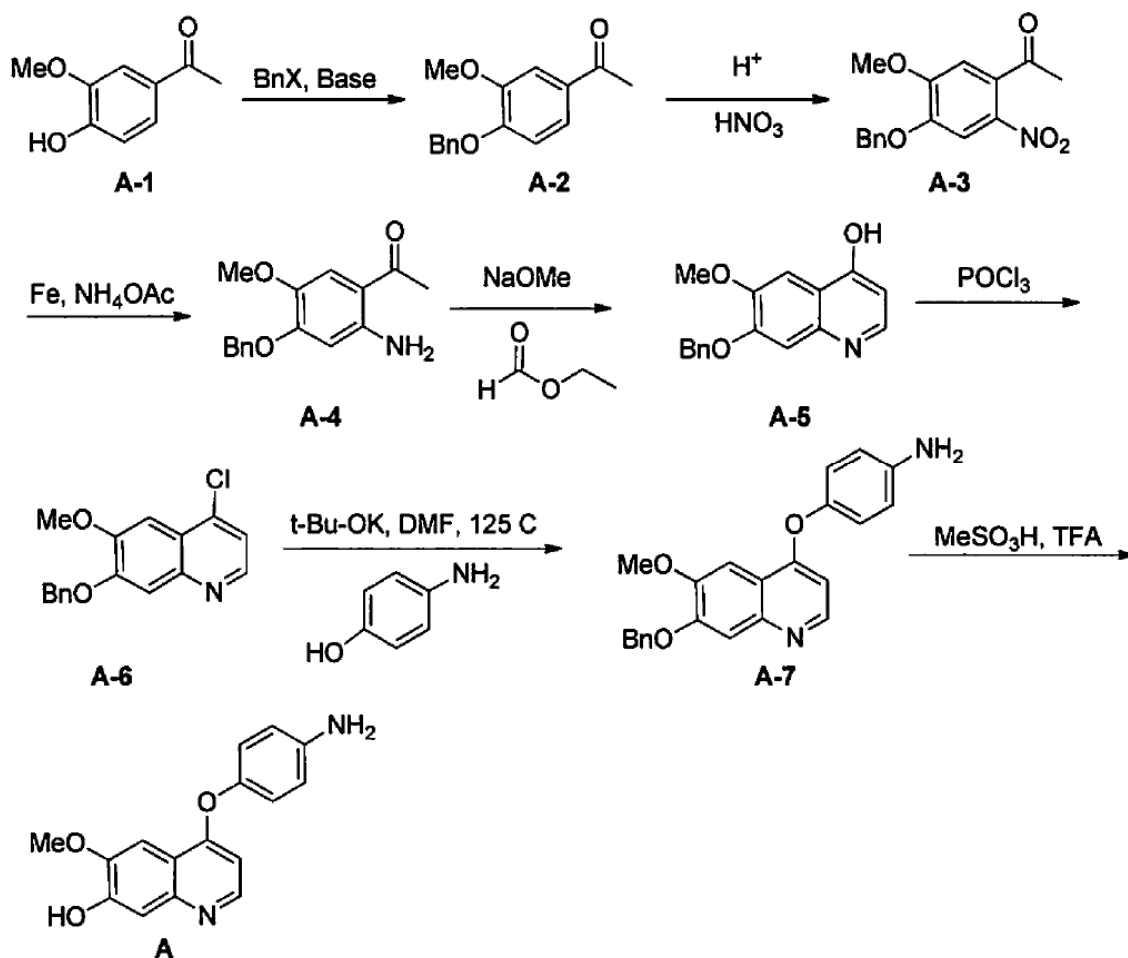
fabricar los fenoles **C-1** y **C-2** a partir de las correspondientes aminas y ácidos carboxílicos. Están disponibles una variedad de procesos y reactivos para lograr tales transformaciones y se describen, por ejemplo, en Tetrahedron 61 (2005) 10.827-10.852. Un ejemplo representativo se representa en el Esquema 2, en el que el agente activador es cloruro de tionilo, cloruro de oxalilo o similares. El correspondiente cloruro de ácido reacciona con el compuesto **A** o **B**, respectivamente, para proporcionar fenol **C-1** o **C-2**. La posterior reacción de fenol **C-1** o **C-2** con un agente de sulfatación, tal como ácido clorosulfónico o complejo de trióxido de azufre-trimetilamina, en presencia de una base, tal como trietilamina, hidróxido de metal alcalino o similar, puede proporcionar el hidrógenosulfato correspondiente **2b** o **2a**, respectivamente.

Esquema 2



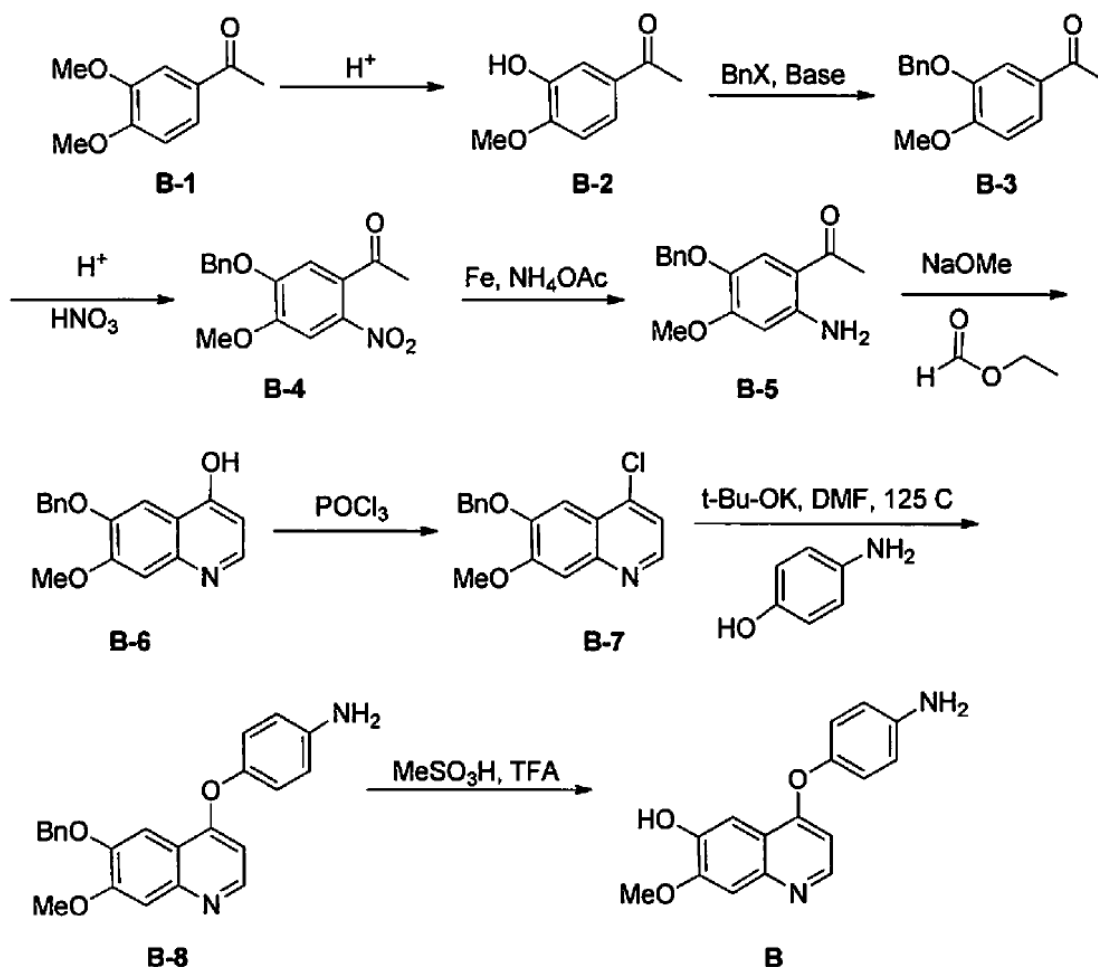
[0094] El compuesto **A** se preparó de acuerdo con el Esquema 3. La bencilación de **A-1** usando un haluro de bencilo o similar proporciona **A-2** protegido con bencilo. La nitración de **A-2** utilizando una mezcla de ácido nítrico y ácido sulfúrico proporciona **A-3**. La reducción del grupo nitro en **A-3** a la amina **A-4** puede realizarse usando condiciones de reducción nitro estándar, tales como el hierro y acetato de amonio. La ciclación de **A-4** con formiato de etilo y un alcóxido, tal como metóxido de sodio, proporciona **A-5**. La conversión de **A-5** en el cloruro correspondiente usando oxicloruro de fósforo proporciona **A-6**. La reacción de **A-6** con 4-amino fenol proporciona **A-7**, que se desprotege con ácido metano sulfónico para proporcionar el compuesto **A**.

Esquema 3



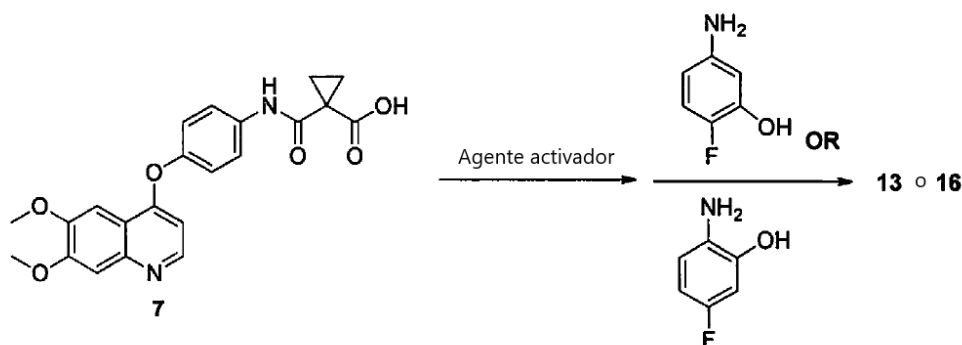
[0095] De manera similar, el compuesto **B** se preparó de acuerdo con el Esquema 4. La desmetilación de **B-1** proporciona **B-2**. La bencilación del **B-2** usando un haluro de bencilo BNX , en el que X es Br , Cl o I , o similar proporciona **B-3** protegido con bencilo. La nitración de **B-3** utilizando una mezcla de ácido nítrico y ácido sulfúrico proporciona **B-4**. La reducción del grupo nitró en **B-4** a la amina **B-5** se puede realizar usando condiciones de reducción nitró estándar, tales como el hierro y acetato de amonio. La ciclación de **B-5** con formiato de etilo y un alcóxido, tal como metóxido de sodio, proporciona **B-6**. La conversión de **B-6** en el cloruro correspondiente usando oxiclóruo de fósforo proporciona **B-7**. La reacción de **B-7** con 4-amino fenol proporciona **B-8**, que se desprotegió con ácido metano sulfónico para proporcionar el compuesto **B**.

Esquema 4



[0096] Los fenoles **13** y **16** se pueden preparar de manera similar a partir del compuesto **7**, la síntesis del cual se da a conocer en el documento WO 2005/030140 como Ejemplo 73. Por lo tanto, en el Esquema 5, el acoplamiento de **7** con 2-amino-5-fluorofenol (CAS Reg. No. 53981-24-1) proporciona **13**. El acoplamiento de **7** con 5-amino-2-fluorofenol (CAS reg. No. 100367-48-4) proporciona **16**.

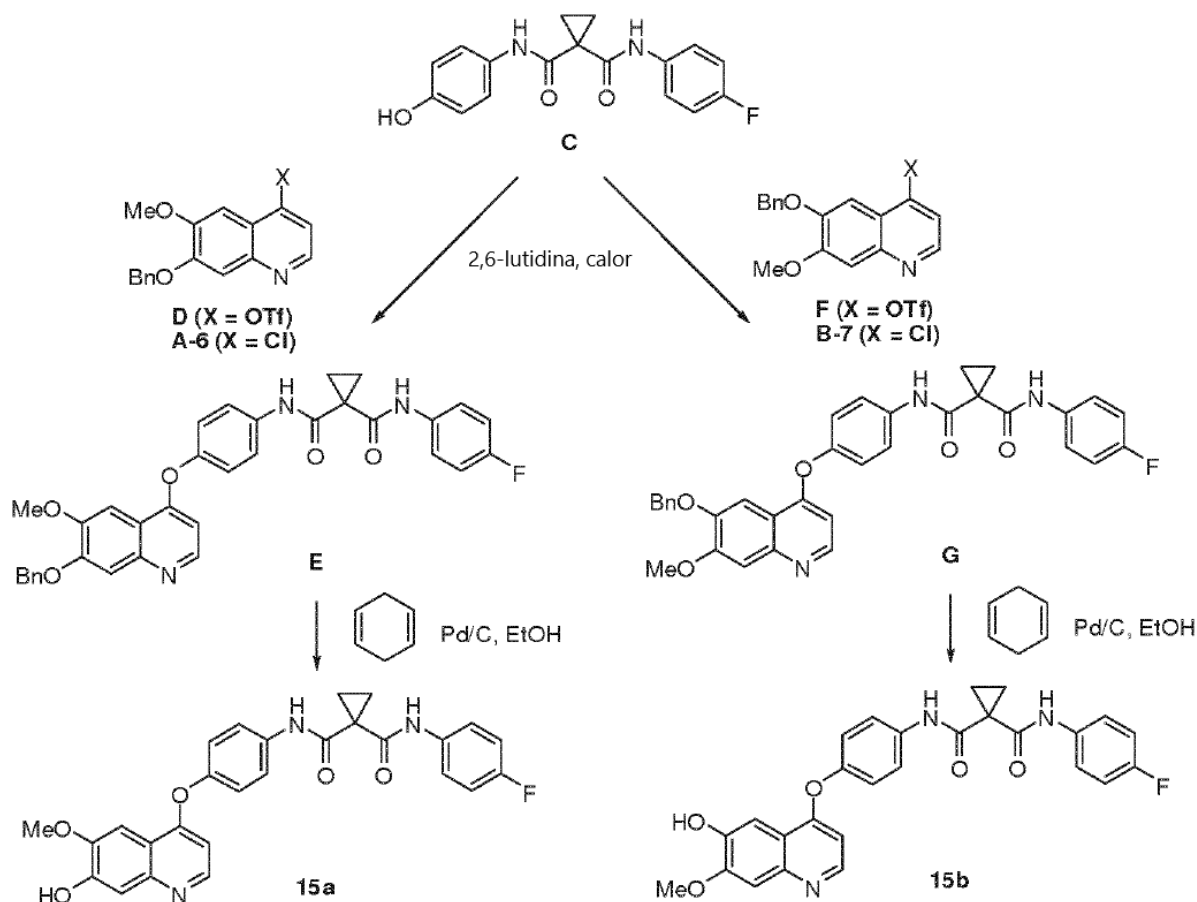
Esquema 5



[0097] Los fenoles **13** y **16** se pueden convertir fácilmente a los sulfatos correspondientes **9** y **12** representados en el Esquema 1 usando, por ejemplo, un agente de sulfatación, tal como complejo de trimetil amina y trióxido de azufre, en presencia de un hidróxido fuerte, tal como hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, o similares, o usando ácido clorosulfónico en presencia de una base amina, tal como trietilamina.

[0098] Los fenoles **15a** y **15b** se pueden preparar mediante el empleo de un procedimiento similar que se da a conocer en el documento WO 2005/030140 para la preparación del Ejemplo 43. Así, en el Esquema 6, el acoplamiento de fenol **C** (Ejemplo 38 en el documento WO 2005/030140) con triflato **D** (Ejemplo 33 en el documento WO 2005/030140), o cloruro de **A-6** (Ejemplo 32 en el documento WO 2005/030140) proporciona **E** que, a continuación, se desprotege bajo condiciones de hidrogenólisis catalizada por Pd para proporcionar el compuesto **15a**. De manera similar, la reacción de fenol **C** con triflato **F** o cloruro **B-7** proporciona **G**, que se somete a desprotección con O-bencilo para proporcionar el compuesto **15b**.

Esquema 6



[0099] El N-óxido **19** se puede preparar mediante la reacción de cabozantinib con un agente oxidante, tal como, por ejemplo un peróxido, un perácido, o similares. En un ejemplo, el agente oxidante es perborato de sodio tetrahidratado.

[0100] Los siguientes ejemplos no limitantes pretenden ilustrar la invención.

Ejemplos

Identificación de metabolitos de cabozantinib

[0101] El objetivo de este estudio fue perfilar e identificar metabolitos de cabozantinib en el plasma humano, la orina y las heces. Las muestras de plasma, orina y heces se recogieron de un estudio de balance de masas de cabozantinib después de una sola administración oral de 175 mg de cabozantinib (sal de L-malato) que contiene [¹⁴C] cabozantinib (100 μCi) en sujetos masculinos sanos.

Diseño del estudio y toma de muestras de plasma, orina y heces

[0102] Ocho sujetos masculinos participaron en el estudio, y cada sujeto recibió una dosis oral única de 175 mg de cabozantinib (sal de L-malato) que contenía [¹⁴C] -cabozantinib (100 μCi). Las muestras de plasma, orina y heces se

recogieron de los 8 sujetos para el perfilado de metabolitos.

Las muestras de plasma se recogieron antes de la dosis, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 8, 14, 24, 72, 168, 336, 504 y 648 horas después de la dosis; se recogieron muestras de orina antes de la dosis, 0-8 horas, 8-24 horas, a intervalos de 24 horas hasta 480 horas después de la dosis, y en intervalos mayores de 48 horas desde 504 a 1152 horas después de la dosis; y las muestras de heces se recogieron antes de la dosis, a intervalos de 24 horas hasta 480 horas después de la dosis, y a intervalos superiores a 48 horas desde 504 hasta 1152 horas después de la dosis. Todas las muestras se enviaron a QPS LLC (Newark, DE) y se almacenaron a -70°C. Se usó HPLC/MS en tándem acoplado con un detector de flujo (RFD) para el perfilado de metabolitos y la identificación de las muestras con niveles suficientes de radiactividad.

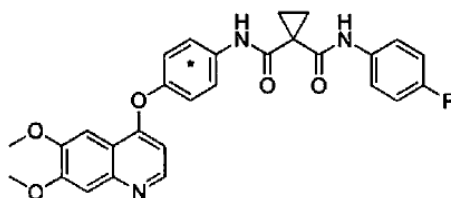
[0103] La recogida de fracciones de HPLC seguido del recuento con TopCount NXT™ se utilizó para radiocuantificación de muestras de plasma con niveles suficientes de radiactividad. Tres procedimientos (3) de HPLC se utilizaron en este estudio para separar cabozantinib y sus metabolitos. El procedimiento de HPLC 1 se usó para el análisis de muestras de orina y fecales agrupadas y muestras de plasma individuales de diferentes puntos de tiempo. El procedimiento de HPLC 2 se utilizó para el análisis de muestras de plasma a partir de un estudio de interacción fármaco-fármaco para buscar posibles metabolitos que pueden coeluir con sulfato de cabozantinib. El procedimiento de HPLC 3 se utilizó para las muestras de plasma agrupadas.

[0104] Se analizaron muestras seleccionadas para el plasma, la orina y las heces de 6 sujetos para cabozantinib y metabolitos y se describieron.

[0105] Las muestras de 2 sujetos fueron utilizados para el estudio de investigación.

Artículo de prueba

[0106] El artículo de prueba para este estudio fue una mezcla de [¹⁴C] cabozantinib y cabozantinib. El asterisco indica la posición del marcaje [¹⁴C]. El cabozantinib marcado con [¹⁴C] se preparó como se indica en el documento WO 2005/030140, excepto que se utilizó 4-amino fenol marcado con [¹⁴C] en lugar de 4-amino fenol no marcado. El 4-amino fenol marcado con [¹⁴C] está disponible comercialmente como la sal clorhidrato, por ejemplo, de Hartmann Analytic, American Radiolabeled Chemicals, o Fisher Scientific.



Patrones químicos generales y de referencia

[0107] El ácido fórmico y acetato de amonio se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO). El acetonitrilo (marca B & J, libre de carbonilo, para aplicaciones sensibles a rastrear aldehído y cetona), agua (marca B & J, para CG, HPLC y espectrofotometría) y metanol (grado HPLC) se adquirieron de Fisher Scientific (Pittsburgh, PA). El agua tipo I se generó usando un sistema de purificación de agua Elgastat UHQ PS. Los patrones de metabolitos no radiomarcados (producto de escisión de fluoroanilina, sulfato de cabozantinib y cabozantinib N-óxido) fueron proporcionados por Exelixis, Inc.

Recogida de muestras biológicas

[0108] Las muestras de plasma, orina y heces se recogieron a partir de un estudio de balance de masas de cabozantinib después de una sola administración oral de 175 mg de cabozantinib (sal de L-malato) que contenía [¹⁴C] cabozantinib (100 µCi) en sujetos masculinos sanos. Las muestras se enviaron desde Celerion (Lincoln, NE) a QPS LLC (Newark, DE) en hielo seco y se almacenaron a -70°C hasta su análisis. Las muestras de 6 sujetos fueron utilizadas para la obtención de perfiles, identificación y radiocuantificación de metabolitos. Las muestras de plasma de 2 sujetos solamente se utilizaron en un estudio puente como parte de la investigación de coelución de metabolitos.

Preparación de la muestra y recuperación radioactiva de plasma humano

[0109] Para la obtención de perfiles, identificación y radiocuantificación de metabolitos, las muestras de plasma radiomarcadas individuales recogidas a las 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 8, 14, 24, 72, 168, y 336 horas después de la dosis se procesaron y se analizaron para 6 sujetos. Para la investigación de coelución de metabolitos, las muestras de plasma no radiomarcado de seis sujetos se agruparon, se procesaron y analizaron para la predosis, 1-7, 8-96, y 120-

336 horas después de la dosis. Para conectar los datos de metabolitos de muestras de plasma no radiomarcadas a muestras de plasma radiomarcadas a partir del estudio de balance de masas humano, las muestras de plasma con [^{14}C] de 0-168 horas después de la dosis para cada uno de los seis sujetos también se agruparon mediante el procedimiento de agrupación de Hamilton, se procesaron y se analizaron mediante radiocuantificación. Las muestras de plasma con [^{14}C] de 1-168 horas después de la dosis para dos sujetos se combinaron (volumen igual), se procesaron y se analizaron.

Procedimiento inicial de extracción de plasma y recuperación

[0110] Dos muestras de plasma de un sujeto (4 y 72 horas después de la dosis) se utilizaron para la extracción inicial y la determinación de recuperación. La radiactividad total para cada muestra de plasma en el estudio de balance de masas fue proporcionada por Exelixis, Inc., y se definió como 100%. Después de descongelar las muestras bajo una campana biológica, se añadieron dos alícuotas de 0,5 ml de cada muestra de plasma a 3 volúmenes (1,5 ml) de MeOH:ACN (20:80, v/v) y se agitó en vórtice (5 min). Las mezclas se centrifugaron a 2.000 rpm durante 10 minutos, y los sobrenadantes se transfirieron a tubos limpios. Los residuos se extrajeron con dos de 3 volúmenes adicionales de MeOH:ACN (20:80 v/v). Las mezclas se centrifugaron y se combinaron los sobrenadantes. Las alícuotas se analizaron mediante un contador de centelleo líquido 2900 TR(LSC) (Packard Instruments, Meridian, CT). La recuperación de la extracción se calculó de la siguiente manera:

Recuperación de extracción (%) = (DPM en el sobrenadante/DPM en muestra de plasma) x 100

[0111] Los sobrenadantes de la extracción se evaporaron a sequedad bajo una corriente de nitrógeno en un baño de agua a temperatura ambiente. Los residuos se reconstituyeron en 0,35-0,5 ml de MeOH:ACN:agua (10:20:70, v/v/v). Las muestras reconstituidas se centrifugaron a 15.000 rpm durante 10 minutos y las alícuotas se analizaron por LSC para la recuperación de la reconstitución.

Recuperación por reconstitución % = (DPM en solución de reconstitución/DPM en sobrenadante) x 100

Preparación de la muestra de plasma

[0112] Las muestras de plasma radiomarcadas y no radiomarcadas se extrajeron empleando el mismo procedimiento utilizando muestras de plasma de 1,0-2 ml, dependiendo del volumen disponible y del nivel de radiactividad de las muestras. Los sobrenadantes se evaporaron a sequedad bajo una corriente de nitrógeno en un baño de agua a temperatura ambiente y los residuos se reconstituyeron en 0,35-0,5 ml de MeOH:ACN:agua (10:20:70, v/v/v). Las muestras reconstituidas se centrifugaron a 15.000 rpm durante 10 minutos. Se inyectaron alícuotas de los sobrenadantes en el sistema de HPLC para el análisis.

Preparación de la muestra y recuperación radioactiva de orina humana

[0113] Las muestras de orina agrupadas de un sujeto (0-72, 168-192, y 312-336 horas después de la dosis) se liofilizaron por triplicado (cada una 4 ml) y los residuos se reconstituyeron en 1 ml de agua:ACN:FA (80:20:0,1, v/v/v). La radiactividad en orina agrupada y solución reconstituida se contó usando LSC y se calculó la recuperación de la reconstitución. Para la obtención de perfiles, identificación y radiocuantificación de metabolitos, se analizaron muestras de orina antes de la dosis y 3 agrupadas (0-72 horas, 168-192 horas, y 312-336 horas después de la dosis) de cada uno de los seis sujetos. Cada muestra de orina agrupada se liofilizó, el residuo se reconstituyó en agua:ACN:FA (80:20:0,1, v/v/v) y la muestra reconstituida se centrifugó a 15.000 rpm durante 10 min antes del análisis.

Preparación de la muestra y recuperación radiactiva de orina humana

[0114] Para evaluar la recuperación de la extracción de muestras de heces, se descongelaron dos muestras de homogeneizado fecal de un sujeto bajo una campana biológica. Se pesaron con precisión aproximadamente 5,5-6 g de homogeneizado fecal para la extracción. Se añadieron quince ml de ACN:MeOH (80:20) a los homogeneizados fecales. Las mezclas se agitaron en vórtice durante 3 minutos y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos limpios. El procedimiento de extracción se repitió dos veces más. Se combinaron los sobrenadantes de las tres extracciones. La radiactividad en los sobrenadantes combinados se determinó mediante LSC. La recuperación de la extracción se calculó usando la siguiente fórmula:

Recuperación de extracción (%) = (DPM en el sobrenadante/DPM en homogeneizado fecal) x 100

[0115] El sobrenadante se concentró bajo una corriente de nitrógeno a temperatura ambiente y los residuos se reconstituyeron en MeOH:ACN:agua (10:20:70). Las alícuotas de solución de reconstitución se contaron con LSC para la recuperación de la reconstitución.

Recuperación por reconstitución % = (DPM en solución de reconstitución/DPM en sobrenadante) x 100

Recuperación global (%) = Recuperación de extracción (%) x Recuperación por reconstitución (%) / 100

[0116] Para obtener perfiles, identificación y radiocuantificación de metabolitos, se extrajeron muestras antes de la dosis y de 3 muestras fecales agrupadas (0-72, 168-192, y 312-336 horas después de la dosis) de cada uno de los seis sujetos mediante los mismos procedimientos para la recuperación de la extracción. Los sobrenadantes se secaron bajo una corriente de nitrógeno y los residuos se reconstituyeron en agua:ACN:FA (80:20:0,1, v/v/v). Las muestras reconstituidas se centrifugaron a 15.000 rpm durante 10 min antes del análisis.

Recuperación en columna de HPLC

[0117] La recuperación en columna de HPLC se llevó a cabo para demostrar que todos los componentes radiactivos se eluyeron con eficacia de la columna utilizando el procedimiento de HPLC 1. Las alícuotas de muestras de orina (sujeto 1042, 24-48 horas después de la dosis) se inyectaron en el sistema de HPLC con o sin una columna, y los eluyentes de 0-30 minutos se recogieron en tubos de centrifuga limpios de 50 ml. Los pesos de eluyente de cada inyección se obtuvieron después de la recogida y se contaron las alícuotas por duplicado (1 ml) usando LSC. El valor promedio de los recuentos se utilizó para calcular la radiactividad total contenida en el eluyente recogido con o sin una columna instalada.

Recuperación en columna (%) = (DPM en eluyente con la columna / DPM en eluyente sin Columna) x 100

[0118] El procedimiento 3 de HPLC se utilizó para plasma agrupado solamente y la recuperación en columna no se realizó debido al volumen limitado de la muestra disponible.

Sistemas HPLC/MS/RFD y HPLC-Radio Análisis

[0119] El sistema para la obtención de perfiles y la identificación de metabolitos (HPLC/MS/RFD) consistía en un automuestreador HTC PAL, una bomba Surveyor HPLC, un espectrómetro de masas de atrapamiento de iones LTQ lineal, y un RFD β -RAM Modelo 3. Los datos obtenidos mediante espectrometría de masas y RFD se procesaron por software Xcalibur y Laura Lite 3, respectivamente. El eluyente de HPLC se dividió entre RFD y espectrómetro de masas con una relación de 3 a 1. Los siguientes datos son el resumen de las condiciones para HPLC, espectrómetro de masas, y RFD.

Procedimiento 1 HPLC/MS/RFD

[0120]

HPLC	Surveyor HPLC Pump		
- Tipo de columna	Phenomenex Synergi Polar RP. 4,6 x 250 mm, 4 μ m		
- Fases móviles	A. H ₂ O con 0,1% FA B. ACN con 0,1% FA		
Programa de gradiente	Tiempo (min)	A%	B%
	0	80	20
	2	80	20
	22	30	70
	23	5	95
	27	5	95
	28	80	20
	34	80	20
- Flujo	800 μ l/minuto		
- Tiempo de análisis	34 minutos		
Espectrometría de masas	Thermo Finnigan LTQ Linear Ion Trap		
- Flujo de gas envolvente	50 unidades		
- Flujo de gas auxiliar	20 unidades		
- Flujo de gas de barrido	10 unidades		
- Voltaje de la pulverización de iones	5 kV para ESI+; 4,3 kV para ESI-		
- Temperatura capilar	300°C		
- Voltaje capilar	22 V para ESI+; -9 kV para ESI-		
- Voltaje de la lente del tubo	80 V para ESI+; -96 kV para ESI-		
- Modo de ionización	ESI+, ESI-		
Detector de flujo radiológico	B-RAM modelo 3		
- Radionucleido	¹⁴ C		
- Volumen celular	400 μ L		
- Cóctel de centelleo	Ultima-Flo M. Perkin Elmer		
- Proporción cóctel/flujo HPLC	3:1		

Procedimiento 2 HPLC/MS

HPLC	Surveyor HPLC Pump		
- Tipo de columna	Phenomenex Synergi Polar RP. 4,6 x 250 mm, 4 µm		
- Fases móviles	C. H ₂ O con 0,1% FA D. ACN con 0,1% FA		
Programa de gradiente	Tiempo (min)	A%	B%
	0	80	20
	2	80	20
	40	35	65
	42	5	95
	47	5	95
	48	80	20
	55	80	20
- Flujo	800 µl/minuto		
- Tiempo de análisis	55 minutos		
Espectrometría de masas	Thermo Finnigan LTQ Linear Ion Trap		
- Flujo de gas envolvente	50 unidades		
- Flujo de gas auxiliar	20 unidades		
- Flujo de gas de barrido	10 unidades		
- Voltaje de la pulverización de iones	5 kV		
- Temperatura capilar	300°C		
- Voltaje capilar	22 V		
- Voltaje de la lente del tubo	80 V		
- Modo de ionización	ESI+		

5 Procedimiento 3 HPLC/MS

HPLC	Surveyor HPLC Pump		
- Tipo de columna	Water Xbridge phenyl 4,6 x 150 mm, 3,5 µm		
- Fases móviles	E. H ₂ O con 0,1% FA F. ACN con 0,15% FA		
Programa de gradiente	Tiempo (min)	A%	B%
	0	80	20
	2	80	20
	40	30	70
	42	5	95
	47	5	95
	48	80	20
	55	80	20
- Flujo	800 µl/minuto		
- Tiempo de análisis	55 minutos		
Espectrometría de masas	Thermo Finnigan LTQ Linear Ion Trap		
- Flujo de gas envolvente	50 unidades		
- Flujo de gas auxiliar	20 unidades		
- Flujo de gas de barrido	10 unidades		
- Voltaje de la pulverización de iones	5 kV		
- Temperatura capilar	300°C		
- Voltaje capilar	22 V		
- Voltaje de la lente del tubo	80 V		
- Modo de ionización	ESI+		

10 **[0121]** El sistema de HPLC-MS para MS de alta resolución consistía en un HPLC Michrom Bioresources Paradigm MS4B y un espectrómetro de masas Thermo LTQ Orbitrap Discovery. Las condiciones cromatográficas y los parámetros de la fuente de iones fueron los mismos que el procedimiento de HPLC 1 para el sistema de LTQ. Los datos fueron adquiridos con una resolución de 30000 en modo centroide.

15 **[0122]** Se utilizó un sistema de HPLC/TopCount NXT™ para la radiocuantificación de las muestras de plasma. El sistema consistía en un automuestreador HTC PAL, dos bombas Shimadzu HPLC y un colector de fracciones Foxy Jr. (Isco, Lincoln, NE). Las fracciones de HPLC recogidas en una placa de 96 pocillos Lumaplate™ se secaron usando un evaporador personal EZ-2plus (Genevac, Valley Cottage, New York), y las muestras secadas se contaron mediante el contador por centello y luminiscencia de microplacas TopCount NXT™ (PerkinElmer®). Los datos se

procesaron utilizando software ProFSA (PerkinElmer®). Los procedimientos de HPLC fueron los mismos que se describieron anteriormente.

Identificación de metabolitos

[0123] Los metabolitos que representaban más del 5% de la radiactividad total o el 5% de la AUC total en la matriz fueron identificados de acuerdo con el siguiente proceso. Se obtuvieron espectros de masas (MS, MS/MS, y MS/MS/MS) de cabozantinib y sus patrones de metabolitos, proporcionados por el Exelixis, Inc., en un espectrómetro de masas de atrapamiento de iones. Se propusieron patrones de fragmentos principales. La identificación de estos metabolitos se confirmó haciendo coincidir los espectros de masas (MS y MS/MS) y los tiempos de retención con patrones de referencia auténticos. Para otros metabolitos desconocidos, los iones moleculares se buscaron en cromatogramas CL/MS que operan en modos de ionización de barrido completo positivos y negativos en los mismos tiempos de retención ue los que se encuentran en cromatograma CL-radio. A continuación se obtuvieron los espectros de las masas de iones de producto y los espectros de masas de alta resolución para los iones moleculares correspondientes. Se propusieron estructuras posibles de metabolitos basándose en el análisis de sus patrones de fragmentos de masas.

Cuantificación de cabozantinib y sus metabolitos

[0124] La cuantificación de cabozantinib y sus metabolitos en muestras agrupadas o individuales de cada matriz en diferentes puntos de tiempo o intervalos de tiempo se basó en la integración de los picos correspondientes que se encuentran en sus radiocromatogramas. Para muestras de plasma, se calculó el porcentaje de la radiactividad total en la muestra para cada pico en cada punto temporal se y se convirtió en ng/ml.

[0125] Para la cuantificación de cabozantinib y sus metabolitos en plasma:

$$\text{ng/ml} = (\% \text{ de la radioactividad total}) \times (\text{total ng de equivalentes/ml para el punto de tiempo}) / 100$$

[0126] Los valores del total ng de equivalentes/ml se obtuvieron a partir de los resultados del estudio de balance de masas humano.

[0127] Para las muestras de orina agrupadas, se calculó el porcentaje de la radiactividad total en la muestra agrupada para cada pico como el % del no original total en las muestras agrupadas:

$$\% \text{ del no original total en las muestras agrupadas} = (\text{radioactividad total del pico} / \text{radioactividad total de los picos no originales}) \times 100$$

[0128] Para las muestras fecales agrupadas, se calculó el porcentaje de la radiactividad total en la muestra agrupada para cada pico como el porcentaje del no original más original en las muestras agrupadas:

$$\% \text{ del no original más original total en las muestras agrupadas} = (\text{radioactividad total del pico} / \text{radioactividad total de los picos no originales y originales}) \times 100$$

[0129] El porcentaje de la radiactividad total en la muestra agrupada para cada pico se convirtió en el porcentaje del original en las muestras agrupadas:

$$\% \text{ de original en las muestras agrupadas} = (\text{radioactividad total del pico} / \text{radioactividad total del pico original}) \times 100$$

[0130] Se ha definido el límite de cuantificación para un detector de radiactividad como la relación de señal a ruido (de 3 a 1) en el radio-cromatograma. Los límites inferiores de cuantificación fueron de 10 y 500 dpm para el TopCount y el detector de flujo radiológico β-RAM, respectivamente.

Resultados y discusión

Recuperación radiactiva

[0131] La recuperación de extracción inicial se determinó usando muestras de plasma de un sujeto a las 4 horas y 72 horas después de la dosis con tres volúmenes de extracción 3 veces de MeOH:ACN (20:80). Las recuperaciones de extracción promedio de radioactividad de las muestras de 4 y 72 horas fueron de 98,43% y 94,99%, respectivamente. Después de secar y la reconstitución en solución de MeOH:ACN, las recuperaciones de reconstitución fueron 92,73% y 85,90%, respectivamente. Las recuperaciones globales fueron 91,27% y 81,60%, respectivamente.

[0132] Las recuperaciones de orina por centrifugación determinadas usando muestras de 0-8, 24-48, 72-96, y 120-144 horas después de la dosis del sujeto varió entre 102% y 104%. La recuperación por reconstitución de la orina después de la liofilización fue del 94,7% utilizando muestras combinadas de un sujeto.

[0133] Para muestras fecales agrupadas de 0-48 horas después de la dosis, la extracción, la reconstitución, y recuperaciones globales fueron 98,48%, 88,80% y 87,37%, respectivamente. Para muestras fecales agrupadas de 120-168 horas después de la dosis, la extracción, la reconstitución y recuperaciones globales fueron 85,85%, 87,69% y 75,24%, respectivamente.

[0134] La recuperación de radiactividad de la columna de HPLC para la muestra de orina fue del 97,05%.

[0135] No se aplicó factor de corrección a la radio-cuantificación de plasma, orina y hecesde para justificar la recuperación.

Obtención de perfiles de metabolitos

[0136] En un sujeto, el cabozantinib, compuesto 9 (sulfato de cabozantinib), y el compuesto 19 (cabozantinib N-óxido) fueron los picos principales en los radiocromatogramas. El compuesto 2 (producto de escisión fluoroanilina desmetilado y sulfatado) fue el principal metabolito en muestras de plasma después de 72 horas después de la dosis. El compuesto de metabolito 7 (producto de escisión fluoroanilina) representó uno de los picos menores. Los compuestos de metabolitos 7, 3 (desmetil cabozantinib glucurónido B), 9 y 10 (éster de metilo de producto de escisión de fluoroanilina) coeluyeron utilizando el procedimiento de HPLC 1.

[0137] Se recogieron los perfiles de metabolitos de orina humanos representativos, los radiocromatogramas (utilizando el procedimiento de HPLC 1) de muestras de orina humana de 0-72 horas, 144-192 horas y 288-336 horas después de la dosis de un sujeto. El compuesto de metabolito 6 fue el principal metabolito en muestras de orina agrupadas 0-72 horas, 144-192 horas y 288-336 horas después de la dosis. Además de compuesto 6, los compuestos de metabolitos 1, 4, 5, 7, y 19 se observaron en la muestra agrupada de 0-72 horas después de la dosis. Los compuestos de metabolitos 1, 4, 5 y 7 se observaron en la muestra agrupada de 144-192 horas después de la dosis. Os compuestos de metabolitos 1 y 5 se detectaron en la muestra agrupada de 288-336 horas después de la dosis. El compuesto original cabozantinib no se observó en muestras de orina.

[0138] Los perfiles de metabolitos fecales humanas representativos, los radiocromatogramas (utilizando el procedimiento de HPLC 1) de muestras fecales humanas de 0-72 horas, 144-192 horas, y 288-336 horas después de la dosis de un Cabozantinib original y el compuesto de metabolito 4, 7, 11, y 15 (incluyendo el compuesto 16) se observaron en la muestra agrupada de 0-72 horas después de la dosis. Los compuestos de metabolitos 4, 7, 11, 15, 16 y 18 se observaron en la muestra agrupada de 144-192 horas después de la dosis. Los compuestos de metabolitos 4 y 11 se observaron en la muestra agrupada de 288-336 horas después de la dosis.

Identificación de metabolitos usando análisis de HPLC/MS

[0139] El análisis HPLC/MS de patrones auténticos utilizando el procedimiento de HPLC 1 mostró que los tiempos de retención de cabozantinib, producto de escisión fluoroanilina (compuesto 7), sulfato (compuesto 9), y N-óxido (compuesto 19) fueron 20,3, 14,4, 16,5 y 23,1 minutos, respectivamente.

[0140] Las muestras de plasma, orina y se analizaron a continuación mediante HPLC/MS, y los compuestos se identificaron en base a sus iones moleculares protonados y los patrones de fragmentación.

Identificación de metabolitos de cabozantinib y sus metabolitos en plasma humano

[0141] El espectro de masas del pico a aproximadamente 19,1 minutos en el XIC mostró los iones moleculares protonados a m/z 502. Su espectro de iones del producto mostró grandes fragmentos a m/z 391, 323, y 297, que es coherente con las del patrón de cabozantinib. Los datos de MS se resumen en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Tiempo de retención del radiocromatograma de HPLC de los metabolitos en muestras de dosis oral única de [¹⁴C] Cabozantinib

Compuesto	Procedimiento HPLC	Tiempo de retención (min)
Patrones		
7	1	14,13
9	1	16,45
1	1	20,26
19	1	23,06
Plasma		
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
Orina		
1	1	4,13
4	1	11,87
5	1	12,80
6	1	13,47
7	1	14,13
19	1	23,47
Heces		
4	1	12,67
7	1	13,47
11	1	16,07
15	1	17,87
I	1	19,60
18	1	21,03
Muestra agrupada de Hamilton		
Plasma		
9	3	17,36
Compuesto	Procedimiento HPLC	Tiempo de retención (min)
7	3	19,32
8	3	19,32 (hombro)
19	3	25,20
I	3	37,52

Tabla 2. Datos de MS para los metabolitos utilizando HPLC

Compuesto	Procedimiento de HPLC	Tiempo de retención de HPLC	MS /m/z)
I	1	19,10	502
19	1	21,85	518
9	1	15,29	518 (pérdida de SO ₃ del ione molecular m/z a m/z 598)
7	1	13,36	409
2a	1	10,70 (2a)	473,395 (pérdida de SO ₃ del ione molecular m/z a m/z 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

5 Actividad quinasa de metabolitos de cabozantinib

Dilución de quinasa

- [0142] La actividad de quinasa se midió y perfiló mediante EMD Millipore de acuerdo con la Kinase Profiler Service Assay Protocols Protocol Guide volumen 57. Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 3. La inhibición se indica como IC₅₀ con la siguiente leyenda: A = IC₅₀ menos de 50 nM, B = IC₅₀ mayor que 50 nM, pero menos de 500 nM, C = IC₅₀ mayor que 500 nM, pero menos de 5000 nM, y D = IC₅₀ mayor que 5000 nM. Dependiendo de la funcionalidad sobre la quinazolina o quinolina, los compuestos de ejemplo de la descripción muestran una selectividad para cualquiera de c-Met, KDR, c-Kit, flt-3 y flt-4. Las abreviaturas para las enzimas enumeradas en la Tabla 3 se definen de la siguiente manera: c-Met se refiere a receptor quinasa del factor de crecimiento de

hepatocitos; RET se refiere a quinasa de proto-oncogén RET; KDR se refiere a quinasa de tirosina quinasa del dominio de inserción; Flt-1 alfa, flt-3, y flt-4, tirosina quinasas similar a fms, representantes de la familia FLK de receptores tirosina quinasas; y Aurora B MP se refiere a Aurora B quinasa. Cuando un porcentaje aparece en lugar de un valor IC₅₀, se indica porcentaje de inhibición a 1 µM. Las celdas vacías en las tablas indican solo la falta de datos.

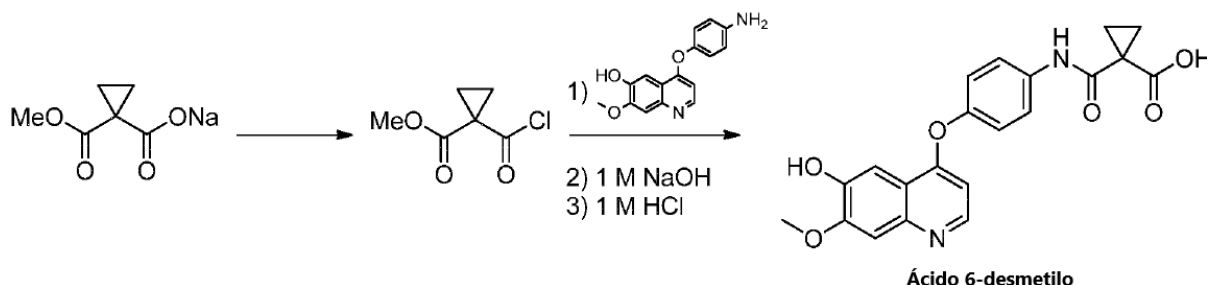
Tabla 3. Actividad de quinasa

Compuesto ID	ESTRUTURA MOL	Patrón c-Met (IC ₅₀) (nM)	Patrón RET (IC ₅₀) (nM)	Patrón KDR (IC ₅₀) (nM)	Flt-1 alfa (IC ₅₀) (nM)	Patrón Flt-3 (IC ₅₀) (nM)	Patrón Flt-4 (IC ₅₀) (nM)	Patrón Aurora B MP 8pt (IC ₅₀) (nM)
Cabozantinib		A	A	A	A	A	A	
16		A		A	C	A		B
13		A		A	C	A		B
2a		≥50% a 1 µM	≤25% a 1 µM	≤25% a 1 µM	≤25% a 1 µM	≤25% a 1 µM	≥25% a 1 µM	≤25% a 1 µM
2b								
9		≥75% a 1 µM	≥75% a 1 µM	≤25% a 1 µM	≥50% a 1 µM	≥50% a 1 µM	≥75% a 1 µM	≥75% a 1 µM
19		B		B		C		C
7		D		D		C		C

Síntesis de metabolitos y datos estructurales

Ácido 6-desmetilo

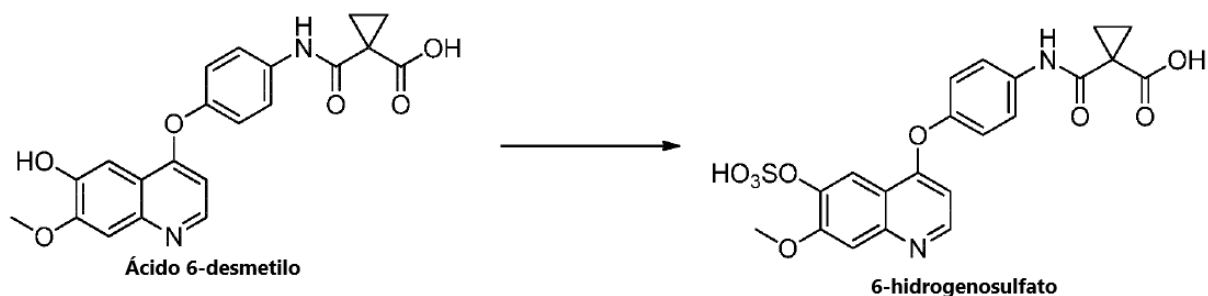
[0143]



[0144] En un recipiente, 4-(4-aminofenoxi)-7-metoxiquinolin-6-ol (15,0 g; 53,3 mmol), que se preparó de acuerdo con el Esquema 4, y carbonato de potasio (29,5 g; 213,3 mmol; 4 equiv) se suspendieron en THF (210 ml; 14 vol) y agua (90 ml; 6 vol) a 20°C. En un recipiente separado, 1-(metoxicarbonil)ciclopropanocarboxilato de sodio (17,71 g; 106,6 mmol; 2 equiv) se suspendió en THF (90 ml; 6 vol). Se añadió DMF (3% mol; 120 µl) y se enfrió a menos de 15°C. Se añadió cloruro de oxalilo (2 equiv; 9,34 ml; 106,6 mmol) durante 90 minutos, y la reacción se envejeció 2 horas a 10-15°C. La suspensión de cloruro de ácido se añadió a la suspensión de cabozantinib a lo largo de 2 horas a 20-25°C y se envejeció al menos 3 horas, después de lo cual el análisis por HPLC mostró una conversión mayor del 99% a una mezcla del material monocarbonilado y biscarbonilado. La mezcla de reacción se filtró sobre Celite®, se lavó con THF (30 ml; 2 vol), y las capas se separaron. Se añadió NaOH 1 M (150 ml; 10 vol.) a la capa de THF superior y la mezcla se calentó a 40°C durante 1 hora, después de lo cual el análisis por HPLC mostró más de un 99% de producto saponificado. La mezcla se enfrió a 25°C y se separó la capa de THF superior. La capa acuosa se acidificó a pH 3-4 con HCl 1 M para precipitar el producto y se envejeció durante 1 hora. El precipitado se filtró, se lavó con agua (90 ml, 6 vol) y se secó a vacío con purga de nitrógeno a 50°C para dar un polvo de color gris a marrón. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 10,8-11,0 (br s, 1H), 10,7 (s, 1H), 8,65 (d, 6,9 Hz, 1H), 7,81 (d, 9,3 Hz, 2H), 7,67 (s, 1H), 7,58 (s, 1H), 7,32 (d, 9,3 Hz, 2H), 6,69 (d, 6,9 Hz, 1H), 4,01 (s, 3H), 2,48-2,53 (m, 4H). MS (ESI-) m/z 393 [MH]⁻.

Ácido 6-hidrógeno sulfato 6-desmetilo

[0145]

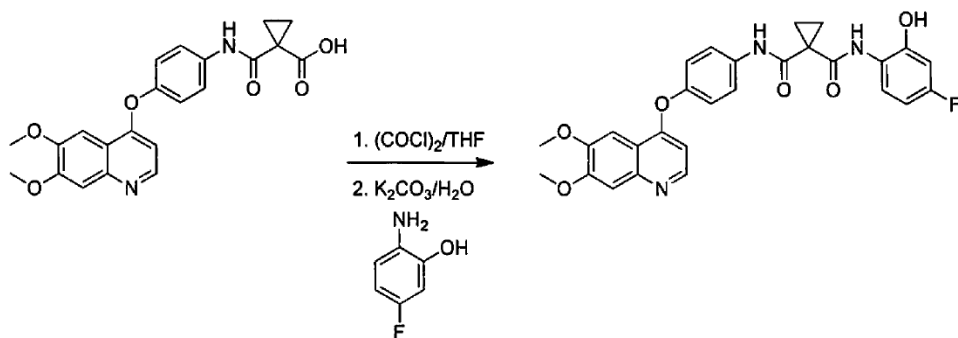


[0146] Se disolvieron ácido 6-desmetilo (120 mg; 0,30 mmol), hidróxido de potasio (118 mg; 2,1 mmol; 7 equiv), y complejo de trióxido de azufre y trimetil amina (292 mg; 2,1 mmol; 7 equiv) en agua (3 ml; 25 vol) y se calentaron a 70°C durante 2 horas, tras lo cual el análisis por HPLC mostró una conversión mayor que 99%. La mezcla de reacción se enfrió entonces en un baño de hielo y se acidificó gota a gota con H₂SO₄ ac. 1 N a aproximadamente pH 1. La suspensión se envejeció a 25°C durante 1 hora, se filtró, se lavó con agua (3 ml; 25 vol) y se eliminaron las aguas madres. La torta húmeda se lavó con acetona (3 ml; 25 vol) y se secó a 35°C a vacío con purga de nitrógeno durante 24 horas para dar un polvo de color beige.

[0147] Alternativamente, el ácido 6-desmetilo (120 mg 0,30 mmol) se suspendió en MeCN (50 vol, 6 ml), y se añadió trietilamina (1,27 ml, 9,12 mmol, 30 equiv.) y a continuación se enfrió en un baño de hielo. Se añadió ácido clorosulfónico (101 µl, 1,52 mmol, 5 equiv.) gota a gota, y la reacción se calentó a continuación a 70°C, durante 1 hora, después de lo cual un análisis por HPLC mostró una conversión mayor del 98 por ciento. La mezcla de reacción se enfrió entonces en un baño de hielo durante 2 horas en el que se formó un precipitado. El precipitado se separó por filtración, aclarando con MeCN frío (50 vol). A continuación, la solución de MeCN se concentró hasta aproximadamente 20 vol (aproximadamente 2 ml) y se inactivó con 100 vol de HCl 1 N y se enfrió en un baño de hielo para dar un precipitado fino que se filtró, se lavó con 50 vol de agua y 50 vol acetona, y se secó a 35°C a vacío con purga de nitrógeno durante 24 horas para dar un polvo de color beige. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 10,8 (s, 1H), 8,83 (d, 5,9 Hz, 1H), 8,5 (s, 1H), 7,85 (d, 8,5 Hz, 2H), 7,52 (s, 1H), 7,40 (d, 8,5 Hz, 2H), 6,84 (d, 5,9 Hz, 1H), 4,04 (s, 3H), 3,20-3,70 (br s, 1H), 1,39-1,48 (br s, 4H). MS (ESI-) m/z 473 [MH]⁻, 236.

Orto-hidroxi-Cabozantinib

[0148]



[0149] Se cargó un matraz con el ácido carboxílico (0,84 g; 2,1 mmol), THF (1,2 ml) y DMF (5 µl), y se enfrió a 15°C. A esta suspensión se añadió cloruro de oxalilo (0,17 ml; 2,1 mmol) gota a gota durante aproximadamente 20 minutos. Después de 2 horas, se añadió la suspensión de cloruro de ácido a otro recipiente que contenía una suspensión agitada de la anilina (0,2 g, 1,6 mmol), carbonato de potasio (0,63 g, 4,6 mmol) en THF (2,8 ml), y agua (1 ml) durante aproximadamente 15 minutos. Después de 3 horas, el análisis de HPLC mostró la conversión completa en el producto. Se detuvo la agitación, se etrajo la capa acuosa inferior y se añadió agua (30 ml) para precipitar el producto. A continuación, el producto se recogió por filtración y se lavó con solución 1:1 de THF-agua (2 x 10 ml) para proporcionar un sólido de color gris pálido. A continuación, se purificó adicionalmente por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando metanol/diclorometano como fase móvil.

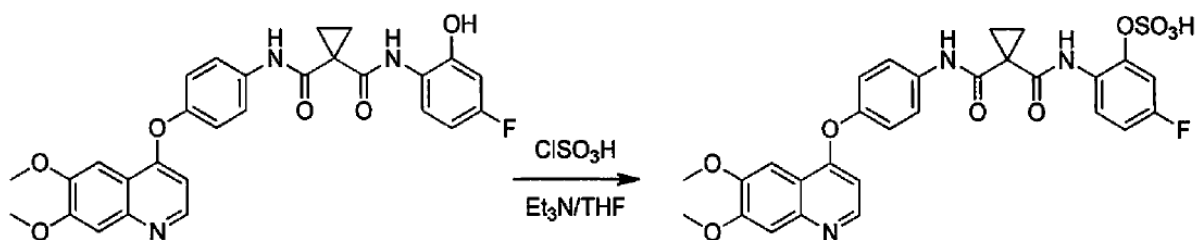
[0150] Alternativamente, una suspensión del ácido carboxílico (4,08 g; 10 mmol), anilina (1,52 g; 12 mmol), y trietilamina (2,7 ml; 20 mmol) en acetonitrilo (100 ml) se trató con EDAC (2,30 g; 12 mmol) y HOBt (0,5 g; 3

mmol). La suspensión se agitó durante la noche a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se controló mediante HPLC. Al final de la reacción, se añadieron 150 ml de agua y el producto precipitado se recogió por filtración, se lavó con agua y a continuación se purificó mediante cromatografía ultrarrápida. ¹ H-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) 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). ¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz) 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.

MS (APCI +) m/z 518,3 [M + H]⁺, 500,3.

Cabozantinib-Hidroxisulfato

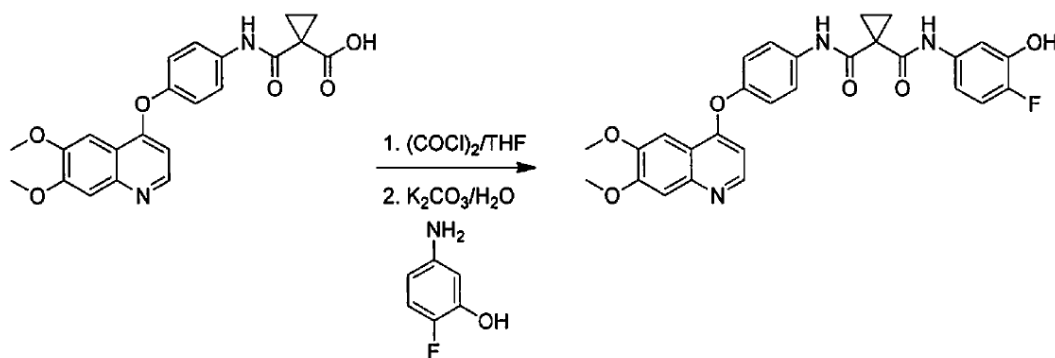
[0151]



[0152] A una suspensión de la hidroxi-cabozantinib (0,95 g 1,9 mmol) en THF (20 ml) se añadió trietilamina (5 ml; 36 mmol) y se enfrió hasta por debajo de 5°C. Se añadió gota a gota de ácido clorosulfónico (15 mmol; 1 ml) de tal manera que la temperatura permaneció por debajo de 10°C, durante aproximadamente 15 minutos. Después de agitar durante la noche a temperatura ambiente, el análisis por HPLC mostró aproximadamente un 5 por ciento de material de partida restante. La mezcla de reacción se trató con HCl acuoso 1 N (25 ml). El producto precipitado se recogió por filtración, se lavó con agua (4 x 25 ml), y se secó bajo vacío para producir un sólido de color blanquecino (937 mg; 82 por ciento de rendimiento en bruto). El análisis por AN-HPLC mostró que el producto era un 90,8% puro, siendo la impureza principal el material de partida. El producto se purificó a más del 99 por ciento (AN-HPLC) mediante HPLC preparativa en una columna C18, usando el sistema de acetato de amonio acuoso/acetonitrilo como fase móvil. ¹ H-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) 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). MS (ESI-) m/z 596,0 [MH]⁻.

Meta-hidroxi-Cabozantinib

[0153]

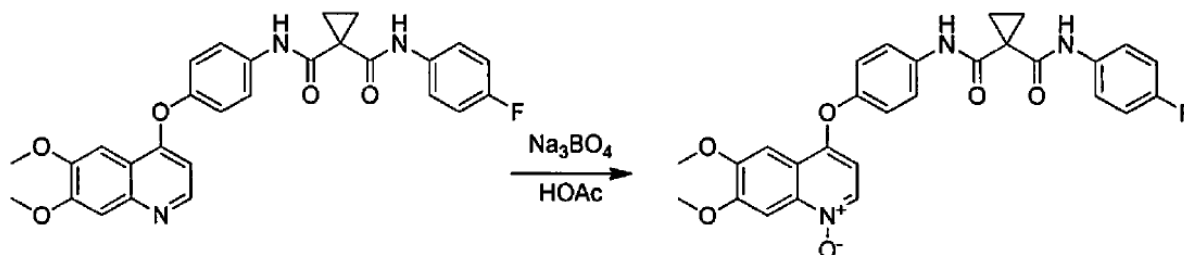


[0154] Se cargó un matraz con el ácido carboxílico (0,84 g; 2,1 mmol), THF (1,2 ml) y DMF (5 µl) y se enfrió a 15°C. A esta suspensión se añadió cloruro de oxalilo (0,17 ml; 2,1 mmol) gota a gota durante aproximadamente 20 minutos. Después de 2 horas, se añadió la suspensión de cloruro de ácido a otro recipiente que contenía una suspensión agitada de la anilina (0,2 g, 1,6 mmol), carbonato de potasio (0,63 g, 4,6 mmol) en THF (2,8 ml), y agua (1 ml) durante aproximadamente 15 minutos. Después de 90 minutos, el análisis HPLC mostró la conversión completa en el producto. La agitación se detuvo, y la capa acuosa inferior se separó y se extrajo con acetato de etilo (15 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró para producir un sólido marrón. El sólido se purificó adicionalmente por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice usando

acetato de etilo/heptano como fase móvil. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) 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). ¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz) 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. MS (APCI +) m/z 518,3 [M + H]⁺, 502,3.

N-óxido de Cabozantinib

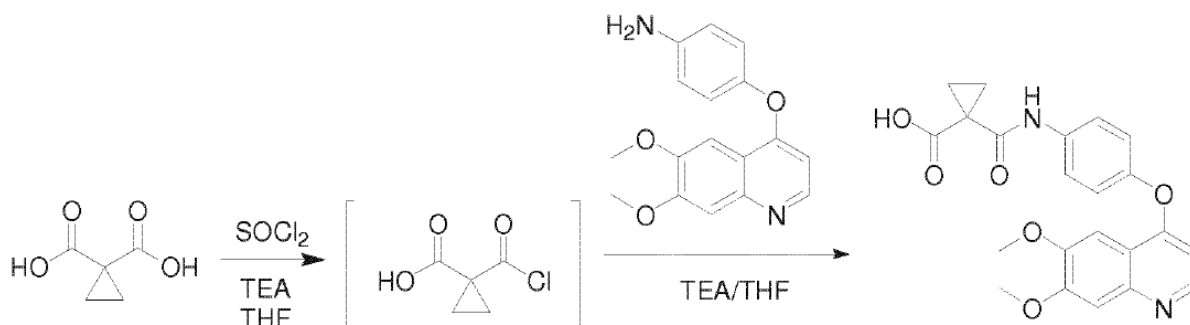
[0155]



[0156] Se cargó un matraz con cabozantinib (3,21 g; 6,4 mmol), ácido acético (32,1 ml) y perborato de sodio tetrahidratado (1,98 g, 12,8 mmol) y se calentó a 65°C y se agitó durante la noche. Después de 24 horas, el análisis por HPLC mostró aproximadamente 38:62 del material de partida:producto. Se añadió más oxidante (12,8 mmol 1,98 g) y se continuó el calentamiento durante la noche. Los disolventes se eliminaron a vacío y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida usando gradiente de diclorometano-metanol (diclorometano a 10% de metanol-diclorometano) para obtener 0,95 g del producto como un sólido blanco. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) 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 (s ancho, 4H). ¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz) 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. MS (APCI +) m/z 518,3 [M + H]⁺.

Ácido 1-[4-(6,7-Dimetoxi-quinolin-4-iloxi)fenilcarbamoi]l-ciclopropano carboxílico

[0157]



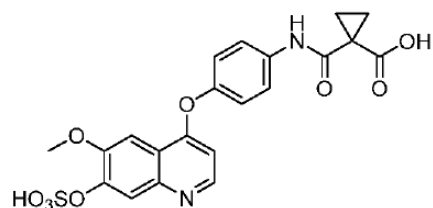
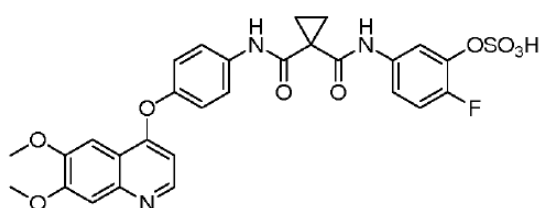
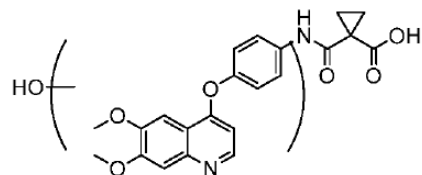
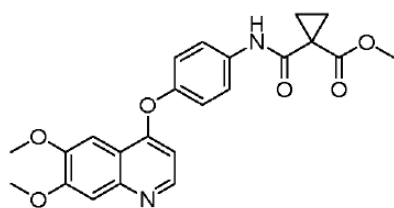
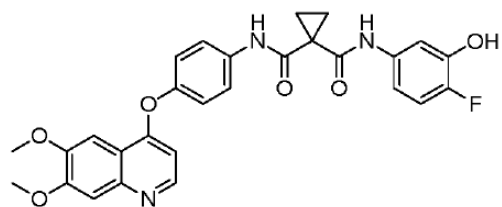
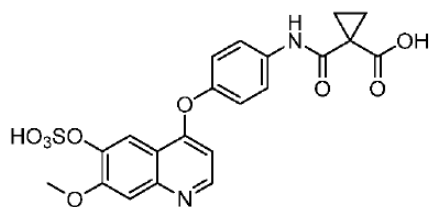
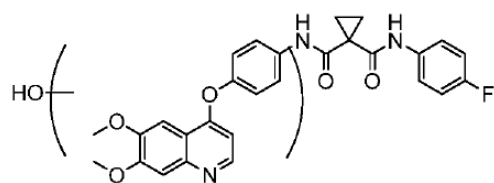
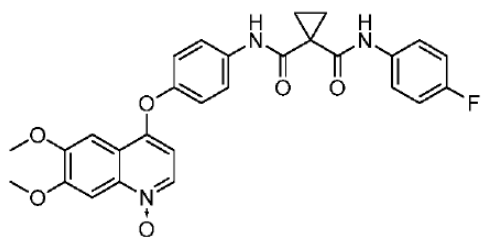
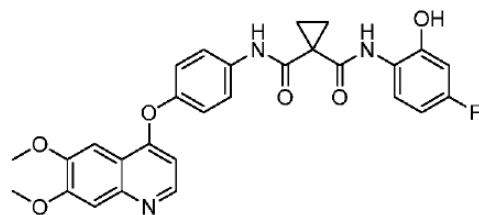
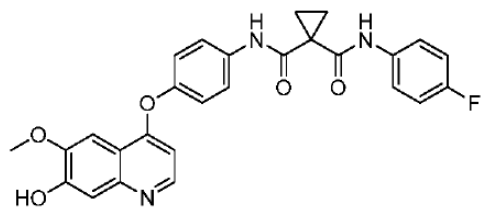
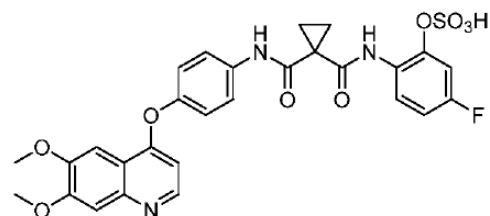
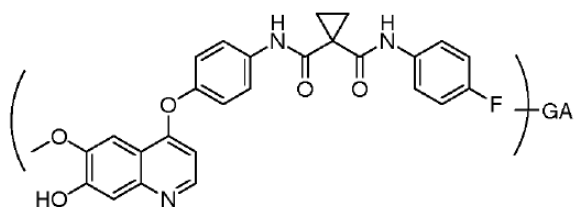
[0158] Al ácido ciclopropil-dicarboxílico (449 mg, 3,45 mmol) en THF (3,5 ml) se añadió TEA (485 µl, 3,45 mmol). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno durante 40 minutos antes de añadir cloruro de tionilo (250 µl, 3,44 mmol). La reacción se controló por CLMS para la formación de cloruro de monoácido (se inactivó la muestra con MeOH y se buscó el correspondiente éster monometílico). Después de 3 horas de agitación a temperatura ambiente, se añadió 4-(6,7-dimetoxi-quinolin-4-iloxi)-fenilamina (1,02 g, 3,44 mmol) como un sólido, seguido de más THF (1,5 ml). La reacción continuó en agitación a temperatura ambiente durante 16 horas. La suspensión espesa resultante se diluyó con EtOAc (10 ml) y se extrajo con NaOH 1N. La suspensión bifásica se filtró, y la fase acuosa se acidificó con HCl concentrado a pH de aproximadamente 6 y se filtró. Ambos sólidos se combinaron y se lavaron con EtOAc, después se secaron bajo vacío. Se obtuvo el producto deseado, ácido 1-[4-(6,7-dimetoxi-quinolin-4-iloxi)-fenilcarbamoi]l-ciclopropanocarboxílico, (962 mg, 68,7 por ciento de rendimiento, 97 por ciento de pureza) como un sólido blanco. ¹H RMN (D₂O/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).

[0159] La descripción anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo para propósitos de

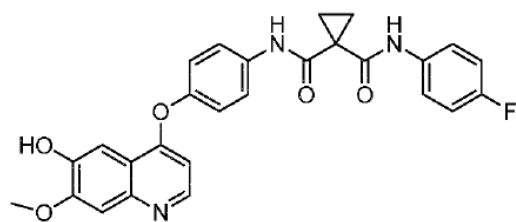
- 5 claridad y comprensión. La invención se ha descrito con referencia a diversas realizaciones y técnicas específicas y preferidas. Será obvio para un experto en la técnica que se pueden realizar cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Por lo tanto, debe entenderse que la descripción anterior pretende ser ilustrativa y no restrictiva. El alcance de la invención debe, por lo tanto, determinarse no con referencia a la descripción anterior, sino en su lugar con referencia a las siguientes reivindicaciones adjuntas, junto con el alcance completo de los equivalentes a los que tales reivindicaciones tienen derecho.

REIVINDICACIONES

1. Metabolito aislado de cabozantinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que es un compuesto seleccionado de:

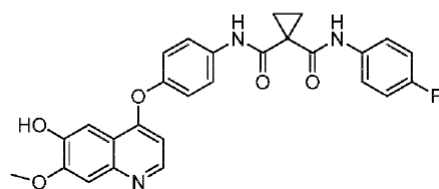
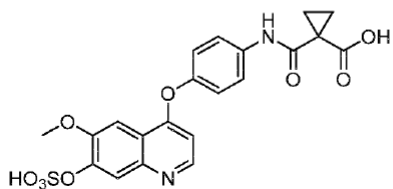
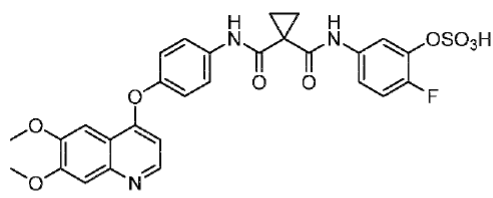
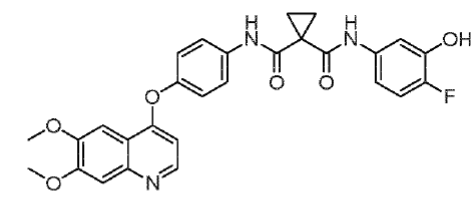
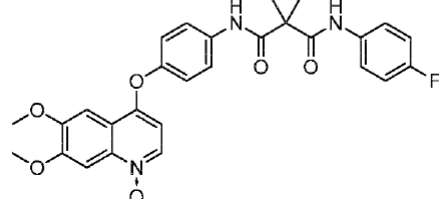
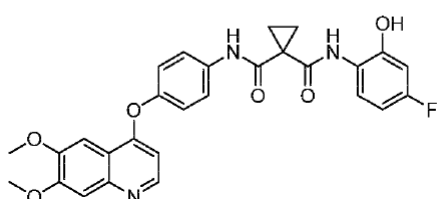
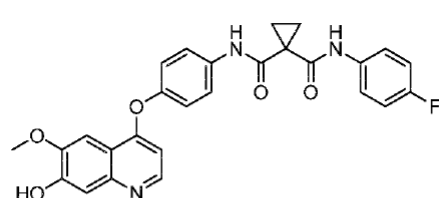
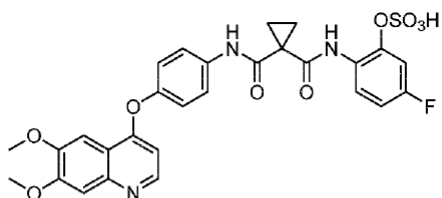


y



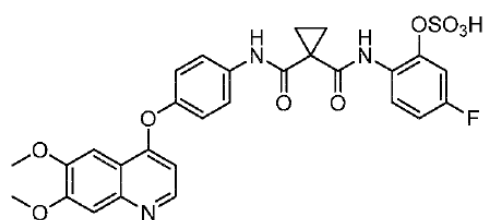
en la que GA es un resto de ácido glucurónico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Metabolito aislado, según la reivindicación 1, que se selecciona entre:



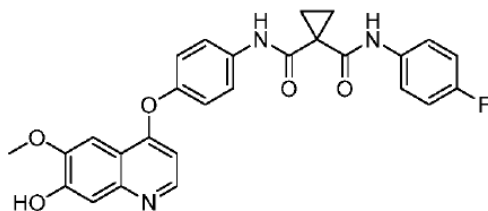
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. Metabolito aislado, según la reivindicación 1, que es



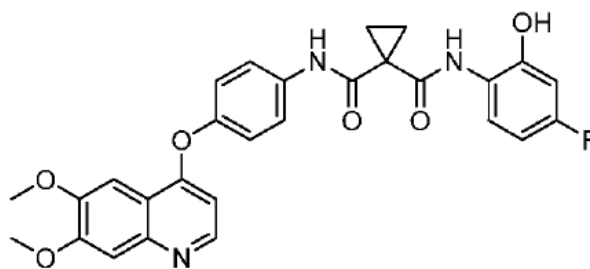
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. Metabolito aislado, según la reivindicación 1 que es



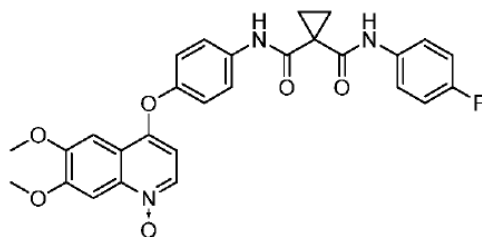
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. Metabolito aislado, según la reivindicación 1 que es



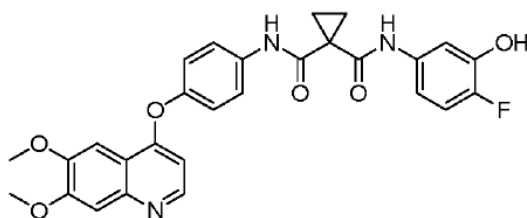
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. Metabolito aislado, según la reivindicación 1 que es



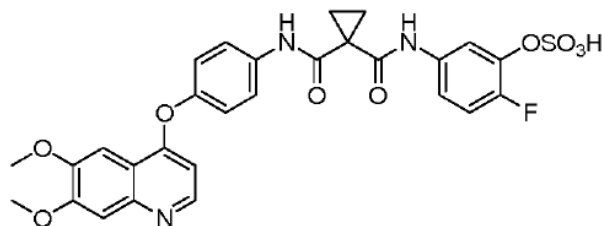
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

7. Metabolito aislado, según la reivindicación 1 que es



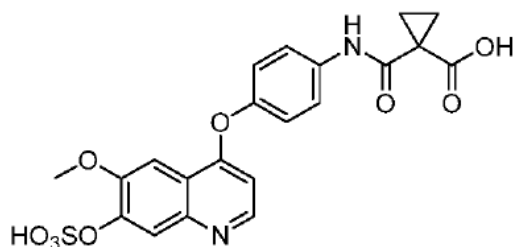
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

8. Metabolito aislado, según la reivindicación 1 que es



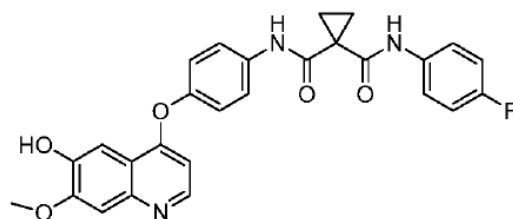
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

9. Metabolito aislado, según la reivindicación 1, que es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

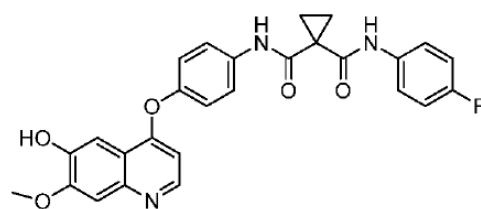
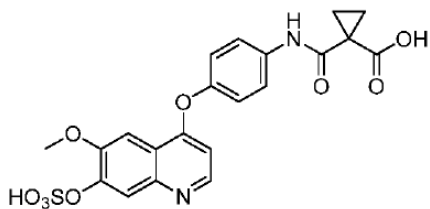
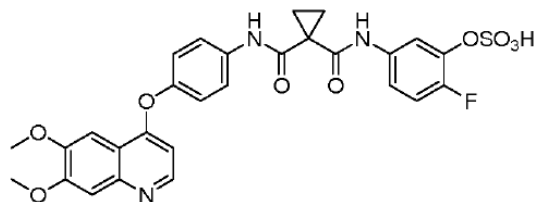
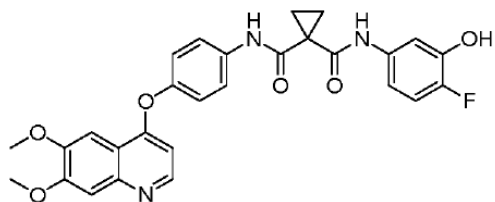
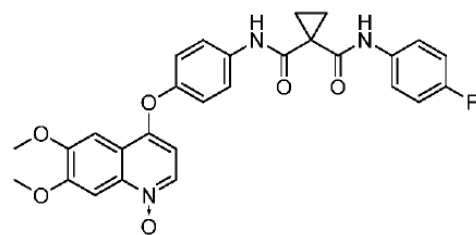
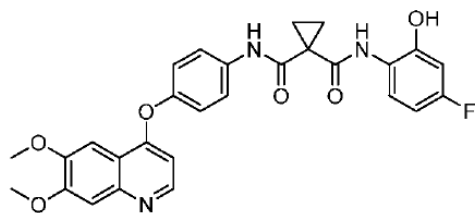
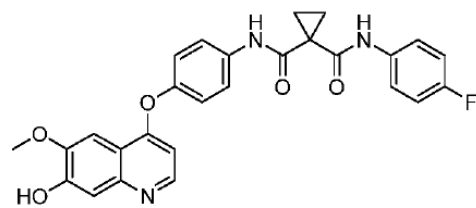
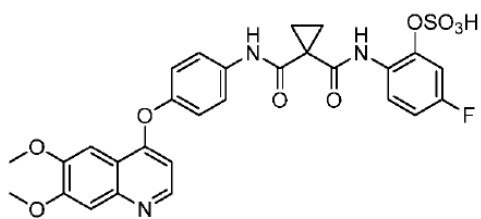
10. Metabolito aislado, según la reivindicación 1, que es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

11. Compuesto para usar en el tratamiento de enfermedades o trastornos asociados con actividades celulares no controladas, anormales y/o no deseadas, en el que el compuesto es un metabolito aislado de cabozantinib o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

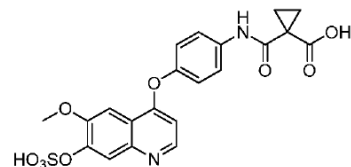
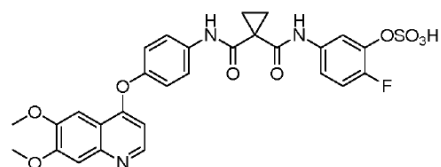
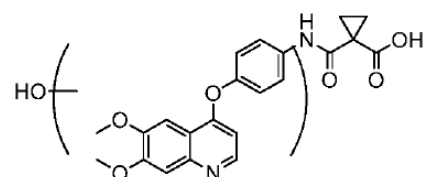
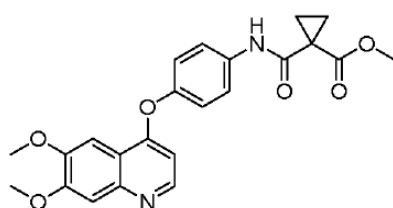
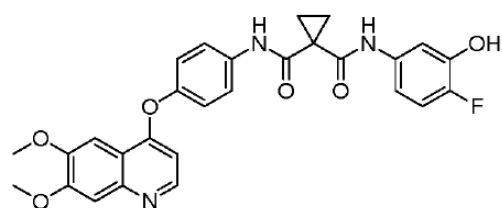
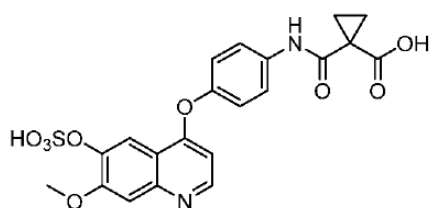
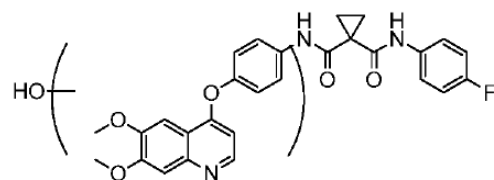
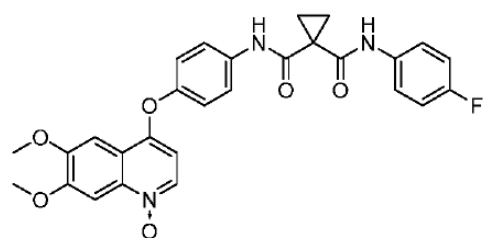
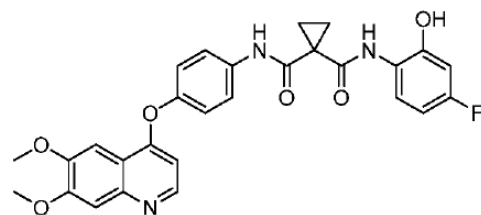
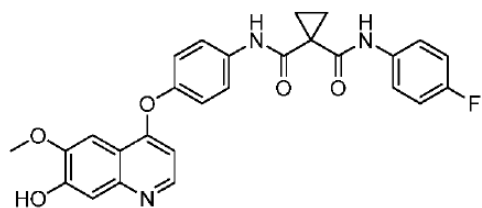
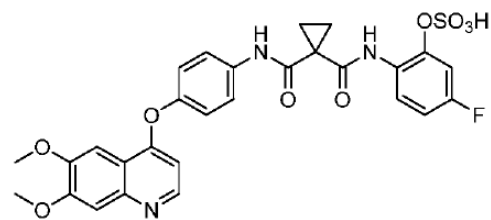
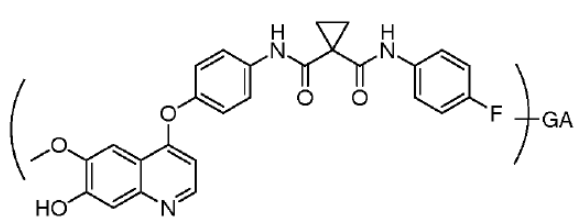
12. Composición farmacéutica que comprende un metabolito de cabozantinib que es un compuesto seleccionado de:



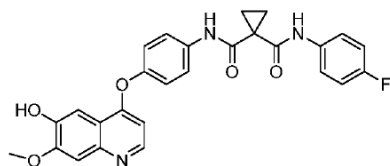
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

13. Composición, según la reivindicación 12, que es adecuada para la administración oral.

14. Compuesto que se selecciona entre:



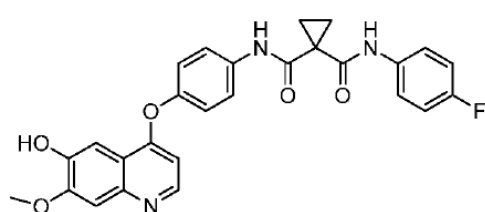
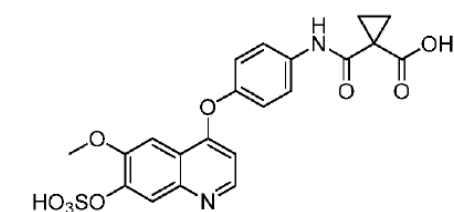
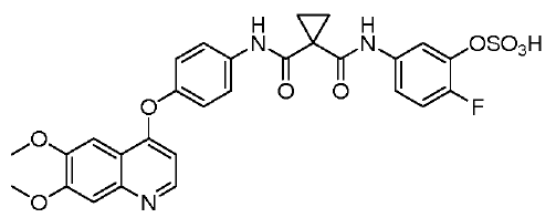
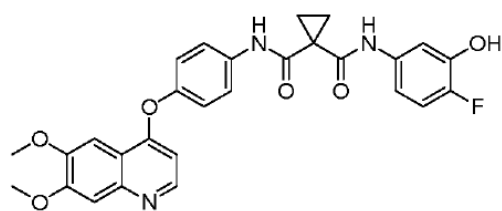
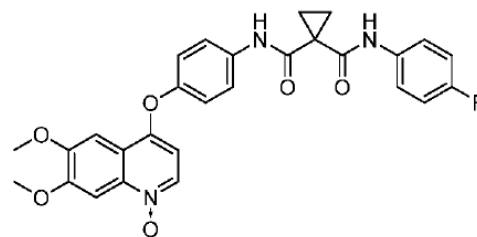
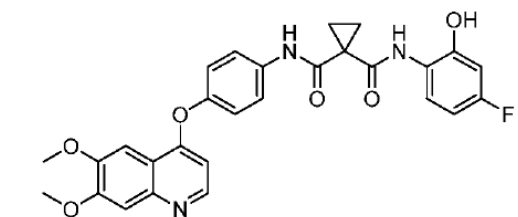
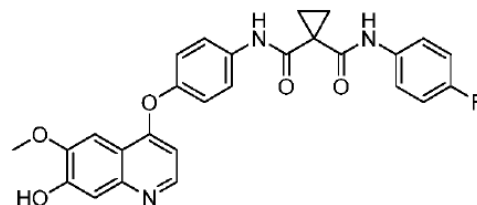
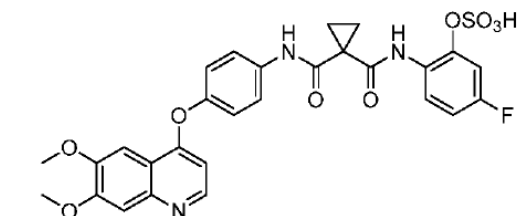
y



,

en la que GA es un resto de ácido glucurónico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15. Compuesto, según la reivindicación 14, que se selecciona entre:

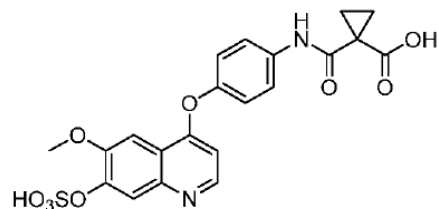
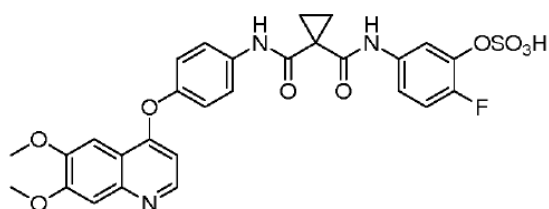
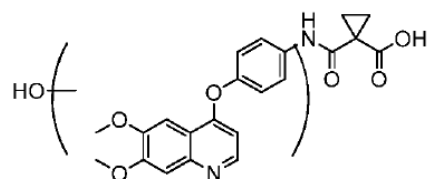
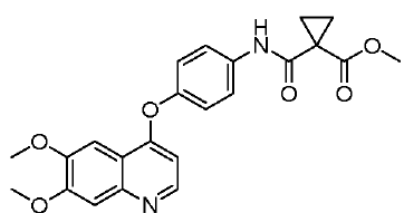
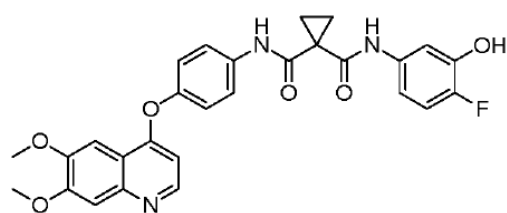
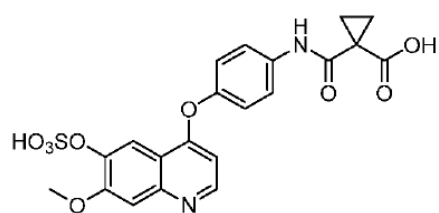
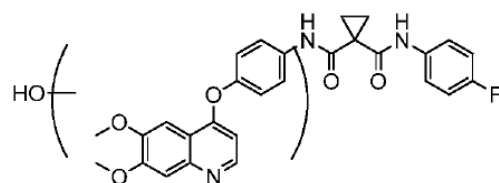
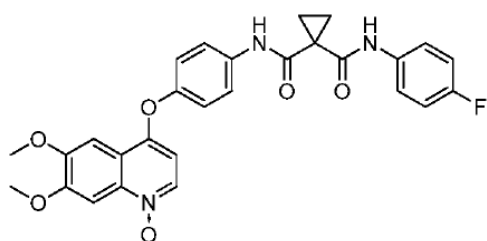
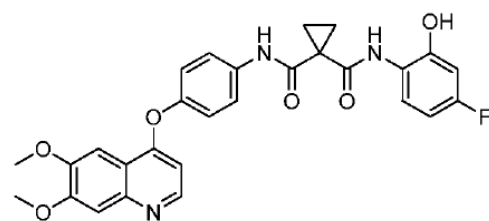
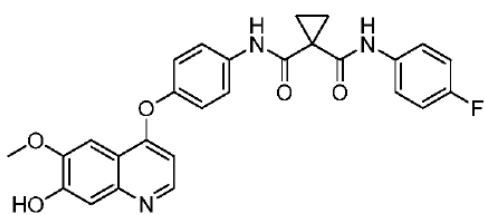
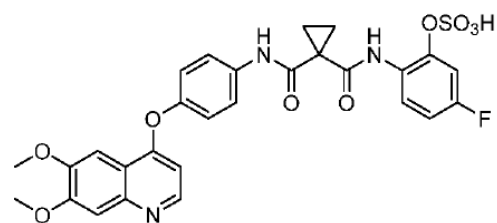
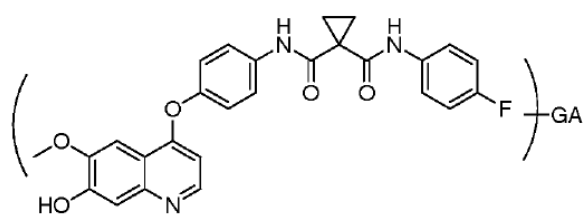


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

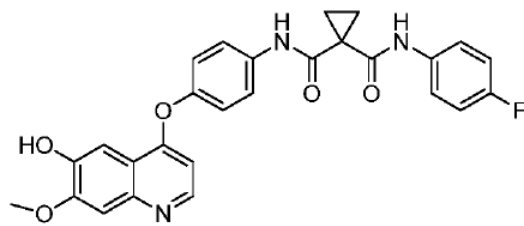
16. Procedimiento para identificar un metabolito de cabozantinib, que comprende:

detectar o medir un nivel o concentración de un metabolito de N-(4-[[6,7-bis(metilo)quinolin-4-il]oxi]fenil)-N'-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida en una muestra de tejido o fluido corporal de un mamífero al que se ha administrado cabozantinib;

en el que el metabolito se selecciona del grupo que consiste en:

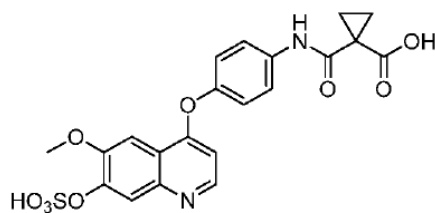
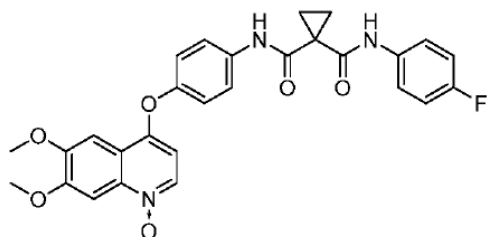
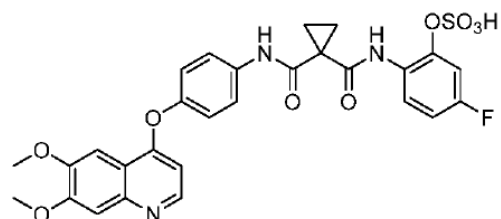
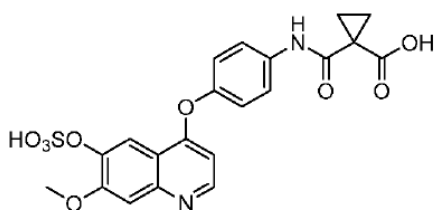
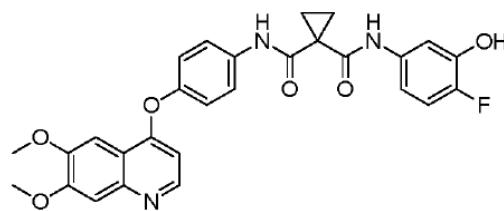
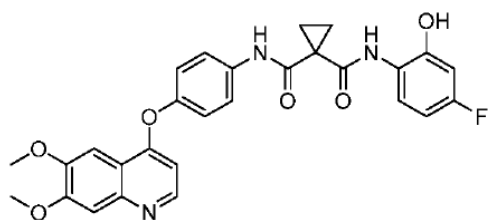


y

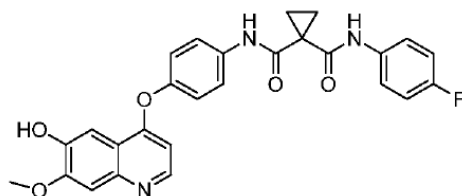


en la que GA es un resto de ácido glucurónico.

17. Procedimiento, según la reivindicación 16, en el que el metabolito se selecciona entre:



y



18. Procedimiento, según la reivindicación 16, en el que el fluido corporal se selecciona del grupo que consiste en plasma, bilis, orina y heces.