



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112015008174-6 B1



(22) Data do Depósito: 11/10/2013

(45) Data de Concessão: 27/12/2022

(54) Título: CONJUGADOS DE PIRROLOBENZODIAZEPINA-ANTICORPO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO DITOS CONJUGADOS E USOS DOS MESMOS PARA TRATAR DOENÇA PROLIFERATIVA E CÂNCER

(51) Int.Cl.: A61P 39/00; A61K 47/48; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 12/10/2012 US 61/712,924; 12/10/2012 US 61/712,928; 14/03/2013 US 61/784,421; 14/03/2013 US 61/784,383; 14/03/2013 US 61/784,362.

(73) Titular(es): MEDIMMUNE LIMITED; ADC THERAPEUTICS SA.

(72) Inventor(es): PATRICIUS HENDRIKUS CORNELIS VAN BERKEL; PHILIP WILSON HOWARD.

(86) Pedido PCT: PCT EP2013071346 de 11/10/2013

(87) Publicação PCT: WO 2014/057117 de 17/04/2014

(85) Data do Início da Fase Nacional: 13/04/2015

(57) Resumo: CONJUGADOS DE PIRROLOBENZODIAZEPINA-ANTICORPO. Conjugados de um anticorpo que se liga a CD19 com dímeros de PBD.

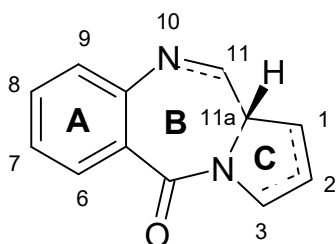
“CONJUGADOS DE PIRROLOBENZODIAZEPINA-ANTICORPO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO DITOS CONJUGADOS E USOS DOS MESMOS PARA TRATAR DOENÇA PROLIFERATIVA E CÂNCER”

[001]A presente invenção refere-se a pirrolobenzodiazepinas (PBDs) tendo um grupo de proteção de C2 ou N10 lábil na forma de um ligador a um anticorpo.

Fundamentos da invenção

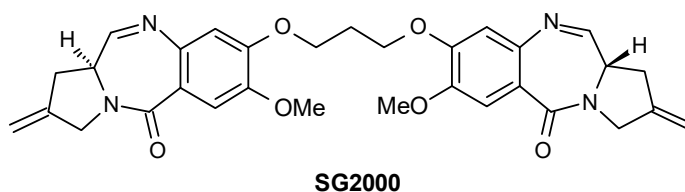
Pirrolobenzodiazepinas

[002]Algumas pirrolobenzodiazepinas (PBDs) têm a capacidade de reconhecer e ligar-se a sequências específicas de DNA; a sequência preferida é PuGpu. O primeiro antibiótico antitumoral de PBD, antramizina, foi descoberto em 1965 (Leimgruber, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 5793 - 5795 (1965); Leimgruber, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 5791 - 5793 (1965)). Desde então, várias PBDs que ocorrem naturalmente foram relatadas, e mais de 10 vias sintéticas foram desenvolvidas para uma variedade de análogos (Thurston, *et al.*, *Chem. Rev.* 1994, 433 - 465 (1994); Antonow, D. e Thurston, D.E., *Chem. Rev.* 2011 111 (4), 2815 - 2864). Membros da família incluem abeimizina (Hochlowski, *et al.*, *J. Antibiotics*, 40, 145 - 148 (1987)), quicamicina (Konishi, *et al.*, *J. Antibiotics*, 37, 200 - 206 (1984)), DC-81 (Patente Japonesa 58-180 487; Thurston, *et al.*, *Chem. Brit.*, 26, 767 - 772 (1990); Bose, *et al.*, *Tetrahedron*, 48, 751 - 758 (1992)), mazetramizina (Kuminoto, *et al.*, *J. Antibiotics*, 33, 665 - 667 (1980)), neotramizinas A e B (Takeuchi, *et al.*, *J. Antibiotics*, 29, 93 - 96 (1976)), porotramizina (Tsunakawa, *et al.*, *J. Antibiotics*, 41, 1366 - 1373 (1988)), protracarcina (Shimizu, *et al.*, *J. Antibiotics*, 29, 2492 - 2503 (1982); Langley e Thurston, *J. Org. Chem.*, 52, 91 - 97 (1987)), sibanomicina (DC-102) (Hara, *et al.*, *J. Antibiotics*, 41, 702 - 704 (1988); Itoh, *et al.*, *J. Antibiotics*, 41, 1281 - 1284 (1988)), sibiromicina (Leber, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 2992 - 2993 (1988)) e tomamicina (Arima, *et al.*, *J. Antibiotics*, 25, 437 - 444 (1972)). PBDs são da estrutura geral:



[003]Elas diferem no número, tipo e posição dos substituintes, tanto em seus anéis A aromáticos quanto anéis C de pirrolo, e no grau de saturação do anel C. No anel B existe uma imina (N=C), uma carbinolamina (NH-CH(OH)), ou um éter metílico de carbinolamina (NH-CH(OMe)) na posição N10-C11 que é o centro eletrofílico responsável por alquilar o DNA. Todos os produtos naturais conhecidos têm uma configuração (S) na posição C11a quiral que os fornece com uma rotação no sentido horário quando observada do anel C para o anel A. isto fornece aos mesmos a forma tridimensional apropriada para isso-helicidade com a ranhura menor do DNA de forma B, levando a um ajuste compacto no sítio de ligação (Kohn, Em *Antibiotics III*. Springer-Verlag, Nova Iorque, páginas 3 - 11 (1975); Hurley e Needham-VanDevanter, *Acc. Chem. Res.*, 19, 230 - 237 (1986)). Sua capacidade de formar um aduto na ranhura menor, permite que eles interfiram com o processamento de DNA, conseqüentemente seu uso como agentes antitumorais.

[004]Um composto de pirrolobenzodiazepina particularmente vantajoso é descrito por Gregson *et al.* (*Chem. Commun.* 1999, 797 - 798) como composto 1, e por Gregson *et al.* (*J. Med. Chem.* 2001, 44, 1161 - 1174) como composto 4a. Este composto, também conhecido como SG2000, é mostrado abaixo:



[005]WO 2007/085930 descreve a preparação de compostos de PBD diméricos tendo grupos ligadores para conexão a um agente de ligação celular, tal como um anticorpo. O ligador está presente na ponte ligando as unidades de PBD mono-

méricas do dímero.

[006]Os presentes inventores descreveram compostos de PBD diméricos tendo grupos ligadores para conexão a um agente de ligação celular, tal como um anticorpo, em WO 2011/130613 e WO 2011/130616. O ligador nestes compostos é ligado ao núcleo de PBD por intermédio da posição C2, e é geralmente clivado pela ação de uma enzima no grupo ligador. Em WO 2011/130598, o ligador nestes compostos é ligado a uma das posições N10 disponíveis no núcleo de PBD, e é geralmente clivado pela ação de uma enzima no grupo ligador.

Conjugados de anticorpo-fármaco

[007]Terapia com anticorpo foi estabelecida para o tratamento alvejado de pacientes com câncer, transtornos imunológicos e angiogênicos (Carter, P. (2006) *Nature Reviews Immunology* 6:343 - 357). O uso de conjugados de anticorpo-fármaco (ADC), isto é, imunoconjugados, para a liberação local de agentes citotóxicos ou citostáticos, isto é fármacos para matar ou inibir células tumorais no tratamento de câncer, alveja a liberação da porção do fármaco a tumores, e acúmulo intracelular nesta, ao passo que a administração sistêmica destes agentes medicamentosos não conjugados pode resultar em níveis inaceitáveis de toxicidade a células normais (Xie *et al* (2006) *Expert. Opin. Biol. Ther.* 6(3):281 - 291; Kovtun *et al* (2006) *Cancer Res.* 66(6):3214 - 3121; Law *et al* (2006) *Cancer Res.* 66(4):2328 - 2337; Wu *et al* (2005) *Nature Biotech.* 23(9):1137 - 1145; Lambert J. (2005) *Current Opin. in Pharmacol.* 5:543 - 549; Hamann P. (2005) *Expert Opin. Ther. Patents* 15(9):1087 - 1103; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207 - 212; Trail *et al* (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328 - 337; Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605 - 614).

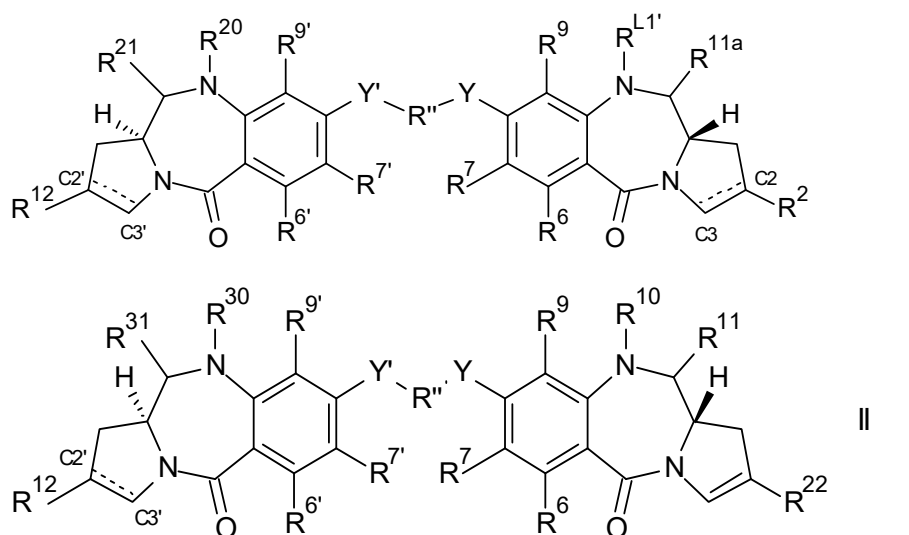
[008]A eficácia máxima com toxicidade mínima é procurada desse modo. Esforços para projetar e refinar ADC focaram na seletividade dos anticorpos monoclonais (mAbs) assim como mecanismo de ação do fármaco, ligação do fármaco, razão

de fármaco/anticorpo (carga), e propriedades de liberação de fármaco (Junutula, *et al.*, 2008b *Nature Biotech.*, 26(8):925 - 932; Dornan *et al* (2009) *Blood* 114(13):2721 - 2729; US 7521541; US 7723485; WO2009/052249; McDonagh (2006) *Protein Eng. Design & Sel.* 19(7): 299 - 307; Doronina *et al* (2006) *Bioconj. Chem.* 17:114 - 124; Erickson *et al* (2006) *Cancer Res.* 66(8):1 - 8; Sanderson *et al* (2005) *Clin. Cancer Res.* 11:843 - 852; Jeffrey *et al* (2005) *J. Med. Chem.* 48:1344 - 1358; Hamblett *et al* (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:7063 - 7070). Porções de fármaco podem comunicar seus efeitos citotóxicos e citostáticos por mecanismos incluindo ligação de tubulina, ligação de DNA, inibição de proteassoma e/ou topoisomerase. Alguns fármacos citotóxicos tendem a ser inativos ou menos ativos quando conjugados a anticorpos grandes ou ligados do receptor de proteína.

[009]Os presentes inventores desenvolveram conjugados de dímero de PBD e anticorpo particulares.

Divulgação da Invenção

[010]Um primeiro aspecto da presente invenção compreende um conjugado da fórmula L $-(D^L)_p$, onde D^L é da fórmula I ou II:



em que:

L é um anticorpo (Ab) como definido abaixo;

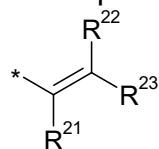
quando existe uma ligação dupla presente entre C2' e C3', R¹² é selecionado

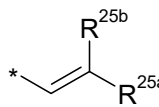
do grupo consistindo em:

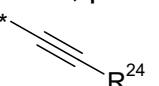
(ia) grupo arila C₅₋₁₀, opcionalmente substituído por um ou mais substituintes selecionados do grupo compreendendo: halo, nitro, ciano, éter, carbóxi, éster, alquila C₁₋₇, heterociclila C₃₋₇ e bis-óxi-alquilenos C₁₋₃;

(ib) alquila alifático saturado C₁₋₅;

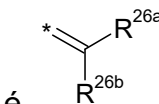
(ic) cicloalquila saturado C₃₋₆;

(id) , em que cada um de R²¹, R²² e R²³ é independentemente selecionado de H, alquila saturado C₁₋₃, alquenila C₂₋₃, alquinila C₂₋₃ e ciclopropila, onde o número total de átomos de carbono no grupo R¹² não é mais do que 5;

(ie) , em que um de R^{25a} e R^{25b} é H e o outro é selecionado de: fenila, fenila este que é opcionalmente substituído por um grupo selecionado de halo, metila, metóxi; piridila; e tiofenila; e

(if) , onde R²⁴ é selecionado de: H; alquila saturado C₁₋₃; alquenila C₂₋₃; alquinila C₂₋₃; ciclopropila; fenila, fenila este que é opcionalmente substituído por um grupo selecionado de halo, metila, metóxi; piridila; e tiofenila;

quando existe uma ligação única presente entre C2' e C3',

R¹² é , onde R^{26a} e R^{26b} são independentemente selecionados de H, F, alquila saturado C₁₋₄, alquenila C₂₋₃, grupos alquila e alquenila estes que são opcionalmente substituídos por um grupo selecionado de alquilamido C₁₋₄ e éster alquílico C₁₋₄; ou, quando um de R^{26a} e R^{26b} é H, o outro é selecionado de nitrila e um éster alquílico C₁₋₄;

R⁶ e R⁹ são independentemente selecionados de H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', nitro, Me₃Sn e halo;

onde R e R' são independentemente selecionados de grupos alquila C₁₋₁₂,

heterociclila C₃₋₂₀ e arila C₅₋₂₀ opcionalmente substituídos;

R⁷ é selecionado de H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NHRR', nitro, Me₃Sn e halo;

R'' é um grupo alquilenos C₃₋₁₂, cadeia esta que pode ser interrompida por um ou mais heteroátomos, por exemplo, O, S, NR^{N2} (onde R^{N2} é H ou alquila C₁₋₄), e/ou anéis aromáticos, por exemplo, benzeno ou piridina;

Y e Y' são selecionados de O, S, ou NH;

R⁶, R⁷, R⁹ são selecionados dos mesmos grupos como R⁶, R⁷ e R⁹ respectivamente;

[Fórmula I]

R^{L1'} é um ligador para conexão ao anticorpo (Ab);

R^{11a} é selecionado de OH, OR^A, onde R^A é alquila C₁₋₄, e SO_zM, onde z é 2 ou 3 e M é um cátion monovalente farmacologicamente aceitável;

R²⁰ e R²¹ juntos formam uma ligação dupla entre os átomos de nitrogênio e carbono aos quais eles são ligados ou;

R²⁰ é selecionado de H e R^C, onde R^C é um grupo de capeamento;

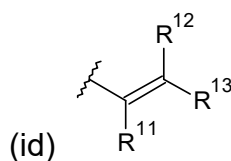
R²¹ é selecionado de OH, OR^A e SO_zM;

quando existe uma ligação dupla presente entre C2 e C3, R² é selecionado do grupo consistindo em:

(ia) grupo arila C₅₋₁₀, opcionalmente substituído por um ou mais substituintes selecionados do grupo compreendendo: halo, nitro, ciano, éter, carbóxi, éster, alquila C₁₋₇, heterociclila C₃₋₇ e bis-óxi-alquilenos C₁₋₃;

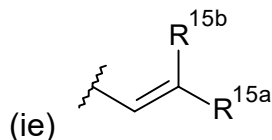
(ib) alquila alifático saturado C₁₋₅;

(ic) cicloalquila saturado C₃₋₆;

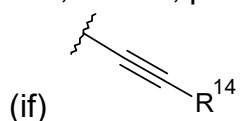


, em que cada um de R¹¹, R¹² e R¹³ é independentemente selecionados de H, alquila saturado C₁₋₃, alquenila C₂₋₃, alquinila C₂₋₃ e ciclopropi-

la, onde o número total de átomos de carbono no grupo R^2 não é mais do que 5;

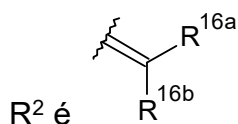


, em que um de R^{15a} e R^{15b} é H e o outro é selecionado de: fenila, fenila este que é opcionalmente substituído por um grupo selecionado de halo, metila, metóxi; piridila; e tiofenila; e



, onde R^{14} é selecionado de: H; alquila saturado C_{1-3} ; alquenila C_{2-3} ; alquinila C_{2-3} ; ciclopropila; fenila, fenila este que é opcionalmente substituído por um grupo selecionado de halo, metila, metóxi; piridila; e tiofenila;

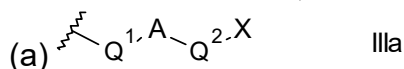
quando existe uma ligação única presente entre C2 e C3,



, onde R^{16a} e R^{16b} são independentemente selecionados de H, F, alquila saturado C_{1-4} , alquenila C_{2-3} , grupos alquila e alquenila estes que são opcionalmente substituídos por um grupo selecionado de alquilamido C_{1-4} e éster alquílico C_{1-4} ; ou, quando um de R^{16a} e R^{16b} é H, o outro é selecionado de nitrila e um éster alquílico C_{1-4} ;

[Fórmula II]

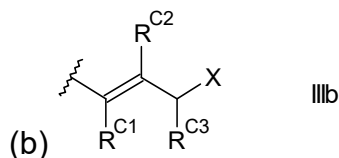
R^{22} é da fórmula IIIa, fórmula IIIb ou fórmula IIIc:



onde A é um grupo arila C_{5-7} , e

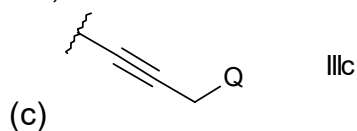
(i) Q^1 é uma ligação única, e Q^2 é selecionado de uma ligação única e $-Z-(CH_2)_n-$, onde Z é selecionado de uma ligação única, O, S e NH e n é de 1 a 3; ou

(ii) Q^1 é $-CH=CH-$, e Q^2 é uma ligação única;

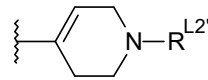
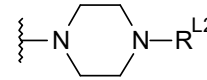


onde;

R^{C1} , R^{C2} e R^{C3} são independentemente selecionados de H e alquila C_{1-2} não substituído;



onde Q é selecionado de $O-R^{L2'}$, $S-R^{L2'}$ e $NR^N-R^{L2'}$, e R^N é selecionado de H, metila e etila

X é selecionado do grupo compreendendo: $O-R^{L2'}$, $S-R^{L2'}$, $CO_2-R^{L2'}$, $CO-R^{L2'}$, $NH-C(=O)-R^{L2'}$, $NHNH-R^{L2'}$, $CONHNH-R^{L2'}$, , , $NR^N-R^{L2'}$, em que R^N é selecionado do grupo compreendendo H e alquila C_{1-4} ;

$R^{L2'}$ é um ligador para conexão ao anticorpo (Ab);

R^{10} e R^{11} juntos formam uma ligação dupla entre os átomos de nitrogênio e carbono aos quais eles são ligados ou;

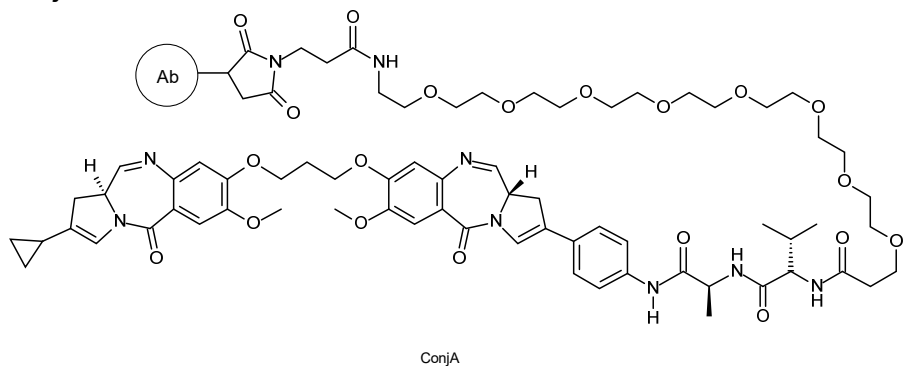
R^{10} é H e R^{11} é selecionado de OH, OR^A e SO_2M ;

R^{30} e R^{31} juntos formam uma ligação dupla entre os átomos de nitrogênio e carbono aos quais eles são ligados ou;

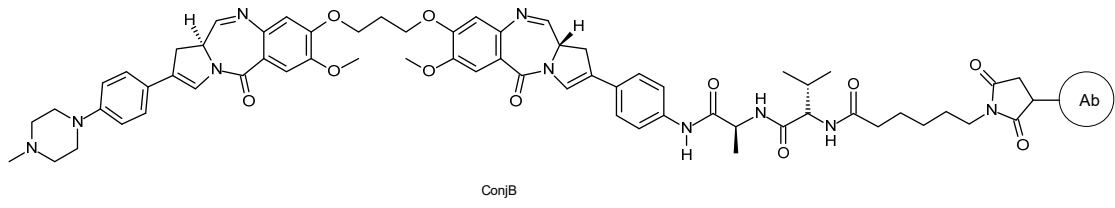
R^{30} é H e R^{31} é selecionado de OH, OR^A e SO_2M .

[011]Em algumas formas de realização, o conjugado não é:

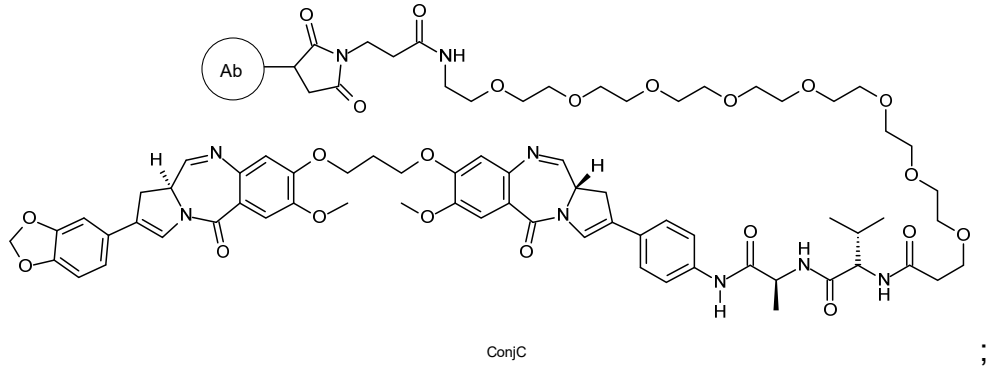
ConjA



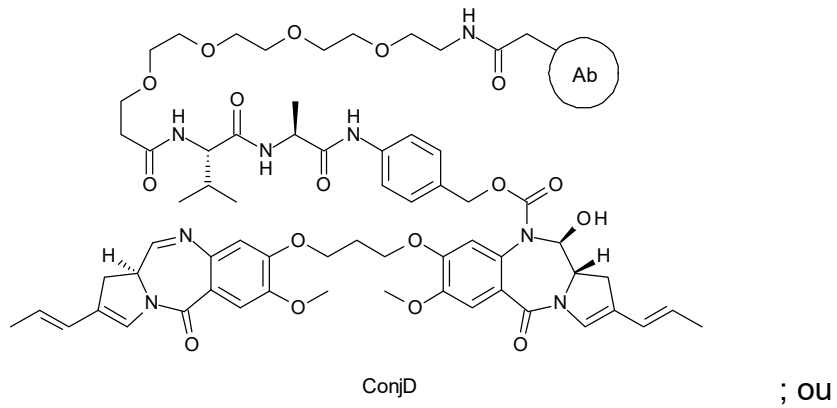
ConjB



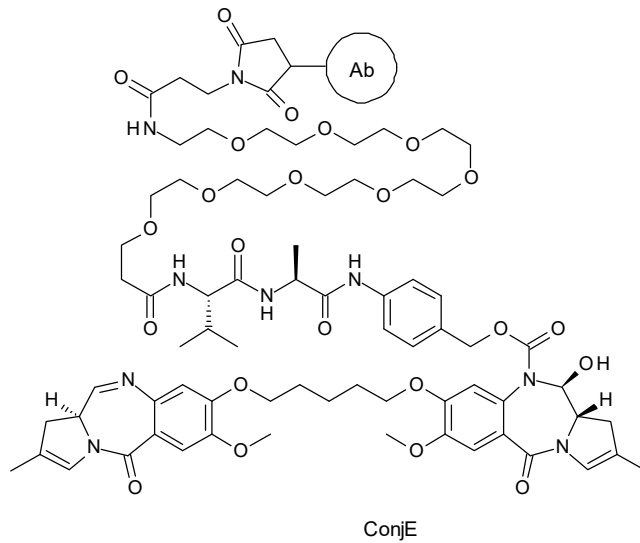
ConjC:



ConjD



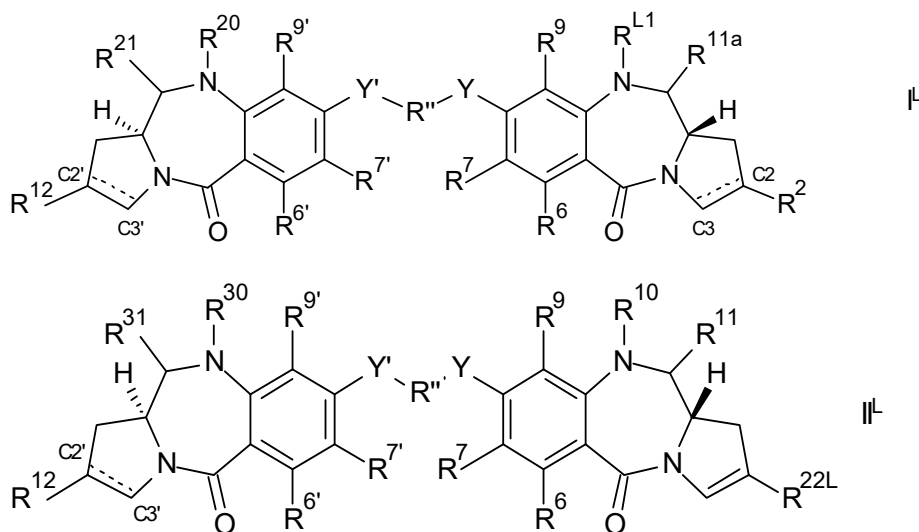
ConjE:



[012]Em outras formas de realização, pode ser preferido que o conjugado seja selecionado de um conjugado da fórmula ConjA, ConjB, ConjC, ConjD e ConjE.

[013]O subscrito p na fórmula I é um número inteiro de 1 a 20. Consequentemente, os Conjugados compreendem um anticorpo (Ab) como definido abaixo covalentemente ligado a pelo menos uma unidade de Fármaco por uma unidade de Ligador. A unidade de Ligando, descrita mais completamente abaixo, é um agente de alvejamento que liga-se a uma porção alvo. Consequentemente, a presente invenção também fornece métodos para o tratamento de, por exemplo, vários cancêres e doença autoimune. A carga de fármaco é representada por p, o número de moléculas de fármaco por anticorpo. A carga de fármaco pode variar de 1 a 20 unidades de Fármaco (D^L) por anticorpo. Para composições, p representa a carga de fármaco média dos Conjugados na composição, e p varia de 1 a 20.

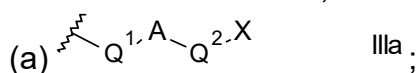
[014]Um segundo aspecto da invenção fornece um método de fabricar um conjugado de acordo com o primeiro aspecto da invenção compreendendo conjugar um composto da fórmula I^L ou II^L:

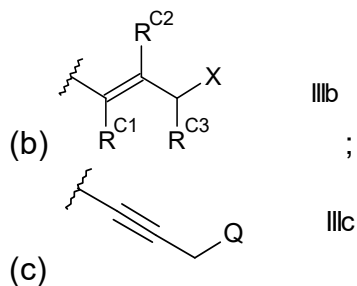


ao anticorpo (Ab) como definido abaixo, em que:

R^{L1} é um ligador adequado para conjugação ao anticorpo (Ab);

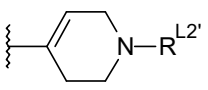
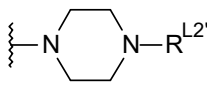
R^{22L} é da fórmula IIIa^L, fórmula IIIb^L ou fórmula IIIc^L:





onde Q^L é selecionado de O-R^{L2}, S-R^{L2} e NR^N-R^{L2}, e R^N é selecionado de H, metila e etila

X^L é selecionado do grupo compreendendo: O-R^{L2}, S-R^{L2}, CO₂-R^{L2}, CO-R^{L2},

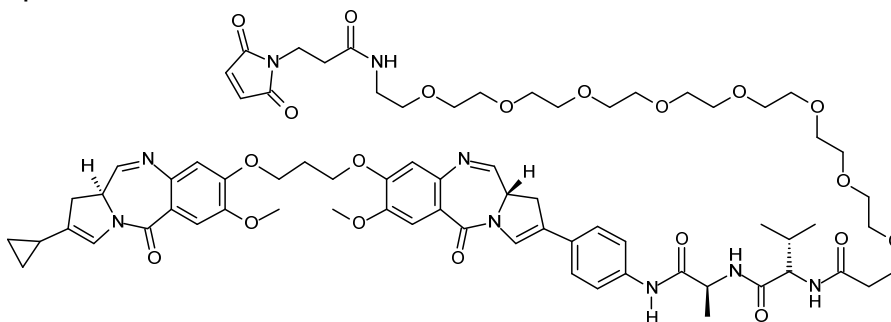
N=C=O-R^{L2}, NHNH-R^{L2}, CONHNH-R^{L2}, , , NR^NR^L,

em que R^N é selecionado do grupo compreendendo H e alquila C₁₋₄;

R^{L2} é um ligador adequado para conjugação ao anticorpo (Ab);

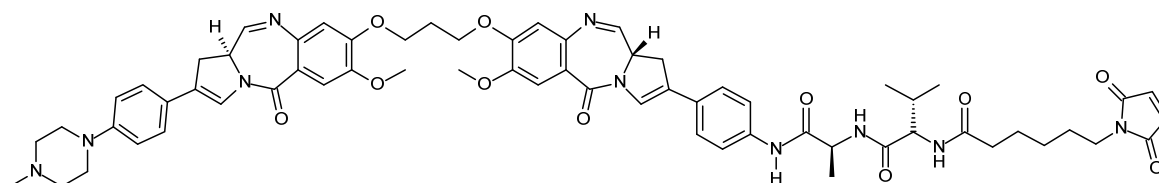
e todos os grupos remanescentes são como definidos no primeiro aspecto.

[015] Assim, pode ser preferido no segundo aspecto, que a invenção fornece um método de fabricar um conjugado selecionado do grupo consistindo em ConjA, ConjB, ConjC, ConjD e ConjE compreendendo conjugar um composto que é selecionado respectivamente de A:



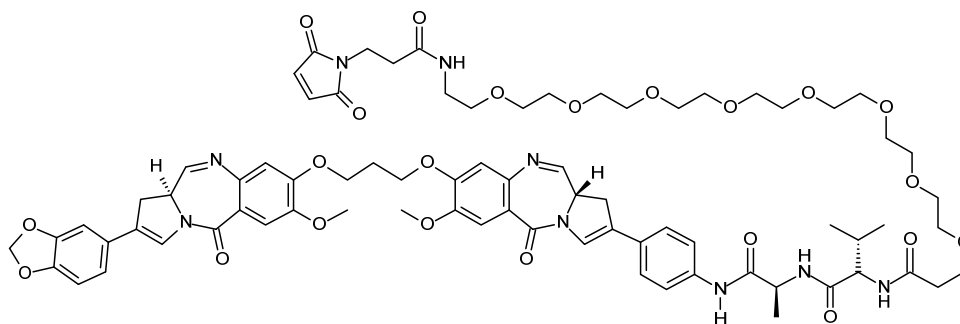
A

B:



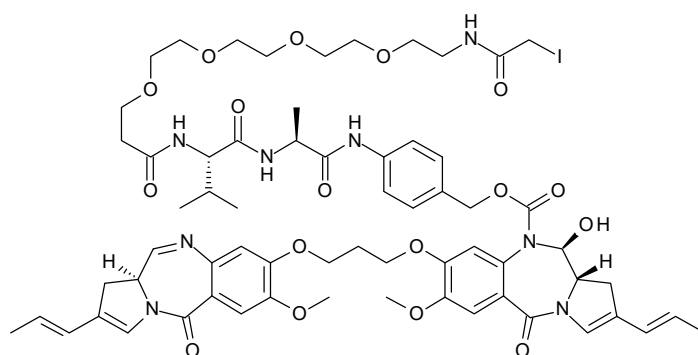
B

C:



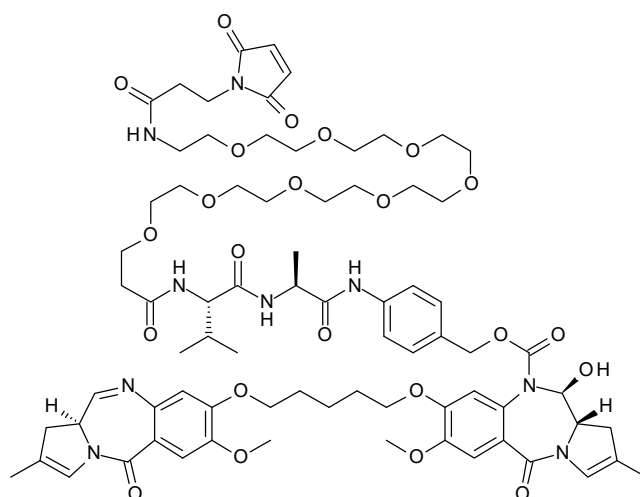
c

D:



D

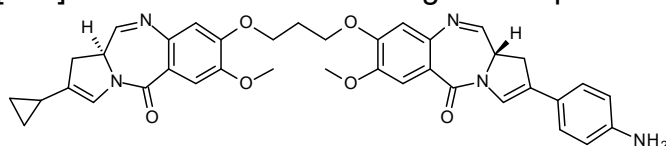
e E:



E

com um anticorpo como definido abaixo.

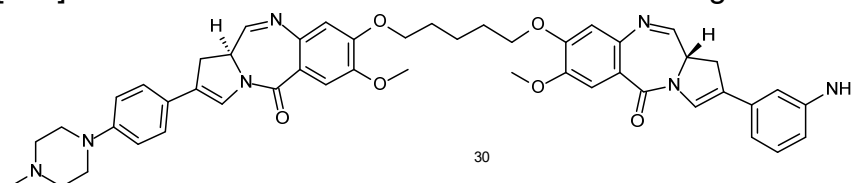
[016]A WO 2011/130615 divulga o composto 26:



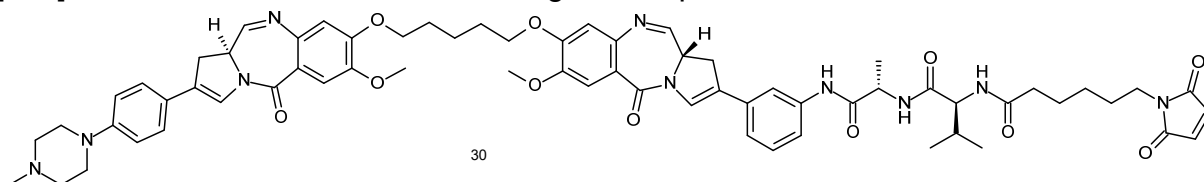
26

que é o composto precursor de A. O Composto A compreende este PBD com um ligador para fixação a um agente de ligação celular. O agente de ligação celular fornece várias porções etileno glicol para fornecer solubilidade que é útil na síntese de conjugados.

[017]A WO 2010/043380 e WO 2011/130613 divulgam o composto 30:

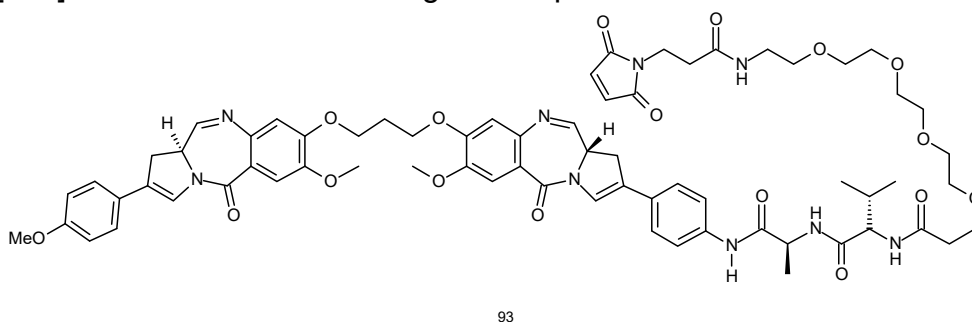


[018]A WO 2011/130613 também divulga o composto 51:



[019]O Composto B difere do composto 30 por ter apenas um limite $(CH_2)_3$ entre as porções PBD, ao invés de um limite $(CH_2)_5$, que reduz a lipofilicidade do dímero de PBD liberado. O grupo de ligação é ligado ao grupo C2-fenila na posição para ao invés da posição meta.

[020]A WO 2011/130613 divulga o composto 93:

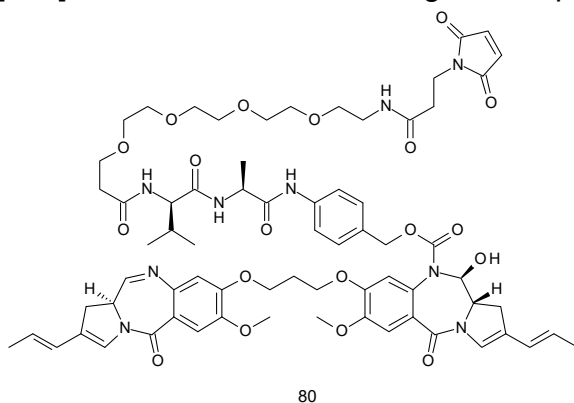


[021]O Composto C difere deste em dois aspectos. O agente de ligação celular fornece um número aumentado de porções etileno glicol para fornecer solubilidade que é útil na síntese de conjugados, e o substituinte de fenila fornece dois ao invés de um átomo de oxigênio, que também auxilia na solubilidade. A estrutura do

Composto C também pode significar que ela liga mais fortemente na ranhura menor.

[022]Os Compostos A, B e C têm dois centros sp^2 em cada anel C, que podem levar em consideração a ligação mais forte na ranhura menor de DNA, do que para compostos com apenas um centro sp^2 em cada anel C.

[023]A WO 2011/130598 divulga o composto 80:



[024]O Composto D difere deste compreendendo-se um grupo iodoacetamida para ligação ao agente de ligação celular. Este grupo pode oferecer vantagens sobre o composto 80 quanto a sua estabilidade quando ligado a um agente de ligação celular (ver abaixo). O grupo maleimida no composto 80 pode passar por uma reação de retro-Michael, tornando-se não conjugado do agente de ligação celular, e assim vulnerável à limpeza por outras moléculas biológicas contendo tiol, tais como albumina e glutathiona. Tal não conjugação não pode ocorrer com o composto A. Também, o grupo iodoacetamida pode evitar outras reações laterais indesejadas.

[025]O Composto E difere de dímeros de PBD previamente divulgados com um ligador de fármaco tendo uma ligação dupla C2-3 endo, por ter um substituinte C2 menos lipofílico, menor, por exemplo, 4F-fenila, propileno. Como tal, os conjugados do composto B (ver abaixo) são menos prováveis a agregar uma vez que sintetizados. Tal agregação de conjugados pode ser medida por Cromatografia de exclusão por tamanho (SEC).

[026]Tanto o composto D quanto E têm dois centros sp^2 em cada anel C, que podem levar em consideração a ligação mais forte na ranhura menor de DNA,

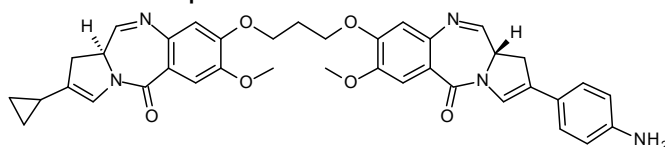
do que para compostos com apenas um centro sp^2 em cada anel C.

[027] Os ligadores de fármaco divulgados em WO 2010/043880, WO 2011/130613, WO 2011/130598 e WO 2011/130616 podem ser usados na presente invenção, e são incorporados aqui por referência. Os ligadores de fármaco descritos aqui podem ser sintetizados como descrito nestas divulgações.

Descrição Detalhada da Invenção

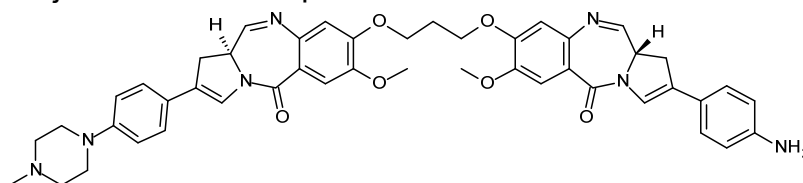
[028] A presente invenção é adequada para o uso em fornecer um composto de PBD a um sítio preferido em um indivíduo. O conjugado permite a liberação de um composto de PBD ativo que não retém qualquer parte do ligador. Não existe nenhum resto presente que possa afetar a reatividade do composto de PBD. Assim

ConjA liberaria o composto RelA:



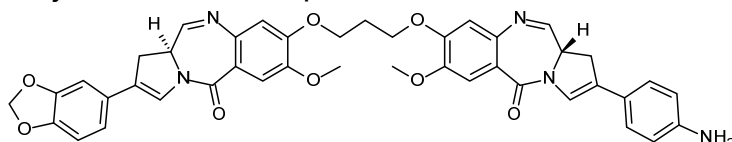
RelA

ConjB liberaria o composto RelB:



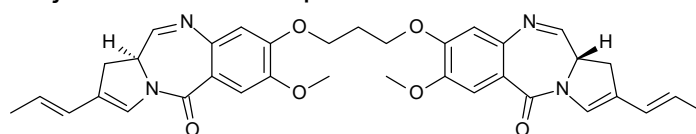
RelB

ConjC liberaria o composto RelC:



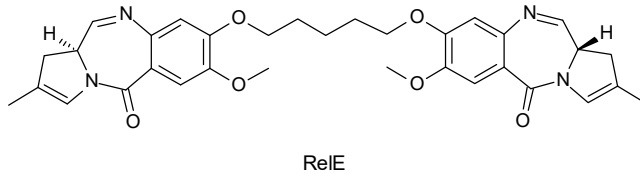
RelC

ConjD liberaria o composto RelD:



RelD

e ConjE liberaria o composto RelE:



[029]A ligação específica entre o dímero de PBD e o anticorpo, na presente invenção é preferivelmente estável extracelularmente. Antes de transportar ou liberar em uma célula, o conjugado de anticorpo-fármaco (ADC) é preferivelmente estável e permanece intacto, isto é o anticorpo permanece ligado à porção do fármaco. Os ligadores são estáveis fora da célula alvo e podem ser clivados em alguma taxa eficaz dentro da célula. Um ligador eficaz: (i) manterá as propriedades de ligação específicas do anticorpo; (ii) permitirá a liberação intracelular do conjugado ou porção do fármaco; (iii) permanecerá estável e intacto, isto é, não clivado, até que o conjugado fosse liberado ou transportado ao seu sítio alvejado; e (iv) manterá um efeito de morte celular, citotóxico ou um efeito citostático da porção do fármaco de PBD. A estabilidade do ADC pode ser medida por técnicas analíticas padrão tais como espectroscopia de massa, HPLC, e a técnica de separação/análise LC/MS.

[030]A liberação dos compostos das fórmulas RelA, RelB, RelC, RelD ou RelE é obtida no sítio de ativação desejado dos conjugados das fórmulas ConjA, ConjB, ConjC, ConjD ou ConjE pela ação de uma enzima, tal como catepsina, no grupo de ligação, e em particular na porção de dipeptídeo de valina-alanina.

Anticorpo

[031]Em um aspecto o anticorpo é um anticorpo que liga-se a CD19, o anticorpo compreendendo um domínio VH tendo a sequência de acordo com qualquer uma das SEQ ID NOs. 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

[032]O anticorpo pode compreender ainda um domínio VL. Em algumas formas de realização o anticorpo compreende ainda um domínio VL tendo a sequência de acordo com qualquer uma das SEQ ID NOs. 7, 8, 9, 10, 11 ou 12.

[033]Em algumas formas de realização o anticorpo compreende um domínio VH emparelhado com um domínio VL, os domínios VH e VL tendo sequências sele-

cionadas do grupo consistindo em:

SEQ ID NO. 1 emparelhada com qualquer uma das SEQ ID NOs. 7, 8, 9, 10, 11 ou 12;

SEQ ID NO. 2 emparelhada com qualquer uma das SEQ ID NOs. 7, 8, 9, 10, 11 ou 12;

SEQ ID NO. 3 emparelhada com qualquer uma das SEQ ID NOs. 7, 8, 9, 10, 11 ou 12;

SEQ ID NO. 4 emparelhada com qualquer uma das SEQ ID NOs. 7, 8, 9, 10, 11 ou 12;

SEQ ID NO. 5 emparelhada com qualquer uma das SEQ ID NOs. 7, 8, 9, 10, 11 ou 12; e

SEQ ID NO. 6 emparelhada com qualquer uma das SEQ ID NOs. 7, 8, 9, 10, 11 ou 12. Por exemplo SEQ ID NO. 1 emparelhada com a SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 2 emparelhada com a SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 3 emparelhada com a SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 4 emparelhada com a SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 5 emparelhada com a SEQ ID NO. 11 ou SEQ ID NO. 6 emparelhada com a SEQ ID NO. 12.

[034]O(s) domínio(s) VH e VL podem emparelhar de modo a formar um sítio de ligação de anticorpo a antígeno que liga CD19.

[035]Em algumas formas de realização o anticorpo é um anticorpo intacto compreendendo um domínio VH emparelhado com um domínio VL, os domínios VH e VL tendo sequências selecionadas do grupo consistindo em:

SEQ ID NO. 1 emparelhada com qualquer uma das SEQ ID NOs. 7, 8, 9, 10, 11 ou 12;

SEQ ID NO. 2 emparelhada com qualquer uma das SEQ ID NOs. 7, 8, 9, 10, 11 ou 12;

SEQ ID NO. 3 emparelhada com qualquer uma das SEQ ID NOs. 7, 8, 9, 10, 11 ou 12;

SEQ ID NO. 4 emparelhada com qualquer uma das SEQ ID NOs. 7, 8, 9, 10, 11 ou 12;

SEQ ID NO. 5 emparelhada com qualquer uma das SEQ ID NOs. 7, 8, 9, 10, 11 ou 12; e

SEQ ID NO. 6 emparelhada com qualquer uma das SEQ ID NOs. 7, 8, 9, 10, 11 ou 12. Por exemplo SEQ ID NO. 1 emparelhada com a SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 2 emparelhada com a SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 3 emparelhada com a SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 4 emparelhada com a SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 5 emparelhada com a SEQ ID NO. 11 ou SEQ ID NO. 6 emparelhada com a SEQ ID NO. 12.

[036]Em algumas formas de realização, o anticorpo compete com o anticorpo secretado pelo hibridoma com N° de acesso ATCC HB-305 pela ligação a CD19. Em uma forma de realização o anticorpo liga CD19 com uma constante de associação (K_a) não menor do que 2, 5 ou 10 vezes menor do que o anticorpo secretado pelo hibridoma.

[037]Em aspecto o anticorpo é um anticorpo como descrito aqui que foi modificado (ou modificado ainda) como descrito abaixo. Em algumas formas de realização o anticorpo é uma versão humanizada, desimunizada ou recapeada de um anticorpo divulgado aqui.

Terminologia

[038]O termo “anticorpo” aqui é usado no sentido mais amplo e especificamente inclui anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, dímeros, multímeros, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos), anticorpo intactos e fragmentos de anticorpo, contanto que eles exibam a atividade biológica desejada, por exemplo, a capacidade para ligar CD19 (Miller *et al* (2003) *Jour. of Immunology* 170:4854 - 4861). Anticorpos podem ser de murino, humanos, humanizados, quiméricos, ou derivados de outras espécies. Um anticorpo é uma proteína gerada pelo sistema imune que é capaz de reconhecer e ligar a um antígeno específico.

(Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology, 5th Ed.*, Garland Publishing, Nova Iorque). Um antígeno alvo geralmente tem numerosos sítios de ligação, também chamados epítomos, reconhecidos por CDRs em anticorpos múltiplos. Cada anticorpo que especificamente liga-se a um epítomo diferente tem uma estrutura diferente. Assim, um antígeno pode ter mais do que um anticorpo correspondente. Um anticorpo inclui um molécula de imunoglobulina de tamanho natural ou uma porção imunologicamente ativa de uma molécula de imunoglobulina de tamanho natural, isto é, uma molécula que contém um sítio de ligação ao antígeno que imunoespecificamente liga um antígeno de um alvo de interesse ou parte deste, tais alvos incluindo mas não limitados a, célula ou células do câncer que produzem anticorpos autoimunes associados com uma doença autoimune. A imunoglobulina pode ser de qualquer tipo (por exemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, e IgA), classe (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) ou subclasse, ou alótipo (por exemplo, G1m1, G1m2, G1m3, não-G1m1 [este, é qualquer alótipo exceto G1m1], G1m17, G2m23, G3m21, G3m28, G3m11, G3m5, G3m13, G3m14, G3m10, G3m15, G3m16, G3m6, G3m24, G3m26, G3m27, A2m1, A2m2, Km1, Km2 e Km3 humanos) de molécula de imunoglobulina. As imunoglobulinas podem ser derivadas de qualquer espécie, incluindo origem humana, de murino, ou coelho.

[039]Como usado aqui, “liga CD19” é usado para significar que o anticorpo liga CD19 com uma afinidade mais alta do que um parceiro não específico tal como Albumina Sérica Bovina (BSA, N° de acesso no Genbank CAA76847, versão n° CAA76847,1 GI:3336842, data de atualização de registro: 7 de Jan de 2011 02:30 PM). Em algumas formas de realização o anticorpo liga CD19 com uma constante de associação (K_a) pelo menos 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000, 10^4 , 10^5 ou 10^6 vezes mais alta do que a constante de associação do anticorpo para BSA, quando medidas a condições fisiológicas. Os anticorpos da invenção podem ligar CD19 com uma afinidade alta. Por exemplo, em algumas formas de realização

o anticorpo pode ligar CD19 com uma K_D igual a ou menos do que cerca de 10^{-6} M, tal como 1×10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} ou 10^{-14} .

[040]Em algumas formas de realização, o polipeptídeo CD19 corresponde ao N° de acesso no Genbank NP_001171569, versão n° NP_001171569,1 GI:296010921, data de atualização de registro: 10 de Set de 2012 12:43 AM. Em uma forma de realização, o ácido nucleico que codifica o polipeptídeo CD19 corresponde ao n° de acesso no Genbank NM_001178098, versão n° NM_001178098,1 GI:296010920, data de atualização de registro: 10 de Set de 2012 12:43 AM.

[041]“Fragmentos de anticorpo” compreendem uma porção de um anticorpo de tamanho natural, geralmente a ligação ao antígeno ou região variável deste. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, e scFv; diacorpos; anticorpos lineares; fragmentos produzidos por uma biblioteca de expressão de Fab, anticorpos anti-idiotípicos (anti-Id), CDR (região determinante de complementaridade), e fragmentos de ligação ao epítopo de qualquer um do acima que imunoespecificamente liga-se a antígenos de célula do câncer, antígenos virais ou antígenos microbianos, moléculas de anticorpo de cadeia única; e anticorpos multi-específicos formados de fragmentos de anticorpo.

[042]O termo “anticorpo monoclonal” como usado aqui refere-se a um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, isto é os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos exceto para mutações que ocorrem naturalmente possíveis que podem estar presentes em quantidades menores. Anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo dirigidos contra um único sítio antigênico. Além disso, ao contrário de preparações de anticorpo policlonal que incluem diferentes anticorpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticorpo monoclonal é dirigido contra um único determinante no antígeno. Além de sua especificidade, os anticorpos monoclonais são vantajosos em que eles podem ser sintetizados não contaminados por outros anticorpos. O

modificador “monoclonal” indica o caráter do anticorpo como sendo obtido de uma população substancialmente homogênea de anticorpos, e não deve ser interpretado como requerendo a produção do anticorpo por qualquer método particular. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a serem usados de acordo com a presente invenção podem ser fabricados pelo método do hibridoma primeiro descrito por Kohler *et al* (1975) *Nature* 256:495, ou pode ser fabricado por métodos de DNA recombinante (ver, US 4816567). Os anticorpos monoclonais também podem ser isolados de bibliotecas de anticorpo de fago usando as técnicas descritas em Clackson *et al* (1991) *Nature*, 352:624 - 628; Marks *et al* (1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581 - 597 ou de camundongos transgênicos que carregam um sistema de imunoglobulina completamente humana (Lonberg (2008) *Curr. Opin.* 20(4):450 - 459).

[043]Os anticorpos monoclonais aqui especificamente incluem anticorpos “quiméricos” em que uma porção da cadeia pesada e/ou leve é idêntica com ou homóloga a sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie particular ou pertencendo a uma classe ou subclasse de anticorpo particular, enquanto o restante da(s) cadeia(s) é idêntico com ou homólogo às sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma outra espécie ou pertencendo a uma outra classe ou subclasse de anticorpo, assim como fragmentos de tais anticorpos, contanto que eles exibam a atividade biológica desejada (US 4816567; e Morrison *et al* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851 - 6855). Anticorpos quiméricos incluem anticorpos “primatizados” compreendendo sequências de ligação a antígeno de domínio variável derivadas de um primata não humano (por exemplo, Macacos do Velho Mundo ou Símios) e sequências de região constante humanas.

[044]Um “anticorpo intacto” aqui é um compreendendo domínios VL e VH, assim como um domínio constante de cadeia leve (CL) e domínios constantes de cadeia pesada, CH1, CH2 e CH3. Os domínios constantes podem ser domínios constantes de sequência nativa (por exemplo, domínios constantes de sequência

nativa humana) ou variante da sequência de aminoácido destes. O anticorpo intacto pode ter uma ou mais “funções efetoras” que referem-se àquelas atividades biológicas atribuíveis à região Fc (uma região Fc de sequência nativa ou região Fc de variante da sequência de aminoácido) de um anticorpo. Exemplos de funções efetoras de anticorpo incluem ligação de C1q; citotoxicidade dependente de complemento; ligação de receptor Fc; citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpo (ADCC); fagocitose; e infrarregulação de receptores de superfície celular tais como receptor de célula B e BCR.

[045]Dependendo da sequência de aminoácido do domínio constante de suas cadeias pesadas, anticorpos intactos podem ser designados a diferentes “classes.” Existem cinco classes principais de anticorpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, e vários destes podem ser divididos ainda em “subclasses” (isótipos), por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2. Os domínios constantes de cadeia pesada que correspondem às diferentes classes de anticorpos são chamados α , δ , ϵ , γ , e μ , respectivamente. As estruturas de subunidade e configurações tridimensionais de diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas.

Modificação de anticorpos

[046]Os anticorpos divulgados aqui podem ser modificados. Por exemplo, para torná-los menos imunogênicos a um indivíduo humano. Isto pode ser obtido usando qualquer uma das várias técnicas familiares à pessoa habilitada na técnica. Algumas destas técnicas são descritas em mais detalhe abaixo.

Humanização

[047]Técnicas para reduzir a imunogenicidade *in vivo* de um anticorpo não humano ou fragmento de anticorpo incluem aquelas denominadas “humanização”.

[048]Um “anticorpo humanizado” refere-se a um polipeptídeo compreendendo pelo menos uma porção de uma região variável modificada de um anticorpo humano em que uma porção da região variável, preferivelmente uma porção substan-

cialmente menor do que o domínio variável humano intacto, foi substituída pela sequência correspondente de uma espécie não humana e em que a região variável modificada é ligada a pelo menos uma outra parte de uma outra proteína, preferivelmente a região constante de um anticorpo humano. A expressão “anticorpos humanizados” inclui anticorpos humanos em que um ou mais resíduos de aminoácido de região determinante de complementaridade (“CDR”) e/ou um ou mais resíduos de aminoácido de região de estrutura (“FW” ou “FR”) são substituídos por resíduos de aminoácido de sítios análogos em roedor ou outros anticorpos não humanos. A expressão “anticorpo humanizado” também inclui uma variante da sequência de aminoácido de imunoglobulina ou fragmento desta que compreende uma FR tendo substancialmente a sequência de aminoácido de uma imunoglobulina humana e uma CDR tendo substancialmente a sequência de aminoácido de uma imunoglobulina não humana.

[049] Formas “humanizadas” de anticorpos não humanos (por exemplo, de murino) são anticorpos quiméricos que contêm sequência mínima derivada de imunoglobulina não humana. Ou, considerado de um outro modo, um anticorpo humanizado é um anticorpo humano que também contêm sequências selecionadas de anticorpos não humanos (por exemplo, de murino) no lugar das sequências humanas. Um anticorpo humanizado pode incluir substituições de aminoácido conservativas ou resíduos não naturais da mesma espécie ou diferente que não significativamente alteram sua atividade de ligação e/ou biológica. Tais anticorpos são anticorpos quiméricos que contêm sequência mínima derivada de imunoglobulinas não humanas.

[050] Existe uma faixa de técnicas de humanização, incluindo ‘enxerto de CDR’, ‘seleção guiada’, ‘desimunização’, ‘recapeamento’ (também conhecido como ‘laminação’), ‘anticorpos compósitos’, ‘Otimização de Conteúdo da Cadeia Humana’ e rearranjo de estrutura.

Enxerto de CDR

[051]Nesta técnica, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor) em que resíduos de uma região determinante de complementaridade (CDR) do anticorpo receptor são substituídos por resíduos de uma CDR de uma espécie não humana (anticorpo doador) tal como camundongo, rato, camelo, bovino, cabra, ou coelho tendo as propriedades desejadas (em vigor, as CDRs não humanas são 'enxertadas' sobre a estrutura humana). Em alguns exemplos, resíduos de região de estrutura (FR) da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não humanos correspondentes (isto pode acontecer quando, por exemplo, um resíduo de FR particular tem efeito significativo sobre a ligação ao antígeno).

[052]Além disso, anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados nem no anticorpo receptor nem nas sequências de CDR ou estrutura importadas. Estas modificações são feitas para refinar e maximizar ainda o desempenho de anticorpo. Assim, em geral, um anticorpo humanizado compreenderá todos de pelo menos um, e em um aspecto dois, domínios variáveis, em que todas ou todas as sequências hipervariáveis correspondem àquelas de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as regiões FR são aquelas de uma sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado opcionalmente também compreenderá pelo menos uma porção de uma região constante (Fc) de imunoglobulina, ou aquela de uma imunoglobulina humana.

Seleção guiada

[053]O método consiste em combinar o domínio V_H ou V_L de um anticorpo não humano dado específico para um epítopo particular com uma biblioteca de V_H ou V_L humana e domínios V humanos específicos são selecionados contra o antígeno de interesse. Este V_H humano selecionado depois é combinado com uma biblioteca de V_L para gerar uma combinação de V_HxV_L completamente humana. O método é descrito em Nature Biotechnology (N.Y.) 12, (1994) 899 - 903.

Anticorpos compósitos

[054] Neste método, dois ou mais segmentos de sequência de aminoácido de um anticorpo humano são combinados dentro da molécula de anticorpo final. Eles são construídos combinando-se segmentos de sequência de VH e VL humanos múltiplos em combinações que limitam ou evitam epítomos de célula T humanos nas regiões V de anticorpo compósito final. Onde necessário, epítomos de célula T são limitados ou evitados trocando-se segmentos da região V que contribuem para ou que codificam um epítomo de célula T com segmentos alternativos que evitam os epítomos de célula T. Este método é descrito em US 2008/0206239 A1.

Desimunização

[055] Este método envolve a remoção de epítomos de célula T humanos (ou outra espécie secundária) das regiões V do anticorpo terapêutico (ou outra molécula). A sequência da região V de anticorpos terapêuticos é analisada quanto à presença de motivos de inibição de MHC classe II, por exemplo, por comparação com bases de dados de motivos de ligação de MHC (tal como a base de dados de “motivos” hospedada em www.wehi.edu.au). Alternativamente, motivos de ligação de MHC classe II podem ser identificados usando métodos de processamento computacionais tais como aqueles desenvolvidos por Altuvia *et al.* (J. Mol. Biol. 249 244 - 250 (1995)); nestes métodos, peptídeos de sobreposição consecutivos das sequências de região V estão testando quanto às suas energias de ligação a proteínas de MHC classe II. Estes dados depois podem ser combinados com informação em outras características de sequência que referem-se a peptídeos apresentados com êxito, tais como anfipaticidade, motivos de Rothbard, e sítios de clivagem para catepsina B e outras enzimas de processamento.

[056] Uma vez que epítomos de célula T de espécie secundária potenciais (por exemplo, humanos) foram identificados, eles são eliminados pela alteração de um ou mais aminoácidos. Os aminoácidos modificados estão usualmente dentro do epítomo de célula T propriamente dito, mas também podem ser adjacentes ao epíto-

po em termos da estrutura primária ou secundária da proteína (e portanto, podem não ser adjacentes na estrutura primária). O mais tipicamente, a alteração é por via de substituição mas, em algumas circunstâncias a adição ou supressão de aminoácido será mais apropriada.

[057]Todas as alterações podem ser realizadas por tecnologia de DNA recombinante, de modo que a molécula final possa ser preparada por expressão de um hospedeiro recombinante usando métodos bem estabelecidos tais como Mutagênese Sítio Dirigida. Entretanto, o uso de química de proteína ou qualquer outro meio de alteração molecular também é possível.

Recapeamento

[058]Este método envolve:

(a) determinar a estrutura conformacional da região variável do anticorpo não humano (por exemplo, de roedor) (ou fragmento deste) construindo-se um modelo tridimensional da região variável de anticorpo não humano;

(b) gerar alinhamentos de sequência usando distribuições de acessibilidade relativas de estruturas cristalográficas de raio X de um número suficiente de cadeias pesadas e leves de região variável de anticorpo não humano e humano para fornecer um conjunto de posições de estrutura de cadeia pesada e leve em que as posições de alinhamento são idênticas em 98 % do número suficiente de cadeias pesadas e leves de anticorpo não humano;

(c) definir quanto ao anticorpo não humano a ser humanizado, um conjunto de resíduos de aminoácido expostos à superfície de cadeia pesada e leve usando o conjunto de posições de estrutura geradas na etapa (b);

(d) identificar a partir das sequências de aminoácido de anticorpo humano um conjunto de resíduos de aminoácido expostos à superfície de cadeia pesada e leve que é o mais estritamente idêntico ao conjunto de resíduos de aminoácido expostos à superfície definidos na etapa (c), em que a cadeia pesada e leve do anti-

corpo humano são ou não são naturalmente emparelhadas;

(e) substituir, na sequência de aminoácido do anticorpo não humano a ser humanizado, o conjunto de resíduos de aminoácido expostos à superfície de cadeia pesada e leve definido na etapa (c) com o conjunto de resíduos de aminoácido expostos à superfície de cadeia pesada e leve identificado na etapa (d);

(f) construir um modelo tridimensional da região variável do anticorpo não humano que resulta da substituição especificada na etapa (e);

(g) identificar, comparando-se os modelos tridimensionais construídos nas etapas (a) e (f), quaisquer resíduos de aminoácido dos conjuntos identificados nas etapas (c) ou (d), que estão dentro de 5 Angstroms de qualquer átomo de qualquer resíduo das regiões determinantes de complementaridade do anticorpo não humano a ser humanizado; e

(h) mudar quaisquer resíduos identificados na etapa (g) do resíduo de aminoácido humano para o resíduo de aminoácido não humano original para desse modo definir um conjunto de humanização de anticorpo não humano de resíduos de aminoácido expostos à superfície; com a condição de que a etapa (a) não precisa ser conduzida primeiro, mas deve ser conduzida antes da etapa (g).

Super-humanização

[059]O método compara a sequência não humana com o repertório de gene de linhagem germinativa humana funcional. Aqueles genes humanos que codificam estruturas canônicas idênticas ou estritamente relacionadas às sequências não humanas são selecionados. Aqueles genes humanos selecionados com homologia mais alta dentro das CDRs são escolhidos como doadores de FR. Finalmente, as CDRs não humanas são enxertadas sobre essas FRs humanas. Este método é descrito na patente WO 2005/079479 A2.

Otimização de Conteúdo da Cadeia Humana

[060]Este método compara a sequência não humana (por exemplo, de ca-

mundongo) com o repertório de genes de linhagem germinativa humana e as diferenças são registrada como Conteúdo da Cadeia Humana (HSC) que quantifica uma sequência no nível de epítomos de MHC/célula T potenciais. A sequência alvo depois é humanizada maximizando-se seu HSC ao invés de usar uma medida de identidade global para gerar variantes humanizadas diversas múltiplas (descritas em *Molecular Immunology*, 44, (2007) 1986-1998).

Rearranjo de estrutura

[061]As CDRs do anticorpo não humano são fundidas em estrutura a misturas de cDNA abrangendo todas as estruturas de gene de linhagem germinativa humana de cadeia pesada e leve conhecidas. Anticorpos humanizados depois são selecionados por exemplo, por movimentação da biblioteca de anticorpo exibida em fago. Isto é descrito em *Methods* 36, 43 - 60 (2005).

Definições

Cátions farmacologicamente aceitáveis

[062]Exemplos de cátions monovalentes e bivalentes farmacologicamente aceitáveis são debatidos em Berge, *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 66, 1 - 19 (1977), que é incorporado aqui por referência.

[063]O cátion farmacologicamente aceitável pode ser inorgânico ou orgânico.

[064]Exemplos de farmacologicamente cátions inorgânicos monovalentes aceitáveis incluem, mas não são limitados a, íons de metal alcalino tais como Na^+ e K^+ . Exemplos de cátions inorgânicos bivalentes farmacologicamente aceitáveis incluem, mas não são limitados a, cátions alcalinos terrosos tais como Ca^{2+} e Mg^{2+} . Exemplos de cátions orgânicos farmacologicamente aceitáveis incluem, mas não são limitados a, íon amônio (isto é NH_4^+) e íons amônios substituídos (por exemplo, NH_3R^+ , NH_2R_2^+ , NHR_3^+ , NR_4^+). Exemplos de alguns íons amônios substituídos adequados são aqueles derivado de: etilamina, dietilamina, dicicloexilamina, trietilamina, butilamina, etilenodiamino, etanolamina, dietanolamina, piperazina, benzilamina, fe-

nilbenzilamina, colina, meglumina, e trometamina, assim como aminoácidos, tais como lisina e arginina. Um exemplo de um íon amônio quaternário comum é $N(CH_3)_4^+$.

Substituintes

[065]A frase “opcionalmente substituído” como usado aqui, pertence a um grupo precursor que pode ser não substituído ou que pode ser substituído.

[066]A menos que de outro modo especificado, o termo “substituído” como usado aqui, pertence a um grupo precursor que porta um ou mais substituintes. O termo “substituinte” é usado aqui no sentido convencional e refere-se a uma porção química que é covalentemente ligada a, ou se apropriado, fundida a, um grupo precursor. Uma variedade ampla de substituintes é bem conhecida, e métodos para sua formação e introdução em uma variedade de grupos precursores também é bem conhecida.

[067]Exemplos de substituintes são descritos em mais detalhe abaixo.

[068]Alquila C_{1-12} : O termo “alquila C_{1-12} ” como usado aqui, pertence a uma porção monovalente obtida removendo-se um átomo de hidrogênio de um átomo de carbono de um composto de hidrocarboneto tendo de 1 a 12 átomos de carbono, que pode ser alifático ou alicíclico, e que pode ser saturado ou insaturado (por exemplo, parcialmente insaturado, completamente insaturado). O termo “alquila C_{1-4} ” como usado aqui, pertence a uma porção monovalente obtida removendo-se um átomo de hidrogênio de um átomo de carbono de um composto de hidrocarboneto tendo de 1 a 4 átomos de carbono, que pode ser alifático ou alicíclico, e que pode ser saturado ou insaturado (por exemplo, parcialmente insaturado, completamente insaturado). Assim, o termo “alquila” inclui as subclasses alquenila, alquinila, cicloalquila, etc., debatidas abaixo.

[069]Exemplos de grupos alquila saturados incluem, mas não são limitados a, metila (C_1), etila (C_2), propila (C_3), butila (C_4), pentila (C_5), hexila (C_6) e heptila

(C₇).

[070]Exemplos de grupos alquila lineares saturados incluem, mas não são limitados a, metila (C₁), etila (C₂), n-propila (C₃), n-butila (C₄), n-pentila (amila) (C₅), n-hexila (C₆) e n-heptila (C₇).

[071]Exemplos de grupos alquila ramificados saturados incluem iso-propila (C₃), iso-butila (C₄), sec-butila (C₄), terc-butila (C₄), iso-pentila (C₅), e neo-pentila (C₅).

[072]Alquenila C₂₋₁₂: O termo “alquenila -C₂₋₁₂” como usado aqui, pertence a um grupo alquila tendo uma ou mais ligações duplas carbono-carbono.

[073]Exemplos de grupos alquenila insaturados incluem, mas não são limitados a, etenila (vinila, -CH=CH₂), 1-propenila (-CH=CH-CH₃), 2-propenila (alila, -CH-CH=CH₂), isopropenila (1-metilvinila, -C(CH₃)=CH₂), butenila (C₄), pentenila (C₅), e hexenila (C₆).

[074]Alquinila C₂₋₁₂: O termo “alquinila C₂₋₁₂” como usado aqui, pertence a um grupo alquila tendo uma ou mais ligações triplas carbono-carbono.

[075]Exemplos de grupos alquinila insaturados incluem, mas não são limitados a, etinila (-C≡CH) e 2-propinila (propargila, -CH₂-C≡CH).

[076]Cicloalquila C₃₋₁₂: O termo “cicloalquila C₃₋₁₂” como usado aqui, pertence a um grupo alquila que também é um grupo cíclico; isto é, uma porção monovalente obtida removendo-se um átomo de hidrogênio de um átomo do anel alicíclico de um composto de hidrocarboneto cíclico (carbocíclico), porção esta que tem de 3 a 7 átomos de carbono, incluindo de 3 a 7 átomos no anel.

[077]Exemplos de grupos cicloalquila incluem, mas não são limitados a, aqueles derivados de:

compostos de hidrocarboneto monocíclicos saturados:

ciclopropano (C₃), ciclobutano (C₄), ciclopentano (C₅), ciclohexano (C₆), cicloheptano (C₇), metilciclopropano (C₄), dimetilciclopropano (C₅), metilciclobutano (C₅),

dimetilciclobutano (C₆), metilciclopentano (C₆), dimetilciclopentano (C₇) e metilcicloexano (C₇);

compostos de hidrocarboneto monocíclicos insaturados:

ciclopropeno (C₃), ciclobuteno (C₄), ciclopenteno (C₅), cicloexeno (C₆), metilciclopropeno (C₄), dimetilciclopropeno (C₅), metilciclobuteno (C₅), dimetilciclobuteno (C₆), metilciclopenteno (C₆), dimetilciclopenteno (C₇) e metilcicloexeno (C₇); e

compostos de hidrocarboneto policíclicos saturados:

norcarano (C₇), norpinano (C₇), norbornano (C₇).

[078]Heterociclila C₃₋₂₀: O termo “heterociclila C₃₋₂₀” como usado aqui, pertence a uma porção monovalente obtida removendo-se um átomo de hidrogênio de um átomo no anel de um composto heterocíclico, porção esta que tem de 3 a 20 átomos no anel, dos quais de 1 a 10 são heteroátomos no anel. Preferivelmente, cada anel tem de 3 a 7 átomos no anel, dos quais de 1 a 4 são heteroátomos no anel.

[079]Neste contexto, os prefixos (por exemplo, C₃₋₂₀, C₃₋₇, C₅₋₆, etc.) denotam o número de átomos no anel, ou faixa de número de átomos no anel, se átomos de carbono ou heteroátomos. Por exemplo, o termo “heterociclila C₅₋₆”, como usado aqui, pertence a um grupo heterocíclico tendo 5 ou 6 átomos no anel.

[080]Exemplos de grupos heterocíclicos monocíclicos incluem, mas não são limitados a, aqueles derivados de:

N₁: aziridina (C₃), azetidina (C₄), pirrolidina (tetraidropirrol) (C₅), pirrolina (por exemplo, 3-pirrolina, 2,5-diidropirrol) (C₅), 2H-pirrol ou 3H-pirrol (isopirrol, isoazol) (C₅), piperidina (C₆), diidropiridina (C₆), tetraidropiridina (C₆), azepina (C₇);

O₁: oxirano (C₃), oxetano (C₄), oxolano (tetraidrofurano) (C₅), oxol (diidrofurano) (C₅), oxano (tetraidropirano) (C₆), diidropirano (C₆), pirano (C₆), oxepina (C₇);

S₁: tiirano (C₃), tietano (C₄), tiolano (tetraidrotiofeno) (C₅), tiano (tetraidrotiopirano) (C₆), tiepano (C₇);

O₂: dioxolano (C₅), dioxano (C₆), e dioxepano (C₇);

O₃: trioxano (C₆);

N₂: imidazolidina (C₅), pirazolidina (diazolidina) (C₅), imidazolina (C₅), pirazolina (diidropirazol) (C₅), piperazina (C₆);

N₁O₁: tetraidrooxazol (C₅), diidrooxazol (C₅), tetraidroisoxazol (C₅), diidroisoxazol (C₅), morfolina (C₆), tetraidrooxazina (C₆), diidrooxazina (C₆), oxazina (C₆);

N₁S₁: tiazolina (C₅), tiazolidina (C₅), tiomorfolina (C₆);

N₂O₁: oxadiazina (C₆);

O₁S₁: oxatiol (C₅) e oxatiano (tioxano) (C₆); e,

N₁O₁S₁: oxatiazina (C₆).

[081]Exemplos de grupos heterocíclicos monocíclicos substituídos incluem aqueles derivados de sacarídeos, na forma cíclica, por exemplo, furanoses (C₅), tais como arabinofuranose, lixofuranose, ribofuranose, e xilofuranse, e piranoses (C₆), tais como alopiranose, altropiranose, glucopiranose, manopiranose, gulopiranose, idopiranose, galactopiranose, e talopiranose.

[082]Arla C₅₋₂₀: O termo “arila C₅₋₂₀”, como usado aqui, pertence a uma porção monovalente obtida removendo-se um átomo de hidrogênio de um átomo no anel aromático de um composto aromático, porção esta que tem de 3 a 20 átomos no anel. O termo “arila C₅₋₇”, como usado aqui, pertence a um porção monovalente obtida removendo-se um átomo de hidrogênio de um átomo no anel aromático de um composto aromático, porção esta que tem de 5 a 7 átomos no anel e o termo “arila C₅₋₁₀”, como usado aqui, pertence a uma porção monovalente obtida removendo-se um átomo de hidrogênio de um átomo no anel aromático de um composto aromático, porção esta que tem de 5 a 10 átomos no anel. Preferivelmente, cada anel tem de 5 a 7 átomos no anel.

[083]Neste contexto, os prefixos (por exemplo, C₃₋₂₀, C₅₋₇, C₅₋₆, C₅₋₁₀, etc.) denotam o número de átomos no anel, ou faixa de número de átomos no anel, se

átomos de carbono ou heteroátomos. Por exemplo, o termo “arila C₅₋₆” como usado aqui, pertence a um grupo arila tendo 5 ou 6 átomos no anel.

[084]Os átomos no anel podem ser todos átomos de carbono, como em “grupos carboarila”.

[085]Exemplos de grupos carboarila incluem, mas não são limitados a, aqueles derivados de benzeno (isto é fenila) (C₆), naftaleno (C₁₀), azuleno (C₁₀), antraceno (C₁₄), fenantreno (C₁₄), naftaceno (C₁₈), e pireno (C₁₆).

[086]Exemplos de grupos arila que compreendem anéis fundidos, pelo menos um dos quais é um anel aromático, incluem, mas não são limitados a, grupos derivados de indano (por exemplo, 2,3-diidro-1H-indeno) (C₉), indeno (C₉), isoindeno (C₉), tetralina (1,2,3,4-tetraidronaftaleno (C₁₀), acenafteno (C₁₂), fluoreno (C₁₃), fena-leno (C₁₃), acefenantreno (C₁₅), e aceantreno (C₁₆).

[087]Alternativamente, os átomos no anel podem incluir um ou mais heteroátomos, como em “grupos heteroarila”. Exemplos de grupos heteroarila monocíclicos incluem, mas não são limitados a, aqueles derivados de:

N₁: pirrol (azol) (C₅), piridina (azina) (C₆);

O₁: furano (oxol) (C₅);

S₁: tiofeno (tiol) (C₅);

N₁O₁: oxazol (C₅), isoxazol (C₅), isoxazina (C₆);

N₂O₁: oxadiazol (furazano) (C₅);

N₃O₁: oxatriazol (C₅);

N₁S₁: tiazol (C₅), isotiazol (C₅);

N₂: imidazol (1,3-diazol) (C₅), pirazol (1,2-diazol) (C₅), piridazina (1,2-diazina) (C₆), pirimidina (1,3-diazina) (C₆) (por exemplo, citosina, timina, uracila), pirazina (1,4-diazina) (C₆);

N₃: triazol (C₅), triazina (C₆); e,

N₄: tetrazol (C₅).

[088]Exemplos de heteroarila que compreendem anéis fundidos, incluem, mas não são limitados a:

C₉ (com 2 anéis fundidos) derivado de benzofurano (O₁), isobenzofurano (O₁), indol (N₁), isoindol (N₁), indolizina (N₁), indolina (N₁), isoindolina (N₁), purina (N₄) (por exemplo, adenina, guanina), benzimidazol (N₂), indazol (N₂), benzoxazol (N₁O₁), benzisoxazol (N₁O₁), benzodioxol (O₂), benzofurazano (N₂O₁), benzotriazol (N₃), benzotiofurano (S₁), benzotiazol (N₁S₁), benzotiadiazol (N₂S);

C₁₀ (com 2 anéis fundidos) derivado de cromeno (O₁), isocromeno (O₁), cromano (O₁), isocromano (O₁), benzodioxano (O₂), quinolina (N₁), isoquinolina (N₁), quinolizina (N₁), benzoxazina (N₁O₁), benzodiazina (N₂), piridopiridina (N₂), quinoxalina (N₂), quinazolina (N₂), cinolina (N₂), ftalazina (N₂), naftiridina (N₂), pteridina (N₄);

C₁₁ (com 2 anéis fundidos) derivado de benzodiazepina (N₂);

C₁₃ (com 3 anéis fundidos) derivado de carbazol (N₁), dibenzofurano (O₁), dibenzotiofeno (S₁), carbolina (N₂), pirimidina (N₂), piridoindol (N₂); e,

[089]C₁₄ (com 3 anéis fundidos) derivado de acridina (N₁), xanteno (O₁), tioxanteno (S₁), oxantreno (O₂), fenoxatiina (O₁S₁), fenazina (N₂), fenoxazina (N₁O₁), fenotiazina (N₁S₁), tiantreno (S₂), fenantridina (N₁), fenantrolina (N₂), fenazina (N₂).

[090]Os grupos acima, se sozinhos ou parte de um outro substituinte, podem por si só opcionalmente ser substituídos com um ou mais grupos selecionados de si mesmos e os substituintes adicionais listados abaixo.

Halo: -F, -Cl, -Br, e -I.

Hidróxi: -OH.

[091]Éter: -OR, em que R é um substituinte de éter, por exemplo, um grupo alquila C₁₋₇ (também referido como um grupo alcóxi C₁₋₇, debatido abaixo), um grupo heterociclila C₃₋₂₀ (também referido como um grupo heterocicilóxi C₃₋₂₀), ou um grupo arila C₅₋₂₀ (também referido como um grupo arilóxi C₅₋₂₀), preferivelmente um grupo alquila C₁₋₇.

[092]Alcóxi: -OR, em que R é um grupo alquila, por exemplo, um grupo alquila C₁₋₇. Exemplos de grupos alcóxi C₁₋₇ incluem, mas não são limitados a, -OMe (metóxi), -OEt (etóxi), -O(nPr) (n-propóxi), -O(iPr) (isopropóxi), -O(nBu) (n-butóxi), -O(sBu) (sec-butóxi), -O(iBu) (isobutóxi), e -O(tBu) (terc-butóxi).

[093]Acetal: -CH(OR¹)(OR²), em que R¹ e R² são independentemente substituintes de acetal, por exemplo, um grupo alquila C₁₋₇, um grupo heterociclila C₃₋₂₀, ou um grupo arila C₅₋₂₀, preferivelmente um grupo alquila C₁₋₇, ou, no caso de um grupo acetal "cíclico", R¹ e R², tomados junto com os dois átomos de oxigênio aos quais eles são ligados, e os átomos de carbono aos quais eles são ligados, formam um anel heterocíclico tendo de 4 a 8 átomos no anel. Exemplos de grupos acetais incluem, mas não são limitados a, -CH(OMe)₂, -CH(OEt)₂, e -CH(OMe)(OEt).

[094]Hemiacetal: -CH(OH)(OR¹), em que R¹ é um substituinte de hemiacetal, por exemplo, um grupo alquila C₁₋₇, um grupo heterociclila C₃₋₂₀, ou um grupo arila C₅₋₂₀, preferivelmente um grupo alquila C₁₋₇. Exemplos de grupos hemiacetal incluem, mas não são limitados a, -CH(OH)(OMe) e -CH(OH)(OEt).

[095]Cetal: -CR(OR¹)(OR²), onde R¹ e R² são como definidos para acetais, e R é um substituinte de cetal exceto hidrogênio, por exemplo, um grupo alquila C₁₋₇, um grupo heterociclila C₃₋₂₀, ou um grupo arila C₅₋₂₀, preferivelmente um grupo alquila C₁₋₇. Exemplos de grupos cetal incluem, mas não são limitados a, -C(Me)(OMe)₂, -C(Me)(OEt)₂, -C(Me)(OMe)(OEt), -C(Et)(OMe)₂, -C(Et)(OEt)₂, e -C(Et)(OMe)(OEt).

[096]Hemicetal: -CR(OH)(OR¹), onde R¹ é como definido para hemiacetais, e R é um substituinte de hemicetal exceto hidrogênio, por exemplo, um grupo alquila C₁₋₇, um grupo heterociclila C₃₋₂₀, ou um grupo arila C₅₋₂₀, preferivelmente um grupo alquila C₁₋₇. Exemplos de grupos hemiacetal incluem, mas não são limitados a, -C(Me)(OH)(OMe), -C(Et)(OH)(OMe), -C(Me)(OH)(OEt), e -C(Et)(OH)(OEt).

[097]Oxo (ceto, -ona): =O.

[098]Tiona (tiocetona): =S.

[099]Imino (imina): =NR, em que R é um substituinte de imino, por exemplo, hidrogênio, grupo alquila C₁₋₇, um grupo heterociclila C₃₋₂₀, ou um grupo arila C₅₋₂₀, preferivelmente hidrogênio ou um grupo alquila C₁₋₇. Exemplos de grupos éster incluem, mas não são limitados a, =NH, =NMe, =NEt, e =NPh.

[0100]Formila (carbaldeído, carboxaldeído): -C(=O)H.

[0101]Acila (ceto): -C(=O)R, em que R é um substituinte de acila, por exemplo, um grupo alquila C₁₋₇ (também referido como alquilacila C₁₋₇ ou alcanóila C₁₋₇), um grupo heterociclila C₃₋₂₀ (também referido como heterocicilacila C₃₋₂₀), ou um grupo arila C₅₋₂₀ (também referido como arilacila C₅₋₂₀), preferivelmente um grupo alquila C₁₋₇. Exemplos de grupos acila incluem, mas não são limitados a, -C(=O)CH₃ (acetila), -C(=O)CH₂CH₃ (propionila), -C(=O)C(CH₃)₃ (t-butila), e -C(=O)Ph (benzoíla, fenona).

[0102]Carbóxi (ácido carboxílico): -C(=O)OH.

[0103]Tiocarbóxi (ácido tiocarboxílico): -C(=S)SH.

[0104]Tiocarbóxi (ácido tiocarboxílico): -C(=O)SH.

[0105]Tionocarbóxi (ácido tionocarboxílico): -C(=S)OH.

[0106]Ácido imídico: -C(=NH)OH.

[0107]Ácido hidroxâmico: -C(=NOH)OH.

[0108]Éster (carboxilato, éster do ácido carboxílico, oxicarbonila): -C(=O)OR, em que R é um substituinte de éster, por exemplo, um grupo alquila C₁₋₇, um grupo heterociclila C₃₋₂₀, ou um grupo arila C₅₋₂₀, preferivelmente um grupo alquila C₁₋₇. Exemplos de grupos éster incluem, mas não são limitados a, -C(=O)OCH₃, -C(=O)OCH₂CH₃, -C(=O)OC(CH₃)₃, e -C(=O)OPh.

[0109]Acilóxi (éster reverso): -OC(=O)R, em que R é um substituinte de acilóxi, por exemplo, um grupo alquila C₁₋₇, um grupo heterociclila C₃₋₂₀, ou um grupo arila C₅₋₂₀, preferivelmente um grupo alquila C₁₋₇. Exemplos de grupos acilóxi inclu-

em, mas não são limitados a, $-\text{OC}(=\text{O})\text{CH}_3$ (acetóxi), $-\text{OC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{Ph}$, e $-\text{OC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{Ph}$.

[0110]Oxicarboilóxi: $-\text{OC}(=\text{O})\text{OR}$, em que R é um substituinte de éster, por exemplo, um grupo alquila C_{1-7} , um grupo heterociclila C_{3-20} , ou um grupo arila C_5-20 , preferivelmente um grupo alquila C_{1-7} . Exemplos de grupos éster incluem, mas não são limitados a, $-\text{OC}(=\text{O})\text{OCH}_3$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$, e $-\text{OC}(=\text{O})\text{OPh}$.

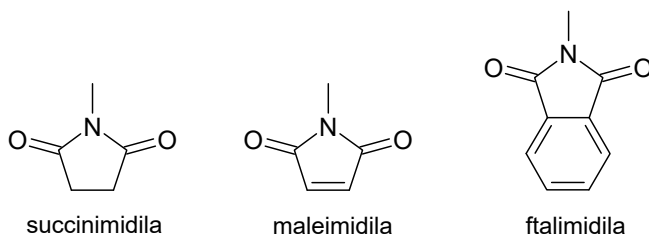
[0111]Amino: $-\text{NR}^1\text{R}^2$, em que R^1 e R^2 são independentemente substituintes de amino, por exemplo, hidrogênio, um grupo alquila C_{1-7} (também referido como alquilamino C_{1-7} ou di-alquilamino C_{1-7}), um grupo heterociclila C_{3-20} , ou um grupo arila C_5-20 , preferivelmente H ou um grupo alquila C_{1-7} , ou, no caso de um grupo amino “cíclico”, R^1 e R^2 , tomados junto com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados, formam um anel heterocíclico tendo de 4 a 8 átomos no anel. Grupos amino podem ser primários ($-\text{NH}_2$), secundários ($-\text{NHR}^1$), ou terciários ($-\text{NHR}^1\text{R}^2$), e na forma catiônica, podem ser quaternários ($-\text{NR}^1\text{R}^2\text{R}^3$). Exemplos de grupos amino incluem, mas não são limitados a, $-\text{NH}_2$, $-\text{NHCH}_3$, $-\text{NHC}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, e $-\text{NHPh}$. Exemplos de grupos amino cíclicos incluem, mas não são limitados a, aziridino, azetidino, pirrolidino, piperidino, piperazino, morfolino, e tiomorfolino.

[0112]Amido (carbamoíla, carbamila, aminocarbonila, carboxamida): $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^1\text{R}^2$, em que R^1 e R^2 são independentemente substituintes de amino, como definido para grupos amino. Exemplos de grupos amido incluem, mas não são limitados a, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NHCH}_3$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_3$, e $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, assim como grupos amido em que R^1 e R^2 , junto com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados, formam uma estrutura heterocíclica como em, por exemplo, piperidinocarbonila, morfolinocarbonila, tiomorfolinocarbonila, e piperazinocarbonila.

[0113]Tioamido (tiocarbamila): $-\text{C}(=\text{S})\text{NR}^1\text{R}^2$, em que R^1 e R^2 são indepen-

dentemente substituintes de amino, como definido para grupos amino. Exemplos de grupos amido incluem, mas não são limitados a, $-C(=S)NH_2$, $-C(=S)NHCH_3$, $-C(=S)N(CH_3)_2$, e $-C(=S)NHCH_2CH_3$.

[0114]Acilamido (acilamino): $-NR^1C(=O)R^2$, em que R^1 é um substituinte de amida, por exemplo, hidrogênio, um grupo alquila C_{1-7} , um grupo heterociclila C_{3-20} , ou um grupo arila C_{5-20} , preferivelmente hidrogênio ou um grupo alquila C_{1-7} , e R^2 é um substituinte de acila, por exemplo, um grupo alquila C_{1-7} , um grupo heterociclila C_{3-20} , ou um grupo arila C_{5-20} , preferivelmente hidrogênio ou um grupo alquila C_{1-7} . Exemplos de grupos acilamida incluem, mas não são limitados a, $-NHC(=O)CH_3$, $-NHC(=O)CH_2CH_3$, e $-NHC(=O)Ph$. R^1 e R^2 podem juntos formar uma estrutura cíclica, como em, por exemplo, succinimidila, maleimidila, e ftalimidila:



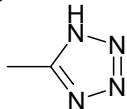
[0115]Aminocarbonilóxi: $-OC(=O)NR^1R^2$, em que R^1 e R^2 são independentemente substituintes de amino, como definido para grupos amino. Exemplos de grupos aminocarbonilóxi incluem, mas não são limitados a, $-OC(=O)NH_2$, $-OC(=O)NHMe$, $-OC(=O)NMe_2$, e $-OC(=O)NEt_2$.

[0116]Ureido: $-N(R^1)CONR^2R^3$ em que R^2 e R^3 são independentemente substituintes de amino, como definido para grupos amino, e R^1 é um substituinte de ureido, por exemplo, hidrogênio, um grupo alquila C_{1-7} , um grupo heterociclila C_{3-20} , ou um grupo arila C_{5-20} , preferivelmente hidrogênio ou um grupo alquila C_{1-7} . Exemplos de grupos ureido incluem, mas não são limitados a, $-NHCONH_2$, $-NHCONHMe$, $-NHCONHEt$, $-NHCONMe_2$, $-NHCONEt_2$, $-NMeCONH_2$, $-NMeCONHMe$, $-NMeCONHEt$, $-NMeCONMe_2$, e $-NMeCONEt_2$.

Guanidino: $-NH-C(=NH)NH_2$.

[0117]Tetrazolila: um anel aromático de cinco membros tendo quatro átomos

de nitrogênio e um átomo de carbono,



[0118]Imino: =NR, em que R é um substituinte de imino, por exemplo, por exemplo, hidrogênio, um grupo alquila C₁₋₇, um grupo heterociclila C₃₋₂₀, ou um grupo arila C₅₋₂₀, preferivelmente H ou um grupo alquila C₁₋₇. Exemplos de grupos imino incluem, mas não são limitados a, =NH, =NMe, e =NEt.

[0119]Amidina (amidino): -C(=NR)NR₂, em que cada R é um substituinte de amidina, por exemplo, hidrogênio, um grupo alquila C₁₋₇, um grupo heterociclila C₃₋₂₀, ou um grupo arila C₅₋₂₀, preferivelmente H ou um grupo alquila C₁₋₇. Exemplos de grupos amidina incluem, mas não são limitados a, -C(=NH)NH₂, -C(=NH)NMe₂, e -C(=NMe)NMe₂.

Nitro: -NO₂.

Nitroso: -NO.

Azido: -N₃.

Ciano (nitrila, carbonitrila): -CN.

Isociano: -NC.

Cianato: -OCN.

Isocianato: -NCO.

Tiociano (tiocianato): -SCN.

Isotiociano (isotiocianato): -NCS.

Sulfidril (tiol, mercapto): -SH.

[0120]Tioéter (sulfeto): -SR, em que R é um substituinte de tioéter, por exemplo, um grupo alquila C₁₋₇ (também referido como um grupo alquiltio C₁₋₇), um grupo heterociclila C₃₋₂₀, ou um grupo arila C₅₋₂₀, preferivelmente um grupo alquila C₁₋₇. Exemplos de grupos alquiltio C₁₋₇ incluem, mas não são limitados a, -SCH₃ e -SCH₂CH₃.

[0121]Dissulfeto: -SS-R, em que R é um substituinte de dissulfeto, por

exemplo, um grupo alquila C₁₋₇, um grupo heterociclila C₃₋₂₀, ou um grupo arila C₅₋₂₀, preferivelmente um grupo alquila C₁₋₇ (também referido aqui como dissulfeto de alquila C₁₋₇). Exemplos de grupos dissulfeto de alquila C₁₋₇ incluem, mas não são limitados a, -SSCH₃ e -SSCH₂CH₃.

[0122]Sulfina (sulfinila, sulfóxido): -S(=O)R, em que R é um substituinte de sulfina, por exemplo, um grupo alquila C₁₋₇, um grupo heterociclila C₃₋₂₀, ou um grupo arila C₅₋₂₀, preferivelmente um grupo alquila C₁₋₇. Exemplos de grupos sulfina incluem, mas não são limitados a, -S(=O)CH₃ e -S(=O)CH₂CH₃.

[0123]Sulfona (sulfonila): -S(=O)₂R, em que R é um substituinte de sulfona, por exemplo, um grupo alquila C₁₋₇, um grupo heterociclila C₃₋₂₀, ou um grupo arila C₅₋₂₀, preferivelmente um grupo alquila C₁₋₇, incluindo, por exemplo, um grupo alquila C₁₋₇ fluorado ou perfluorado. Exemplos de grupos sulfona incluem, mas não são limitados a, -S(=O)₂CH₃ (metanossulfonila, mesila), -S(=O)₂CF₃ (trifila), -S(=O)₂CH₂CH₃ (esila), -S(=O)₂C₄F₉ (nonaflila), -S(=O)₂CH₂CF₃ (tresila), -S(=O)₂CH₂CH₂NH₂ (taurila), -S(=O)₂Ph (fenilsulfonila, besila), 4-metilfenilsulfonila (tosila), 4-clorofenilsulfonila (closila), 4-bromofenilsulfonila (brosila), 4-nitrofenila (nosila), 2-naftalenossulfonato (napsila), e 5-dimetilamino-naftalen-1-ilsulfonato (dansila).

Ácido sulfínico (sulfino): -S(=O)OH, -SO₂H.

Ácido sulfônico (sulfo): -S(=O)₂OH, -SO₃H.

[0124]Sulfinato (éster do ácido sulfínico): -S(=O)OR; em que R é um substituinte de sulfinato, por exemplo, um grupo alquila C₁₋₇, um grupo heterociclila C₃₋₂₀, ou um grupo arila C₅₋₂₀, preferivelmente um grupo alquila C₁₋₇. Exemplos de grupos sulfinato incluem, mas não são limitados a, -S(=O)OCH₃ (metoxissulfinila; sulfinato de metila) e -S(=O)OCH₂CH₃ (etoxissulfinila; sulfinato de etila).

[0125]Sulfonato (éster do ácido sulfônico): -S(=O)₂OR, em que R é um substituinte de sulfonato, por exemplo, um grupo alquila C₁₋₇, um grupo heterociclila C₃₋₂₀,

ou um grupo arila C₅₋₂₀, preferivelmente um grupo alquila C₁₋₇. Exemplos de grupos sulfonato incluem, mas não são limitados a, -S(=O)₂OCH₃ (metoxissulfonila; sulfonato de metila) e -S(=O)₂OCH₂CH₃ (etoxissulfonila; sulfonato de etila).

[0126]Sulfinilóxi: -OS(=O)R, em que R é um substituinte de sulfinilóxi, por exemplo, um grupo alquila C₁₋₇, um grupo heterociclila C₃₋₂₀, ou um grupo arila C₅₋₂₀, preferivelmente um grupo alquila C₁₋₇. Exemplos de grupos sulfinilóxi incluem, mas não são limitados a, -OS(=O)CH₃ e -OS(=O)CH₂CH₃.

[0127]Sulfonilóxi: -OS(=O)₂R, em que R é um substituinte de sulfonilóxi, por exemplo, um grupo alquila C₁₋₇, um grupo heterociclila C₃₋₂₀, ou um grupo arila C₅₋₂₀, preferivelmente um grupo alquila C₁₋₇. Exemplos de grupos sulfonilóxi incluem, mas não são limitados a, -OS(=O)₂CH₃ (mesilato) e -OS(=O)₂CH₂CH₃ (esilato).

[0128]Sulfato: -OS(=O)₂OR; em que R é um substituinte de sulfato, por exemplo, um grupo alquila C₁₋₇, um grupo heterociclila C₃₋₂₀, ou um grupo arila C₅₋₂₀, preferivelmente um grupo alquila C₁₋₇. Exemplos de grupos sulfato incluem, mas não são limitados a, -OS(=O)₂OCH₃ e -SO(=O)₂OCH₂CH₃.

[0129]Sulfamila (sulfamoíla; amida do ácido sulfinico; sulfinamida): -S(=O)NR¹R², em que R¹ e R² são independentemente substituintes de amino, como definido para grupos amino. Exemplos de grupos sulfamila incluem, mas não são limitados a, -S(=O)NH₂, -S(=O)NH(CH₃), -S(=O)N(CH₃)₂, -S(=O)NH(CH₂CH₃), -S(=O)N(CH₂CH₃)₂, e -S(=O)NHPH.

[0130]Sulfonamido (sulfinamoíla; amida do ácido sulfônico; sulfonamida): -S(=O)₂NR¹R², em que R¹ e R² são independentemente substituintes de amino, como definido para grupos amino. Exemplos de grupos sulfonamido incluem, mas não são limitados a, -S(=O)₂NH₂, -S(=O)₂NH(CH₃), -S(=O)₂N(CH₃)₂, -S(=O)₂NH(CH₂CH₃), -S(=O)₂N(CH₂CH₃)₂, e -S(=O)₂NHPH.

[0131]Sulfamino: -NR¹S(=O)₂OH, em que R¹ é um substituinte de amino, como definido para grupos amino. Exemplos de grupos sulfamino incluem, mas não

são limitados a, $-\text{NHS}(=\text{O})_2\text{OH}$ e $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{S}(=\text{O})_2\text{OH}$.

[0132]Sulfonamino: $-\text{NR}^1\text{S}(=\text{O})_2\text{R}$, em que R^1 é um substituinte de amino, como definido para grupos amino, e R é um substituinte de sulfonamino, por exemplo, um grupo alquila C_{1-7} , um grupo heterociclila C_{3-20} , ou um grupo arila C_{5-20} , preferivelmente um grupo alquila C_{1-7} . Exemplos de grupos sulfonamino incluem, mas não são limitados a, $-\text{NHS}(=\text{O})_2\text{CH}_3$ e $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{S}(=\text{O})_2\text{C}_6\text{H}_5$.

[0133]Sulfinamino: $-\text{NR}^1\text{S}(=\text{O})\text{R}$, em que R^1 é um substituinte de amino, como definido para grupos amino, e R é um substituinte de sulfinamino, por exemplo, um grupo alquila C_{1-7} , um grupo heterociclila C_{3-20} , ou um grupo arila C_{5-20} , preferivelmente um grupo alquila C_{1-7} . Exemplos de grupos sulfinamino incluem, mas não são limitados a, $-\text{NHS}(=\text{O})\text{CH}_3$ e $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{S}(=\text{O})\text{C}_6\text{H}_5$.

[0134]Fosfino (fosfina): $-\text{PR}_2$, em que R é um substituinte de fosfino, por exemplo, $-\text{H}$, um grupo alquila C_{1-7} , um grupo heterociclila C_{3-20} , ou um grupo arila C_{5-20} , preferivelmente $-\text{H}$, um grupo alquila C_{1-7} , ou um grupo arila C_{5-20} . Exemplos de grupos fosfino incluem, mas não são limitados a, $-\text{PH}_2$, $-\text{P}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{P}(\text{t-Bu})_2$, e $-\text{P}(\text{Ph})_2$.

Fosfo: $-\text{P}(=\text{O})_2$.

[0135]Fosfinila (óxido de fosfina): $-\text{P}(=\text{O})\text{R}_2$, em que R é um substituinte de fosfinila, por exemplo, um grupo alquila C_{1-7} , um grupo heterociclila C_{3-20} , ou um grupo arila C_{5-20} , preferivelmente um grupo alquila C_{1-7} ou um grupo arila C_{5-20} . Exemplos de grupos fosfinila incluem, mas não são limitados a, $-\text{P}(=\text{O})(\text{CH}_3)_2$, $-\text{P}(=\text{O})(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{P}(=\text{O})(\text{t-Bu})_2$, e $-\text{P}(=\text{O})(\text{Ph})_2$.

Ácido fosfônico (fosfono): $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})_2$.

[0136]Fosfonato (fosfono éster): $-\text{P}(=\text{O})(\text{OR})_2$, onde R é um substituinte de fosfonato, por exemplo, $-\text{H}$, um grupo alquila C_{1-7} , um grupo heterociclila C_{3-20} , ou um grupo arila C_{5-20} , preferivelmente $-\text{H}$, um grupo alquila C_{1-7} , ou um grupo arila C_{5-20} . Exemplos de grupos fosfonato incluem, mas não são limitados a, $-\text{P}(=\text{O})(\text{OCH}_3)_2$,

$-P(=O)(OCH_2CH_3)_2$, $-P(=O)(O-t-Bu)_2$, e $-P(=O)(OPh)_2$.

Ácido fosfórico (fosfonoóxi): $-OP(=O)(OH)_2$.

[0137]Fosfato (éster de fosfonoóxi): $-OP(=O)(OR)_2$, onde R é um substituinte de fosfato, por exemplo, -H, um grupo alquila C₁₋₇, um grupo heterociclila C₃₋₂₀, ou um grupo arila C₅₋₂₀, preferivelmente -H, um grupo alquila C₁₋₇, ou um grupo arila C₅₋₂₀. Exemplos de grupos fosfato incluem, mas não são limitados a, $-OP(=O)(OCH_3)_2$, $-OP(=O)(OCH_2CH_3)_2$, $-OP(=O)(O-t-Bu)_2$, e $-OP(=O)(OPh)_2$.

Ácido fosforoso: $-OP(OH)_2$.

[0138]Fosfito: $-OP(OR)_2$, onde R é um substituinte de fosfito, por exemplo, -H, um grupo alquila C₁₋₇, um grupo heterociclila C₃₋₂₀, ou um grupo arila C₅₋₂₀, preferivelmente -H, um grupo alquila C₁₋₇, ou um grupo arila C₅₋₂₀. Exemplos de grupos fosfito incluem, mas não são limitados a, $-OP(OCH_3)_2$, $-OP(OCH_2CH_3)_2$, $-OP(O-t-Bu)_2$, e $-OP(OPh)_2$.

[0139]Fosforamidita: $-OP(OR^1)-NR^2_2$, onde R¹ e R² são substituintes de fosforamidita, por exemplo, -H, um (opcionalmente substituído) grupo alquila C₁₋₇, um grupo heterociclila C₃₋₂₀, ou um grupo arila C₅₋₂₀, preferivelmente -H, um grupo alquila C₁₋₇, ou um grupo arila C₅₋₂₀. Exemplos de grupos fosforamidita incluem, mas não são limitados a, $-OP(OCH_2CH_3)-N(CH_3)_2$, $-OP(OCH_2CH_3)-N(i-Pr)_2$, e $-OP(OCH_2CH_2CN)-N(i-Pr)_2$.

[0140]Fosforamidato: $-OP(=O)(OR^1)-NR^2_2$, onde R¹ e R² são substituintes de fosforamidato, por exemplo, -H, um grupo alquila C₁₋₇ (opcionalmente substituído), um grupo heterociclila C₃₋₂₀, ou um grupo arila C₅₋₂₀, preferivelmente -H, um grupo alquila C₁₋₇, ou um grupo arila C₅₋₂₀. Exemplos de grupos fosforamidato incluem, mas não são limitados a, $-OP(=O)(OCH_2CH_3)-N(CH_3)_2$, $-OP(=O)(OCH_2CH_3)-N(i-Pr)_2$, e $-OP(=O)(OCH_2CH_2CN)-N(i-Pr)_2$.

Alquileno

[0141]Alquileno C₃₋₁₂: O termo “alquileno C₃₋₁₂”, como usado aqui, pertence a

uma porção bidentada obtida removendo-se dois átomos de hidrogênio, tanto do mesmo átomo de carbono, quanto um de cada um de dois átomos de carbono diferentes, de um composto de hidrocarboneto tendo de 3 a 12 átomos de carbono (a menos que de outro modo especificado), que pode ser alifático ou alicíclico, e que pode ser saturado, parcialmente insaturado, ou completamente insaturado. Assim, o termo “alquilenos” inclui as subclasses alquenileno, alquinileno, cicloalquilenos, etc., debatidas abaixo.

[0142]Exemplos de grupos alquilenos C_{3-12} saturados lineares incluem, mas não são limitados a, $-(CH_2)_n-$ onde n é um número inteiro de 3 a 12, por exemplo, $-CH_2CH_2CH_2-$ (propileno), $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ (butileno), $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ (pentileno) e $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ (heptileno).

[0143]Exemplos de grupos alquilenos C_{3-12} saturados ramificados incluem, mas não são limitados a, $-CH(CH_3)CH_2-$, $-CH(CH_3)CH_2CH_2-$, $-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH(CH_3)CH_2-$, $-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_2-$, $-CH(CH_2CH_3)-$, $-CH(CH_2CH_3)CH_2-$, e $-CH_2CH(CH_2CH_3)CH_2-$.

[0144]Exemplos de grupos alquilenos C_{3-12} parcialmente insaturados lineares (grupos alquenileno e alquinileno C_{3-12}) incluem, mas não são limitados a, $-CH=CH-CH_2-$, $-CH_2-CH=CH_2-$, $-CH=CH-CH_2-CH_2-$, $-CH=CH-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH=CH-CH=CH-$, $-CH=CH-CH=CH-CH_2-$, $-CH=CH-CH=CH-CH_2-CH_2-$, $-CH=CH-CH_2-CH=CH-$, $-CH=CH-CH_2-CH_2-CH=CH-$, e $-CH_2-C\equiv C-CH_2-$.

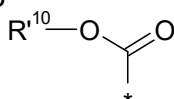
[0145]Exemplos de grupos alquilenos C_{3-12} parcialmente insaturados ramificados (grupos alquenileno e alquinileno C_{3-12}) incluem, mas não são limitados a, $-C(CH_3)=CH-$, $-C(CH_3)=CH-CH_2-$, $-CH=CH-CH(CH_3)-$ e $-C\equiv C-CH(CH_3)-$.

[0146]Exemplos de grupos alquilenos C_{3-12} saturados alicíclicos (cicloalquilenos C_{3-12}) incluem, mas não são limitados a, ciclopentileno (por exemplo, ciclopent-1,3-ileno), e cicloexileno (por exemplo, cicloex-1,4-ileno).

[0147]Exemplos de grupos alquilenos C_{3-12} parcialmente insaturados alicíclicos

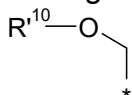
cos (cicloalquilenos C₃₋₁₂) incluem, mas não são limitados a, ciclopentenileno (por exemplo, 4-ciclopenten-1,3-ileno), cicloexenileno (por exemplo, 2-cicloexen-1,4-ileno; 3-cicloexen-1,2-ileno; 2,5-cicloexadien-1,4-ileno).

[0148]Grupo de proteção de nitrogênio carbamato: o termo “grupo de proteção de nitrogênio carbamato” pertence a uma porção que mascara o nitrogênio na ligação de imina, e estes são bem conhecidos na técnica. Estes grupos têm a estrutura seguinte:



em que R¹⁰ é R como definido acima. Um número grande de grupos adequados é descrito nas páginas 503 a 549 de Greene, T.W. e Wuts, G.M., Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª Edição, John Wiley & Sons, Inc., 1999, que é incorporado aqui por referência.

[0149]Grupo de proteção de nitrogênio hemi-aminal: o termo “grupo de proteção de nitrogênio hemi-aminal” pertence a um grupo tendo a estrutura seguinte:



em que R¹⁰ é R como definido acima. Um número grande de grupos adequados é descrito nas páginas 633 a 647 como grupos de proteção de amida de Greene, T.W. e Wuts, G.M., Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª Edição, John Wiley & Sons, Inc., 1999, que é incorporado aqui por referência.

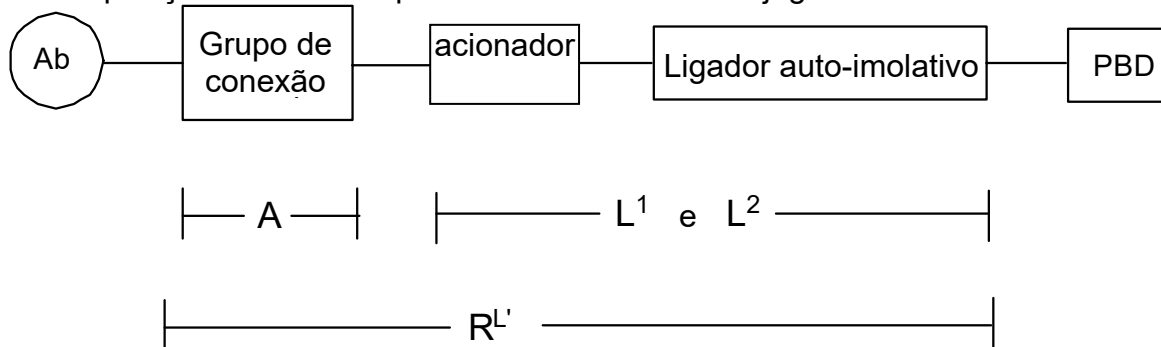
[0150]Os grupos Grupo de proteção de nitrogênio carbamato e Grupo de proteção de nitrogênio hemi-aminal podem ser juntamente denominados um “grupo de proteção de nitrogênio para a síntese”.

Conjugados

[0151]A presente invenção fornece um conjugado compreendendo um composto de PBD conectado ao anticorpo via uma Unidade ligadora.

[0152]Em uma forma de realização, o conjugado compreende o anticorpo

conectado a um grupo contendo espaçador, o espaçador conectado a um acionador, o acionador conectado a um ligador auto-imolativo, e o ligador auto-imolativo conectado à posição N10 do composto de PBD. Um tal conjugado é ilustrado abaixo:



onde Ab é o anticorpo como definido acima e PBD é um composto de pirrolobenzodiazepina (D), como descrito aqui. A ilustração mostra as porções que correspondem a $R^{L'}$, A, L^1 e L^2 em certas formas de realização da invenção. $R^{L'}$ pode ser $R^{L1'}$ ou $R^{L2'}$. D é D^L com $R^{L1'}$ ou $R^{L2'}$ removido.

[0153]A presente invenção é adequada para o uso em fornecer um composto de PBD a um sítio preferido em um indivíduo. Nas formas de realização preferidas, o conjugado permite a liberação de um composto de PBD ativo que não retém qualquer parte do ligador. Não existe nenhum resto presente que possa afetar a reatividade do composto de PBD.

[0154]O ligador fixa o anticorpo à porção D do fármaco de PBD através de ligação(ões) covalente(s). O ligador é uma porção bifuncional ou multifuncional que pode ser usada para ligar uma ou mais porções do fármaco (D) e uma unidade de anticorpo (Ab) para formar conjugados de anticorpo-fármaco (ADC). O ligador ($R^{L'}$) pode ser estável fora de uma célula, isto é extracelular, ou ele pode ser clivável por atividade enzimática, hidrólise, ou outras condições metabólicas. Conjugados de anticorpo-fármaco (ADC) podem ser convenientemente preparados usando um ligador tendo funcionalidade reativa para ligar à porção do fármaco e ao anticorpo. Uma cisteína tiol, ou uma amina, por exemplo, cadeia de término N ou lateral de aminoácido tal como lisina, do anticorpo (Ab) pode formar uma ligação com um grupo funcional

de um reagente de ligador ou espaçador, porção do fármaco de PBD (D) ou reagente de ligador de fármaco (D^L , $D-R^L$), onde R^L pode ser R^{L1} ou R^{L2} .

[0155]Os ligadores do ADC preferivelmente impedem a agregação de moléculas de ADC e mantêm o ADC livremente solúvel em meios aquosos e em um estado monomérico.

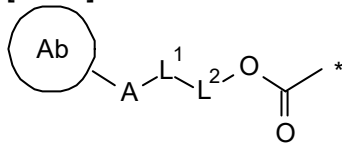
[0156]Os ligadores do ADC são preferivelmente estáveis extracelularmente. Antes do transporte ou liberação em uma célula, o conjugado de anticorpo-fármaco (ADC) é preferivelmente estável e permanece intacto, isto é o anticorpo permanece ligado à porção do fármaco. Os ligadores são estáveis fora da célula alvo e podem ser clivados em alguma taxa eficaz dentro da célula. Um ligador eficaz: (i) manterá as propriedades de ligação específicas do anticorpo; (ii) permitirá a liberação intracelular do conjugado ou porção do fármaco; (iii) permanecerá estável e intacto, isto é não clivado, até que o conjugado fosse liberado ou transportado para o seu sítio alvo; e (iv) manterá um efeito de morte celular, citotóxico ou um efeito citostático da porção do fármaco de PBD. A estabilidade do ADC pode ser medida por técnicas analíticas padrão tais como espectroscopia de massa, HPLC, e a técnica de separação/análise LC/MS.

[0157]A fixação covalente do anticorpo e da porção do fármaco requer que o ligador tenha dois grupos funcionais reativos, isto é bivalência em um sentido reativo. Reagentes de ligador bivalentes que são úteis para fixar duas ou mais porções funcionais ou biologicamente ativas, tais como peptídeos, ácidos nucleicos, fármacos, toxinas, anticorpos, haptenos, e grupos repórteres são conhecidos, e métodos foram descritos para seus conjugados resultantes (Hermanson, G.T. (1996) Bioconjugate Techniques; Academic Press: Nova Iorque, p 234 - 242).

[0158]Em uma outra forma de realização, o ligador pode ser substituído com grupos que modulam a agregação, solubilidade ou reatividade. Por exemplo, um substituinte de sulfonato pode aumentar a solubilidade em água do reagente e facilit-

tar a reação de acoplamento do reagente de ligador com o anticorpo ou a porção do fármaco, ou facilitar a reação de acoplamento de Ab-L com D^L, ou D^L-L com Ab, dependendo da via sintética utilizada para preparar o ADC.

[0159]Em uma forma de realização, L-R^L é um grupo:



onde o asterisco indica o ponto de fixação à Unidade do Fármaco (D), Ab é o anticorpo (L), L¹ é um ligador, A é um grupo de conexão conectando L¹ ao anticorpo, L² é uma ligação covalente ou junto com -OC(=O)- forma um ligador auto-imolativo, e L¹ ou L² é um ligador clivável.

L¹ é preferivelmente o ligador clivável, e pode ser referido como um acionador para a ativação do ligador para clivagem.

[0160]A natureza de L¹ e L², onde presentes, pode variar amplamente. Estes grupos são escolhidos na base de suas características de clivagem, que podem ser ditas pelas condições no sítio ao qual o conjugado é liberado. Aqueles ligadores que são clivados pela ação de enzimas são preferidos, embora ligadores que são cliváveis por mudanças no pH (por exemplo, lábil em ácido ou base), temperatura ou na irradiação (por exemplo, fotolábel) também podem ser usados. Ligadores que são cliváveis sob condições de redução ou oxidação também podem encontrar uso na presente invenção.

[0161]L¹ pode compreender uma sequência de aminoácido contíguas. A sequência de aminoácido pode ser o substrato alvo para clivagem enzimática, desse modo permitindo a liberação de L-R^L da posição N10.

[0162]Em uma forma de realização, L¹ é clivável pela ação de uma enzima. Em uma forma de realização, a enzima é uma esterase ou uma peptidase.

[0163]Em uma forma de realização, L² está presente e junto com -C(=O)O- forma um ligador auto-imolativo. Em uma forma de realização, L² é um substrato pa-

ra atividade enzimática, desse modo permitindo a liberação de $L-R^{L^1}$ da posição N10.

[0164]Em uma forma de realização, onde L^1 é clivável pela ação de uma enzima e L^2 está presente, a enzima cliva a ligação entre L^1 e L^2 .

[0165] L^1 e L^2 , onde presentes, podem ser conectados por uma ligação selecionada de:

-C(=O)NH-,
 -C(=O)O-,
 -NHC(=O)-,
 -OC(=O)-,
 -OC(=O)O-,
 -NHC(=O)O-,
 -OC(=O)NH-, e
 -NHC(=O)NH-.

[0166]Um grupo amino de L^1 que conecta a L^2 pode ser o término N de um aminoácido ou pode ser derivado de um grupo amino de uma cadeia lateral de aminoácido, por exemplo uma cadeia lateral de aminoácido lisina.

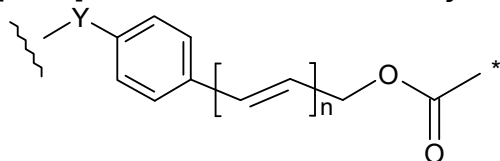
[0167]Um grupo carboxila de L^1 que conecta a L^2 pode ser o término C de um aminoácido ou pode ser derivado de um grupo carboxila de uma cadeia lateral de aminoácido, por exemplo uma cadeia lateral de aminoácido ácido glutâmico.

[0168]Um grupo hidroxila de L^1 que conecta a L^2 pode ser derivado de um grupo hidroxila de uma cadeia lateral de aminoácido, por exemplo uma cadeia lateral de aminoácido serina.

[0169]O termo “cadeia lateral de aminoácido” inclui aqueles grupos encontrados em: (i) aminoácidos que ocorrem naturalmente tais como alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutâmico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina, e valina; (ii) aminoácidos menores tais como ornitina e citrulina; (iii) aminoá-

cidos não naturais, beta-aminoácidos, análogos sintéticos e derivados de aminoácidos que ocorrem naturalmente; e (iv) todos os enantiômeros, diastereômeros, isomericamente enriquecidos, isotopicamente rotulados (por exemplo, ^2H , ^3H , ^{14}C , ^{15}N), formas protegidas, e misturas racêmicas destes.

[0170] Em uma forma de realização, $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ e L^2 juntos formam o grupo:



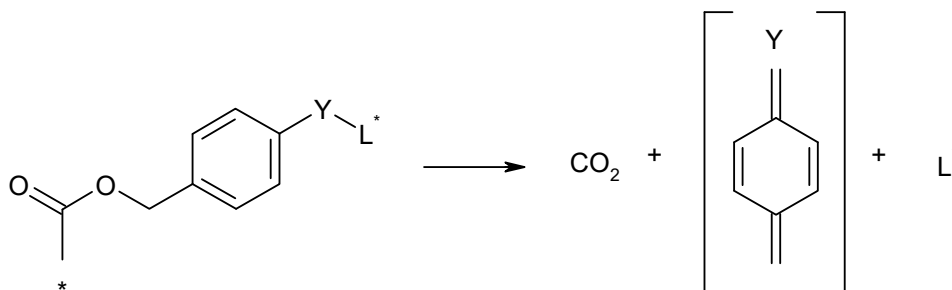
onde o asterisco indica o ponto de fixação à posição N10, a linha ondulada indica o ponto de fixação ao ligador L^1 , Y é $-\text{N}(\text{H})-$, $-\text{O}-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})-$ ou $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$, e n é 0 a 3. O anel de fenileno é opcionalmente substituído com um, dois ou três substituintes como descrito aqui. Em uma forma de realização, o grupo fenileno é opcionalmente substituído com halo, NO_2 , R ou OR.

Em uma forma de realização, Y é NH.

[0171] Em uma forma de realização, n é 0 ou 1. Preferivelmente, n é 0.

Onde Y é NH e n é 0, o ligador auto-imolativo pode ser referido como um ligador de p-aminobenzilcarbonila (PABC).

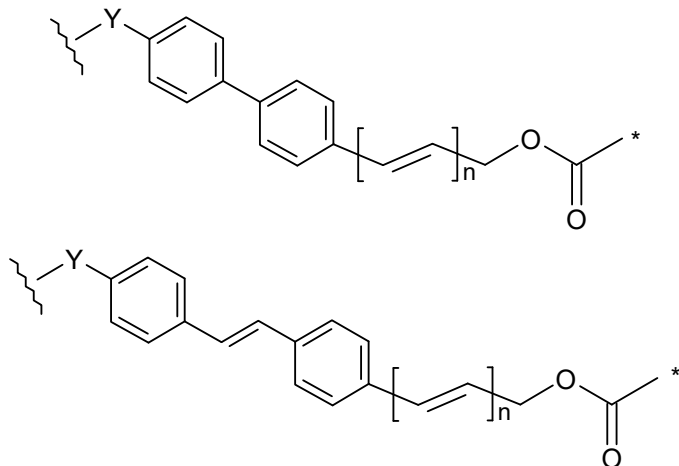
[0172] O ligador auto-imolativo levará em consideração a liberação do composto protegido quando um sítio remoto é ativado, procedendo ao longo das linhas mostradas abaixo (para $n=0$):



onde L^* é a forma ativada da porção remanescente do ligador. Estes grupos têm a vantagem de separar o sítio de ativação do composto sendo protegido. Como descrito acima, o grupo fenileno pode ser opcionalmente substituído.

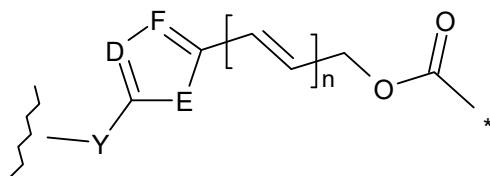
[0173] Em uma forma de realização descrita aqui, o grupo L^* é um ligador L^1 como descrito aqui, que pode incluir um grupo dipeptídeo.

[0174] Em uma outra forma de realização, $-C(=O)O-$ e L^2 juntos formam um grupo selecionado de:



onde o asterisco, a linha ondulada, Y, e n são como definidos acima. Cada anel de fenileno é opcionalmente substituído com um, dois ou três substituintes como descrito aqui. Em uma forma de realização, o anel de fenileno tendo o substituinte de Y é opcionalmente substituído e o anel de fenileno não tendo o substituinte de Y é não substituído. Em uma forma de realização, o anel de fenileno tendo o substituinte de Y é não substituído e o anel de fenileno não tendo o substituinte de Y é opcionalmente substituído.

[0175] Em uma outra forma de realização, $-C(=O)O-$ e L^2 juntos formam um grupo selecionado de:



onde o asterisco, a linha ondulada, Y, e n são como definidos acima, E é O, S ou NR, D é N, CH, ou CR, e F é N, CH, ou CR.

Em uma forma de realização, D é N.

Em uma forma de realização, D é CH.

Em uma forma de realização, E é O ou S.

Em uma forma de realização, F é CH.

Em uma forma de realização preferida, o ligador é um ligador lábil em catepsina.

[0176]Em uma forma de realização, L¹ compreende um dipeptídeo. O dipeptídeo pode ser representado como -NH-X₁-X₂-CO-, onde -NH- e -CO- representam os terminais N e C dos grupos de aminoácido X₁ e X₂ respectivamente. Os aminoácidos no dipeptídeo podem ser qualquer combinação de aminoácidos naturais. Onde o ligador é um ligador lábil em catepsina, o dipeptídeo pode ser o sítio de ação para clivagem mediada por catepsina.

[0177]Adicionalmente, para aqueles grupos de aminoácidos tendo funcionalidade de cadeia lateral de carboxila ou amino, por exemplo Glu e Lys respectivamente, CO e NH podem representar esta funcionalidade de cadeia lateral.

[0178]Em uma forma de realização, o grupo -X₁-X₂- no dipeptídeo, -NH-X₁-X₂-CO-, é selecionado de:

-Phe-Lys-,

-Val-Ala-,

-Val-Lys-,

-Ala-Lys-,

-Val-Cit-,

-Phe-Cit-,

-Leu-Cit-,

-Ile-Cit-,

-Phe-Arg-,

-Trp-Cit-

onde Cit é citrulina.

[0179]Preferivelmente, o grupo -X₁-X₂- no dipeptídeo, -NH-X₁-X₂-CO-, é se-

selecionado de:

-Phe-Lys-,

-Val-Ala-,

-Val-Lys-,

-Ala-Lys-,

-Val-Cit-.

[0180]O mais preferivelmente, o grupo -X₁-X₂- no dipeptídeo, -NH-X₁-X₂-CO-, é -Phe-Lys- ou -Val-Ala-.

[0181]Outras combinações de dipeptídeo podem ser usadas, incluindo aquelas descritas por Dubowchik *et al.*, *Bioconjugate Chemistry*, 2002, 13,855 - 869, que é incorporado aqui por referência.

[0182]Em uma forma de realização, a cadeia lateral de aminoácido é derivada, onde apropriado. Por exemplo, um grupo amino ou grupo carbóxi de uma cadeia lateral de aminoácido pode ser derivado.

[0183]Em uma forma de realização, um grupo amino NH₂ de um aminoácido de cadeia lateral, tal como lisina, é uma forma derivada selecionada do grupo consistindo em NHR e NRR'.

[0184]Em uma forma de realização, um grupo carbóxi COOH de um aminoácido de cadeia lateral, tal como ácido aspártico, é uma forma derivada selecionada do grupo consistindo em COOR, CONH₂, CONHR e CONRR'.

[0185]Em uma forma de realização, a cadeia lateral de aminoácido é quimicamente protegida, onde apropriado. O grupo de proteção da cadeia lateral pode ser um grupo como debatido abaixo em relação ao grupo R^L. Os presentes inventores estabeleceram que sequências de aminoácido protegidas são cliváveis por enzimas. Por exemplo, foi estabelecido que uma sequência de dipeptídeo compreendendo um resíduo de Lys protegido por cadeia lateral de Boc é clivável por catepsina.

[0186]Grupos de proteção para as cadeias laterais de aminoácidos são bem

conhecidos na técnica e são descritos no Novabiochem Catalog. Estratégias de grupo de proteção adicionais são apresentadas em *Protective Groups in Organic Synthesis*, Greene e Wuts.

[0187] Grupos de proteção de cadeia lateral possíveis são mostrados abaixo para aqueles aminoácidos tendo funcionalidade de cadeia lateral reativa:

Arg: Z, Mtr, Tos;

Asn: Trt, Xan;

Asp: Bzl, t-Bu;

Cys: Acn, Bzl, Bzl-OMe, Bzl-Me, Trt;

Glu: Bzl, t-Bu;

Gln: Trt, Xan;

His: Boc, Dnp, Tos, Trt;

Lys: Boc, Z-Cl, Fmoc, Z, Alloc;

Ser: Bzl, TBDMS, TBDPS;

Thr: Bz;

Trp: Boc;

Tyr: Bzl, Z, Z-Br.

[0188] Em uma forma de realização, a proteção da cadeia lateral é selecionada para ser ortogonal a um grupo fornecido como, ou como parte de, um grupo de capeamento, onde presente. Assim, a remoção do grupo de proteção da cadeia lateral não remove o grupo de capeamento, ou qualquer funcionalidade do grupo de proteção que é parte do grupo de capeamento.

[0189] Em outras formas de realização da invenção, os aminoácidos selecionados são aqueles não tendo nenhuma funcionalidade de cadeia lateral reativa. Por exemplo, os aminoácidos podem ser selecionados de: Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, e Val.

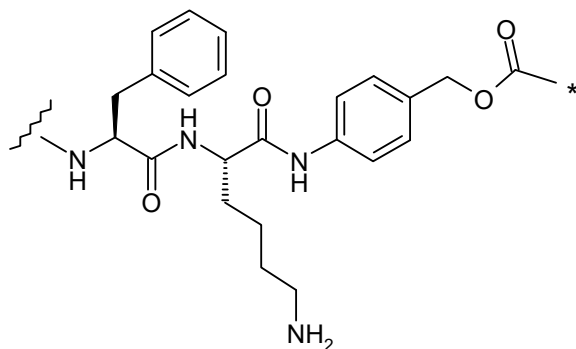
[0190] Em uma forma de realização, o dipeptídeo é usado em combinação

com um ligador auto-imolativo. O ligador auto-imolativo pode ser conectado a $-X_2-$.

[0191]Onde um ligador auto-imolativo está presente, $-X_2-$ é conectado diretamente ao ligador auto-imolativo. Preferivelmente o grupo $-X_2-CO-$ é conectado a Y, onde Y é NH, desse modo formando o grupo $-X_2-CO-NH-$.

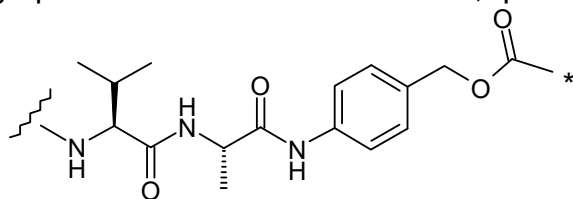
[0192]-NH- X_1- é conectado diretamente a A. Pode-se compreender a funcionalidade $-CO-$ desse modo para formar uma ligação de amida com $-X_1-$.

[0193]Em uma forma de realização, L^1 e L^2 junto com $-OC(=O)-$ compreendem o grupo $NH-X_1-X_2-CO-PABC-$. O grupo PABC é conectado diretamente à posição N10. Preferivelmente, o ligador auto-imolativo e o dipeptídeo juntos formam o grupo $-NH-Phe-Lys-CO-NH-PABC-$, que é ilustrado abaixo:



onde o asterisco indica o ponto de fixação à posição N10, e a linha ondulada indica o ponto de fixação à porção remanescente do ligador L^1 ou o ponto de fixação a A. Preferivelmente, a linha ondulada indica o ponto de fixação a A. A cadeia lateral do aminoácido Lys pode ser protegida, por exemplo, com Boc, Fmoc, ou Alloc, como descrito acima.

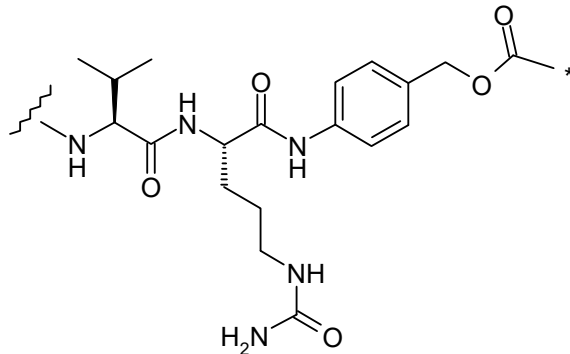
[0194]Alternativamente, o ligador auto-imolativo e o dipeptídeo juntos formam o grupo $-NH-Val-Ala-CO-NH-PABC-$, que é ilustrado abaixo:



onde o asterisco e a linha ondulada são como definidos acima.

[0195]Alternativamente, o ligador auto-imolativo e o dipeptídeo juntos for-

mam o grupo -NH-Val-Cit-CO-NH-PABC-, que é ilustrado abaixo:



onde o asterisco e a linha ondulada são como definidos acima.

[0196] Em uma forma de realização, A é uma ligação covalente. Assim, L¹ e o anticorpo são diretamente conectados. Por exemplo, onde L¹ compreende uma sequência de aminoácido contígua, o término N da sequência pode conectar diretamente ao anticorpo.

[0197] Assim, onde A é uma ligação covalente, a conexão entre o anticorpo e L¹ pode ser selecionada de:

- C(=O)NH-,
- C(=O)O-,
- NHC(=O)-,
- OC(=O)-,
- OC(=O)O-,
- NHC(=O)O-,
- OC(=O)NH-,
- NHC(=O)NH-,
- C(=O)NHC(=O)-,
- S-,
- S-S-,
- CH₂C(=O)-, e
- =N-NH-.

[0198] Um grupo amino de L¹ que conecta ao anticorpo pode ser o término N

de um aminoácido ou pode ser derivado de um grupo amino de uma cadeia lateral de aminoácido, por exemplo uma cadeia lateral de aminoácido lisina.

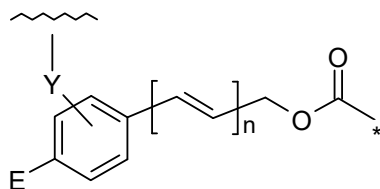
[0199]Um grupo carboxila de L^1 que conecta ao anticorpo pode ser o término C de um aminoácido ou pode ser derivado de um grupo carboxila de uma cadeia lateral de aminoácido, por exemplo uma cadeia lateral de aminoácido de ácido glutâmico.

[0200]Um grupo hidroxila de L^1 que conecta ao anticorpo pode ser derivado de um grupo hidroxila de uma cadeia lateral de aminoácido, por exemplo uma cadeia lateral de aminoácido serina.

[0201]Um grupo tiol de L^1 que conecta ao anticorpo pode ser derivado de um grupo tiol de uma cadeia lateral de aminoácido, por exemplo uma cadeia lateral de aminoácido serina.

[0202]Os comentários acima em relação aos grupos amino, carboxila, hidroxila e tiol de L^1 também aplicam-se ao anticorpo.

[0203]Em uma forma de realização, L^2 junto com $-OC(=O)-$ representa:

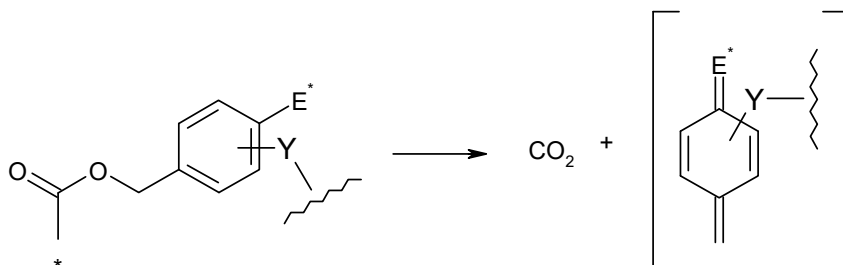


onde o asterisco indica o ponto de fixação à posição N10, a linha ondulada indica o ponto de fixação a L^1 , n é 0 a 3, Y é uma ligação covalente ou um grupo funcional, e E é um grupo ativável, por exemplo por ação enzimática ou luz, desse modo para gerar uma unidade auto-imolativa. O anel de fenileno é opcionalmente substituído ainda com um, dois ou três substituintes como descrito aqui. Em uma forma de realização, o grupo fenileno é opcionalmente substituído ainda com halo, NO_2 , R ou OR . Preferivelmente n é 0 ou 1, o mais preferivelmente 0.

E é selecionado tal que o grupo é suscetível à ativação, por exemplo, por luz ou pela ação de uma enzima. E pode ser $-NO_2$ ou ácido glicorônico. O primeiro pode

ser suscetível à ação de um nitrorredutase, o último à ação de uma β -glicoronidase.

[0204] Nesta forma de realização, o ligador auto-imolativo levará em consideração a liberação do composto protegido quando E é ativado, procedendo ao longo das linhas mostradas abaixo (para $n=0$):



onde o asterisco indica o ponto de fixação à posição N10, E^* é a forma ativada de E, e Y é como descrito acima. Estes grupos têm a vantagem de separar o sítio de ativação do composto sendo protegido. Como descrito acima, o grupo fenileno pode ser opcionalmente substituído ainda.

[0205] O grupo Y pode ser uma ligação covalente a L^1 .

[0206] O grupo Y pode ser um grupo funcional selecionado de:

- C(=O)-
- NH-
- O-
- C(=O)NH-,
- C(=O)O-,
- NHC(=O)-,
- OC(=O)-,
- OC(=O)O-,
- NHC(=O)O-,
- OC(=O)NH-,
- NHC(=O)NH-,
- NHC(=O)NH,
- C(=O)NHC(=O)-, e

-S-.

[0207]Onde L^1 é um dipeptídeo, é preferido que Y seja -NH- ou -C(=O)-, desse modo para formar uma ligação de amida entre L^1 e Y. Nesta forma de realização, a sequência de dipeptídeo não precisa ser um substrato para uma atividade enzimática.

[0208]Em uma outra forma de realização, A é um grupo espaçador. Assim, L^1 e o anticorpo são indiretamente conectados.

[0209] L^1 e A podem ser conectados por uma ligação selecionada de:

-C(=O)NH-,

-C(=O)O-,

-NHC(=O)-,

-OC(=O)-,

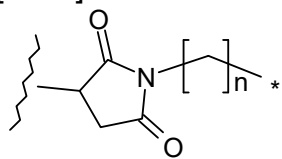
-OC(=O)O-,

-NHC(=O)O-,

-OC(=O)NH-, e

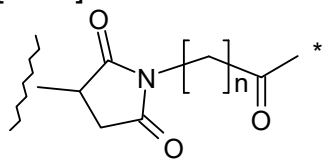
-NHC(=O)NH-.

[0210]Em uma forma de realização, o grupo A é:



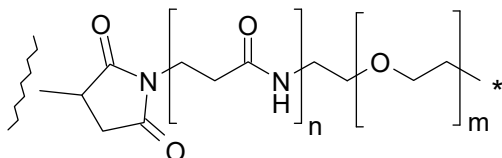
onde o asterisco indica o ponto de fixação a L^1 , a linha ondulada indica o ponto de fixação ao anticorpo, e n é 0 a 6. Em uma forma de realização, n é 5.

[0211]Em uma forma de realização, o grupo A é:



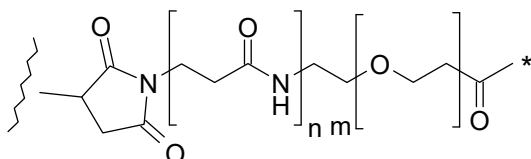
onde o asterisco indica o ponto de fixação a L^1 , a linha ondulada indica o ponto de fixação ao anticorpo, e n é 0 a 6. Em uma forma de realização, n é 5.

[0212] Em uma forma de realização, o grupo A é:



onde o asterisco indica o ponto de fixação a L^1 , a linha ondulada indica o ponto de fixação ao anticorpo, n é 0 ou 1, e m é 0 a 30. Em uma forma de realização preferida, n é 1 e m é 0 a 10, 1 a 8, preferivelmente 4 a 8, e o mais preferivelmente 4 ou 8. Em uma outra forma de realização, m é 10 a 30, e preferivelmente 20 a 30. Alternativamente, m é 0 a 50. Nesta forma de realização, m é preferivelmente 10 a 40 e n é 1.

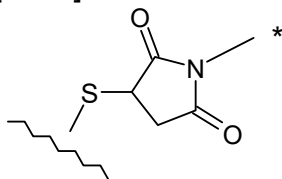
[0213] Em uma forma de realização, o grupo A é:



onde o asterisco indica o ponto de fixação a L^1 , a linha ondulada indica o ponto de fixação ao anticorpo, n é 0 ou 1, e m é 0 a 30. Em uma forma de realização preferida, n é 1 e m é 0 a 10, 1 a 8, preferivelmente 4 a 8, e o mais preferivelmente 4 ou 8. Em uma outra forma de realização, m é 10 a 30, e preferivelmente 20 a 30. Alternativamente, m é 0 a 50. Nesta forma de realização, m é preferivelmente 10 a 40 e n é 1.

[0214] Em uma forma de realização, a conexão entre o anticorpo e A é através de um resíduo de tiol do anticorpo e um grupo maleimida de A.

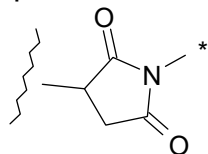
[0215] Em uma forma de realização, a conexão entre o anticorpo e A é:



onde o asterisco indica o ponto de fixação à porção remanescente de A e a linha ondulada indica o ponto de fixação à porção remanescente do anticorpo. Nesta

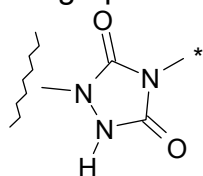
forma de realização, o átomo de S é tipicamente derivado do anticorpo.

[0216]Em cada uma das formas de realização acima, uma funcionalidade alternativa pode ser usada no lugar do grupo derivado de maleimida mostrado abaixo:



onde a linha ondulada indica o ponto de fixação ao anticorpo como antes, e o asterisco indica a ligação à porção remanescente do grupo A.

[0217]Em uma forma de realização, o grupo derivado de maleimida é substituído com o grupo:



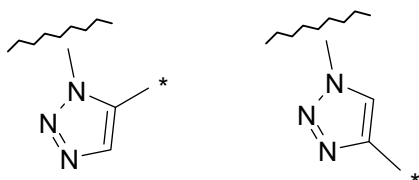
onde a linha ondulada indica o ponto de fixação ao anticorpo, e o asterisco indica a ligação à porção remanescente do grupo A.

[0218]Em uma forma de realização, o grupo derivado de maleimida é substituído com um grupo, que opcionalmente junto com o anticorpo, é selecionado de:

- C(=O)NH-,
- C(=O)O-,
- NHC(=O)-,
- OC(=O)-,
- OC(=O)O-,
- NHC(=O)O-,
- OC(=O)NH-,
- NHC(=O)NH-,
- NHC(=O)NH,
- C(=O)NHC(=O)-,
- S-,

-S-S-,
 -CH₂C(=O)-
 -C(=O)CH₂-,
 =N-NH-, e
 -NH-N=.

[0219]Em uma forma de realização, o grupo derivado de maleimida é substituído com um grupo, que opcionalmente junto com o anticorpo, é selecionado de:



onde a linha ondulada indica o ponto de fixação ao anticorpo ou a ligação à porção remanescente do grupo A, e o asterisco indica o outro do ponto de fixação ao anticorpo ou a ligação à porção remanescente do grupo A.

[0220]Outros grupos adequados para conectar L¹ ao anticorpo são descritos em WO 2005/082023.

[0221]Em uma forma de realização, o Grupo de Conexão A está presente, o Acionador L¹ está presente e Ligador auto-imolativo L² está ausente. Assim, L¹ e a unidade de Fármaco são diretamente conectados via uma ligação. Equivalentemente nesta forma de realização, L² é uma ligação. Isto pode ser particularmente relevante quando D^L é da Fórmula II.

[0222]L¹ e D podem ser conectados por uma ligação selecionada de:

-C(=O)N<,
 -C(=O)O-,
 -NHC(=O)-,
 -OC(=O)-,
 -OC(=O)O-,
 -NHC(=O)O-,

-OC(=O)N<, e

-NHC(=O)N<,

onde N< ou O- são parte de D.

[0223]Em uma forma de realização, L¹ e D são preferivelmente conectados por uma ligação selecionada de:

-C(=O)N<, e

-NHC(=O)-.

[0224]Em uma forma de realização, L¹ compreende um dipeptídeo e uma extremidade do dipeptídeo é ligada a D. Como descrito acima, os aminoácidos no dipeptídeo podem ser qualquer combinação de aminoácidos naturais e aminoácidos não naturais. Em algumas formas de realização, o dipeptídeo compreende aminoácidos naturais. Onde o ligador é um ligador lábil em catepsina, o dipeptídeo é o sítio de ação para clivagem mediada por catepsina. O dipeptídeo depois é um sítio de reconhecimento para catepsina.

[0225]Em uma forma de realização, o grupo -X₁-X₂- no dipeptídeo, -NH-X₁-X₂-CO-, é selecionado de:

-Phe-Lys-,

-Val-Ala-,

-Val-Lys-,

-Ala-Lys-,

-Val-Cit-,

-Phe-Cit-,

-Leu-Cit-,

-Ile-Cit-,

-Phe-Arg-, e

-Trp-Cit-;

onde Cit é citrulina. Em um tal dipeptídeo, -NH- é o grupo amino de X₁, e CO

é o grupo carbonila de X₂.

[0226] Preferivelmente, o grupo -X₁-X₂- no dipeptídeo, -NH-X₁-X₂-CO-, é selecionado de:

-Phe-Lys-,

-Val-Ala-,

-Val-Lys-,

-Ala-Lys-, e

-Val-Cit-.

[0227] O mais preferivelmente, o grupo -X₁-X₂- no dipeptídeo, -NH-X₁-X₂-CO-, é -Phe-Lys- ou -Val-Ala-.

[0228] Outras combinações de dipeptídeo de interesse incluem:

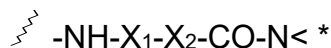
-Gly-Gly-,

-Pro-Pro-, e

-Val-Glu-.

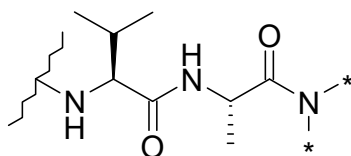
[0229] Outras combinações de dipeptídeo podem ser usadas, incluindo aquelas descritas acima.

[0230] Em uma forma de realização, L¹- D é:



onde -NH-X₁-X₂-CO é o dipeptídeo, -N< é parte da unidade de Fármaco, o asterisco indica os pontos de fixação ao restante da unidade de Fármaco, e a linha ondulada indica o ponto de fixação à porção remanescente de L¹ ou o ponto de fixação a A. Preferivelmente, a linha ondulada indica o ponto de fixação a A.

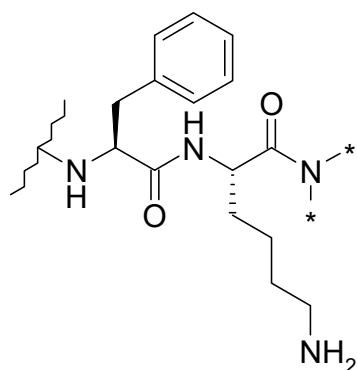
[0231] Em uma forma de realização, o dipeptídeo é valina-alanina e L¹- D é:



onde os asteriscos, -N< e a linha ondulada são como definidos acima.

[0232] Em uma forma de realização, o dipeptídeo é fenilalanina-lisina e L¹- D

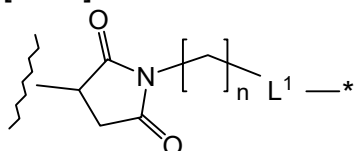
é:



onde os asteriscos, -N< e a linha ondulada são como definidos acima.

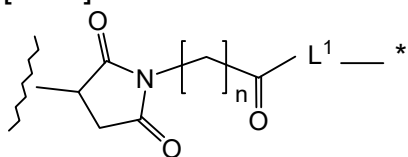
Em uma forma de realização, o dipeptídeo é valina-citrulina.

[0233] Em uma forma de realização, os grupos A-L¹ são:



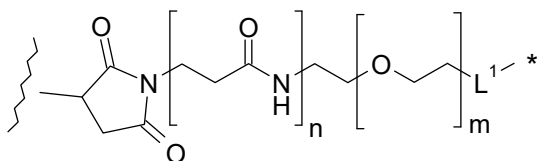
onde o asterisco indica o ponto de fixação a L² ou D, a linha ondulada indica o ponto de fixação à unidade de Ligando, e n é 0 a 6. Em uma forma de realização, n é 5.

[0234] Em uma forma de realização, os grupos A-L¹ são:



onde o asterisco indica o ponto de fixação a L² ou D, a linha ondulada indica o ponto de fixação à unidade de Ligando, e n é 0 a 6. Em uma forma de realização, n é 5.

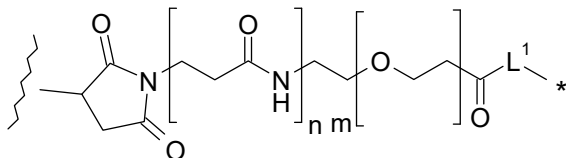
[0235] Em uma forma de realização, os grupos A-L¹ são:



onde o asterisco indica o ponto de fixação a L² ou D, a linha ondulada indica

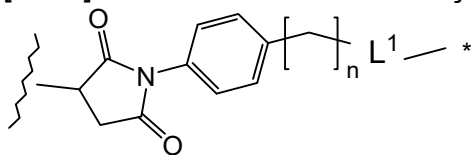
o ponto de fixação à unidade de Ligando, n é 0 ou 1, e m é 0 a 30. Em uma forma de realização preferida, n é 1 e m é 0 a 10, 1 a 8, preferivelmente 4 a 8, o mais preferivelmente 4 ou 8.

[0236] Em uma forma de realização, os grupos A-L¹ são:



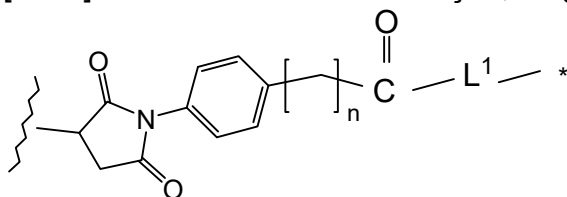
onde o asterisco indica o ponto de fixação a L² ou D, a linha ondulada indica o ponto de fixação à unidade de Ligando, n é 0 ou 1, e m é 0 a 30. Em uma forma de realização preferida, n é 1 e m é 0 a 10, 1 a 7, preferivelmente 3 a 7, o mais preferivelmente 3 ou 7.

[0237] Em uma forma de realização, os grupos A-L¹ são:



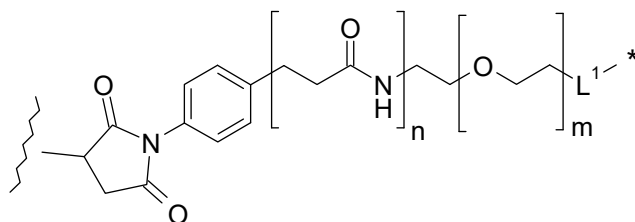
onde o asterisco indica o ponto de fixação a L² ou D, a linha ondulada indica o ponto de fixação à unidade de Ligando, e n é 0 a 6. Em uma forma de realização, n é 5.

[0238] Em uma forma de realização, os grupos A-L¹ são:



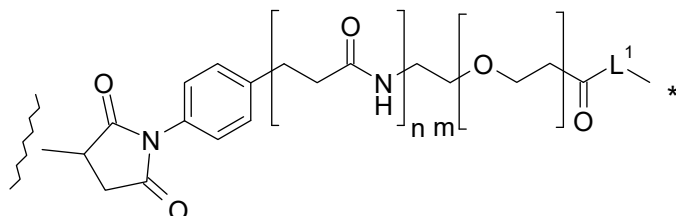
onde o asterisco indica o ponto de fixação a L² ou D, a linha ondulada indica o ponto de fixação à unidade de Ligando, e n é 0 a 6. Em uma forma de realização, n é 5.

[0239] Em uma forma de realização, os grupos A-L¹ são:



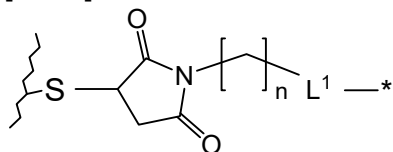
onde o asterisco indica o ponto de fixação a L^2 ou D, a linha ondulada indica o ponto de fixação à unidade de Ligando, n é 0 ou 1, e m é 0 a 30. Em uma forma de realização preferida, n é 1 e m é 0 a 10, 1 a 8, preferivelmente 4 a 8, o mais preferivelmente 4 ou 8.

[0240] Em uma forma de realização, os grupos A- L^1 são:



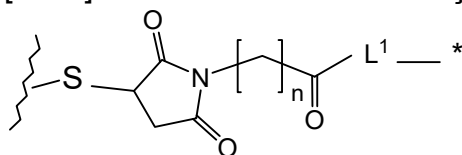
onde o asterisco indica o ponto de fixação a L^2 ou D, a linha ondulada indica o ponto de fixação à unidade de Ligando, n é 0 ou 1, e m é 0 a 30. Em uma forma de realização preferida, n é 1 e m é 0 a 10, 1 a 8, preferivelmente 4 a 8, o mais preferivelmente 4 ou 8.

[0241] Em uma forma de realização, os grupos A- L^1 são:



onde o asterisco indica o ponto de fixação a L^2 ou D, S é um grupo enxofre da unidade de Ligando, a linha ondulada indica o ponto de fixação ao restante da unidade de Ligando, e n é 0 a 6. Em uma forma de realização, n é 5.

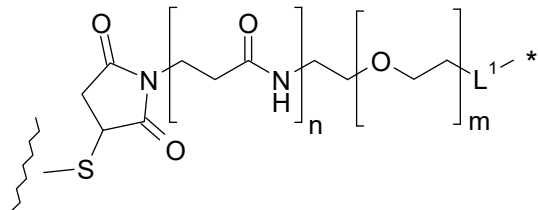
[0242] Em uma forma de realização, o grupo A- L^1 é:



onde o asterisco indica o ponto de fixação a L^2 ou D, S é um grupo enxofre

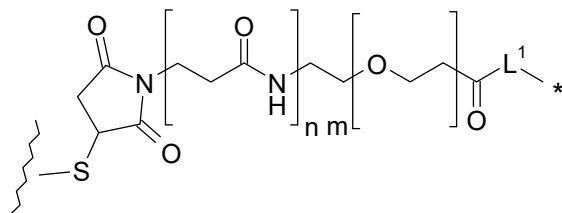
da unidade de Ligando, a linha ondulada indica o ponto de fixação ao restante da unidade de Ligando, e n é 0 a 6. Em uma forma de realização, n é 5.

[0243] Em uma forma de realização, os grupos A^1-L^1 :



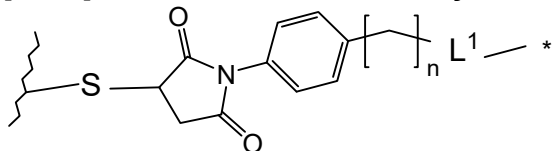
onde o asterisco indica o ponto de fixação a L^2 ou D, S é um grupo enxofre da unidade de Ligando, a linha ondulada indica o ponto de fixação ao restante da unidade de Ligando, n é 0 ou 1, e m é 0 a 30. Em uma forma de realização preferida, n é 1 e m é 0 a 10, 1 a 8, preferivelmente 4 a 8, o mais preferivelmente 4 ou 8.

[0244] Em uma forma de realização, os grupos A^1-L^1 são:



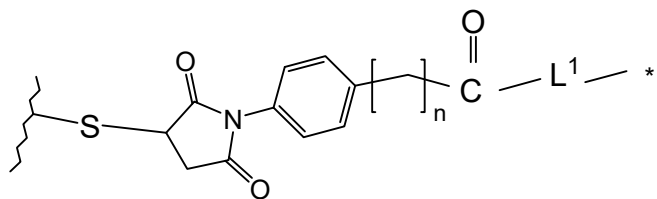
onde o asterisco indica o ponto de fixação a L^2 ou D, a linha ondulada indica o ponto de fixação à unidade de Ligando, n é 0 ou 1, e m é 0 a 30. Em uma forma de realização preferida, n é 1 e m é 0 a 10, 1 a 7, preferivelmente 4 a 8, o mais preferivelmente 4 ou 8.

[0245] Em uma forma de realização, os grupos A^1-L^1 são:



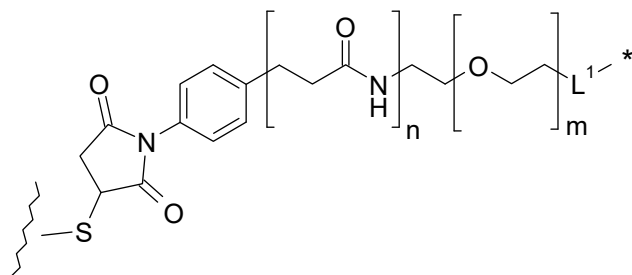
onde o asterisco indica o ponto de fixação a L^2 ou D, a linha ondulada indica o ponto de fixação ao restante da unidade de Ligando, e n é 0 a 6. Em uma forma de realização, n é 5.

[0246] Em uma forma de realização, os grupos A^1-L^1 são:



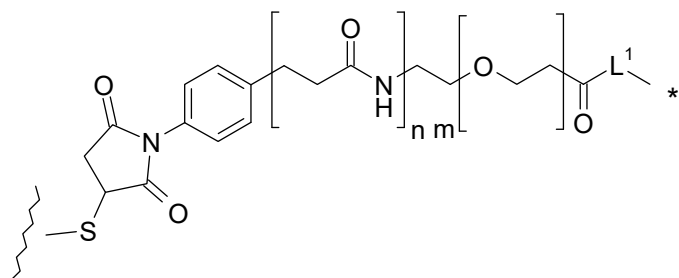
onde o asterisco indica o ponto de fixação a L^2 ou D, a linha ondulada indica o ponto de fixação ao restante da unidade de Ligando, e n é 0 a 6. Em uma forma de realização, n é 5.

[0247] Em uma forma de realização, os grupos A^1-L^1 são:



onde o asterisco indica o ponto de fixação a L^2 ou D, a linha ondulada indica o ponto de fixação ao restante da unidade de Ligando, n é 0 ou 1, e m é 0 a 30. Em uma forma de realização preferida, n é 1 e m é 0 a 10, 1 a 8, preferivelmente 4 a 8, o mais preferivelmente 4 ou 8.

[0248] Em uma forma de realização, os grupos A^1-L^1 são:



onde o asterisco indica o ponto de fixação a L^2 ou D, a linha ondulada indica o ponto de fixação ao restante da unidade de Ligando, n é 0 ou 1, e m é 0 a 30. Em uma forma de realização preferida, n é 1 e m é 0 a 10, 1 a 8, preferivelmente 4 a 8, o mais preferivelmente 4 ou 8.

[0249] O grupo $R^{L'}$ é derivável do grupo R^L . O grupo R^L pode ser convertido a um grupo $R^{L'}$ por conexão de um anticorpo a um grupo funcional de R^L . Outras eta-

pas podem ser tomadas para converter R^L a R^L . Estas etapas podem incluir a remoção de grupos de proteção, onde presentes, ou a instalação de um grupo funcional apropriado.

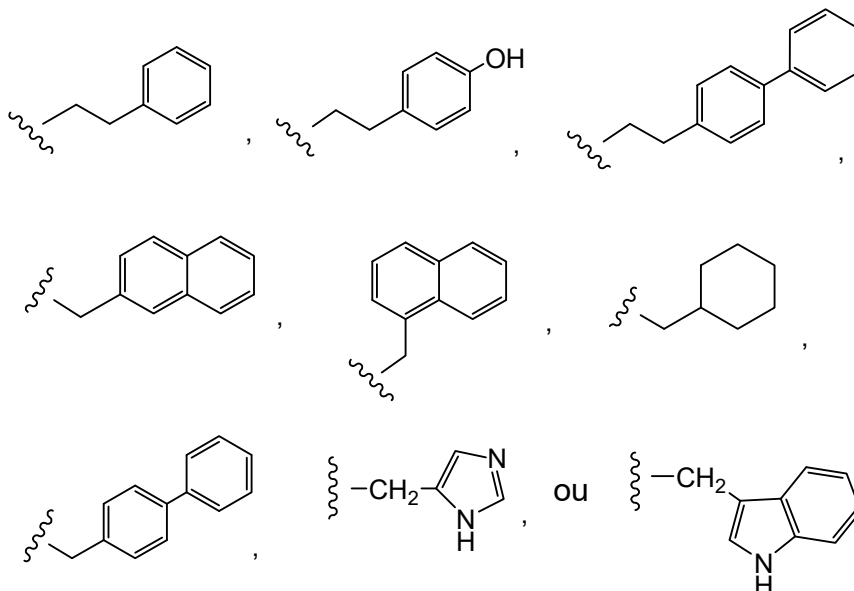
R^L

[0250]Ligadores podem incluir porções peptídicas cliváveis em protease compreendendo uma ou mais unidades de aminoácido. Reagentes de ligador de peptídeo podem ser preparados por métodos de síntese de fase sólida ou fase líquida (E. Schröder e K. Lübke, *The Peptides*, volume 1, páginas 76 - 136 (1965) Academic Press) que são bem conhecidos no campo da química de peptídeo, incluindo química de t-BOC (Geiser *et al* "Automation of solid-phase peptide synthesis" em *Macromolecular Sequencing and Synthesis*, Alan R. Liss, Inc., 1988, páginas 199 - 218) e química de Fmoc/HBTU (Fields, G. e Noble, R. (1990) "Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids", *Int. J. Peptide Protein Res.* 35:161 - 214), em um sintetizador automático tal como o Rainin Symphony Peptide Synthesizer (Protein Technologies, Inc., Tucson, AZ), ou Modelo 433 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

[0251]Ligadores de aminoácido exemplares incluem um dipeptídeo, um tripeptídeo, um tetrapeptídeo ou um pentapeptídeo. Dipeptídeos exemplares incluem: valina-citrulina (vc ou val-cit), alanina-fenilalanina (af ou ala-phe). Tripeptídeos exemplares incluem: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) e glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Resíduos de aminoácido que compreendem um componente ligador de aminoácido incluem aqueles que ocorrem naturalmente, assim como aminoácidos menores e análogos de aminoácido que não ocorrem naturalmente, tal como citrulina. Componentes ligadores de aminoácido podem ser designados e otimizados em sua seletividade para clivagem enzimática por uma enzima particular, por exemplo, uma protease associada ao tumor, catepsina B, C e D, ou uma plasmina protease.

[0252]Cadeias laterais de aminoácidos incluem aquelas que ocorrem natu-

ralmente, assim como aminoácidos menores e análogos de aminoácido que não ocorrem naturalmente, tal como citrulina. Cadeias laterais de aminoácidos incluem hidrogênio, metila, isopropila, isobutila, sec-butila, benzila, p-hidroxibenzila, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$, 2-piridilmetil-, 3-piridilmetil-, 4-piridilmetil-, fenila, cicloexila, assim como as estruturas seguintes:

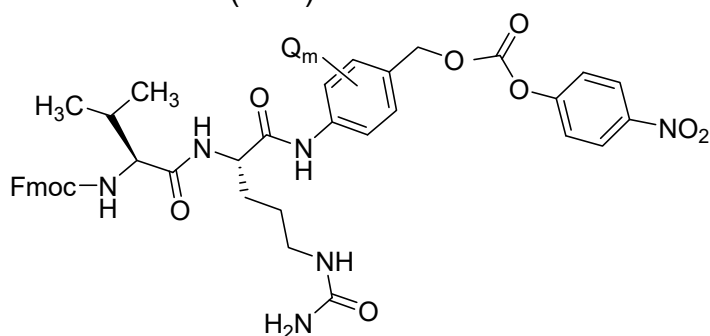


[0253] Quando as cadeias laterais de aminoácidos incluem outro que não hidrogênio (glicina), o átomo de carbono ao qual a cadeia lateral de aminoácido é ligada é quiral. Cada átomo de carbono ao qual a cadeia lateral de aminoácido é ligada está independentemente na configuração (*S*) ou (*R*), ou uma mistura racêmica. Reagentes de ligador de fármaco assim podem ser enantiomericamente puros, racêmicos, ou diastereoméricos.

[0254] Em formas de realização exemplares, cadeias laterais de aminoácidos são selecionadas daquelas de aminoácidos naturais e não naturais, incluindo alanina, ácido 2-amino-2-cicloexilacético, ácido 2-amino-2-fenilacético, arginina, aspara-

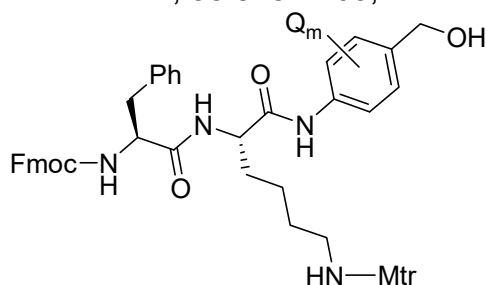
gina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutâmico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norleucina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina, valina, ácido γ -aminobutírico, ácido α,α -dimetil γ -aminobutírico, ácido β,β -dimetil γ -aminobutírico, ornitina, e citrulina (Cit).

[0255]Um reagente de ligador de dipeptídeo valina-citrulina (val-cit ou vc) exemplar útil para construir um intermediário de ligador-porção do fármaco de PBD para conjugação a um anticorpo, tendo um espaçador auto-imolativo de para-aminobenzilcarbamoíla (PAB) tem a estrutura:



onde Q é alquila C1-C8, -O-(alquila C1-C8), -halogênio, -NO₂ ou -CN; e m é um número inteiro variando de 0 a 4.

[0256]Um reagente de ligador de dipeptídeo phe-lys(Mtr) exemplar tendo um grupo p-aminobenzila pode ser preparado de acordo com Dubowchik, *et al.* (1997) Tetrahedron Letters, 38:5257 - 60, e tem a estrutura:

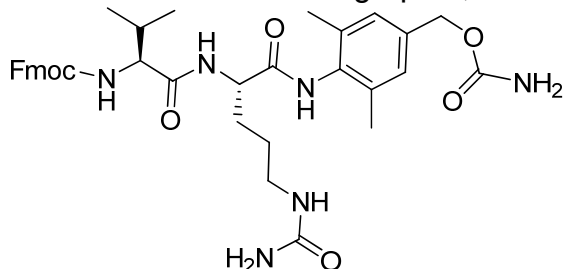


onde Mtr é mono-4-metoxitritila, Q é alquila C1-C8, -O-(alquila C1-C8), -halogênio, -NO₂ ou -CN; e m é um número inteiro variando de 0 a 4.

[0257]O "ligador auto-imolativo" PAB (para-aminobenziloxicarbonila), fixa a porção do fármaco ao anticorpo no conjugado de anticorpo e fármaco (Carl *et al* (1981) J. Med. Chem. 24:479 - 480; Chakravarty *et al* (1983) J. Med. Chem. 26:638 -

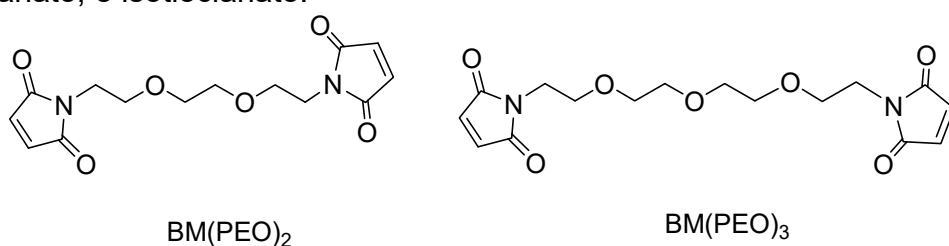
644; US 6214345; US20030130189; US20030096743; US6759509; US20040052793; US6218519; US6835807; US6268488; US20040018194; WO98/13059; US20040052793; US6677435; US5621002; US20040121940; WO2004/032828). Outros exemplos de espaçadores auto-imolativos além de PAB incluem, mas não são limitados a: (i) compostos aromáticos que são eletronicamente similares ao grupo PAB tais como derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (Hay *et al.* (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237), tiazóis (US 7375078), unidades de PAB alongadas, múltiplas (de Groot *et al.* (2001) *J. Org. Chem.* 66:8815 - 8830); e orto ou para-aminobenzilacetais; e (ii) análogos de estiril PAB homologados (US 7223837). Espaçadores podem ser usados que passam por ciclização na hidrólise da ligação de amida, tais como amidas do ácido 4-aminobutírico substituídas e não substituídas (Rodrigues *et al.* (1995) *Chemistry Biology* 2:223), sistemas de anel biciclo[2.2.1] e biciclo[2.2.2] apropriadamente substituídos (Storm *et al.* (1972) *J. Amer. Chem. Soc.* 94:5815) e amidas do ácido 2-aminofenilpropiônico (Amsberry, *et al.* (1990) *J. Org. Chem.* 55:5867). A eliminação de fármacos contendo amina que são substituídos em glicina (Kingsbury *et al.* (1984) *J. Med. Chem.* 27:1447) também são exemplos de espaçadores auto-imolativos úteis em ADC.

[0258]Em uma forma de realização, um reagente de análogo de PAB de di-peptídeo valina-citrulina tem um grupo 2,6 dimetil fenila e tem a estrutura:



[0259]Reagentes de ligador úteis para os conjugados de anticorpo e fármaco da invenção incluem, mas não são limitados a: BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, e sulfo-

SMPB, e SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato), e reagentes de bis-maleimida: DTME, BMB, BMDB, BMH, BMOE, 1,8-bis-maleimidodietilenoglicol (BM(PEO)₂), e 1,11-bis-maleimidotrietilenoglicol (BM(PEO)₃), que são comercialmente disponíveis da Pierce Biotechnology, Inc., ThermoScientific, Rockford, IL, e outros fornecedores de reagentes. Reagentes de bis-maleimida permitem a fixação de um grupo tiol livre de um resíduo de cisteína de um anticorpo a uma porção do fármaco contendo tiol, rótulo, ou intermediário de ligador, em uma forma sequencial ou concorrente. Outros grupos funcionais além de maleimida, que são reativos com um grupo tiol de um anticorpo, porção do fármaco de PBD, ou intermediário de ligador incluem iodoacetamida, bromoacetamida, vinil piridina, dissulfeto, dissulfeto de piridila, isocianato, e isotiocianato.



[0260]Outras formas de realização de reagentes de ligador são: N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP), N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP, Carlsson *et al* (1978) *Biochem. J.* 173:723 - 737), succinimidil-4-(N-maleimidometil) cicloexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como HCl de adipimidato de dimetila), ésteres ativos (tal como suberato de disuccinimidila), aldeídos (tal como glutaraldeído), compostos de bis-azido (tal como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazônio (tal como bis-(p-diazôniobenzoil)-etilenodiamino), diisocianatos (tal como 2,6-diisocianato de tolueno), e compostos de flúor bis-ativos (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Reagentes de ligador úteis também podem ser obtidos via outras fontes comerciais, tais como Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO), ou sintetizados de acordo com procedimentos descritos em Toki *et al* (2002) *J. Org. Chem.* 67:1866 - 1872; US 6214345; WO 02/088172; US 2003130189; US2003096743; WO

[0263]O conjugado do primeiro aspecto da invenção pode ter um grupo de capeamento R^C na posição N10. O Composto E pode ter um grupo de capeamento R^C .

[0264]Em uma forma de realização, onde o conjugado é um dímero com cada monômero sendo da fórmula (a), o grupo R^{10} em uma das unidades de monômero é um grupo de capeamento R^C ou é um grupo R^{10} .

[0265]Em uma forma de realização, onde o conjugado é um dímero com cada monômero sendo da fórmula (a), o grupo R^{10} em uma das unidades de monômero é um grupo de capeamento R^C .

[0266]Em uma forma de realização, onde o composto E é um dímero com cada monômero sendo da fórmula (E), o grupo R^L em uma das unidades de monômero é um grupo de capeamento R^C ou é um ligador para conexão a um anticorpo.

[0267]Em uma forma de realização, onde o composto E é um dímero com cada monômero sendo da fórmula (E), o grupo R^L em uma das unidades de monômero é um grupo de capeamento R^C .

[0268]O grupo R^C é removível da posição N10 da porção PBD para deixar uma ligação de imina N10-C11, uma carbinolamina, uma carbinolamina substituída, onde QR^{11} é OSO_3M , um aduto de bissulfito, uma tiocarbinolamina, uma tiocarbinolamina substituída, ou uma carbinolamina substituída.

[0269]Em uma forma de realização, R^C , pode ser um grupo de proteção que é removível para deixar uma ligação de imina N10-C11, uma carbinolamina, uma carbinolamina substituída, ou, onde QR^{11} é OSO_3M , um aduto de bissulfito. Em uma forma de realização, R^C é um grupo de proteção que é removível para deixar uma ligação de imina N10-C11.

[0270]O grupo R^C é intencionado a ser removível sob as mesmas condições como aquelas necessárias para a remoção do grupo R^{10} , por exemplo para produzir uma ligação de imina N10-C11, uma carbinolamina e assim por diante. O grupo de

capeamento age como um grupo de proteção para a funcionalidade intencionada na posição N10. O grupo de capeamento é intencionado a não ser reativo para um anticorpo. Por exemplo, R^C não é o mesmo como R^L .

[0271] Compostos tendo um grupo de capeamento podem ser usados como intermediários na síntese de dímeros tendo um monômero de imina. Alternativamente, compostos tendo um grupo de capeamento podem ser usados como conjugados, onde o grupo de capeamento é removido no local alvo para produzir uma imina, uma carbinolamina, uma cabinolamina substituída e assim por diante. Assim, nesta forma de realização, o grupo de capeamento pode ser referido como um grupo de proteção de nitrogênio terapeuticamente removível, como definido no pedido mais inicial dos inventores WO 00/12507.

[0272] Em uma forma de realização, o grupo R^C é removível sob as condições que clivam o ligador R^L do grupo R^{10} . Assim, em uma forma de realização, o grupo de capeamento é clivável pela ação de uma enzima.

[0273] Em uma forma de realização alternativa, o grupo de capeamento é removível antes da conexão do ligador R^L ao anticorpo. Nesta forma de realização, o grupo de capeamento é removível sob condições que não clivam o ligador R^L .

[0274] Onde um composto inclui um grupo funcional G^1 para formar uma conexão ao anticorpo, o grupo de capeamento é removível antes da adição ou desmascaramento de G^1 .

[0275] O grupo de capeamento pode ser usado como parte de uma estratégia de grupo de proteção para garantir que apenas uma das unidades de monômero em um dímero é conectada a um anticorpo.

[0276] O grupo de capeamento pode ser usado como uma máscara para uma ligação de imina N10-C11. O grupo de capeamento pode ser removido tem tal tempo conforme a funcionalidade imina é necessária no composto. O grupo de capeamento também é uma máscara para uma carbinolamina, uma cabinolamina

substituída, e um aduto de bissulfito, como descrito acima.

[0277] R^C pode ser um grupo de proteção de N10, tais como aquelas grupos descritos no pedido mais inicial dos inventores, WO 00/12507. Em uma forma de realização, R^C é um grupo de proteção de nitrogênio terapeuticamente removível, como definido no pedido mais inicial dos inventores, WO 00/12507.

[0278]Em uma forma de realização, R^C é um grupo de proteção de carbamato.

[0279]Em uma forma de realização, o grupo de proteção de carbamato é selecionado de:

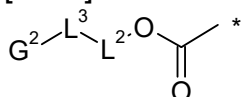
Alloc, Fmoc, Boc, Troc, Teoc, Psec, Cbz e PNZ.

[0280]Opcionalmente, o grupo de proteção de carbamato é selecionado ainda de Moc.

[0281]Em uma forma de realização, R^C é um grupo ligador R^L que carece do grupo funcional para conexão ao anticorpo.

[0282]Este pedido é particularmente relacionado com aquelas grupos R^C que são carbamatos.

[0283]Em uma forma de realização, R^C é um grupo:



onde o asterisco indica o ponto de fixação à posição N10, G^2 é um grupo de terminação, L^3 é uma ligação covalente ou um ligador clivável L^1 , L^2 é uma ligação covalente ou junto com $OC(=O)$ forma um ligador auto-imolativo.

[0284]Onde L^3 e L^2 são ambas ligações covalentes, G^2 e $OC(=O)$ juntos formam um grupo de proteção de carbamato como definido acima.

L^1 é como definido acima em relação a R^{10} .

L^2 é como definido acima em relação a R^{10} .

[0285]Vários grupos de terminação são descritos abaixo, incluindo aqueles com base em grupos de proteção bem conhecidos.

[0286]Em uma forma de realização L^3 é um ligador clivável L^1 , e L^2 , junto com $OC(=O)$, forma um ligador auto-imolativo. Nesta forma de realização, G^2 é Ac (acetila) ou Moc, ou um grupo de proteção de carbamato selecionado de:

Alloc, Fmoc, Boc, Troc, Teoc, Psec, Cbz e PNZ.

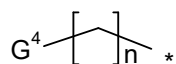
[0287]Opcionalmente, o grupo de proteção de carbamato é selecionado ainda de Moc.

[0288]Em uma outra forma de realização, G^2 é um grupo acila $-C(=O)G^3$, onde G^3 é selecionado de alquila (incluindo cicloalquila, alquenila e alquinila), heteroalquila, heterociclila e arila (incluindo heteroarila e carboarila). Estes grupos podem ser opcionalmente substituídos. O grupo acila junto com um grupo amino de L^3 ou L^2 , onde apropriado, pode formar uma ligação de amida. O grupo acila junto com um grupo hidróxi de L^3 ou L^2 , onde apropriado, pode formar uma ligação de éster.

[0289]Em uma forma de realização, G^3 é heteroalquila. O grupo heteroalquila pode compreender polietilenoglicol. O grupo heteroalquila pode ter um heteroátomo, tal como O ou N, adjacente ao grupo acila, desse modo formando um grupo carbamato ou carbonato, onde apropriado, com um heteroátomo presente no grupo L^3 ou L^2 , onde apropriado.

[0290]Em uma forma de realização, G^3 é selecionado de NH_2 , NHR e NRR' . Preferivelmente, G^3 é NRR' .

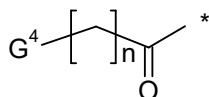
[0291]Em uma forma de realização G^2 é o grupo:



onde o asterisco indica o ponto de fixação a L^3 , n é 0 a 6 e G^4 é selecionado de OH, OR, SH, SR, COOR, $CONH_2$, $CONHR$, $CONRR'$, NH_2 , NHR , NRR' , NO_2 , e halo. Os grupos OH, SH, NH_2 e NHR são protegidos. Em uma forma de realização, n é 1 a 6, e preferivelmente n é 5. Em uma forma de realização, G^4 é OR, SR, COOR, $CONH_2$, $CONHR$, $CONRR'$, e NRR' . Em uma forma de realização, G^4 é OR, SR, e NRR' . Preferivelmente G^4 é selecionado de OR e NRR' , o mais preferivelmente G^4 é

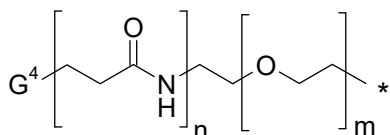
OR. O mais preferivelmente G^4 é OMe.

[0292] Em uma forma de realização, o grupo G^2 é:



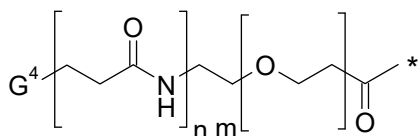
onde o asterisco indica o ponto de fixação a L^3 , e n e G^4 são como definidos acima.

[0293] Em uma forma de realização, o grupo G^2 é:



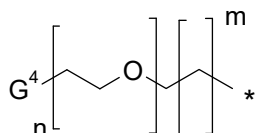
onde o asterisco indica o ponto de fixação a L^3 , n é 0 ou 1, m é 0 a 50, e G^4 é selecionado de OH, OR, SH, SR, COOR, CONH₂, CONHR, CONRR', NH₂, NHR, NRR', NO₂, e halo. Em uma forma de realização preferida, n é 1 e m é 0 a 10, 1 a 2, preferivelmente 4 a 8, e o mais preferivelmente 4 ou 8. Em uma outra forma de realização, n é 1 e m é 10 a 50, preferivelmente 20 a 40. Os grupos OH, SH, NH₂ e NHR são protegidos. Em uma forma de realização, G^4 é OR, SR, COOR, CONH₂, CONHR, CONRR', e NRR'. Em uma forma de realização, G^4 é OR, SR, e NRR'. Preferivelmente G^4 é selecionado de OR e NRR', o mais preferivelmente G^4 é OR. Preferivelmente G^4 é OMe.

[0294] Em uma forma de realização, o grupo G^2 é:



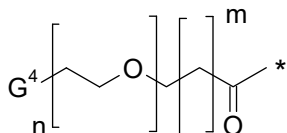
onde o asterisco indica o ponto de fixação a L^3 , e n , m e G^4 são como definidos acima.

[0295] Em uma forma de realização, o grupo G^2 é:



onde n é 1 a 20, m é 0 a 6, e G^4 é selecionado de OH, OR, SH, SR, COOR, CONH₂, CONHR, CONRR', NH₂, NHR, NRR', NO₂, e halo. Em uma forma de realização, n é 1 a 10. Em uma outra forma de realização, n é 10 a 50, preferivelmente 20 a 40. Em uma forma de realização, n é 1. Em uma forma de realização, m é 1. Os grupos OH, SH, NH₂ e NHR são protegidos. Em uma forma de realização, G^4 é OR, SR, COOR, CONH₂, CONHR, CONRR', e NRR'. Em uma forma de realização, G^4 é OR, SR, e NRR'. Preferivelmente G^4 é selecionado de OR e NRR', o mais preferivelmente G^4 é OR. Preferivelmente G^4 é OMe.

[0296] Em uma forma de realização, o grupo G^2 é:



onde o asterisco indica o ponto de fixação a L^3 , e n , m e G^4 são como definidos acima.

[0297] Em cada uma das formas de realização acima G^4 pode ser OH, SH, NH₂ e NHR. Estes grupos são preferivelmente protegidos.

[0298] Em uma forma de realização, OH é protegido com Bzl, TBDMS, ou TBDPS.

[0299] Em uma forma de realização, SH é protegido com Acn, Bzl, Bzl-OMe, Bzl-Me, ou Trt.

[0300] Em uma forma de realização, NH₂ ou NHR são protegidos com Boc, Moc, Z-Cl, Fmoc, Z, ou Alloc.

[0301] Em uma forma de realização, o grupo G^2 está presente em combinação com um grupo L^3 , grupo este que é um dipeptídeo.

[0302] O grupo de capeamento não é intencionado para conexão ao anticorpo. Assim, o outro monômero presente no dímero serve como o ponto de conexão ao anticorpo via um ligador. Consequentemente, é preferido que a funcionalidade presente no grupo de capeamento não esteja disponível para reação com um anti-

corpo. Assim, grupos funcionais reativos tais como OH, SH, NH₂, COOH são preferivelmente evitados. Entretanto, tal funcionalidade pode estar presente no grupo de capeamento se protegido, como descrito acima.

Formas de realização

[0303] Formas de realização da presente invenção incluem ConjA em que o anticorpo é como definido acima.

[0304] Formas de realização da presente invenção incluem ConjB em que o anticorpo é como definido acima.

[0305] Formas de realização da presente invenção incluem ConjC em que o anticorpo é como definido acima.

[0306] Formas de realização da presente invenção incluem ConjD em que o anticorpo é como definido acima.

[0307] Formas de realização da presente invenção incluem ConjE em que o anticorpo é como definido acima.

[0308] Como mencionado acima, algumas formas de realização da invenção excluem ConjA, ConjB, ConjC, ConjD e ConjE.

Carga de fármaco

[0309] A carga de fármaco é o número médio de fármacos de PBD por anticorpo, por exemplo, anticorpo. Onde os compostos da invenção são ligados a cisteínas, a carga de fármaco pode variar de 1 a 8 fármacos (D^L) por anticorpo, isto é onde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, e 8 porções de fármaco são covalentemente ligadas ao anticorpo. Composições de conjugados incluem coleções de anticorpos, conjugados com uma faixa de fármacos, de 1 a 8. Onde os compostos da invenção são ligados a lisinas, a carga de fármaco pode variar de 1 a 80 fármacos (D^L) por anticorpo, embora um limite superior de 40, 20, 10 ou 8 possa ser preferido. Composições de conjugados incluem coleções de anticorpos, conjugados com uma faixa de fármacos, de 1 a 80, 1 a 40, 1 a 20, 1 a 10 ou 1 a 8.

[0310]O número médio de fármacos por anticorpo em preparações de ADC de reações de conjugação pode ser caracterizado por meios convencionais tais como UV, HPLC de fase reversa, HIC, espectroscopia de massa, ensaio ELISA, e eletroforese. A distribuição quantitativa de ADC em termos de p também pode ser determinada. Por ELISA, o valor ponderado de p em uma preparação particular de ADC pode ser determinado (Hamblett *et al* (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063 - 7070; Sanderson *et al* (2005) Clin. Cancer Res. 11:843 - 852). Entretanto, a distribuição de valores de p (fármaco) não é discernível pela ligação do anticorpo ao antígeno e limitação de detecção de ELISA. Também, ensaio ELISA para a detecção de conjugados de anticorpo-fármaco não determina onde as porções de fármaco são ligadas ao anticorpo, tais como os fragmentos de cadeia pesada ou cadeia leve, ou os resíduos de aminoácido particulares. Em alguns exemplos, separação, purificação, e caracterização de ADC homogêneo onde p é um certo valor de ADC com outras cargas de fármacos podem ser obtidas por meios tais como HPLC de fase reversa ou eletroforese. Tais técnicas também são aplicáveis a outros tipos de conjugados.

[0311]Para alguns conjugados de anticorpo-fármaco, p pode ser limitado pelo número de sítios de fixação no anticorpo. Por exemplo, um anticorpo pode ter apenas um ou vários grupos tiol de cisteína, ou pode ter apenas um ou vários grupos tiol suficientemente reativos através dos quais um ligador pode ser ligado. Carga de fármaco mais alta, por exemplo, $p > 5$, pode causar agregação, insolubilidade, toxicidade, ou perda de permeabilidade celular de certos conjugados de anticorpo-fármaco.

[0312]Tipicamente, menos do que a máxima teórica de porções de fármaco são conjugados a um anticorpo durante uma reação de conjugação. Um anticorpo pode conter, por exemplo, muitos resíduos de lisina que não reagem com o intermediário de fármaco-ligador (D-L) ou reagente de ligador. Apenas os grupos lisina mais reativos podem reagir com um reagente de ligador reativo em amina. Também, ape-

nas os grupos cisteína tiol mais reativos podem reagir com um reagente de ligador reativo em tiol. Geralmente, anticorpos não contêm muitos, se alguns, grupos cisteína tiol livres e reativos que podem ser ligados a uma porção do fármaco. A maioria dos resíduos de cisteína tiol nos anticorpos dos compostos existe como pontes de dissulfeto e deve ser reduzida com um agente redutor tal como ditioneitol (DTT) ou TCEP, sob condições de redução parcial ou total. A carga (razão de fármaco/anticorpo) de um ADC pode ser controlada em várias maneiras diferentes, incluindo: (i) limitar o excesso molar do intermediário de fármaco-ligador (D-L) ou reagente de ligador em relação ao anticorpo, (ii) limitar o tempo ou temperatura da reação de conjugação, e (iii) condições redutivas parciais ou limitantes para modificação de cisteína tiol.

[0313]Certos anticorpos têm dissulfetos intercadeia reduzíveis, isto é pontes de cisteína. Anticorpos podem ser feitos reativos para conjugação com reagentes de ligador por tratamento com um agente redutor tal como DTT (ditioneitol). Cada ponte de cisteína assim formará, teoricamente, dois nucleófilos de tiol reativos. Grupos nucleofílicos adicionais podem ser introduzidos em anticorpos através da reação de lisinas com 2-iminotiolano (reagente de Traut) resultando na conversão de uma amina em um tiol. Grupos tiol reativos podem ser introduzidos no anticorpo (ou fragmento deste) engendrando-se um, dois, três, quatro, ou mais resíduos de cisteína (por exemplo, preparando anticorpos mutantes compreendendo um ou mais resíduos de aminoácido cisteína não reativos). US 7521541 mostra a engenharia de anticorpos por introdução de aminoácidos cisteína reativos.

[0314]Aminoácidos cisteína podem ser engendrados em sítios reativos em um anticorpo e que não formam ligações dissulfeto intracadeia ou intermoleculares (Junutula, *et al.*, 2008b Nature Biotech., 26(8):925 - 932; Dornan *et al* (2009) Blood 114(13):2721 - 2729; US 7521541; US 7723485; WO2009/052249). Os tióis de cisteína engendrados podem reagir com reagentes de ligador ou os reagentes de ligador

de fármaco da presente invenção que têm grupos eletrofílicos reativos em tiol tais como maleimida ou alfa-halo amidas para formar ADC com anticorpos engendrados com cisteína e as porções de fármaco de PBD. O local da porção do fármaco assim pode ser projetado, controlado, e conhecido. A carga de fármaco pode ser controlada visto que os grupos cisteína tiol engendrados tipicamente reagem com reagentes de ligador reativos em tiol ou reagentes de ligador de fármaco em rendimento alto. A engenharia de um anticorpo de IgG para introduzir um aminoácido cisteína por substituição em um único sítio na cadeia pesada ou leve fornece duas novas cisteínas no anticorpo simétrico. Uma carga de fármaco perto de 2 pode ser obtida com homogeneidade aproximada do produto de conjugação ADC.

[0315]Alternativamente, a conjugação específica de sítio pode ser obtida engendrando-se anticorpos para conter aminoácidos não naturais em suas cadeias pesadas e/ou leves como descrito por Axup *et al.* ((2012), Proc Natl Acad Sci U S A. 109(40):16101 - 16116). Os aminoácidos não naturais fornecem a vantagem adicional de que a química ortogonal pode ser projetada para fixar o reagente de ligador e fármaco.

[0316]Onde mais do que um grupo nucleofílico ou eletrofílico do anticorpo reage com um intermediário de fármaco-ligador, ou reagente de ligador seguido por porção do reagente de fármaco, então o produto resultante é uma mistura de compostos de ADC com uma distribuição de porções de fármaco ligadas a um anticorpo, por exemplo, 1, 2, 3, etc. Métodos de cromatografia líquida tais como fase reversa polimérica (PLRP) e interação hidrofóbica (HIC) podem separar os compostos na mistura pelo valor da carga de fármaco. Preparações de ADC com um único valor da carga de fármaco (p) podem ser isoladas, entretanto, estes ADCs de valor de carga único ainda podem ser misturas heterogêneas porque as porções de fármaco podem ser ligadas, por intermédio do ligador, em sítios diferentes no anticorpo.

[0317]Assim as composições de conjugado de anticorpo-fármaco da inven-

ção incluem misturas de compostos de conjugado de anticorpo-fármaco onde o anticorpo tem uma ou mais porções de fármaco de PBD e onde as porções de fármaco podem ser ligadas ao anticorpo em vários resíduos de aminoácido.

[0318]Em uma forma de realização, o número médio de grupos pirrolobenzodiazepina diméricos por anticorpo está na faixa de 1 a 20. Em algumas formas de realização a faixa é selecionada de 1 a 8, 2 a 8, 2 a 6, 2 a 4, e 4 a 8.

[0319]Em algumas formas de realização, existe um grupo pirrolobenzodiazepina dimérico por anticorpo.

Inclui Outras Formas

[0320]A menos que de outro modo especificado, incluídas no acima são as formas iônicas, salinas, de solvato e protegidas bem conhecidas destes substituintes. Por exemplo, uma referência a ácido carboxílico (-COOH) também inclui a forma aniônica (carboxilato) (-COO⁻), um sal ou solvato desta, assim como formas protegidas convencionais. Similarmente, uma referência a um grupo amino inclui a forma protonada (-N⁺HR¹R²), um sal ou solvato do grupo amino, por exemplo, um sal de cloridreto, assim como formas protegidas convencionais de um grupo amino. Similarmente, uma referência a um grupo hidroxila também inclui a forma aniônica (-O⁻), um sal ou solvato desta, assim como formas protegidas convencionais.

Sais

[0321]Pode ser conveniente ou desejável preparar, purificar, e/ou manejar um sal correspondente do composto ativo, por exemplo, um sal farmacologicamente aceitável. Exemplos de sais farmacologicamente aceitáveis são debatidos em Berge, *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 66, 1 - 19 (1977).

[0322]Por exemplo, se o composto for aniônico, ou tiver um grupo funcional que pode ser aniônico (por exemplo, -COOH pode ser -COO⁻), então um sal pode ser formado com um cátion adequado. Exemplos de cátions inorgânicos adequados incluem, mas não são limitados a, íons de metal alcalino tais como Na⁺ e K⁺, cátions

alcalinos terrosos tais como Ca^{2+} e Mg^{2+} , e outros cátions tais como Al^{+3} . Exemplos de cátions orgânicos adequados incluem, mas não são limitados a, íon amônio (isto é NH_4^+) e íons amônios substituídos (por exemplo, NH_3R^+ , NH_2R_2^+ , NHR_3^+ , NR_4^+). Exemplos de alguns íons amônios substituídos adequados são aquelas derivados de: etilamina, dietilamina, dicicloexilamina, trietilamina, butilamina, etilenodiamino, etanolamina, dietanolamina, piperazina, benzilamina, fenilbenzilamina, colina, meglumina, e trometamina, assim como aminoácidos, tais como lisina e arginina. Um exemplo de um íon amônio quaternário comum é $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$.

[0323]Se o composto for catiônico, ou tiver um grupo funcional que pode ser catiônico (por exemplo, $-\text{NH}_2$ pode ser $-\text{NH}_3^+$), então um sal pode ser formado com um ânion adequado. Exemplos de ânions inorgânicos adequados incluem, mas não são limitados, àqueles derivados dos ácidos inorgânicos seguintes: clorídrico, bromídrico, iodídrico, sulfúrico, sulfuroso, nítrico, nitroso, fosfórico, e fosforoso.

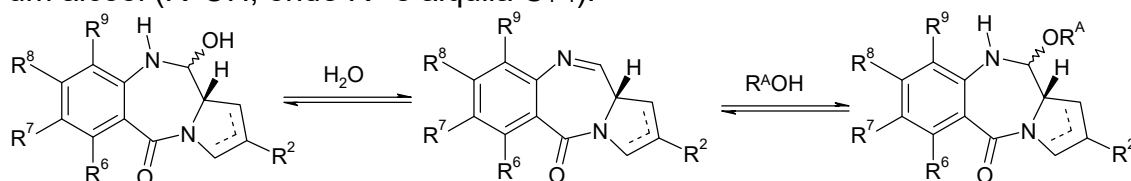
[0324]Exemplos de ânions orgânicos adequados incluem, mas não são limitados, àqueles derivados dos ácidos orgânicos seguintes: 2-acetioxibenzoico, acético, ascórbico, aspártico, benzoico, canforsulfônico, cinâmico, cítrico, edético, etanodissulfônico, etanossulfônico, fumárico, glicoeptônico, glicônico, glutâmico, glicólico, hidroximaleico, hidroxinaftaleno carboxílico, isetiônico, láctico, lactobiônico, láurico, maleico, málico, metanossulfônico, mícico, oleico, oxálico, palmítico, pamoico, pantotênico, fenilacético, fenilsulfônico, propiônico, pirúvico, salicílico, esteárico, succínico, sulfanílico, tartárico, toluenossulfônico, ácido trifluoroacético e valérico. Exemplos de ânions orgânicos poliméricos adequados incluem, mas não são limitados, àqueles derivados dos ácidos poliméricos seguintes: ácido tânico, carboximetil celulose.

Solvatos

[0325]Pode ser conveniente ou desejável preparar, purificar, e/ou manejar um solvato correspondente do composto ativo. O termo "solvato" é usado aqui no sentido convencional para referir-se a um complexo de soluto (por exemplo, compos-

to ativo, sal de composto ativo) e solvente. Se o solvente for água, o solvato pode ser convenientemente referido como um hidrato, por exemplo, um mono-hidrato, um di-hidrato, um tri-hidrato, etc.

[0326]A invenção inclui compostos onde um solvente se junta através da ligação de imina da porção PBD, que é ilustrada abaixo onde o solvente é água ou um álcool ($R^A\text{OH}$, onde R^A é alquila C_{1-4}):



[0327]Estas formas podem ser chamadas as formas de carbinolamina e éter de carbinolamina do PBD (como descrito na seção referem-se a R^{10} acima). O balanceamento destes equilíbrios depende das condições em que os compostos são encontrados, assim como da natureza da porção propriamente dita.

[0328]Estes compostos particulares podem ser isolados na forma sólida, por exemplo, por liofilização.

Isômeros

[0329]Certos compostos da invenção podem existir em uma ou mais formas geométricas, ópticas, enantioméricas, diastereoméricas, epiméricas, atrópicas, estereoisoméricas, tautoméricas, conformacionais, ou anoméricas particulares, incluindo mas não limitadas a, formas cis e trans; formas E e Z; formas c, t, e r; formas endo e exo; formas R, S, e meso; formas D e L; formas d e l; formas (+) e (-); formas ceto, enol, e enolato; formas sin e anti; formas sinclinais e anticlinais; formas α e β ; formas axiais e equatoriais; formas de bote, cadeira, trança, envelope, e meia-cadeira; e combinações destes, em seguida coletivamente referidos como “isômeros” (ou “formas isoméricas”).

[0330]O termo “quiral” refere-se a moléculas que têm a propriedade de capacidade de não superposição do parceiro de imagem idêntica, enquanto o termo “aquiral” refere-se a moléculas que são superponíveis em seu parceiro de imagem

idêntica.

[0331]O termo “estereoisômeros” refere-se a compostos que têm constituição química idêntica, mas diferem quanto ao arranjo dos átomos ou grupos no espaço.

[0332]“Diastereômero” refere-se a um estereoisômero com dois ou mais centros de quiralidade e cujas moléculas não são imagens idênticas entre si. Diastereômeros têm propriedades físicas diferentes, por exemplo, pontos de fusão, pontos de ebulição, propriedades espectrais, e reatividades. Misturas de diastereômeros podem separar sob procedimentos analíticos de alta resolução tais como eletroforese e cromatografia.

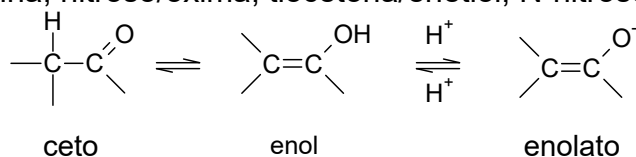
[0333]“Enantiômeros” referem-se a dois estereoisômeros de um composto que são imagens idênticas não superponíveis uma da outra.

[0334]Definições estereoquímicas e convenções usadas aqui geralmente seguem S. P. Parker, Ed., *McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, Nova Iorque; e Eliel, E. e Wilen, S., “*Stereochemistry of Organic Compounds*”, John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque, 1994. Os compostos da invenção podem conter centros assimétricos ou quirais, e portanto existir em formas estereoisoméricas diferentes. É intencionado que todas as formas estereoisoméricas dos compostos da invenção, incluindo mas não limitadas a, diastereômeros, enantiômeros e atropisômeros, assim como misturas destes tais como misturas racêmicas, formam parte da presente invenção. Muitos compostos orgânicos existem em formas opticamente ativas, isto é, eles têm a capacidade de girar o plano da luz polarizada no plano. Em descrever um composto opticamente ativo, os prefixos D e L, ou R e S, são usados para denotar a configuração absoluta da molécula sobre seu(s) centro(s) quiral(is). Os prefixos d e l ou (+) e (-) são utilizados para designar o sinal de rotação da luz polarizada no plano pelo composto, com (-) ou l significando que o composto é levógiro. Um composto prefixado com (+) ou d é dextrorrotatório. Para uma estru-

tura química dada, estes estereoisômeros são idênticos exceto que eles são imagens idênticas entre si. Um estereoisômero específico também pode ser referido como um enantiômero, e uma mistura de tais isômeros é frequentemente chamada uma mistura enantiomérica. Uma mistura a 50:50 de enantiômeros é referida como uma mistura racêmica ou um racemato, que podem ocorrer onde não houve nenhuma estereosseleção ou estereoespecificidade em uma reação química ou processo. Os termos “mistura racêmica” e “racemato” referem-se a uma mistura equimolar de duas espécies enantioméricas, destituídas de atividade óptica.

[0335]Note que, exceto como debatido abaixo para formas tautoméricas, especificamente excluídos do termo “isômeros”, como usado aqui, são isômeros estruturais (ou constitucionais) (isto é isômeros que diferem nas conexões entre átomos ao invés de meramente pela posição de átomos no espaço). Por exemplo, uma referência a um grupo metóxi, $-OCH_3$, não deve ser interpretada como uma referência ao seu isômero estrutural, um grupo hidroximetila, $-CH_2OH$. Similarmente, uma referência a orto-clorofenila não deve ser interpretada como uma referência ao seu isômero estrutural, meta-clorofenila. Entretanto, uma referência a uma classe de estruturas pode incluir satisfatoriamente formas estruturalmente isoméricas que caem dentro desta classe (por exemplo, alquila C_{1-7} inclui n-propila e iso-propila; butila inclui n-, iso-, sec-, e terc-butila; metoxifenila inclui orto-, meta-, e para-metoxifenila).

[0336]A exclusão acima não pertence a formas tautoméricas, por exemplo, formas de ceto, enol, e enolato, como, por exemplo, nos pares tautoméricos seguintes: ceto/enol (ilustrado abaixo), imina/enamina, amida/imino álcool, amidina/amidina, nitroso/oxima, tiocetona/enetiol, N-nitroso/hidroxiato, e nitro/aci-nitro.



[0337]O termo “tautômero” ou “forma tautomérica” refere-se a isômeros estruturais de energias diferentes que são interconvertíveis via uma barreira de ener-

gia baixa. Por exemplo, tautômeros de próton (também conhecidos como tautômeros prototrópicos) incluem interconversões via migração de um próton, tais como isomerizações de ceto-enol e imina-enamina. Tautômeros de valência incluem interconversões por reorganização de alguns dos elétrons de ligação.

[0338]Note que especificamente incluídos no termo “isômero” são compostos com uma ou mais substituições isotópicas. Por exemplo, H pode estar em qualquer forma isotópica, incluindo ^1H , ^2H (D), e ^3H (T); C pode estar em qualquer forma isotópica, incluindo ^{12}C , ^{13}C , e ^{14}C ; O pode estar em qualquer forma isotópica, incluindo ^{16}O e ^{18}O ; e semelhantes.

[0339]Exemplos de isótopos que podem ser incorporados em compostos da invenção incluem isótopos de hidrogênio, carbono, nitrogênio, oxigênio, fosforo, flúor, e cloro, tais como, mas não limitados a ^2H (deutério, D), ^3H (trítio), ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , e ^{125}I . Vários compostos isotopicamente rotulados da presente invenção, por exemplo aqueles em que isótopos radioativos tais como ^3H , ^{13}C , e ^{14}C são incorporados. Tais compostos isotopicamente rotulados podem ser úteis em estudos metabólicos, estudos cinéticos de reação, técnicas de detecção ou imageamento, tais como tomografia de emissão positrônica (PET) ou tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT) incluindo ensaios de distribuição de fármaco ou tecido de substrato, ou em tratamento radioativo de pacientes. Os compostos terapêuticos rotulados com deutério ou substituídos da invenção podem ter propriedades de DMPK melhoradas (metabolismo do fármaco e farmacocinética), referem-se à distribuição, metabolismo, e excreção (ADME). A substituição com isótopos mais pesados tal como deutério pode fornecer certas vantagens terapêuticas que resultam de maior estabilidade metabólica, por exemplo meia-vida *in vivo* aumentada ou necessidades de dosagem reduzidas. Um composto rotulado com ^{18}F pode ser útil para estudos de PET ou SPECT. Compostos isotopicamente rotulados desta invenção e pró-fármacos destes geralmente podem ser preparados realizando-

se os procedimentos divulgados nos esquemas ou nos exemplos e preparações descritos abaixo substituindo-se um reagente isotopicamente rotulado prontamente disponível no lugar de um reagente não isotopicamente rotulado. Além disso, a substituição com isótopos mais pesados, particularmente deutério (isto é, 2H ou D) pode fornecer certas vantagens terapêuticas que resultam de maior estabilidade metabólica, por exemplo meia-vida *in vivo* aumentada ou necessidades de dosagem reduzidas ou uma melhora no índice terapêutico. É entendido que deutério neste contexto é considerado como um substituinte. A concentração de um tal isótopo mais pesado, especificamente deutério, pode ser definida por um fator de enriquecimento isotópico. Nos compostos desta invenção qualquer átomo não especificamente designado como um isótopo particular é significado como representando qualquer isótopo estável deste átomo.

[0340]A menos que de outro modo especificado, uma referência a um composto particular inclui todas as tais formas isoméricas, incluindo (inteiramente ou parcialmente) racêmicas e outras misturas destas. Métodos para a preparação (por exemplo, síntese assimétrica) e separação (por exemplo, cristalização parcial e meios cromatográficos) de tais formas isoméricas são conhecidos na técnica ou são facilmente obtidos adaptando-se os métodos mostrados aqui, ou métodos conhecidos, em uma maneira conhecida.

Atividade biológica

Ensaio de proliferação celular *in vitro*

[0341]Geralmente, a atividade citotóxica ou citostática de um conjugado de anticorpo-fármaco (ADC) é medida: expondo-se células mamíferas tendo proteínas receptoras ao anticorpo do ADC em um meio de cultura celular; cultivando-se as células por um período de cerca de 6 horas a cerca de 5 dias; e medindo-se a viabilidade celular. Ensaio *in vitro* com base em célula são usados para medir a viabilidade (proliferação), citotoxicidade, e indução de apoptose (ativação de caspase) de um

ADC da invenção.

[0342]A potência *in vitro* de conjugados de anticorpo-fármaco pode ser medida por um ensaio de proliferação celular. O Ensaio de Viabilidade de Célula Luminescente CellTiter-Glo[®] é um método de ensaio homogêneo comercialmente disponível (Promega Corp., Madison, WI) com base na expressão recombinante de luciferase de *Coleoptera* (Patentes US N^{os} 5583024; 5674713 e 5700670). Este ensaio de proliferação celular determina o número de células viáveis em cultura com base na quantificação do ATP presente, um indicador de células metabolicamente ativas (Crouch *et al* (1993) *J. Immunol. Meth.* 160:81 - 88; US 6602677). O ensaio CellTiter-Glo[®] é conduzido em formato de 96 reservatórios, tornando-o receptivo à triagem de alta produtividade automática (HTS) (Cree *et al* (1995) *AntiCancer Drugs* 6:398 - 404). O procedimento de ensaio homogêneo envolve adicionar o único reagente (Reagente CellTiter-Glo[®]) diretamente às células cultivadas em meio suplementado com soro. Lavagem de célula, remoção do meio e etapas de pipetagem múltiplas não são necessárias. O sistema detecta apenas 15 células/reservatório em um formato de 384 reservatórios em 10 minutos depois de adicionar o reagente e misturar. As células podem ser tratadas continuamente com ADC, ou elas podem ser tratadas e separadas de ADC. Geralmente, células tratadas brevemente, isto é 3 horas, mostraram os mesmos efeitos de potência como células continuamente tratadas.

[0343]O formato homogêneo de “adicionar-misturar-medir” resulta em lise celular e geração de um sinal luminescente proporcional à quantidade de ATP presente. A quantidade of ATP é diretamente proporcional ao número de células presentes em cultura. O Ensaio CellTiter-Glo[®] gera um sinal luminescente do “tipo incandescente”, produzido pela reação de luciferase, que tem uma meia-vida geralmente maior do que cinco horas, dependendo do tipo de célula e meio usados. Células viáveis são refletidas em unidades de luminescência relativas (RLU). O substrato, Beetle Luciferina, é oxidativamente descarboxilado por luciferase de vaga-lume re-

combinante com conversão concomitante de ATP a AMP e geração de fótons.

[0344]A potência *in vitro* de conjugados de anticorpo-fármaco também pode ser medida por um ensaio de citotoxicidade. Células aderentes cultivadas são lavadas com PBS, separadas com tripsina, diluídas em meio completo, contendo 10 % de FCS, centrifugadas, recolocadas em suspensão em meio fresco e contadas com um hemocitômetro. Culturas em suspensão são contadas diretamente. suspensões de célula monodispersas adequadas para contagem podem requerer agitação da suspensão por aspiração repetida para quebrar grupos de células.

[0345]A suspensão celular é diluída à densidade de semeadura desejada e dispensada (100 µl por reservatório) em placas de 96 reservatórios pretas. Placas de linhagens de célula aderentes são incubadas durante a noite para permitir a aderência. Culturas de célula em suspensão podem ser usadas no dia da semeadura.

[0346]Uma solução de estoque (1 ml) de ADC (20 µg/ml) é fabricada no meio de cultura celular apropriado. Diluições seriais de 10 vezes de ADC de estoque são feitas em tubos de centrífuga de 15 ml transferindo-se serialmente 100 µl a 900 µl de meio de cultura celular.

[0347]Quatro reservatórios replicados de cada diluição de ADC (100 µl) são dispensados em placas pretas de 96 reservatórios, previamente plaqueadas com suspensão celular (100 µl), resultando em um volume final de 200 µl. Reservatórios de controle recebem o meio de cultura celular (100µl).

[0348]Se o tempo de duplicação da linhagem celular for maior do que 30 horas, a incubação de ADC é por 5 dias, de outro modo uma incubação de quatro dias é feita.

[0349]No final do período de incubação, a viabilidade celular é avaliada com o ensaio Alamar blue. AlamarBlue (Invitrogen) é dispensado sobre a placa inteira (20 µl por reservatório) e incubado por 4 horas. A fluorescência de Alamar blue é medida a excitação de 570 nm, emissão de 585 nm no leitor de placa instantâneo Varioskan.

A porcentagem de sobrevivência celular é calculada da fluorescência média nos reservatórios tratados com ADC comparada à fluorescência média nos reservatórios de controle.

Uso

[0350]Os conjugados da invenção podem ser usados para fornecer um composto de PBD em um local alvo.

[0351]O local alvo é preferivelmente uma população de célula proliferativa. O anticorpo é um anticorpo para um antígeno presente em uma população de célula proliferativa.

[0352]Em uma forma de realização o antígeno é ausente ou presente em um nível reduzido em uma população de célula não proliferativa comparado à quantidade de antígeno presente na população de célula proliferativa, por exemplo uma população de célula tumoral.

[0353]No local alvo o ligador pode ser clivado de modo a liberar um composto RelA, RelB, RelC, RelD ou RelE. Assim, o conjugado pode ser usado para fornecer seletivamente um composto RelA, RelB, Rel C, RelD ou RelE ao local alvo.

O ligador pode ser clivado por uma enzima presente no local alvo.

O local alvo pode ser *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*.

[0354]Os compostos de conjugado de anticorpo-fármaco (ADC) da invenção incluem aqueles com utilidade para atividade anticâncer. Em particular, os compostos incluem um anticorpo conjugado, isto é covalentemente ligado por um ligador, a uma porção do fármaco de PBD, isto é toxina. Quando o fármaco não é conjugado a um anticorpo, o fármaco de PBD tem um efeito citotóxico. A atividade biológica da porção do fármaco de PBD é assim modulada por conjugação a um anticorpo. Os conjugados de anticorpo-fármaco (ADC) da invenção seletivamente liberam uma dose eficaz de um agente citotóxico ao tecido tumoral como maior seletividade, isto é uma dose eficaz mais baixa, pode ser obtida.

[0355]Assim, em um aspecto, a presente invenção fornece um composto de conjugado como descrito aqui para o uso em terapia.

[0356]Em um outro aspecto a mesma também fornece um composto de conjugado como descrito aqui para o uso no tratamento de uma doença proliferativa. Um segundo aspecto da presente invenção fornece o uso de um composto de conjugado na fabricação de um medicamento para tratar uma doença proliferativa.

[0357]Uma pessoa de habilidade comum na técnica é facilmente capaz de determinar se ou não um conjugado candidato trata uma condição proliferativa para qualquer tipo de célula particular. Por exemplo, ensaios que podem ser convenientemente usados para avaliar a atividade oferecida por um composto particular são descritos nos exemplos abaixo.

[0358]O termo “doença proliferativa” pertence a uma proliferação celular indesejada ou descontrolada de células excessivas ou anormais que é indesejada, tal como, crescimento neoplástico ou hiperplástico, se *in vitro* ou *in vivo*.

[0359]Exemplos de condições proliferativas incluem, mas não são limitados a, proliferação celular benigna, pré-maligna, e maligna, incluindo mas não limitadas a, neoplasmas e tumores (por exemplo, histocitoma, glioma, astrocitoma, osteoma), canceres (por exemplo, câncer de pulmão, câncer de pulmão de células pequenas, câncer gastrointestinal, câncer colorretal, câncer de cólon, carcinoma de mama, carcinoma de ovário, câncer de próstata, câncer testicular, câncer de fígado, câncer renal, câncer de bexiga, câncer de pâncreas, câncer cerebral, sarcoma, osteossarcoma, sarcoma de Kaposi, melanoma), linfomas, leucemias, psoríase, doenças ósseas, transtornos fibroproliferativos (por exemplo, de tecidos conjuntivos), e aterosclerose. Canceres de interesse particular incluem, mas não são limitados a, leucemias e canceres ovarianos.

[0360]Qualquer tipo de célula pode ser tratado, incluindo mas não limitado a, pulmão, gastrointestinal (incluindo, por exemplo, intestino, cólon), mama (mamário),

ovário, próstata, fígado (hepático), rim (renal), bexiga, pâncreas, cérebro, e pele.

[0361] Transtornos de interesse particular incluem, mas não são limitados a, linfoma não-Hodgkin incluindo linfoma de célula B grande difuso (DLBCL), linfoma folicular, (FL), linfoma de Célula do Manto (MCL), linfoma linfático crônico (CLL) e leucemias tais como leucemia de células pilosas (HCL), leucemia de células pilosas variante (HCL-v) e leucemia linfoblástica aguda (ALL).

[0362] É considerado que os conjugados de anticorpo-fármaco (ADC) da presente invenção podem ser usados para tratar várias doenças ou transtornos, por exemplo, caracterizados pela superexpressão de um antígeno de tumor. Condições exemplares ou transtornos hiperproliferativos incluem tumores benignos ou malignos; leucemia, hematologia, e malignidades linfoides. Outros incluem transtornos neuronais, gliais, astrocitais, hipotalâmicos, glandulares, macrofágicos, epiteliais, estromais, blastocélicos, inflamatórios, angiogênicos e imunológicos, incluindo autoimunes.

[0363] Geralmente, a doença ou transtorno a serem tratados é uma doença hiperproliferativa tal como câncer. Exemplos de câncer a ser tratado aqui incluem, mas não são limitados a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, e leucemia ou malignidades linfoides. Exemplos mais particulares de tais cânceres incluem câncer de célula escamosa (por exemplo, câncer de célula escamosa epitelial), câncer de pulmão incluindo câncer de pulmão de células pequenas, câncer de pulmão de células não pequenas, adenocarcinoma do pulmão e carcinoma escamoso do pulmão, câncer do peritônio, câncer hepatocelular, câncer gástrico ou de estômago incluindo câncer gastrointestinal, câncer pancreático, glioblastoma, câncer cervical, câncer ovariano, câncer de fígado, câncer de bexiga, hepatoma, câncer de mama, câncer de cólon, câncer de reto, câncer colorretal, carcinoma endometrial ou uterino, carcinoma da glândula salivar, câncer do rim ou renal, câncer de próstata, câncer vulvar, câncer da tireoide, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma peniano, assim

como câncer de cabeça e pescoço.

[0364]Doenças autoimunes para as quais os compostos de ADC podem ser usados no tratamento incluem transtornos reumatológicos (tais como, por exemplo, artrite reumatoide, síndrome de Sjögren, esclerodermia, lúpus tais como SLE e nefrite por lúpus, polimiosite/dermatomiosite, crioglobulinemia, síndrome do anticorpo antifosfolipídico, e artrite psoriática), osteoartrite, transtornos gastrointestinais e hepáticos autoimunes (tais como, por exemplo, doenças inflamatórias intestinais (por exemplo, colite ulcerativa e doença de Crohn), gastrite autoimune e anemia perniciosa, hepatite autoimune, cirrose biliar primária, colangite esclerosante primária, e doença celíaca), vasculite (tal como, por exemplo, vasculite associada a ANCA, incluindo vasculite de Churg-Strauss, granulomatose de Wegener, e poliarteriite), transtornos neurológicos autoimunes (tais como, por exemplo, esclerose múltipla, síndrome de opsoclonia mioclonia, miastenia grave, neuromielite óptica, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, e polineuropatias autoimunes), transtornos renais (tais como, por exemplo, glomerulonefrite, síndrome de Goodpasture, e doença de Berger), transtornos dermatológicos autoimunes (tais como, por exemplo, psoríase, urticária, pênfigo vulgar, penfigoide bolhoso, e lúpus eritematoso cutâneo), transtornos hematológicos (tais como, por exemplo, púrpura trombocitopênica, púrpura trombocitopênica trombótica, púrpura pós-transfusão, e anemia hemolítica autoimune), aterosclerose, uveíte, doenças auditivas autoimunes (tais como, por exemplo, doença do ouvido interno e perda auditiva), doença de Behçet, síndrome de Raynaud, transplante de órgão, e transtornos endócrinos autoimunes (tais como, por exemplo, doenças autoimunes relacionadas a diabéticos tais como diabete melito insulino-dependente (IDDM), doença de Addison, e doença da tireoide autoimune (por exemplo, doença de Graves e tireoidite)). Tais doenças mais preferidas incluem, por exemplo, artrite reumatoide, colite ulcerativa, vasculite associada a ANCA, lúpus, esclerose múltipla, síndrome de Sjögren, doença de Graves, IDDM, anemia pernicio-

sa, tireoidite, e glomerulonefrite.

Métodos de Tratamento

[0365]Os conjugados da presente invenção podem ser usados em um método de terapia. Também fornecido é um método de tratamento, compreendendo administrar a um indivíduo em necessidade de tratamento uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto de conjugado da invenção. O termo “quantidade terapeuticamente eficaz” é uma quantidade suficiente para mostrar benefício a um paciente. Tal benefício pode ser pelo menos melhora de pelo menos um sintoma. A quantidade real administrada, e taxa e curso de tempo da administração, dependerá da natureza e severidade do que está sendo tratado. Prescrição do tratamento, por exemplo, decisões na dosagem, está dentro da responsabilidade de médicos de clínica geral e outros médicos.

[0366]Um composto da invenção pode ser administrado sozinho ou em combinação com outros tratamentos, simultaneamente ou sequencialmente dependendo da condição a ser tratada. Exemplos de tratamentos e terapias incluem, mas não são limitados a, quimioterapia (a administração de agentes ativos, incluindo, por exemplo, fármacos, tais como quimioterapêuticos); cirurgia; e terapia de radiação.

[0367]Um “agente quimioterapêutico” é um composto químico útil no tratamento de câncer, não obstante do mecanismo de ação. Classes de agentes quimioterápicos incluem, mas não são limitados a: agentes alquilantes, antimetabólitos, alcaloides de plantas de veneno antifuso, antibióticos citotóxicos/antitumor, inibidores de topoisomerase, anticorpos, fotossensibilizadores, e inibidores de cinase. Agentes quimioterápicos incluem compostos usados em “terapia alvejada” e quimioterapia convencional.

[0368]Exemplos de agentes quimioterápicos incluem: erlotinibe (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), docetaxel (TAXOTERE®, Sanofi-Aventis), 5-FU (fluorouracila, 5-fluorouracila, CAS N° 51-21-8), gencitabina (GEMZAR®, Lilly), PD-0325901

(CAS N° 391210-10-9, Pfizer), cisplatina (cis-diamina, dicloroplatina(II), CAS N° 15663-27-1), carboplatina (CAS N° 41575-94-4), paclitaxel (TAXOL[®], Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), trastuzumabe (HERCEPTIN[®], Genentech), temozolomida (4-metil-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabicyclo [4,3,0] nona-2,7,9-trieno-9-carboxamida, CAS N° 85622-93-1, TEMODAR[®], TEMODAL[®], Schering Plough), tamoxifeno ((Z)-2-[4-(1,2-difenilbut-1-enil)fenóxi]-N,N-dimetiletanamina, NOLVADEX[®], ISTUBAL[®], VALODEX[®]), e doxorubicina (ADRIAMYCIN[®]), Akti-1/2, HPPD, e rapamicina.

[0369]Mais exemplos de agentes quimioterápicos incluem: oxaliplatina (ELOXATIN[®], Sanofi), bortezomibe (VELCADE[®], Millennium Pharm.), sunitinibe (SUNITINIB[®], SU11248, Pfizer), letrozol (FEMARA[®], Novartis), mesilato de imatinibe (GLEEVEC[®], Novartis), XL-518 (inibidor de Mek, Exelixis, WO 2007/044515), ARRY-886 (inibidor de Mek, AZD6244, Array BioPharma, Astra Zeneca), SF-1126 (inibidor de PI3K, Semafore Pharmaceuticals), BEZ-235 (inibidor de PI3K, Novartis), XL-147 (inibidor de PI3K, Exelixis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), fulvestrant (FASLODEX[®], AstraZeneca), leucovorin (ácido folínico), rapamicina (sirolimo, RAPAMUNE[®], Wyeth), lapatinibe (TYKERB[®], GSK572016, Glaxo Smith Kline), lonafarnibe (SARASAR[™], SCH 66336, Schering Plough), sorafenibe (NEXAVAR[®], BAY43 - 9006, Bayer Labs), gefitinibe (IRESSA[®], AstraZeneca), irinotecano (CAMPTOSAR[®], CPT-11, Pfizer), tipifarnibe (ZARNESTRA[™], Johnson & Johnson), ABRAXANE[™] (isento de Cremophor), formulações de nanopartícula engendradas em albumina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, IL), vandetanibe (rINN, ZD6474, ZACTIMA[®], AstraZeneca), clorambucil, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), temsirolimo (TORISEL[®], Wyeth), pazopanibe (GlaxoSmithKline), canfosfamida (TELCYTA[®], Telik), tiotepa e ciclosfosfamida (CYTOXAN[®], NEOSAR[®]); sulfonatos de alquila tais como busulfano, improssulfano e pipossulfano; aziridinas tais como benzodopa, carboquona, meturedopa, e uredopa; etileniminas e metilamelaminas

incluindo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida e trimetilomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina e bulatacinona); uma camptotecina (incluindo o topotecano análogo sintético); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluindo seus análogos sintéticos de adozelesina, carzelesina e bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 e criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluindo os análogos sintéticos, KW-2189 e CB1-TM1); eleuterobina; pancreatistatina; uma sarcodictiina; espongiostatina; mostardas de nitrogênio tais como clorambucil, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, cloridreto de óxido de mecloretamina, melfalano, novembiquina, fenosterina, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracila; nitrosoureas tais como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, e ranimustina; antibióticos tais como os antibióticos de enediina (por exemplo, caliqueamicina, caliqueamicina gama11, caliqueamicina ômega11 (*Angew Chem. Intl. Ed. Engl.* (1994) 33:183 - 186); dinemicina, dinemicina A; bisfosfonatos, tais como clodronato; uma esperamicina; assim como cromóforo de neocarzinostatina e cromóforos de antibiótico de cromoproteína enediina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina e desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, nemorrubicina, marcelomicina, mitomicinas tais como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti-metabólitos tais como metotrexato e 5-fluorouracila (5-FU); análogos de ácido fólico tais como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tais como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tais como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluri-

dina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tais como calusterona, propionato de drostanolona, epitiostanol, mepitioetano, testolactona; anti-adrenais tais como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamida glicosídeo; ácido aminolevulínico; eniluracila; ansacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptínio; um eptilona; etoglucid; nitrato de gálio; hidroxíureia; lentinan; lonidainina; maitansinoides tais como maitansina e ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complexo de polissacarídeo PSK[®] (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermânio; ácido tenuazônico; triaziquona; 2,2',2"-triclortrietilamina; tricoteceenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A e anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platina tais como cisplatina e carboplatina; vimblastina; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina (NAVELBINE[®]); novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; capecitabina (XELODA[®], Roche); ibandronato; CPT-11; inibidor de topoisomerase RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tais como ácido retinoico; e sais farmacologicamente aceitáveis, ácidos e derivados de qualquer um do acima.

[0370] Também incluídos na definição de "agente quimioterapêutico" são: (i) agentes anti-hormonais que agem para regular ou inibir a ação do hormônio em tumores tais como anti-estrógenos e moduladores seletivos do receptor de estrógeno (SERMs), incluindo, por exemplo, tamoxifeno (incluindo NOLVADEX[®]; citrato de tamoxifeno), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, ceoxifeno, LY117018, onapristona, e FARESTON[®] (citrato de toremifina); (ii) inibidores de aromatase que inibem a enzima aromatase, que regula a produção de estrógeno nas

glândulas adrenais, tais como, por exemplo, 4(5)-imidazóis, aminoglutetimida, MEGASE[®] (acetato de megestrol), AROMASIN[®] (exemestano; Pfizer), formestanie, fadrozol, RIVISOR[®] (vorozol), FEMARA[®] (letrozol; Novartis), e ARIMIDAX[®] (anastrozol; AstraZeneca); (iii) anti-andrógenos tais como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, e goserelina; assim como troxacitabina (um análogo de citosina de nucleosídeo de 1,3-dioxolano); (iv) inibidores de proteína cinase tais como inibidores de MEK (WO 2007/044515); (v) inibidores de lipídeo cinase; (vi) oligonucleotídeos anti-sentido, particularmente aqueles que inibem a expressão de genes em vias de sinalização implicadas na proliferação de célula aberrante, por exemplo, PKC-alfa, Raf e H-Ras, tal como oblimerseno (GENASENSE[®], Genta Inc.); (vii) ribozimas tais como inibidores da expressão de VEGF (por exemplo, ANGIOZYME[®]) e inibidores da expressão de HER2; (viii) vacinas tais como vacinas de terapia genética, por exemplo, ALLOVECTIN[®], LEUVECTIN[®], e VAXID[®]; PROLEUKIN[®] rIL-2; inibidores de topoisomerase 1 tais como LURTOTECAN[®]; ABARELIX[®] rmRH; (ix) agentes anti-angiogênicos tais como bevacizumabe (AVASTIN[®], Genentech); e sais farmacologicamente aceitáveis, ácidos e derivados de qualquer um do acima.

[0371]Também incluídos na definição de “agente quimioterapêutico” são anticorpos terapêuticos tais como alemtuzumabe (Campath), bevacizumabe (AVASTIN[®], Genentech); cetuximabe (ERBITUX[®], Imclone); panitumumabe (VECTIBIX[®], Amgen), rituximabe (RITUXAN[®], Genentech/Biogen Idec), ofatumumabe (ARZERRA[®], GSK), pertuzumabe (PERJETA[™], OMNITARG[™], 2C4, Genentech), trastuzumabe (HERCEPTIN[®], Genentech), tositumomabe (Bexxar, Corixa), e o conjugado de anticorpo e fármaco, gentuzumabe ozogamicina (MYLOTARG[®], Wyeth).

[0372]Anticorpos humanizados monoclonais com potencial terapêutico como agentes quimioterápicos em combinação com os conjugados da invenção incluem: alemtuzumabe, apolizumabe, aselizumabe, atlizumabe, bapineuzumabe, bevacizu-

mabe, bivatuzumabe mertansina, cantuzumabe mertansina, cedelizumabe, certolizumabe pegol, cidfusituzumabe, cidtuzumabe, daclizumabe, eculizumabe, efalizumabe, epratuzumabe, erlizumabe, felvizumabe, fontolizumabe, gentuzumabe ozogamicina, inotuzumabe ozogamicina, ipilimumabe, labetuzumabe, lintuzumabe, matuzumabe, mepolizumabe, motavizumabe, motovizumabe, natalizumabe, nimotuzumabe, nolovizumabe, numavizumabe, ocrelizumabe, omalizumabe, palivizumabe, pascolizumabe, pecfusituzumabe, pectuzumabe, pertuzumabe, pexelizumabe, ralivizumabe, ranibizumabe, reslivizumabe, reslizumabe, resivizumabe, rovelizumabe, ruplizumabe, sibrotuzumabe, sipilizumabe, sontuzumabe, tacatuzumabe tetraxetano, tadocizumabe, talizumabe, tefibazumabe, tocilizumabe, toralizumabe, trastuzumabe, tucotuzumabe celmoleucina, tucosituzumabe, umavizumabe, urtoxazumabe, e visilizumabe.

[0373]Composições farmacêuticas de acordo com a presente invenção, e para o uso de acordo com a presente invenção, podem compreender, além do ingrediente ativo, isto é um composto de conjugado, um excipiente farmacêuticamente aceitável, carregador, tampão, estabilizador ou outros materiais bem conhecidos àquelas habilitados na técnica. Tais materiais não devem ser tóxicos e não devem interferir com a eficácia do ingrediente ativo. A natureza precisa do carregador ou outro material dependerá da via de administração, que pode ser oral, ou por injeção, por exemplo, cutânea, subcutânea, ou intravenosa.

[0374]Composições farmacêuticas para administração oral podem estar na forma de tablete, cápsula, pó ou líquido. Um tablete pode compreender um carregador sólido ou um adjuvante. Composições farmacêuticas líquidas geralmente compreendem um carregador líquido tal como água, petróleo, óleos animais ou vegetais, óleo mineral ou óleo sintético. Solução salina fisiológica, dextrose ou outra solução de sacarídeo ou glicóis tais como etileno glicol, propileno glicol ou polietilenoglicol podem ser incluídos. Uma cápsula pode compreender um carregador sólido tal como

gelatina.

[0375]Para injeção intravenosa, cutânea ou subcutânea, ou injeção no sítio de aflição, o ingrediente ativo estará na forma de uma solução aquosa parenteralmente aceitável que é isenta de pirógeno e tem pH, isotonicidade e estabilidade adequados. Aquelas de habilidade relevante na técnica são bem capazes de preparar soluções adequadas usando, por exemplo, veículos isotônicos tais como Injeção de Cloreto de Sódio, Injeção de Ringer, Injeção de Ringer Lactato. Preservantes, estabilizadores, tampões, antioxidantes e/ou outros aditivos podem ser incluídos, conforme necessário.

Formulações

[0376]Embora seja possível que o composto de conjugado seja usado (por exemplo, administrada) sozinho, é frequentemente preferível apresentá-lo como uma composição ou formulação.

[0377]Em uma forma de realização, a composição é uma composição farmacêutica (por exemplo, formulação, preparação, medicamento) compreendendo um composto de conjugado, como descrito aqui, e um carregador, diluente, ou excipiente farmacêuticamente aceitáveis.

[0378]Em uma forma de realização, a composição é uma composição farmacêutica compreendendo pelo menos um composto de conjugado, como descrito aqui, junto com um ou mais outros ingredientes farmacêuticamente aceitáveis bem conhecidos àquelas habilitados na técnica, incluindo, mas não limitados a, carregadores, diluentes, excipientes, adjuvantes, enchedores, tampões, preservantes, antioxidantes, lubrificantes, estabilizadores, solubilizadores, tensoativos (por exemplo, agentes umectantes), agentes de mascaramento, agentes corantes, agentes flavorizantes, e agentes adoçantes farmacêuticamente aceitáveis.

[0379]Em uma forma de realização, a composição compreende ainda outros agentes ativos, por exemplo, outros agentes terapêuticos ou profiláticos.

[0380]Carregadores, diluentes, excipientes, etc. adequados podem ser encontrados em textos farmacêuticos padrão. Ver, por exemplo, Handbook of Pharmaceutical Additives, 2ª Edição (eds. M. Ash e I. Ash), 2001 (Sinapse Information Resources, Inc., Endicott, Nova Iorque, USA), Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª edição, pub. Lippincott, Williams & Wilkins, 2000; e Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2ª edição, 1994.

[0381]Um outro aspecto da presente invenção pertence a métodos de fabricar uma composição farmacêutica compreendendo misturar pelo menos um conjugado [^{14}C]-radiorrotulado ou composto semelhante a conjugado, como definido aqui, junto com um ou mais outros ingredientes farmacêuticamente aceitáveis bem conhecidos àquelas habilitados na técnica, por exemplo, carregadores, diluentes, excipientes, etc. Se formulada como unidades separadas (por exemplo, tabletes, etc.), cada unidade contém uma quantidade predeterminada (dosagem) do composto ativo.

[0382]O termo “farmacêuticamente aceitável,” como usado aqui, pertence a compostos, ingredientes, materiais, composições, formas de dosagem, etc., que são, dentro do escopo do julgamento médico sólido, adequado para o uso em contato com os tecidos do indivíduo em questão (por exemplo, ser humano) sem toxicidade, irritação, resposta alérgica excessivas, ou outro problema ou complicação, comensurável com um razão de risco/benefício razoável. Cada carregador, diluente, excipiente, etc. também devem ser “aceitáveis” no sentido de serem compatíveis com os outros ingredientes da formulação.

[0383]As formulações podem ser preparadas por quaisquer métodos bem conhecidos na técnica de farmácia. Tais métodos incluem a etapa de levar em associação o composto ativo com um carregador que constitui um ou mais ingredientes acessórios. Em geral, as formulações são preparadas uniformemente e intimamente levando-se em associação o composto ativo com carregadores (por exemplo, carregadores líquidos, carregador sólido finamente dividido, etc.), e depois formando o

produto, se necessário.

[0384]A formulação pode ser preparada para levar em consideração a liberação rápida ou lenta; liberação imediata, retardada, regulada, ou sustentada; ou uma combinação destas.

[0385]Formulações adequadas para administração parenteral (por exemplo, por injeção), incluem líquidos aquosos ou não aquosos, isotônicos, isentos de pirógeno, estéreis (por exemplo, soluções, suspensões), em que o ingrediente ativo é dissolvido, colocado em suspensão, ou de outro modo fornecido (por exemplo, em um lipossoma ou outro microparticulado). Tais líquidos podem conter adicionalmente outros ingredientes farmacêuticamente aceitáveis, tais como antioxidantes, tampões, preservantes, estabilizadores, bacteriostatos, agentes de suspensão, agentes espessantes, e solutos que tornam a formulação isotônica com o sangue (ou outro fluido corpóreo relevante) do receptor intencionado. Exemplos de excipientes incluem, por exemplo, água, álcoois, polióis, glicerol, óleos vegetais, e semelhantes. Exemplos de carregadores isotônicos adequados para o uso em tais formulações incluem injeção de cloreto de sódio, solução de Ringer, ou injeção de Ringer lactato. Tipicamente, a concentração do ingrediente ativo no líquido é de cerca de 1 ng/ml a cerca de 10 µg/ml, por exemplo de cerca de 10 ng/ml a cerca de 1 µg/ml. As formulações podem ser apresentadas em recipientes vedados de dose unitária ou doses múltiplas, por exemplo, ampolas e frascos, e podem ser armazenadas em uma condição seca por congelamento (liofilizada) que requer apenas a adição do carregador líquido estéril, por exemplo água para injeções, imediatamente antes do uso. Soluções e suspensões para injeção extemporânea podem ser preparadas a partir de pós, grânulos, e tabletes estéreis.

Dosagem

[0386]Será avaliado por uma pessoa de habilidade na técnica que dosagens apropriadas do composto de conjugado, e composições compreendendo o composto

de conjugado, podem variar de paciente para paciente. Determinar a dosagem ideal geralmente envolverá o balanceamento do nível de benefício terapêutico contra qualquer risco ou efeitos colaterais deletérios. O nível de dosagem selecionado dependerá de uma variedade de fatores incluindo, mas não limitados, à atividade do composto particular, à via de administração, ao tempo de administração, à taxa de excreção do composto, à duração do tratamento, outros fármacos, compostos, e/ou materiais usados em combinação, à severidade da condição, e à espécie, sexo, idade, peso, condição, saúde geral, e história médica anterior do paciente. A quantidade de composto e via de administração basicamente estará no critério do médico, veterinário, ou clínico, embora geralmente a dosagem será selecionada para obter concentrações locais no sítio de ação que obtém o efeito desejado sem causar efeitos colaterais prejudiciais ou deletérios substanciais.

[0387]A administração pode ser efetuada em uma dose, continuamente ou intermitentemente (por exemplo, em doses divididas em intervalos apropriados) por todo o curso de tratamento. Métodos de determinar os meios mais eficazes e dosagem de administração são bem conhecidos àquelas de habilidade na técnica e variação com a formulação usada para terapia, o propósito da terapia, a(s) célula(s) alvo(s) sendo tratada(s), e o indivíduo sendo tratado. Administrações únicas ou múltiplas podem ser realizadas com o nível de dose e padrão sendo selecionados pelo médico, veterinário, ou clínico do tratamento.

[0388]Em geral, uma dose adequada do composto ativo está na faixa de cerca de 100 ng a cerca de 25 mg (mais tipicamente cerca de 1 µg a cerca de 10 mg) por quilograma de peso corporal do indivíduo por dia. Onde o composto ativo é um sal, um éster, uma amida, um pró-fármaco, ou semelhantes, a quantidade administrada é calculada na base do composto precursor e de modo que o peso real a ser usado é aumentado proporcionalmente.

[0389]Em uma forma de realização, o composto ativo é administrado a um

paciente humano de acordo com o regime de dosagem seguinte: cerca de 100 mg, 3 vezes ao dia.

[0390]Em uma forma de realização, o composto ativo é administrado a um paciente humano de acordo com o regime de dosagem seguinte: cerca de 150 mg, 2 vezes ao dia.

[0391]Em uma forma de realização, o composto ativo é administrado a um paciente humano de acordo com o regime de dosagem seguinte: cerca de 200 mg, 2 vezes ao dia.

[0392]Entretanto em uma forma de realização, o composto de conjugado é administrado a um paciente humano de acordo com o regime de dosagem seguinte: cerca de 50 ou cerca de 75 mg, 3 ou 4 vezes ao dia.

[0393]Em uma forma de realização, o composto de conjugado é administrado a um paciente humano de acordo com o regime de dosagem seguinte: cerca de 100 ou cerca de 125 mg, 2 vezes ao dia.

[0394]As quantidades de dosagem descritas acima podem aplicar-se ao conjugado (incluindo a porção PBD e o ligador ao anticorpo) ou à quantidade eficaz de composto de PBD fornecido, por exemplo a quantidade de composto que é liberável depois da clivagem do ligador.

[0395]Para a prevenção ou tratamento da doença, a dosagem apropriada de um ADC da invenção dependerá do tipo de doença a ser tratada, como definido acima, da severidade e curso da doença, se a molécula é administrada para propósitos preventivos ou terapêuticos, terapia prévia, da história clínica do paciente e resposta ao anticorpo, e do critério do médico atendente. A molécula é adequadamente administrada ao paciente de uma vez ou em uma série de tratamentos. Dependendo do tipo e severidade da doença, cerca de 1 µg/kg a 15 mg/kg (por exemplo, 0,1 a 20 mg/kg) de molécula é uma dosagem candidata inicial para administração ao paciente, se, por exemplo, por uma ou mais administrações separadas, ou por infusão con-

tínua. Uma dosagem diária típica pode variar de cerca de 1 µg/kg a 100 mg/kg ou mais, dependendo dos fatores mencionados acima. Uma dosagem exemplar de ADC a ser administrado a um paciente está na faixa de cerca de 0,1 a cerca de 10 mg/kg de peso do paciente. Para administrações repetidas durante vários dias ou mais, dependendo da condição, o tratamento é sustentado até que uma supressão desejada dos sintomas da doença ocorra. Um regime de dosagem exemplar compreende um curso de administrar uma dose de carga inicial de cerca de 4 mg/kg, seguido por doses adicionais a cada semana, duas semanas, ou três semanas de um ADC. Outros regimes de dosagem podem ser úteis. O progresso desta terapia é facilmente monitorado por técnicas e ensaios convencionais.

Tratamento

[0396]O termo “tratamento,” como usado aqui no contexto de tratar uma condição, pertence geralmente ao tratamento e terapia, se de um ser humano ou um animal (por exemplo, em aplicações veterinárias), em que algum efeito terapêutico desejado é obtido, por exemplo, a inibição do progresso da condição, e inclui uma redução na taxa de progresso, uma parada na taxa de progresso, regressão da condição, melhora da condição, e cura da condição. Tratamento como uma medida profilática (isto é, profilaxia, prevenção) também é incluído.

[0397]O termo “quantidade terapeuticamente eficaz,” como usado aqui, pertence àquela quantidade de um composto ativo, ou um material, composição ou dosagem de compreender um composto ativo, que é eficaz para produzir algum efeito terapêutico desejado, comensurável com uma razão de risco/benefício razoável, quando administrado de acordo com um regime de tratamento desejado.

[0398]Similarmente, o termo “quantidade profilaticamente eficaz,” como usado aqui, pertence àquela quantidade de um composto ativo, ou um material, composição ou dosagem de compreender um composto ativo, que é eficaz para produzir algum efeito profilático desejado, comensurável com uma razão de risco/benefício

razoável, quando administrado de acordo com um regime de tratamento desejado.

Preparação de conjugados de fármaco

[0399]Conjugados de anticorpo e fármaco podem ser preparados por várias vias, utilizando reações, condições, e reagentes da química orgânica conhecidos àqueles habilitados na técnica, incluindo reação de um grupo nucleofílico de um anticorpo com um reagente de ligador de fármaco. Este método pode ser utilizado para preparar os conjugados de anticorpo-fármaco da invenção.

[0400]Grupos nucleofílicos em anticorpos incluem, mas não são limitados a grupos tiol de cadeia lateral, por exemplo, cisteína. Grupos tiol são nucleofílicos e capazes de reagir para formar ligações covalentes com grupos eletrofílicos em porções ligadoras tais como aquelas da presente invenção. Certos anticorpos têm dissulfetos intercadeia reduzíveis, isto é pontes de cisteína. Anticorpos podem ser feitos reativos para conjugação com reagentes de ligador por tratamento com um agente redutor tal como DTT (reagente de Cleland, ditioneitol) ou TCEP cloridreto de (tris(2-carboxietil)fosfina; Getz *et al* (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73 - 80; Soltec Ventures, Beverly, MA). Cada ponte de dissulfeto de cisteína assim formará, teoricamente, dois nucleófilos de tiol reativos. Grupos nucleofílicos adicionais podem ser introduzidos em anticorpos através da reação de lisinas com 2-iminotiolano (reagente de Traut) resultando na conversão de uma amina em um tiol.

O Indivíduo/Paciente

[0401]O indivíduo/paciente pode ser um animal, mamífero, um mamífero placentário, um marsupial (por exemplo, canguru, fascólomo), um monotrêmato (por exemplo, ornitorrinco), um roedor (por exemplo, um porquinho-da-índia, um hamster, um rato, um camundongo), murino (por exemplo, um camundongo), um lagomorfo (por exemplo, um coelho), aviário (por exemplo, uma ave), canino (por exemplo, um cão), felino (por exemplo, um gato), equino (por exemplo, um cavalo), porcino (por exemplo, um porco), ovino (por exemplo, uma ovelha), bovino (por exemplo, uma

vaca), um primata, símio (por exemplo, um macaco ou símio), um macaco (por exemplo, sagui, babuíno), um símio (por exemplo, gorila, chimpanzé, orangotango, gibão), ou um ser humano.

[0402]Além disso, o indivíduo/paciente pode ser qualquer um de suas formas de desenvolvimento, por exemplo, um feto. Em uma forma de realização preferida, o indivíduo/paciente é um ser humano.

Outras Preferências

[0403]As preferências seguintes podem aplicar-se a todos os aspectos da invenção como descrito acima, ou podem referir-se a um único aspecto. As preferências podem ser combinadas entre si em qualquer combinação.

[0404]Em algumas formas de realização, R^6 , R^7 , R^9 , e Y' são preferivelmente os mesmos como R^6 , R^7 , R^9 , e Y respectivamente.

Ligação dimérica

Y e Y' são preferivelmente O .

R'' é preferivelmente um grupo alquilenos C_{3-7} sem nenhum substituinte. Mais preferivelmente R'' é um alquilenos C_3 , C_5 ou C_7 . O mais preferivelmente, R'' é um alquilenos C_3 ou C_5 .

R^6 a R^9

R^9 é preferivelmente H .

R^6 é preferivelmente selecionado de H , OH , OR , SH , NH_2 , nitro e halo, e é mais preferivelmente H ou halo, e o mais preferivelmente é H .

R^7 é preferivelmente selecionado de H , OH , OR , SH , SR , NH_2 , NHR , NRR' , e halo, e mais preferivelmente independentemente selecionado de H , OH e OR , onde R é preferivelmente selecionado de grupos alquila C_{1-7} , heterociclila C_{3-10} e arila C_{5-10} opcionalmente substituídos. R pode ser mais preferivelmente um grupo alquila C_{1-4} , que pode ser substituído ou não. Um substituinte de interesse é um grupo arila C_{5-6} (por exemplo, fenila). Substituintes particularmente preferidos nas posições 7 são

OMe e OCH₂Ph. Outros substituintes de interesse particular são dimetilamino (isto é -NMe₂); -(OC₂H₄)_qOMe, onde q é de 0 a 2; heterociclilas C₆ contendo nitrogênio, incluindo morfolino, piperidinila e N-metil-piperazinila.

[0405]Estas preferências aplicam-se a R⁹, R⁶ e R⁷ respectivamente.

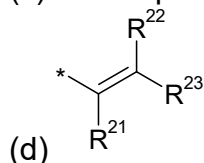
R¹²

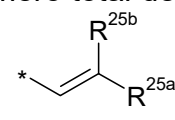
[0406]Quando existe uma ligação dupla presente entre C2' e C3', R¹² é selecionado de:

(a) grupo arila C₅₋₁₀, opcionalmente substituído por um ou mais substituintes selecionados do grupo compreendendo: halo, nitro, ciano, éter, alquila C₁₋₇, heterociclila C₃₋₇ e bis-óxi-alquilenos C₁₋₃;

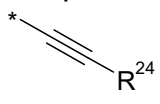
(b) alquila alifático saturado C₁₋₅;

(c) cicloalquila saturado C₃₋₆;



(e)  , em que um de R^{25a} e R^{25b} é H e o outro é selecionado de:

fenila, fenila este que é opcionalmente substituído por um grupo selecionado de halo metila, metóxi; piridila; e tiofenila; e

(f)  , onde R²⁴ é selecionado de: H; alquila saturado C₁₋₃; alquenila C₂₋₃; alquinila C₂₋₃; ciclopropila; fenila, fenila este que é opcionalmente substituído por um grupo selecionado de halo metila, metóxi; piridila; e tiofenila.

[0407]Quando R¹² é um grupo arila C₅₋₁₀, ele pode ser um grupo arila C₅₋₇. Um grupo arila C₅₋₇ pode ser um grupo fenila ou um grupo heteroarila C₅₋₇, por exemplo furanila, tiofenila e piridila. Em algumas formas de realização, R¹² é preferivelmente fenila. Em outras formas de realização, R¹² é preferivelmente tiofenila, por

exemplo, tiofen-2-ila e tiofen-3-ila.

[0408]Quando R^{12} é um grupo arila C_{5-10} , ele pode ser um arila C_{8-10} , por exemplo um grupo quinolinila ou isoquinolinila. O grupo quinolinila ou isoquinolinila pode ser ligado ao núcleo de PBD através de qualquer posição no anel disponível. Por exemplo, o quinolinila pode ser quinolin-2-ila, quinolin-3-ila, quinolin-4-ila, quinolin-5-ila, quinolin-6-ila, quinolin-7-ila e quinolin-8-ila. Destes, quinolin-3-ila e quinolin-6-ila podem ser preferidos. O isoquinolinila pode ser isoquinolin-1-ila, isoquinolin-3-ila, isoquinolin-4-ila, isoquinolin-5-ila, isoquinolin-6-ila, isoquinolin-7-ila e isoquinolin-8-ila. Destes, isoquinolin-3-ila e isoquinolin-6-ila podem ser preferidos.

[0409]Quando R^{12} é um grupo arila C_{5-10} , ele pode portar qualquer número de grupos substituintes. Ele preferivelmente porta de 1 a 3 grupos substituintes, com 1 e 2 sendo mais preferidos, e grupos individualmente substituídos sendo os mais preferidos. Os substituintes podem ser de qualquer posição.

[0410]Onde R^{12} é grupo arila C_{5-7} , um único substituinte é preferivelmente em um átomo no anel que não é adjacente à ligação ao restante do composto, isto é ele é preferivelmente β ou γ para a ligação ao restante do composto. Portanto, onde o grupo arila C_{5-7} é fenila, o substituinte está preferivelmente nas posições meta ou para, e mais preferivelmente está na posição para.

[0411]Onde R^{12} é um grupo arila C_{8-10} , por exemplo quinolinila ou isoquinolinila, ele pode portar qualquer número de substituintes em qualquer posição dos anéis de quinolina ou isoquinolina. Em algumas formas de realização, ele porta um, dois ou três substituintes, e estes podem estar nos anéis proximais e distais ou ambos (se mais do que um substituinte).

Substituintes de R^{12} , quando R^{12} for um grupo arila C_{5-10}

[0412]Se um substituinte em R^{12} quando R^{12} for um grupo arila C_{5-10} for halo, ele é preferivelmente F ou Cl, mais preferivelmente Cl.

[0413]Se um substituinte em R^{12} quando R^{12} for um grupo arila C_{5-10} for éter,

ele pode em algumas formas de realização ser um grupo alcóxi, por exemplo, um grupo alcóxi C₁₋₇ (por exemplo, metóxi, etóxi) ou ele pode em algumas formas de realização ser um grupo arilóxi C₅₋₇ (por exemplo, fenóxi piridilóxi, furanilóxi). O grupo alcóxi por si só pode ser substituído ainda, por exemplo por um grupo amina (por exemplo, dimetilamino).

[0414]Se um substituinte em R¹² quando R¹² for um grupo arila C₅₋₁₀ for alquila C₁₋₇, ele pode ser preferivelmente um grupo alquila C₁₋₄ (por exemplo, metila, etila, proprila, butila).

[0415]Se um substituinte em R¹² quando R¹² for um grupo arila C₅₋₁₀ for heterocíclica C₃₋₇, ele pode em algumas formas de realização ser grupo heterocíclico contendo nitrogênio C₆, por exemplo, morfolino, tiomorfolino, piperidinila, piperazinila. Estes grupos podem ser ligados ao restante da porção PBD por intermédio do átomo de nitrogênio. Estes grupos podem ser substituídos ainda, por exemplo, por grupos alquila C₁₋₄. Se o grupo heterocíclico contendo nitrogênio C₆ for piperazinila, o dito substituinte adicional pode estar no segundo átomo de nitrogênio no anel.

[0416]Se um substituinte em R¹² quando R¹² for um grupo arila C₅₋₁₀ for bis-óxi-alquilenos C₁₋₃, este é preferivelmente bis-óxi-metileno ou bis-óxi-etileno.

[0417]Se um substituinte em R¹² quando R¹² for um grupo arila C₅₋₁₀ for éster, este é preferivelmente éster metílico ou éster etílico.

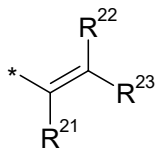
[0418]Substituintes particularmente preferidos quando R¹² for um grupo arila C₅₋₁₀ incluem metóxi, etóxi, fluoro, cloro, ciano, bis-óxi-metileno, metil-piperazinila, morfolino e metil-tiofenila. Outro substituinte particularmente preferido para R¹² são dimetilaminopropilóxi e carbóxi.

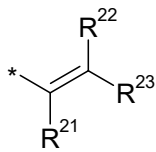
[0419]Grupos R¹² substituídos particularmente preferidos quando R¹² for um grupo arila C₅₋₁₀ incluem, mas não são limitados a, 4-metóxi-fenila, 3-metoxifenila, 4-etóxi-fenila, 3-etóxi-fenila, 4-fluoro-fenila, 4-cloro-fenila, 3,4-bisoximetileno-fenila, 4-metiltiofenila, 4-cianofenila, 4-fenoxifenila, quinolin-3-ila e quinolin-6-ila, isoquinolin-3-

ila e isoquinolin-6-ila, 2-tienila, 2-furanila, metoxinaftila, e naftila. Um outro grupo R^{12} substituído possível é 4-nitrofenila. Grupos R^{12} de interesse particular incluem 4-(4-metilpiperazin-1-il)fenila e 3,4-bisoximetileno-fenila.

[0420]Quando R^{12} for alquila alifático saturado C_{1-5} , ele pode ser metila, etila, propila, butila ou pentila. Em algumas formas de realização, ele pode ser metila, etila ou propila (n-pentila ou isopropila). Em algumas destas formas de realização, ele pode ser metila. Em outras formas de realização, ele pode ser butila ou pentila, que podem ser lineares ou ramificados.

[0421]Quando R^{12} for cicloalquila saturado C_{3-6} , ele pode ser ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila ou cicloexila. Em algumas formas de realização, ele pode ser ciclopropila.



Quando R^{12} for , cada um de R^{21} , R^{22} e R^{23} é independentemente selecionado de H, alquila saturado C_{1-3} , alquenila C_{2-3} , alquinila C_{2-3} e ciclopropila, onde o número total de átomos de carbono no grupo R^{12} não é mais do que 5. Em algumas formas de realização, o número total de átomos de carbono no grupo R^{12} não é mais do que 4 ou não mais do que 3.

[0422]Em algumas formas de realização, um de R^{21} , R^{22} e R^{23} é H, com os outros dois grupos sendo selecionados de H, alquila saturado C_{1-3} , alquenila C_{2-3} , alquinila C_{2-3} e ciclopropila.

[0423]Em outras formas de realização, dois de R^{21} , R^{22} e R^{23} são H, com o outro grupo sendo selecionado de H, alquila saturado C_{1-3} , alquenila C_{2-3} , alquinila C_{2-3} e ciclopropila.

[0424]Em algumas formas de realização, os grupos que não são H são selecionados de metila e etila. Em algumas destas formas de realização, os grupos que não são H são metila.

Em algumas formas de realização, R^{21} é H.

Em algumas formas de realização, R²² é H.

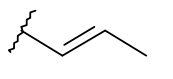
Em algumas formas de realização, R²³ é H.

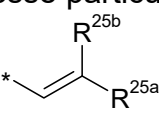
Em algumas formas de realização, R²¹ e R²² são H.

Em algumas formas de realização, R²¹ e R²³ são H.

Em algumas formas de realização, R²² e R²³ são H.

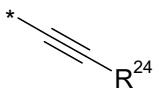
Um grupo R¹² de interesse particular é:



[0425] Quando R¹² for , um de R^{25a} e R^{25b} é H e o outro é selecionado de:

fenila, fenila este que é opcionalmente substituído por um grupo selecionado de halo, metila, metóxi; piridila; e tiofenila. Em algumas formas de realização, o grupo que não é H é fenila opcionalmente substituído. Se o substituinte opcional de fenila for halo, ele é preferivelmente fluoro. Em alguma forma de realização, o grupo fenila não é substituído.

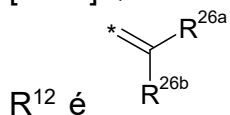
[0426] Quando R¹² for



, R²⁴ é selecionado de: H; alquila saturado C₁₋₃; alquenila C₂₋₃; alquinila C₂₋₃; ciclopropila; fenila, fenila este que é opcionalmente substituído por um grupo selecionado de halo metila, metóxi; piridila; e tiofenila. Se o substituinte opcional de fenila for halo, ele é preferivelmente fluoro. Em alguma forma de realização, o grupo fenila não é substituído.

[0427] Em algumas formas de realização, R²⁴ é selecionado de H, metila, etila, etenila e etinila. Em algumas destas formas de realização, R²⁴ é selecionado de H e metila.

[0428] Quando existe uma ligação única presente entre C_{2'} e C_{3'},



, onde R^{26a} e R^{26b} são independentemente selecionados de H, F, alquila saturado C₁₋₄, alquenila C₂₋₃, grupos alquila e alquenila estes que são opcionalmente substituídos por um grupo selecionado de alquilamido C₁₋₄ e éster alquílico C₁₋₄; ou, quando um de R^{26a} e R^{26b} for H, o outro é selecionado de nitrila e

um éster alquílico C₁₋₄.

[0429]Em algumas formas de realização, é preferido que R^{26a} e R^{26b} sejam ambos H.

[0430]Em outras formas de realização, é preferido que R^{26a} e R^{26b} sejam ambos metila.

[0431]Em outras formas de realização, é preferido que um de R^{26a} e R^{26b} seja H, e o outro seja selecionado de alquila saturado C₁₋₄, alquenila C₂₋₃, grupos alquila e alquenila estes que são opcionalmente substituídos. Nestas outras formas de realização, pode ser preferido ainda que o grupo que não é H seja selecionado de metila e etila.

*R*²

[0432]As preferências acima para R¹² aplicam-se igualmente a R².

*R*²²

[0433]Em algumas formas de realização, R²² é da fórmula Ila.

[0434]A em R²² quando ele é da fórmula Ila pode ser grupo fenila ou um grupo heteroarila C₅₋₇, por exemplo furanila, tiofenila e piridila. Em algumas formas de realização, A é preferivelmente fenila.

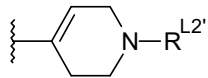
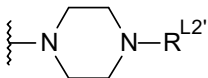
[0435]Q²-X pode estar em qualquer um dos átomos no anel disponíveis do grupo arila C₅₋₇, mas está preferivelmente em um átomo no anel que não é adjacente à ligação ao restante do composto, isto é ele é preferivelmente β ou γ para a ligação ao restante do composto. Portanto, onde o grupo arila C₅₋₇ (a) é fenila, o substituinte (Q²-X) está preferivelmente nas posições meta ou para, e mais preferivelmente está na posição para.

[0436]Em algumas formas de realização, Q¹ é uma ligação única. Nestas formas de realização, Q² é selecionado de uma ligação única e -Z-(CH₂)_n-, onde Z é selecionado de uma ligação única, O, S e NH e é de 1 a 3. Em algumas destas formas de realização, Q² é uma ligação única. Em outras formas de realização, Q² é -Z-

$(\text{CH}_2)_n$. Nestas formas de realização, Z pode ser O ou S e n pode ser 1 ou n pode ser 2. Em outras destas formas de realização, Z pode ser uma ligação única e n pode ser 1.

Em outras formas de realização, Q^1 é $-\text{CH}=\text{CH}-$.

[0437]Em outras formas de realização, R^{22} é da fórmula IIb. Nestes formas de realização, $\text{R}^{\text{C}1}$, $\text{R}^{\text{C}2}$ e $\text{R}^{\text{C}3}$ são independentemente selecionados de H e alquila C_{1-2} não substituído. Em algumas formas de realização preferidas, $\text{R}^{\text{C}1}$, $\text{R}^{\text{C}2}$ e $\text{R}^{\text{C}3}$ são todos H. Em outras formas de realização, $\text{R}^{\text{C}1}$, $\text{R}^{\text{C}2}$ e $\text{R}^{\text{C}3}$ são todos metila. Em certas formas de realização, $\text{R}^{\text{C}1}$, $\text{R}^{\text{C}2}$ e $\text{R}^{\text{C}3}$ são independentemente selecionados de H e metila.

[0438]X é um grupo selecionado da lista compreendendo: $\text{O}-\text{R}^{\text{L}2'}$, $\text{S}-\text{R}^{\text{L}2'}$, $\text{CO}_2-\text{R}^{\text{L}2'}$, $\text{CO}-\text{R}^{\text{L}2'}$, $\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{R}^{\text{L}2'}$, $\text{NHNH}-\text{R}^{\text{L}2'}$, $\text{CONHNH}-\text{R}^{\text{L}2'}$, , , $\text{NR}^{\text{N}}\text{R}^{\text{L}2'}$, em que R^{N} é selecionado do grupo compreendendo H e

alquila C_{1-4} . X pode ser preferivelmente: OH, SH, CO_2H , $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ ou NHR^{N} , e mais preferivelmente pode ser: $\text{O}-\text{R}^{\text{L}2'}$, $\text{S}-\text{R}^{\text{L}2'}$, $\text{CO}_2-\text{R}^{\text{L}2'}$, $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{R}^{\text{L}2'}$ ou $\text{NH}-\text{R}^{\text{L}2'}$. Grupos particularmente preferidos incluem: $\text{O}-\text{R}^{\text{L}2'}$, $\text{S}-\text{R}^{\text{L}2'}$ e $\text{NH}-\text{R}^{\text{L}2'}$, com $\text{NH}-\text{R}^{\text{L}2'}$ sendo o grupo mais preferido.

[0439]Em algumas formas de realização R^{22} é da fórmula IIc. Nestas formas de realização, é preferido que Q seja $\text{NR}^{\text{N}}-\text{R}^{\text{L}2'}$. Em outras formas de realização, Q é $\text{O}-\text{R}^{\text{L}2'}$. Em outras formas de realização, Q é $\text{S}-\text{R}^{\text{L}2'}$. R^{N} é preferivelmente selecionado de H e metila. Em alguma forma de realização, R^{N} é H. Em outras formas de realização, R^{N} é metila.

[0440]Em algumas formas de realização, R^{22} pode ser $-\text{A}-\text{CH}_2-\text{X}$ e $-\text{A}-\text{X}$. Nestas formas de realização, X pode ser $\text{O}-\text{R}^{\text{L}2'}$, $\text{S}-\text{R}^{\text{L}2'}$, $\text{CO}_2-\text{R}^{\text{L}2'}$, $\text{CO}-\text{R}^{\text{L}2'}$ e $\text{NH}-\text{R}^{\text{L}2'}$. Em formas de realização particularmente preferidas, X pode ser $\text{NH}-\text{R}^{\text{L}2'}$.

R^{10} , R^{11}

[0441]Em algumas formas de realização, R^{10} e R^{11} juntos formam uma ligação dupla entre os átomos de nitrogênio e carbono aos quais eles são ligados.

Em algumas formas de realização, R^{11} é OH.

Em algumas formas de realização, R^{11} é OMe.

Em algumas formas de realização, R^{11} é SO_zM , onde z é 2 ou 3 e M é um cátion monovalente farmacologicamente aceitável.

R^{11a}

Em algumas formas de realização, R^{11a} é OH.

Em algumas formas de realização, R^{11a} é OMe.

[0442]Em algumas formas de realização, R^{11a} é SO_zM , onde z é 2 ou 3 e M é um cátion monovalente farmacologicamente aceitável.

R^{20}, R^{21}

[0443]Em algumas formas de realização, R^{20} e R^{21} juntos formam uma ligação dupla entre os átomos de nitrogênio e carbono aos quais eles são ligados.

Em algumas formas de realização R^{20} é H.

Em algumas formas de realização, R^{20} é R^C .

Em algumas formas de realização, R^{21} é OH.

Em algumas formas de realização, R^{21} é OMe.

Em algumas formas de realização, R^{21} é SO_zM , onde z é 2 ou 3 e M é um cátion monovalente farmacologicamente aceitável.

R^{30}, R^{31}

[0444]Em algumas formas de realização, R^{30} e R^{31} juntos formam uma ligação dupla entre os átomos de nitrogênio e carbono aos quais eles são ligados.

Em algumas formas de realização, R^{31} é OH.

Em algumas formas de realização, R^{31} é OMe.

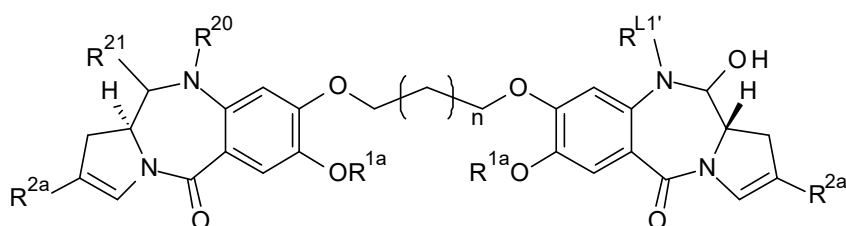
Em algumas formas de realização, R^{31} é SO_zM , onde z é 2 ou 3 e M é um cátion monovalente farmacologicamente aceitável.

M e z

[0445]É preferido que M seja um cátion monovalente farmacologicamente aceitável, e é mais preferivelmente Na⁺.

z é preferivelmente 3.

[0446]Conjugados preferidos do primeiro aspecto da presente invenção podem ter um D^L da fórmula Ia:



Ia

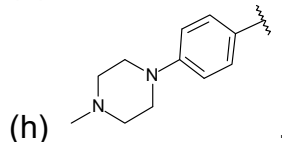
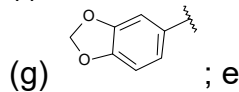
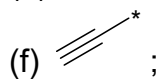
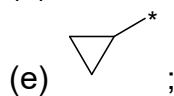
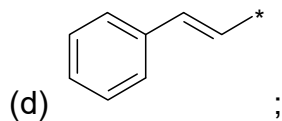
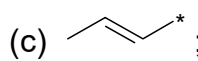
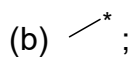
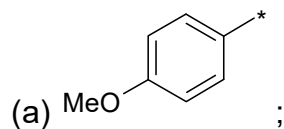
onde

R^{L1'}, R²⁰ e R²¹ são como definidos acima;

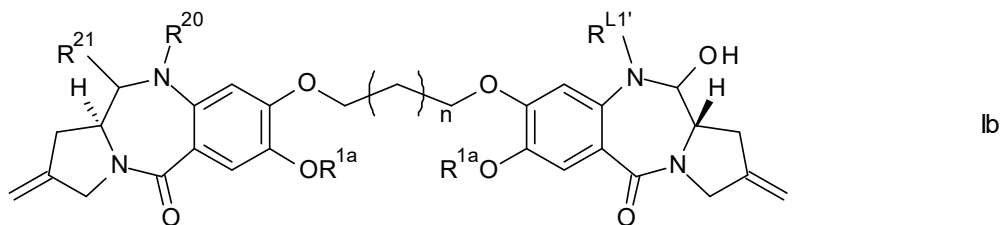
n é 1 ou 3;

R^{1a} é metila ou fenila; e

R^{2a} é selecionado de:



[0447] Conjugados preferidos do primeiro aspecto da presente invenção podem ter um D^L da fórmula Ib:



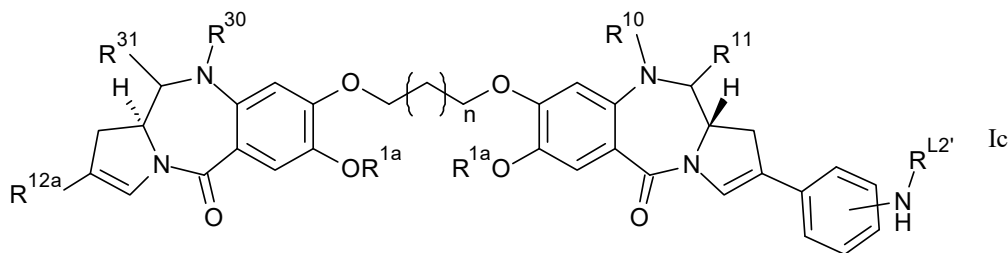
onde

R^{L1'}, R²⁰ e R²¹ são como definidos acima;

n é 1 ou 3; e

R^{1a} é metila ou fenila.

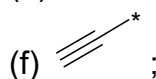
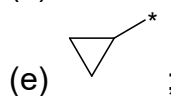
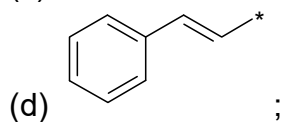
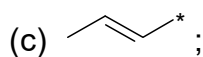
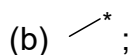
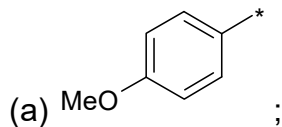
[0448] Conjugados preferidos do primeiro aspecto da presente invenção podem ter um D^L da fórmula Ic:

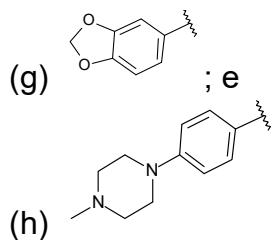


onde R^{L2'}, R¹⁰, R¹¹, R³⁰ e R³¹ são como definidos acima

n é 1 ou 3;

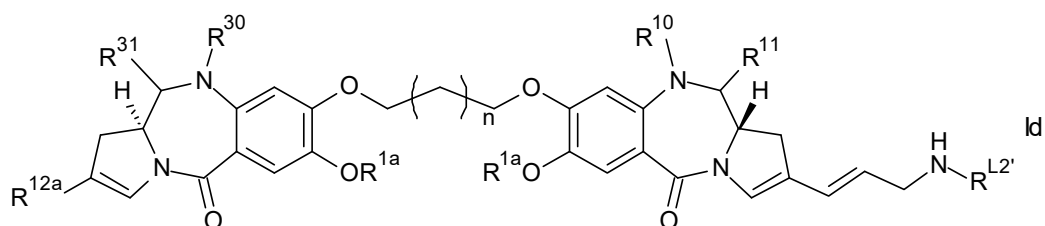
R^{12a} é selecionado de:





o grupo amino está nas posições meta ou para do grupo fenila.

[0449] Conjugados preferidos do primeiro aspecto da presente invenção podem ter um D^L da fórmula Id:

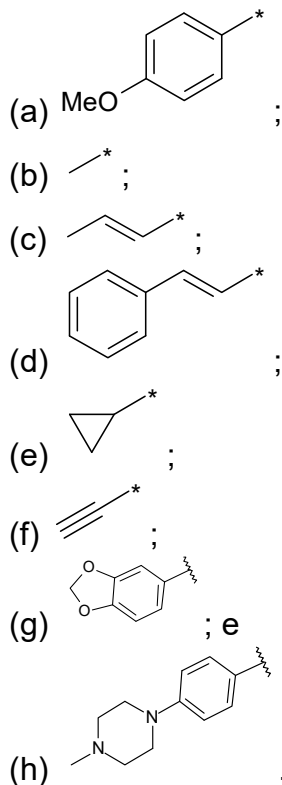


onde R^{L2'}, R¹⁰, R¹¹, R³⁰ e R³¹ são como definidos acima

n é 1 ou 3;

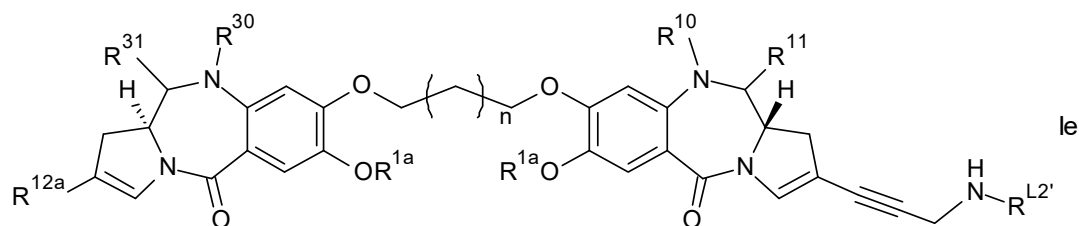
R^{1a} é metila ou fenila;

R^{12a} é selecionado de:



[0450] Conjugados preferidos do primeiro aspecto da presente invenção po-

dem ter um D^L da fórmula Ie:

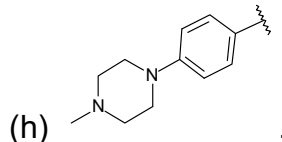
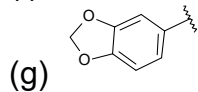
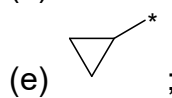
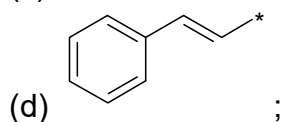
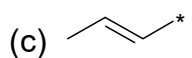
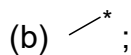
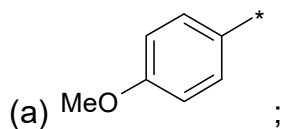


onde R^{L2'}, R¹⁰, R¹¹, R³⁰ e R³¹ são como definidos acima

n é 1 ou 3;

R^{1a} é metila ou fenila;

R^{12a} é selecionado de:



Exemplos

Métodos Experimentais Gerais

[0451]As rotações ópticas foram medidas em um polarímetro ADP 220 (Bellingham Stanley Ltd.) e concentrações (c) são dadas em g/100 mL. Os pontos de fusão foram medidos usando um aparelho de ponto de fusão digital (Electrothermal). Os espectros de IR foram registrados em um Espectrômetro Perkin-Elmer Spectrum

1000 FT IR. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram adquiridos a 300 K usando um espectrômetro de RMN Avance Bruker a 400 e 100 MHz, respectivamente. Os desvios químicos são relatados em relação a TMS ($\delta = 0,0$ ppm), e os sinais são designados como s (singlete), d (dubleto), t (tripleto), dt (duplo tripleto), dd (dubleto de dubletos), ddd (duplo dubleto de dubletos) ou m (multiplete), com acoplamento constante dado em Hertz (Hz). Os dados de espectroscopia de massas (MS) foram coletados usando um instrumento ZQ Micromass Waters acoplado a um HPLC 2695 Waters com um PDA 2996 Waters. Os parâmetros de ZQ Micromass Waters usados foram: Capilar (kV), 3,38; Cone (V), 35; Extrator (V), 3,0; Temperatura fonte ($^{\circ}\text{C}$), 100; Temperatura de Dessolvatação ($^{\circ}\text{C}$), 200; Taxa de fluxo cone (L/h), 50; Taxa de fluxo de dessolvatação (L/h), 250. Dados de espectroscopia de massas de alta resolução (HRMS) foram registrados em um Waters Micromass QTOF Global em modo W positivo usando pontas de vidro de borossilicato revestidas com metal para introduzir as amostras no instrumento. Cromatografia de Camada Fina (TLC) foi realizada em placas de alumínio em gel de sílica (Merck 60, F₂₅₄), e cromatografia flash utilizou gel de sílica (Merck 60, malha 230 - 400 ASTM). Exceto para HOBt (NovaBiochem) e reagentes suportados em sólidos (Argonaut), todos os outros produtos químicos e solventes foram adquiridos a partir da Sigma-Aldrich e foram usados como fornecidos sem purificação adicional. Os solventes de anidro foram preparados por destilação sob uma atmosfera de nitrogênio seca na presença de um agente de secagem apropriado, e foram armazenados sobre peneiras moleculares 4Å ou fios de sódio. Éter de petróleo refere-se à fração em ebulição entre 40 a 60 $^{\circ}\text{C}$.

Condições de LC/MS gerais:

Método 1 (método padrão, usado a menos que de outro modo estabelecido)

[0452]A HPLC (Waters Alliance 2695) foi conduzida usando uma fase móvel de água (A) (ácido fórmico 0,1 %) e acetonitrila (B) (ácido fórmico 0,1 %). Gradiente: composição inicial 5 % de B mantida ao longo de 1,0 min, em seguida, aumento de 5

% de B a 95 % de B ao longo de um período de 3 min. A composição foi mantida por 0,1 min a 95 % de B, em seguida, voltou a 5 % de B em 0,03 min e permaneceu por 0,87 min. Tempo de gradiente de total conduzido igual a 5 minutos.

Método 2

[0453]A HPLC (Waters Alliance 2695) foi conduzida usando uma fase móvel de água (A) (ácido fórmico 0,1 %) e acetonitrila (B) (ácido fórmico 0,1 %). Gradiente: composição inicial 5 % de B mantida ao longo de 1,0 minuto, em seguida, aumento de 5 % de B a 95 % de B ao longo de um período de 2,5 minutos. A composição foi mantida por 0,5 minutos a 95 % de B, em seguida, voltou a 5 % de B em 0,1 min e permaneceu por 0,9 min. Tempo de gradiente de total conduzido igual a 5 minutos.

Para ambos os métodos

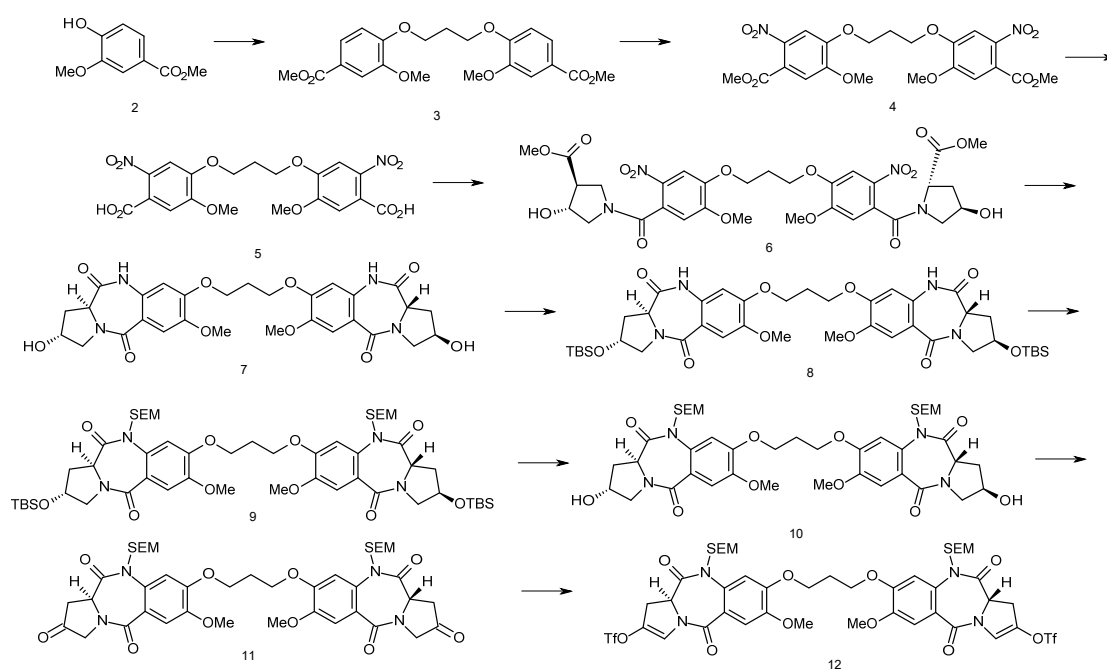
[0454]Taxa de fluxo 3,0 mL/min, 400 µL foram divididos *via* uma peça em T de volume morto nulo que passa no espectrômetro de massas. Faixa de detecção de comprimento de onda: 220 a 400 nm. Tipo de função: arranjo de diodos (535 varreduras). Coluna: Phenomenex Onyx Monolithic C18 50 x 4,60 mm.

[0455]As condições de purificação instantânea de fase reversa foram como segue: O sistema de purificação instantânea (Varian 971-Fp) foi conduzido usando uma fase móvel de água (A) e acetonitrila (B). Gradiente: composição inicial 5 % de B ao longo de 20 C.V. (Volume de Coluna), em seguida, 5 % de B a 70 % de B dentro de 60 C.V. A composição foi mantida por 15 C.V. a 95 % de B, em seguida, voltou a 5 % de B em 5 C.V. e mantida a 5 % de B por 10 C.V. Tempo de gradiente total conduzido igual a 120 C.V. Taxa de fluxo 6,0 mL/min. Faixa de detecção de comprimento de onda: 254 nm. Coluna: Agilent AX1372-1 SF10-5.5gC8.

[0456]HPLC preparativa: Cromatografia líquida de desempenho ultra-alto de fase reversa (UPLC) foi realizada em colunas Phenomenex Gemini NX 5µ C-18 nas dimensões seguintes: 150 x 4,6 mm para análise, e 150 x 21,20 mm para trabalho preparativo. Todos os experimentos de UPLC foram realizados com condições de

gradiente. Os eluentes usados foram solvente A (H₂O com ácido fórmico a 0,1 %) e solvente B (CH₃CN com ácido fórmico a 0,1 %). As taxas de fluxo usadas foram 1,0 ml/min para analítica, e 20,0 ml/min para HPLC preparativa. A detecção foi a 254 e 280 nm.

Síntese de Intermediário 12



(a) 1',3'-Bis[2-metóxi-4-(metoxicarbonil)fenóxi]propano (3)

[0457]Azodicarboxilato de di-isopropila (71,3 mL, 73,2 g, 362 mmol) foi adicionado, às gotas, ao longo de um período de 60 min a uma solução agitada por cima de vanilato de metila 2 (60,0 g, 329 mmol) e Ph₃P (129,4 g, 494 mmol) em THF anidro (800 mL) entre 0 a 5 °C (gelo/acetona) sob uma atmosfera de nitrogênio. A mistura de reação foi deixada agitar entre 0 a 5 °C por mais 1 hora após um tempo em que uma solução de 1,3-propanediol (11,4 mL, 12,0 g, 158 mmol) em THF (12 mL) foi adicionada, às gotas, ao longo de um período de 20 min. A mistura de reação foi deixada aquecer até a temperatura ambiente e agitada por 5 dias. O precipitado branco resultante **3** foi coletado por filtração a vácuo, lavado com THF e seco em um dessecador a vácuo até peso constante. Rendimento = 54,7 g (84 % com base em

1,3-propanediol). Pureza satisfatória por LC/MS (3,20 min (ES+) m/z (intensidade relativa) 427 ($[M + Na]^+$, 10); RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,64 (dd, 2H, $J = 1,8, 8,3$ Hz), 7,54 (d, 2H, $J = 1,8$ Hz), 6,93 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz), 4,30 (t, 4H, $J = 6,1$ Hz), 3,90 (s, 6H), 3,89 (s, 6H), 2,40 (p, 2H, $J = 6,0$ Hz).

(b) *1',3'-Bis[2-metóxi-4-(metoxicarbonil)-5-nitrofenóxi]propano (4)*

[0458] $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ sólido (81,5 g, 337,5 mmol) foi adicionado lentamente a uma pasta fluida agitada por cima do bis-éster 3 (54,7 g, 135 mmol) em anidrido acético (650 mL) entre 0 a 5 °C (gelo/acetona). A mistura de reação foi deixada agitar por 1 hora entre 0 a 5 °C e, em seguida, deixada aquecer até a temperatura ambiente. Uma exotermia suave (ca. 40 a 50 °C), acompanhada por um espessamento da mistura e evolução de NO_2 foi observada neste estágio. Anidrido acético adicional (300 mL) foi adicionado e a mistura de reação foi deixada agitar por 16 horas na temperatura ambiente. A mistura de reação foi vertida sobre gelo (~ 1,5 L), agitada e deixada retornar até a temperatura ambiente. O precipitado amarelo resultante foi coletado por filtração a vácuo e seco em um dessecador para se obter o composto bis-nitro desejado 4 como um sólido amarelo. Rendimento = 66,7 g (100 %). Pureza satisfatória por LC/MS (3,25 min (ES+) m/z (intensidade relativa) 517 ($[M + Na]^+$, 40); RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,49 (s, 2H), 7,06 (s, 2H), 4,32 (t, 4H, $J = 6,0$ Hz), 3,95 (s, 6H), 3,90 (s, 6H), 2,45 - 2,40 (m, 2H).

(c) *1',3'-Bis(4-carbóxi-2-metóxi-5-nitrofenóxi) propano (5)*

[0459]Uma pasta fluida do éster metílico 4 (66,7 g, 135 mmol) em THF (700 mL) foi tratada com NaOH 1N (700 mL) e a mistura de reação foi deixada agitar vigorosamente na temperatura ambiente. Após 4 dias de agitação, a pasta fluida torna-se uma solução de cor escura que foi submetida à evaporação rotativa sob pressão reduzida para remover THF. O resíduo aquoso resultante foi acidificado ao pH 1 com HCl concentrado e o precipitado incolor 5 foi coletado e seco completamente em um forno a vácuo (50 °C). Rendimento = 54,5 g (87 %). Pureza satisfatória por LC/MS

(2,65 min (ES+) m/z (intensidade relativa) 489 ($[M + Na]^+$, 30)); RMN de 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,62 (s, 2H), 7,30 (s, 2H), 4,29 (t, 4H, $J = 6,0$ Hz), 3,85 (s, 6H), 2,30 - 2,26 (m, 2H).

(d) 1,1'-[[*(Propano-1,3-di-il)dióxi*]bis[[*(5-metóxi-2-nitro-1,4-fenileno)carbonil*]]-bis[[*(2S,4R)-metil-4-hidroxipirrolidino-2-carboxilato*]] (6)

[0460] Cloreto de oxalila (24,5 mL, 35,6 g, 281 mmol) foi adicionado a uma suspensão agitada do ácido nitrobenzoico 5 (43 g, 92,3 mmol) e DMF (6 mL) em DCM anidro (600 mL). Após a efervescência inicial, a suspensão de reação torna-se uma solução e a mistura foi deixada agitar na temperatura ambiente por 16 horas. A conversão ao cloreto de ácido foi confirmada tratando uma amostra da mistura de reação com MeOH e o éster bis-metílico resultante foi observado por LC/MS. A maioria de solvente foi removida por evaporação sob pressão reduzida; a solução concentrada resultante foi redissolvida em uma quantidade mínima de DCM seco e triturada com éter dietílico. O precipitado amarelo resultante foi coletado por filtração, lavado com éter dietílico frio e seco por 1 hora em um forno a vácuo a 40 °C. O cloreto de ácido sólido foi adicionado, às porções, ao longo de um período de 25 min a uma suspensão agitada de cloridreto de (2S,4R)-metil-4-hidroxipirrolidino-2-carboxilato (38,1 g, 210 mmol) e TEA (64,5 mL, g, 463 mmol) em DCM (400 mL) a -40 °C (gelo seco/CH₃CN). Imediatamente, a reação foi concluída como julgada por LC/MS (2,47 min (ES+) m/z (intensidade relativa) 721 ($[M + H]^+$, 100). A mistura foi diluída com DCM (200 mL) e lavada com HCl 1N (300 mL), NaHCO₃ saturado (300 mL), salmoura (400 mL), seca (MgSO₄), filtrada e o solvente evaporado a vácuo para se obter o produto 6 puro como um sólido laranja (66,7 g, 100 %). $[\alpha]^{22}_D = -46,1^\circ$ ($c = 0,47$, CHCl₃); RMN de 1H (400 MHz, CDCl₃) (rotâmeros) δ 7,63 (s, 2H), 6,82 (s, 2H), 4,79 - 4,72 (m, 2H), 4,49 - 4,28 (m, 6H), 3,96 (s, 6H), 3,79 (s, 6H), 3,46 - 3,38 (m, 2H), 3,02 (d, 2H, $J = 11,1$ Hz), 2,48 - 2,30 (m, 4H), 2,29 - 2,04 (m, 4H); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl₃) (rotâmeros) δ 172,4, 166,7, 154,6, 148,4, 137,2, 127,0, 109,7,

108,2, 69,7, 65,1, 57,4, 57,0, 56,7, 52,4, 37,8, 29,0; IR (ATR, CHCl₃) 3410 (br), 3010, 2953, 1741, 1622, 1577, 1519, 1455, 1429, 1334, 1274, 1211, 1177, 1072, 1050, 1008, 871 cm⁻¹; MS (ES⁺) *m/z* (intensidade relativa) 721 ([*M* + H]⁺, 47), 388 (80); HRMS [*M* + H]⁺ teórica C₃₁H₃₆N₄O₁₆ *m/z* 721,2199, encontrada (ES⁺) *m/z* 721,2227.

(e) *1,1'-[[[(Propano-1,3-di-il)dióxibis(11a*S*,2*R*)-2-(hidróxi)-7-metóxi-1,2,3,10,11,11a-hexa-hidro-5*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]-benzodiazepin-5,11-diona] (7)*

[0461]Método A: uma solução do nitro-éster 6 (44 g, 61,1 mmol) em MeOH (2,8 L) foi adicionada ao níquel Raney[®] recentemente adquirido (~ 50 g de uma pasta fluida ~ 50 % em H₂O) e grânulos reguladores de ebulição em um frasco de fundo redondo de 3 pescoços de 5L. A mistura foi aquecida a refluxo e, em seguida, tratada, às gotas, com uma solução de hidrato de hidrazina (21,6 mL, 22,2 g, 693 mmol) em MeOH (200 mL) no ponto em que uma efervescência vigorosa foi observada. Quando a adição foi concluída (~ 45 min), níquel Raney[®] adicional foi adicionado cuidadosamente até que a efervescência foi cessada e a cor amarela inicial da mistura de reação foi descarregada. A mistura foi aquecida a refluxo durante mais 5 min no ponto em que a reação foi considerada concluída por TLC (CHCl₃/MeOH 90:10 v/v) e LC/MS (2,12 min (ES⁺) *m/z* (intensidade relativa) 597 ([*M* + H]⁺, 100)). A mistura de reação foi filtrada a quente imediatamente através de um funil sinterizado contendo celite com sucção a vácuo. O filtrado foi reduzido em volume por evaporação a vácuo no ponto em que um precipitado incolor se formou, o qual foi coletado por filtração e seco em um dessecador a vácuo para fornecer 7 (31 g, 85 %). [α]_D²⁷ = +404° (*c* = 0,10, DMF); RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,2 (s, 2H, NH), 7,26 (s, 2H), 6,73 (s, 2H), 5,11 (d, 2H, *J* = 3,98 Hz, OH), 4,32 - 4,27 (m, 2H), 4,19 - 4,07 (m, 6H), 3,78 (s, 6H), 3,62 (dd, 2H, *J* = 12,1, 3,60 Hz), 3,43 (dd, 2H, *J* = 12,0, 4,72 Hz), 2,67 - 2,57 (m, 2H), 2,26 (p, 2H, *J* = 5,90 Hz), 1,99 - 1,89 (m, 2H); RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169,1, 164,0, 149,9, 144,5, 129,8, 117,1, 111,3, 104,5, 54,8, 54,4, 53,1, 33,5, 27,5; IR (ATR, puro) 3438, 1680, 1654, 1610, 1605, 1516, 1490, 1434,

1379, 1263, 1234, 1216, 1177, 1156, 1115, 1089, 1038, 1018, 952, 870 cm^{-1} ; MS (ES^+) m/z (intensidade relativa) 619 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, 10), 597 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 52), 445 (12), 326 (11); HRMS $[\text{M} + \text{H}]^+$ teórica $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_{10}$ m/z 597,2191, encontrada (ES^+) m/z 597,2205.

[0462]Método B: Uma suspensão de Pd a 10 %/C (7,5 g, 10 % p/p) em DMF (40 mL) foi adicionada a uma solução do nitro-éster 6 (75 g, 104 mmol) em DMF (360 mL). A suspensão foi hidrogenada em um aparelho de hidrogenação Parr ao longo de 8 horas. O progresso da reação foi monitorado por LC/MS depois da absorção de hidrogênio ser interrompida. Pd/C sólido foi removido por filtração e o filtrado foi concentrado por evaporação rotativa sob vácuo (abaixo de 10 mbar) a 40 °C para se obter um óleo escuro contendo traços de DMF e carvão residual. O resíduo foi digerido em EtOH (500 mL) a 40 °C em um banho de água (banho de evaporador rotatório) e a suspensão resultante foi filtrada através de celite e lavada com etanol (500 mL) para se obter um filtrado claro. Hidrato de hidrazina (10 mL, 321 mmol) foi adicionado à solução e a mistura de reação foi aquecida a refluxo. Após 20 minutos, a formação de um precipitado branco foi observada e o refluxo foi deixado continuar durante mais 30 minutos. A mistura foi deixada arrefecer até a temperatura ambiente e o precipitado foi recuperado por filtração, lavado com éter dietílico (volume 2:1 de precipitado) e seco em um dessecador a vácuo para fornecer 7 (50 g, 81 %). Dados analíticos para o Método B: Idênticos àqueles obtidos para o Método A (rotação óptica, RMN de ^1H , LC/MS e TLC).

(f) *1,1'-[[[(Propano-1,3-di-il)dióxi]bis(11a*S*,2*R*)-2-(terc-butildimetilsililóxi)-7-metóxi-1,2,3,10,11,11a-hexa-hidro-5*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]-benzodiazepin-5,11-diona]*
(8)

[0463]TBSCI (27,6 g, 182,9 mmol) e imidazol (29,9 g, 438,8 mmol) foram adicionados a uma solução turva da tetralactama 7 (21,8 g, 36,6 mmol) em DMF anidro (400 mL) a 0 °C (gelo/acetona). A mistura foi deixado agitar sob uma atmosfere-

ra de nitrogênio por 3 horas depois do tempo da reação ser considerado completo como julgado por LC/MS (3,90 min (ES+) m/z (intensidade relativa) 825 ($[M + H]^+$, 100). A mistura de reação foi vertida sobre gelo (~ 1,75 L) e deixada aquecer até a temperatura ambiente com agitação. O precipitado branco resultante foi coletado por filtração a vácuo, lavado com H₂O, éter dietílico e seco no dessecador a vácuo para fornecer 8 puro (30,1 g, 99 %). $[\alpha]^{23}_D = +234^\circ$ ($c = 0,41$, CHCl₃); RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,65 (s, 2H, NH), 7,44 (s, 2H), 6,54 (s, 2H), 4,50 (p, 2H, $J = 5,38$ Hz), 4,21 - 4,10 (m, 6H), 3,87 (s, 6H), 3,73 - 3,63 (m, 4H), 2,85 - 2,79 (m, 2H), 2,36 - 2,29 (m, 2H), 2,07 - 1,99 (m, 2H), 0,86 (s, 18H), 0,08 (s, 12H); RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 170,4, 165,7, 151,4, 146,6, 129,7, 118,9, 112,8, 105,3, 69,2, 65,4, 56,3, 55,7, 54,2, 35,2, 28,7, 25,7, 18,0, -4,82 e -4,86; IR (ATR, CHCl₃) 3235, 2955, 2926, 2855, 1698, 1695, 1603, 1518, 1491, 1446, 1380, 1356, 1251, 1220, 1120, 1099, 1033 cm⁻¹; MS (ES⁺) m/z (intensidade relativa) 825 ($[M + H]^+$, 62), 721 (14), 440 (38); HRMS $[M + H]^+$ teórica C₄₁H₆₀N₄O₁₀Si₂ m/z 825,3921, encontrada (ES⁺) m/z 825,3948.

(g) 1,1'-[[[(Propano-1,3-di-il)dióxí]bis(11aS,2R)-2-(terc-butildimetilsililóxi)-7-metóxi-10-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-1,2,3,10,11,11a-hexa-hidro-5H-pirroló[2,1-c][1,4]-benzodiazepin-5,11-diona] (9)

[0464]Uma solução de *n*-BuLi (68,3 mL de uma solução 1,6 M em hexano, 109 mmol) foi adicionada, às gotas, a uma suspensão agitada da tetralactama 8 (30,08 g, 36,4 mmol) em THF anidro (600 mL) a -30 °C (gelo seco/etileno glicol) sob uma atmosfera de nitrogênio. A mistura de reação foi deixada agitar nesta temperatura por 1 hora (agora uma cor laranja avermelhada) no ponto em que uma solução de SEMCI (19,3 mL, 18,2 g, 109 mmol) em THF anidro (120 mL) foi adicionada às gotas. A mistura de reação foi deixada aquecer lentamente até a temperatura ambiente e foi agitada por 16 horas sob uma atmosfera de nitrogênio. A reação foi considerada completa como julgado por TLC (EtOAc) e LC/MS (4,77 min (ES+) m/z (in-

densidade relativa) 1085 ($[M + H]^+$, 100). O THF foi removido por evaporação a vácuo e o resíduo resultante dissolvido em EtOAc (750 mL), lavado com H₂O (250 mL), salmoura (250 mL), seco (MgSO₄), filtrado e evaporado a vácuo para fornecer a tetralactama 9 bruta protegida por N10-SEM como um óleo (max^m 39,5 g, 100 %). Produto carregado através da próxima etapa sem purificação. $[\alpha]^{23}_D = +163^\circ$ ($c = 0,41$, CHCl₃); RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,33 (s, 2H), 7,22 (s, 2H), 5,47 (d, 2H, $J = 9,98$ Hz), 4,68 (d, 2H, $J = 9,99$ Hz), 4,57 (p, 2H, $J = 5,77$ Hz), 4,29 - 4,19 (m, 6H), 3,89 (s, 6H), 3,79 - 3,51 (m, 8H), 2,87 - 2,81 (m, 2H), 2,41 (p, 2H, $J = 5,81$ Hz), 2,03 - 1,90 (m, 2H), 1,02 - 0,81 (m, 22H), 0,09 (s, 12H), 0,01 (s, 18H); RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 170,0, 165,7, 151,2, 147,5, 133,8, 121,8, 111,6, 106,9, 78,1, 69,6, 67,1, 65,5, 56,6, 56,3, 53,7, 35,6, 30,0, 25,8, 18,4, 18,1, -1,24, -4,73; IR (ATR, CHCl₃) 2951, 1685, 1640, 1606, 1517, 1462, 1433, 1360, 1247, 1127, 1065 cm⁻¹; MS (ES⁺) m/z (intensidade relativa) 1113 ($[M + Na]^+$, 48), 1085 ($[M + H]^+$, 100), 1009 (5), 813 (6); HRMS $[M + H]^+$ teórica C₅₃H₈₈N₄O₁₂Si₄ m/z 1085,5548, encontrada (ES⁺) m/z 1085,5542.

(h) *1,1'-[[[(Propano-1,3-di-il)dióxi]bis(11aS,2R)-2-hidróxi-7-metóxi-10-((2-trimetilsilil)etóxi)metil)-1,2,3,10,11,11a-hexa-hidro-5H-pirrolol[2,1-c][1,4]-benzodiazepin-5,11-diona] (10)*

[0465]Uma solução de TBAF (150 mL de uma solução 1,0 M em THF, 150 mmol) foi adicionada a uma solução agitada do éter bis-silílico 9 bruto [84,0 g (max^m 56,8 g), 52,4 mmol] em THF (800 mL) na temperatura ambiente. Depois de agitação por 1 hora, a análise da mistura de reação por TLC (CHCl₃/MeOH 95:5 v/v) revelou a conclusão da reação. O THF foi removido por evaporação sob pressão reduzida na temperatura ambiente e o resíduo resultante dissolvido em EtOAc (500 mL) e lavado com NH₄Cl (300 mL). As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura (60 mL), secas (MgSO₄), filtradas e evaporadas sob pressão reduzida para fornecer o produto bruto. Purificação por cromatografia flash (eluição por gradiente:

CHCl₃ a 100 % para CHCl₃/MeOH 96:4 v/v) forneceu a tetralactama 10 pura como uma espuma branca (36,0 g, 79 %). LC/MS 3,33 min (ES+) *m/z* (intensidade relativa) 879 ([*M* + Na]⁺, 100), 857 ([*M* + H]⁺, 40); [α]²³_D = +202° (*c* = 0,34, CHCl₃); RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,28 (s, 2H), 7,20 (s, 2H), 5,44 (d, 2H, *J* = 10,0 Hz), 4,72 (d, 2H, *J* = 10,0 Hz), 4,61 - 4,58 (m, 2H), 4,25 (t, 4H, *J* = 5,83 Hz), 4,20 - 4,16 (m, 2H), 3,91 - 3,85 (m, 8H), 3,77 - 3,54 (m, 6H), 3,01 (br s, 2H, OH), 2,96 - 2,90 (m, 2H), 2,38 (p, 2H, *J* = 5,77 Hz), 2,11 - 2,05 (m, 2H), 1,00 - 0,91 (m, 4H), 0,00 (s, 18H); RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 169,5, 165,9, 151,3, 147,4, 133,7, 121,5, 111,6, 106,9, 79,4, 69,3, 67,2, 65,2, 56,5, 56,2, 54,1, 35,2, 29,1, 18,4, -1,23; IR (ATR, CHCl₃) 2956, 1684, 1625, 1604, 1518, 1464, 1434, 1361, 1238, 1058, 1021 cm⁻¹; MS (ES⁺) *m/z* (intensidade relativa) 885 ([*M* + 29]⁺, 70), 857 ([*M* + H]⁺, 100), 711 (8), 448 (17); HRMS [*M* + H]⁺ teórica C₄₁H₆₀N₄O₁₂Si₂ *m/z* 857,3819, encontrada (ES⁺) *m/z* 857,3826.

(i) *1,1'-[[[(Propano-1,3-di-il)dióxi]bis(11aS)-7-metóxi-2-oxo-10-((2-(trimetilsilil)-etóxi)metil)-1,2,3,10,11,11a-hexa-hidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]-benzodiazepin-5,11-diona] (11)*

[0466]Diol 10 (25,6 g, 30 mmol, 1 eq.), NaOAc (6,9 g, 84 mmol, 2,8 eq.) e TEMPO (188 mg, 1,2 mmol, 0,04 eq.) foram dissolvidos em DCM (326 mL) sob Ar. Este foi esfriado a -8 °C (temperatura interna) e TCCA (9,7 g, 42 mmol, 1,4 eq.) foi adicionado, às porções, ao longo de 15 minutos. TLC (EtOAc) e LC/MS [3,60 min. (ES+) *m/z* (intensidade relativa) 854,21 ([*M* + H]⁺, 40), (ES-) *m/z* (intensidade relativa) 887,07 ([*M* - H + Cl]⁻, 10)] depois de 30 minutos indicou que a reação foi concluída. DCM frio (200 mL) foi adicionado e a mistura foi filtrada através de uma almofada de Celite antes de lavar com uma solução de hidrogenocarbonato de sódio saturado/tiosulfato de sódio (1:1 v/v; 200 mL x 2). A camada orgânica foi seca com MgSO₄, filtrada e o solvente removido a vácuo para se obter uma esponja amarela/laranja (25,4 g, 99 %). LC/MS [3,60 min. (ES+) *m/z* (intensidade relativa) 854,21

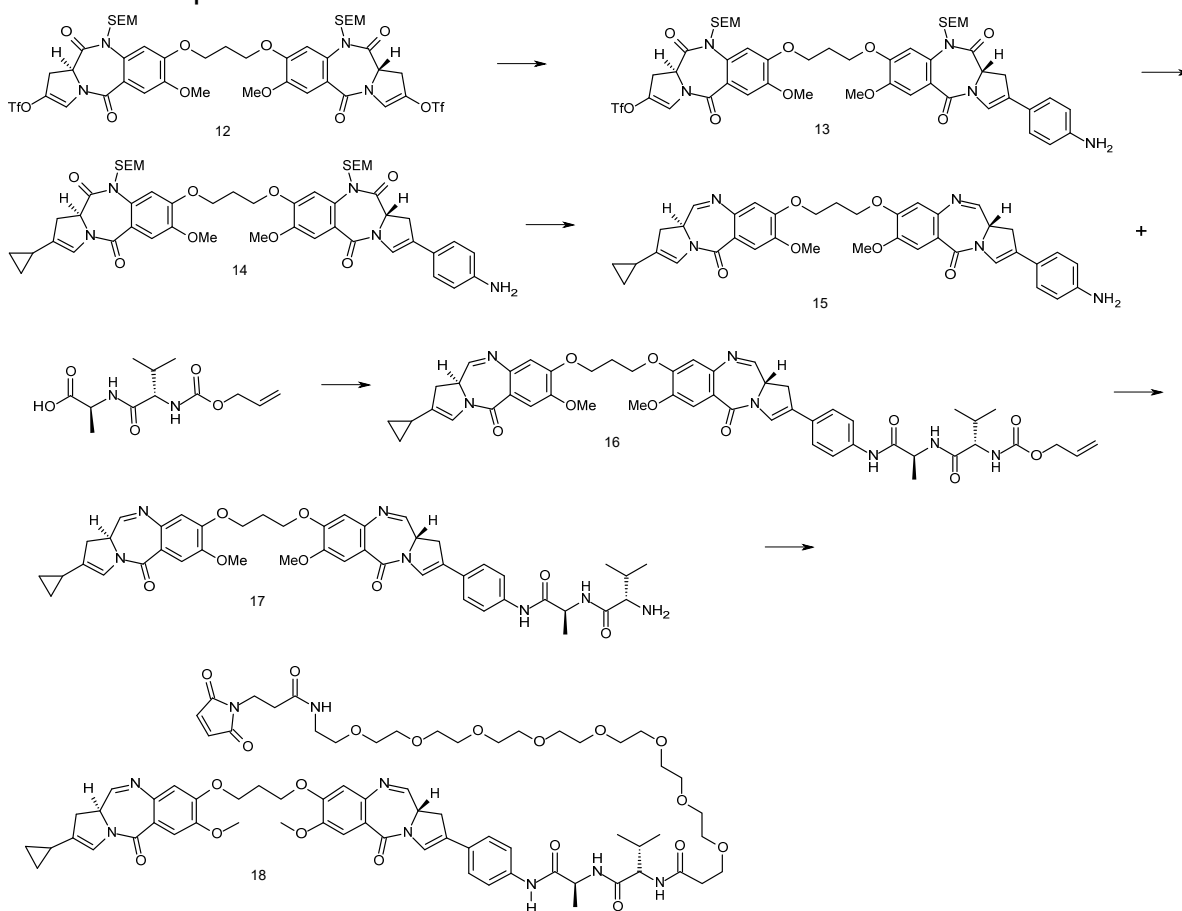
($[M + H]^+$, 40); $[\alpha]^{20}_D = +291^\circ$ ($c = 0,26$, CHCl_3); RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,32 (s, 2H), 7,25 (s, 2H), 5,50 (d, 2H, $J = 10,1$ Hz), 4,75 (d, 2H, $J = 10,1$ Hz), 4,60 (dd, 2H, $J = 9,85, 3,07$ Hz), 4,31 - 4,18 (m, 6H), 3,89 - 3,84 (m, 8H), 3,78 - 3,62 (m, 4H), 3,55 (dd, 2H, $J = 19,2, 2,85$ Hz), 2,76 (dd, 2H, $J = 19,2, 9,90$ Hz), 2,42 (p, 2H, $J = 5,77$ Hz), 0,98 - 0,91 (m, 4H), 0,00 (s, 18H); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 206,8, 168,8, 165,9, 151,8, 148,0, 133,9, 120,9, 111,6, 107,2, 78,2, 67,3, 65,6, 56,3, 54,9, 52,4, 37,4, 29,0, 18,4, -1,24; IR (ATR, CHCl_3) 2957, 1763, 1685, 1644, 1606, 1516, 1457, 1434, 1360, 1247, 1209, 1098, 1066, 1023 cm^{-1} ; MS (ES^+) m/z (intensidade relativa) 881 ($[M + 29]^+$, 38), 853 ($[M + H]^+$, 100), 707 (8), 542 (12); HRMS $[M + H]^+$ teórica $\text{C}_{41}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{Si}_2$ m/z 853,3506, encontrada (ES^+) m/z 853,3502.

(j) 1,1'-[[*(Propano-1,3-di-il)dióxi*]]bis(11a*S*)-7-metóxi-2-[[*(trifluorometil)sulfonil*]-óxi]-10-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-1,10,11,11a-tetra-hidro-5H-pirroló[2,1-*c*][1,4]-benzodiazepin-5,11-diona] (12)

[0467]2,6-Lutidina anidra (5,15 mL, 4,74 g, 44,2 mmol) foi injetada em uma porção para uma solução vigorosamente agitada de bis-cetona 11 (6,08 g, 7,1 mmol) em DCM seco (180 mL) a -45°C (gelo seco/acetoneitrila) sob uma atmosfera de nitrogênio. Anidrido tríflico anidro, tomado a partir de uma ampola aberta recentemente (7,2 mL, 12,08 g, 42,8 mmol), foi injetado rapidamente às gotas, enquanto mantendo a temperatura a -40°C ou abaixo. A mistura de reação foi deixada agitar a -45°C por 1 hora no ponto em que TLC (*n*-hexano/EtOAc 50/50 v/v) revelou o consumo completo do material de partida. A mistura de reação fria foi imediatamente diluída com DCM (200 mL) e, com agitação vigorosa, lavada com água (1 x 100 mL), solução de ácido cítrico a 5 % (1 x 200 mL), NaHCO_3 saturado (200 mL), salmoura (100 mL) e seca (MgSO_4). A filtração e evaporação do solvente sob pressão reduzida proporcionou o produto bruto que foi purificado por cromatografia em coluna flash (eluição por gradiente: *n*-hexano/EtOAc 90:10 v/v para *n*-hexano/EtOAc 70:30 v/v) para se obter triflato de bis-enol 12 como uma espuma amarela (5,5 g, 70 %). LC/MS

4,32 min (ES⁺) *m/z* (intensidade relativa) 1139 ([*M* + Na]⁺, 20); [α]_D²⁴ = +271° (*c* = 0,18, CHCl₃); RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,33 (s, 2H), 7,26 (s, 2H), 7,14 (t, 2H, *J* = 1,97 Hz), 5,51 (d, 2H, *J* = 10,1 Hz), 4,76 (d, 2H, *J* = 10,1 Hz), 4,62 (dd, 2H, *J* = 11,0, 3,69 Hz), 4,32 - 4,23 (m, 4H), 3,94 - 3,90 (m, 8H), 3,81 - 3,64 (m, 4H), 3,16 (ddd, 2H, *J* = 16,3, 11,0, 2,36 Hz), 2,43 (p, 2H, *J* = 5,85 Hz), 1,23 - 0,92 (m, 4H), 0,02 (s, 18H); RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 167,1, 162,7, 151,9, 148,0, 138,4, 133,6, 120,2, 118,8, 111,9, 107,4, 78,6, 67,5, 65,6, 56,7, 56,3, 30,8, 29,0, 18,4, -1,25; IR (ATR, CHCl₃) 2958, 1690, 1646, 1605, 1517, 1456, 1428, 1360, 1327, 1207, 1136, 1096, 1060, 1022, 938, 913 cm⁻¹; MS (ES⁺) *m/z* (intensidade relativa) 1144 ([*M* + 28]⁺, 100), 1117 ([*M* + H]⁺, 48), 1041 (40), 578 (8); HRMS [*M* + H]⁺ teórica C₄₃H₅₄N₄O₁₆Si₂S₂F₆ *m/z* 1117,2491, encontrada (ES⁺) *m/z* 1117,2465.

Exemplo 1



(a) Trifluorometanossulfonato de (S)-8-(3-(((S)-2-(4-aminofenil)-7-metóxi-

5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-5,10,11,11a-tetra-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)óxi)propóxi)-7-metóxi-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-5,10,11,11a-tetra-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-ila (13)

[0468]Pd(PPh₃)₄ (116,9 mg, 0,101 mmol) foi adicionado a uma mistura agitada do triflato de bis-enol 12 (5,65 g, 5,06 mmol), éster pinacólico de ácido 4-aminofenilborônico (1 g, 4,56 mmol), Na₂CO₃ (2,46 g, 23,2 mmol), MeOH (37 mL), tolueno (74 mL) e água (37 mL). A mistura de reação foi deixada agitar a 30 °C sob uma atmosfera de nitrogênio por 24 horas após o tempo em que todo o éster borônico foi consumido. A mistura de reação depois foi evaporada à securo antes do resíduo ser retomado em EtOAc (150 mL) e lavado com H₂O (2 x 100 mL), salmoura (150 mL), seco (MgSO₄), filtrado e evaporado sob pressão reduzida para fornecer o produto bruto. Purificação por cromatografia flash (eluição por gradiente: Hexano/EtOAc 80:20 v/v para Hexano/EtOAc 60:40 v/v) proporcionou o produto 13 como uma espuma amarelada (2,4 g, 45 %). LC/MS 4,02 min (ES+) *m/z* (intensidade relativa) 1060,21 ([*M* + H]⁺, 100); RMN de ¹H: (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,40 (s, 1H), 7,33 (s, 1H), 7,27 (bs, 3H), 7,24 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz), 7,15 (t, 1H, *J* = 2,0 Hz), 6,66 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz), 5,52 (d, 2H, *J* = 10,0 Hz), 4,77 (d, 1H, *J* = 10,0 Hz), 4,76 (d, 1H, *J* = 10,0 Hz), 4,62 (dd, 1H, *J* = 3,7, 11,0 Hz), 4,58 (dd, 1H, *J* = 3,4, 10,6 Hz), 4,29 (t, 4H, *J* = 5,6 Hz), 4,00 - 3,85 (m, 8H), 3,80 - 3,60 (m, 4H), 3,16 (ddd, 1H, *J* = 2,4, 11,0, 16,3 Hz), 3,11 (ddd, 1H, *J* = 2,2, 10,5, 16,1 Hz), 2,43 (p, 2H, *J* = 5,9 Hz), 1,1 - 0,9 (m, 4H), 0,2 (s, 18H). RMN de ¹³C: (CDCl₃, 100 MHz) δ 169,8, 168,3, 164,0, 162,7, 153,3, 152,6, 149,28, 149,0, 147,6, 139,6, 134,8, 134,5, 127,9, 127,5, 125,1, 123,21, 121,5, 120,5, 120,1, 116,4, 113,2, 108,7, 79,8, 79,6, 68,7, 68,5, 67,0, 66,8, 58,8, 58,0, 57,6, 32,8, 32,0, 30,3, 19,7, 0,25.

(b) *(S)-2-(4-Aminofenil)-8-(3-(((S)-2-ciclopropil-7-metóxi-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-5,10,11,11a-tetra-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-*

8-il)óxi)propóxi)-7-metóxi-10-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepino-5,11(10H,11aH)-diona (14)

[0469]Trifenilarsina (0,24 g, 0,8 mmol), óxido de prata (I) (1,02 g, 4,4 mmol), ácido ciclopropilborônico (0,47 g, 5,5 mmol) e material de partida 13 (1,15 g, 1,1 mmol) foram dissolvidos em dioxano (30 mL) sob uma atmosfera de argônio. Fosfato de potássio tribásico (2,8 g, 13,2 mmol) foi moído com um pilão e almofariz e adicionado rapidamente à mistura de reação. A mistura de reação foi despejada e fluxada com argônio 3 vezes e aquecida a 71 °C. *Bis* (cloreto de benzonitrila) de paládio (II) (84 mg, 0,22 mmol) foi adicionado e o vaso de reação foi esvaziado e fluxado com argônio 3 vezes. Após 10 minutos, uma pequena amostra foi tomada para análise por TLC (acetato de etila/hexano 80:20 v/v) e LC/MS. Após 30 minutos, a reação se completou (análise de LC/MS indicou o consumo completo do material de partida) e a reação foi filtrada através de celite e a almofada do filtro lavada com acetato de etila (400 mL). O filtrado foi lavado com água (2 x 200 mL) e salmoura (2 x 200 mL). A camada orgânica foi seca com MgSO₄, filtrada e o solvente removido a vácuo. Purificação por cromatografia em coluna de gel de sílica (Hexano/Acetato de etila 30:70 v/v) proporcionou o produto 14 como um sólido laranja/amarelo (0,66 g, 63 %). Método 1, LC/MS (3,85 min (ES⁺) *m/z* (intensidade relativa) 952,17 ([M + H]⁺, 100). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,36 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz), 7,30 (s, 1H), 7,25 - 7,19 (m, 4H), 6,68 (s, 1H), 6,62 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz), 5,49 (dd, 2H, *J* = 5,6, 10,0 Hz), 4,73 (app. t, 2H, *J* = 10,8 Hz), 4,54 (dd, 1H, *J* = 3,2, 10,4 Hz), 4,40 (dd, 1H, *J* = 3,2, 10,4 Hz), 4,29 - 4,23 (m, 4H), 3,91 - 3,85 (m, 7H), 3,80 - 3,71 (m, 2H), 3,70 - 3,61 (m, 2H), 3,38 - 3,32 (m, 1H), 3,12 - 3,01 (m, 1H), 2,50 - 2,69 (m, 1H), 2,40 (q, 2H, *J* = 5,6 Hz), 1,50 - 1,43 (m, 1H), 0,99 - 0,71 (m, 6H), 0,54 - 0,59 (m, 2H), 0,00 (s, 18H) ppm.

(c) (S)-2-(4-Aminofenil)-8-(3-(((S)-2-ciclopropil-7-metóxi-5-oxo-5,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)óxi)propóxi)-7-metóxi-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-5(11aH)-ona (15)

[0470]SEM dilactama 14 (0,66 g, 0,69 mmol) foi dissolvida em THF (23 mL) e esfriado a -78 °C sob uma atmosfera de argônio. Solução de Super-Hidreto® (1,7 mL, 1 M em THF) foi adicionada, às gotas, ao longo de 5 minutos enquanto monitorando a temperatura. Após 20 minutos, uma pequena amostra foi tomada e lavada com água para análise de LC/MS. Água (50 mL) foi adicionada e o banho frio foi removido. A camada orgânica foi extraída e lavada com salmoura (60 mL). As camadas aquosas combinadas foram lavadas com CH₂Cl₂/MeOH (90/10 v/v) (2 x 50 mL). As camadas orgânicas combinadas foram secas com MgSO₄, filtradas e o solvente removido a vácuo. O produto bruto foi dissolvido em MeOH (48 mL), CH₂Cl₂ (18 mL) e água (6 mL) e gel de sílica suficiente foi adicionado para se obter uma suspensão espessa. Após 5 dias de agitação, a suspensão foi filtrada através de um funil sintetizado e lavada com CH₂Cl₂/MeOH (9:1) (~ 200 mL) até o produto cessado ser eluído. A camada orgânica foi lavada com salmoura (2 x 70 mL), seca com MgSO₄, filtrada e o solvente removido a vácuo. Purificação por cromatografia em coluna de gel de sílica (CHCl₃ a 100 % para CHCl₃/MeOH 96/4 v/v) proporcionou o produto 15 como um sólido amarelo (302 mg, 66 %). Método 1, LC/MS (2,42 min (ES⁺) *m/z* (intensidade relativa) 660,74 ([M + H]⁺, 30). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,86 (d, 1H, *J* = 3,6 Hz), 7,78 (d, 1H, *J* = 3,6 Hz), 7,58 - 7,44 (m, 3H), 7,34 - 7,20 (m, 3H), 6,88 - 6,66 (m, 4H), 4,35 - 4,15 (m, 6H), 3,95 - 3,75 (m, 7H), 3,39 - 3,22 (m, 1H), 3,14 - 3,04 (m, 1H), 2,93 - 2,85 (m, 1H), 2,46 - 2,36 (m, 2H), 1,49 - 1,41 (m, 1H), 0,80 - 0,72 (m, 2H), 0,58 - 0,51 (app. s, 2H) ppm.

(d) ((2S)-1-(((2S)-1-((4-(8-(3-((2-Ciclopropil-7-metóxi-5-oxo-5,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)óxi)propóxi)-7-metóxi-5-oxo-5,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de alila (16)

[0471]Em um frasco de fundo redondo desgaseificado enchido com argônio, HO-Ala-Val-alloc (149,6 mg, 0,549 mmol) e EEDQ (135,8 mg, 0,549 mmol) foram

dissolvidos em uma mistura 9:1 de CH₂Cl₂/MeOH seco (5 mL). O frasco foi envolto em papel-alumínio e a mistura de reação foi deixada agitar na temperatura ambiente por 1 hora antes do material de partida 15 (302 mg, 0,457 mmol) ser adicionado. A mistura de reação foi deixada agitar durante mais 40 horas na temperatura ambiente antes dos voláteis serem removidos por evaporação rotativa sob pressão reduzida (a reação foi seguida por LC/MS, RT do material de partida 2,32 min, (ES⁺ 660,29 ([M + H]⁺, 100)). O produto bruto foi diretamente purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica (CHCl₃ a 100 % a CHCl₃/MeOH 90/10 v/v) para se obter o produto (16) puro em 42 % de rendimento (174 mg). Método 2 LC/MS (2,70 min (ES⁺) *m/z* (intensidade relativa) 914,73 ([M + H]⁺, 60), 660,43 (60), 184,31 (100)).

(e) *(2S)-2-amino-N-((2S)-1-((4-(8-(3-((2-ciclopropil-7-metóxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)óxi)propóxi)-7-metóxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)-3-metilbutanamida (17)*

[0472]O material de partida 16 (170 mg, 0,185 mmol) foi dissolvido em CH₂Cl₂ seco (5 mL) em um frasco de fundo redondo enchido com argônio, antes de pirrolidina (41 µL, 0,21 mmol) ser adicionada. O frasco foi purgado/enchido novamente três vezes com argônio antes de Pd(PPh₃)₄ (14 mg, 0,084 mmol) ser adicionado e a operação de descarga repetida. Após 1 hora, o consumo completo do material de partida foi observado (a reação foi seguida por LC/MS) e Et₂O (50 mL) foi adicionado à mistura de reação que foi deixada agitar até todo o produto sair da solução. O sólido foi filtrado através de um funil sinterizado e lavado duas vezes com Et₂O (2 x 25 mL). O frasco de coleta foi substituído e o sólido isolado foi dissolvido em CHCl₃ (100 mL ou até todo o produto passar através do funil sinterizado). Os voláteis foram então removidos por evaporação rotativa sob pressão reduzida para se obter o produto 17 bruto que foi usado diretamente na próxima etapa (168 mg). LC/MS Método 2 (2,70 min (ES⁺) *m/z* (intensidade relativa) 830,27 ([M + H]⁺, 50),

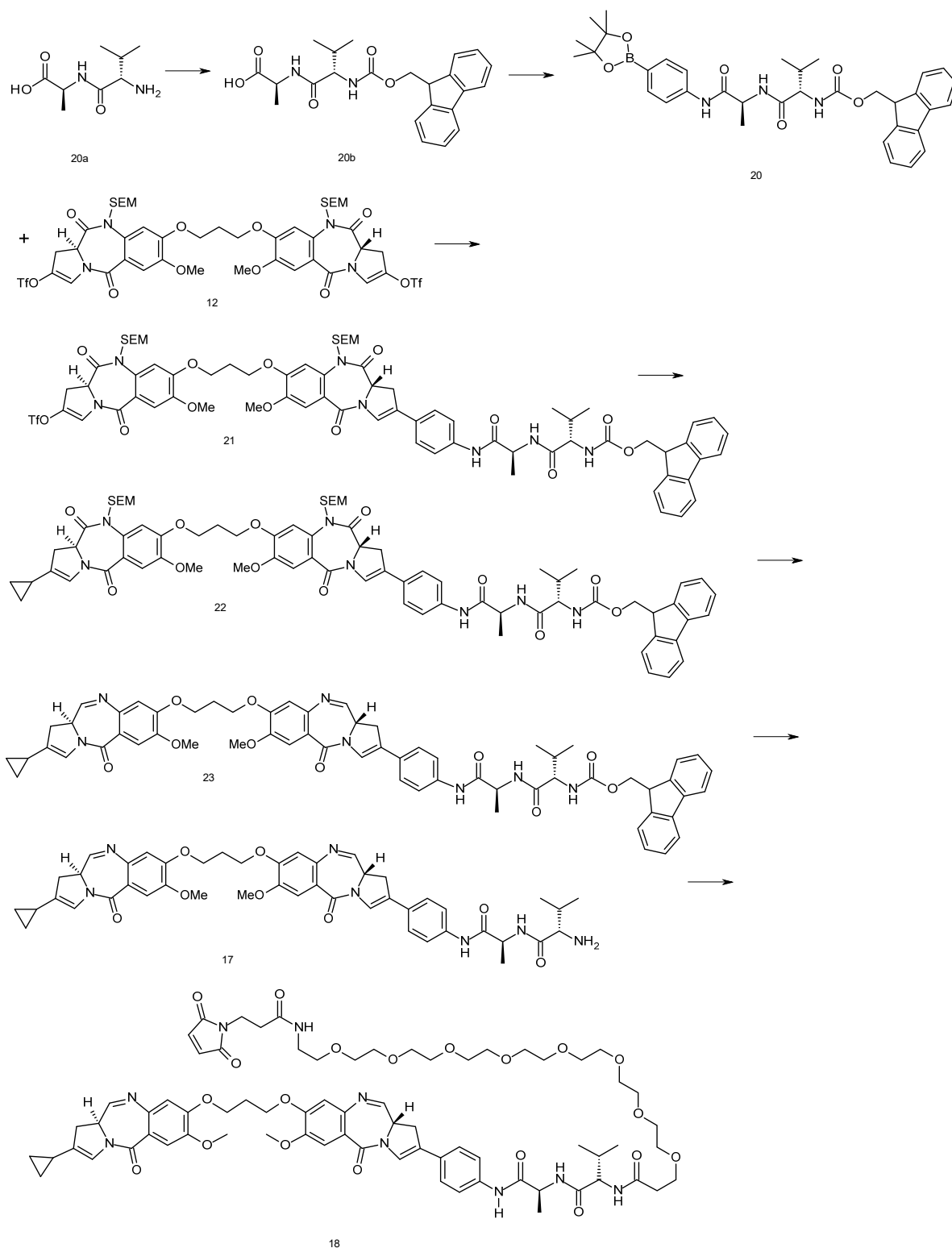
660,13 (80), 171,15 (100)).

(f) *N-((R)-1-(((S)-1-((4-((S)-8-(3-(((S)-2-ciclopropil-7-metóxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)óxi)propóxi)-7-metóxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-1-(3-(2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxa-heptacosan-27-amida (18)*

[0473]Material de partida 17 (154 mg, 0,185 mmol) e EDCI.HCl (110 mg, 0,185 mmol) foram solubilizados em CH₂Cl₂ seco (5 mL) em um frasco de fundo redondo purgado e enchido com argônio. A mistura foi deixada agitar na temperatura ambiente por 1 hora antes de PEG₈-maleimida (35,6 mg, 0,185 mmol) ser adicionado e a mistura de reação agitada durante mais 16 horas (ou até a reação ser concluída, monitorada por LC/MS). A solução de reação foi diluída com CH₂Cl₂ (50 mL) e os orgânicos foram lavados com H₂O (50 mL) e salmoura (50 mL) antes de serem secos com MgSO₄, filtrados e o solvente removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida para se obter o produto bruto. Purificação em cromatografia em coluna de gel de sílica (CHCl₃ a 100 % para CHCl₃/MeOH 85/15 v/v) forneceu o produto desejado (135 mg), entretanto, os traços remanescentes de PEG₈-maleimida não reagida foram observados (por LC/MS, 2,21 min, Método 2). A cromatografia de gel de sílica de fase reversa automatizada (H₂O/CH₃CN) (veja a informação geral para as condições) removeu com êxito a impureza proporcionando o produto final puro (18,37 mg de produto puro partindo de 110 mg, 33 %). Rendimento global = 17 %. Método 2 LC/MS (2,58 min (ES+) *m/z* (intensidade relativa) 1404,03 ([M + H]⁺, 20), 702,63 (100)). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,91 (t, *J* = 3,5 Hz, 1H), 7,80 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H), 7,75 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 7,69 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 7,54 - 7,50 (m, 2H), 7,45 (s, 1H), 7,39 - 7,31 (m, 2H), 6,87 (d, *J* = 10,5 Hz, 2H), 6,76 (s, 1H), 6,72 - 6,68 (m, 2H), 4,74 - 4,62 (m, 1H), 4,45 - 4,17 (m, 7H), 3,95 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 3,67 - 3,58 (m, 34H), 3,54 (m, 2H), 3,42 (dd, *J* = 10,2, 5,2 Hz, 2H), 3,16 - 3,07 (m, 1H), 2,92

(dd, $J = 16,1, 4,1$ Hz, 1H), 2,62 - 2,49 (m, 4H), 2,48 - 2,39 (m, 2H), 2,37 - 2,25 (m, 1H), 1,92 (s, 1H), 1,52 - 1,44 (m, 3H), 1,10 - 0,93 (m, 6H), 0,79 (dd, $J = 9,2, 5,3$ Hz, 2H), 0,57 (dd, $J = 9,2, 5,3$ Hz, 2H), NH não foram observados.

Exemplo 2



(a) ácido *(R)*-2-(((*R*)-2-(((9*H*-fluoren-9-yl)metóxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanóico (**20b**)

[0474]HO-Ala-Val-H **20a** (350 mg, 1,86 mmol) e Na₂CO₃ (493 mg, 4,65

mmol) foram dissolvidos em H₂O destilada (15 mL) e a mistura foi esfriada a 0 °C antes de dioxano (15 mL) ser adicionado (precipitação parcial do sal de aminoácido ocorreu). Uma solução de Fmoc-Cl (504 mg, 1,95 mmol) em dioxano (15 mL) foi adicionada, às gotas, com agitação vigorosa ao longo de 10 minutos. A mistura resultante foi agitada a 0 °C por 2 horas antes do banho de gelo ser removido e a agitação foi mantida por 16 horas. O solvente foi removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida e o resíduo dissolvido em água (150 mL). O pH foi ajustado de 9 a 2 com HCl 1N e a camada aquosa foi subsequentemente extraída com EtOAc (3 x 100 mL). Os orgânicos combinados foram lavados com salmoura (100 mL), secos com MgSO₄, filtrados e os voláteis removidos por evaporação rotativa sob pressão reduzida para se obter HO-Ala-Val-Fmoc 20b puro (746 mg, 97 % de rendimento). LC/MS 2,85 min (ES+) *m/z* (intensidade relativa) 410,60; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,79 (d, *J* = 7,77 Hz, 2H), 7,60 (d, *J* = 7,77 Hz, 2H), 7,43 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,34 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H), 6,30 (bs, 1H), 5,30 (bs, 1H), 4,71 - 7,56 (m, 1H), 4,54 - 4,36 (m, 2H), 4,08 - 3,91 (m, 1H), 2,21 - 2,07 (m, 1H), 1,50 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H), 1,06 - 0,90 (m, 6H).

(b) *((S)*-3-metil-1-oxo-1-(((*S*)-1-oxo-1-((4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)amino)propan-2-il)amino)butan-2-il)carbamato de (9*H*-fluoren-9-il)metila (20)

[0475]Éster pinacólico de ácido 4-aminofenilborônico (146,9 mg, 0,67 mmol) foi adicionado a uma solução de HO-Ala-Val-Fmoc 20b (330 mg, 0,8 mmol), DCC (166 mg, 0,8 mmol) e DMAP (5 mg, cat.) em DCM seco (8 mL) previamente agitada por 30 minutos na temperatura ambiente em um frasco fluxado com argônio. A mistura de reação depois foi deixada agitar na temperatura ambiente durante a noite. A reação foi seguida por LCMS e TLC. A mistura de reação foi diluída com CH₂Cl₂ e os orgânicos foram lavados com H₂O e salmoura antes de serem secos com MgSO₄, filtrados e o solvente removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida. O pro-

duto bruto foi carregado a seco em uma cromatografia em coluna de gel sílica (Hexano/EtOAc, 6:4) e produto 20 puro foi isolado como um sólido branco em 88 % de rendimento (360 mg).

(c) *trifluorometanossulfonato de 8-(3-((2-(4-((S)-2-((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metóxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)fenil)-7-metóxi-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-5,10,11,11a-tetra-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)óxi)propóxi)-7-metóxi-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-5,10,11,11a-tetra-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-ila (21)*

[0476]Bis-triflato 12 (2,03 g, 1,81 mmol), éster borônico pinacólico (1 g, 1,63 mmol) e Na₂CO₃ (881 mg, 8,31 mmol) foram dissolvidos em uma mistura de tolueno/MeOH/H₂O, 2:1:1 (40 mL). O frasco de reação foi purgado e enchido com argônio três vezes antes de *tetracis*(trifenilfosfina)paládio(0) (41 mg, 0,035 mmol) ser adicionado e a mistura de reação aquecida a 30 °C durante a noite. Os solventes foram removidos sob pressão reduzida e o resíduo foi retomado em H₂O (100 mL) e extraído com EtOAc (3 x 100 mL). Os orgânicos combinados foram lavados com salmoura (100 mL), secos com MgSO₄, filtrados e os voláteis removidos por evaporação rotativa sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica (Hexano/EtOAc, 8:2 a 25:75) para se obter 21 puro em 33 % de rendimento (885 mg). LC/MS 3,85 min (ES+) *m/z* (intensidade relativa) 1452,90; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,78 - 7,16 (m, 17H), 7,13 (s, 1H), 6,51 - 6,24 (m, 1H), 5,51 (dd, *J* = 10,0, 5,1 Hz, 2H), 5,36 - 5,11 (m, 1H), 4,74 (dd, *J* = 10,1, 4,4 Hz, 2H), 4,70 - 4,53 (m, 2H), 4,47 (d, *J* = 6,4 Hz, 1H), 4,37 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 4,27 (m, 4H), 4,20 - 4,14 (m, 1H), 3,90 (s, 3H), 3,89 (s, 3H), 3,77 (ddd, *J* = 16,7, 9,0, 6,4 Hz, 3H), 3,71 - 3,61 (m, 2H), 3,24 - 2,91 (m, 3H), 2,55 - 2,33 (m, 2H), 2,22 - 2,07 (m, 1H), 1,52 - 1,37 (m, 3H), 1,04 - 0,86 (m, 10H), 0,00 (s, 18H).

(d) *(9H-fluoren-9-il)metil((2S)-1-(((2S)-1-((4-(8-(3-((2-ciclopropil-7-metóxi-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-5,10,11,11a-tetra-hidro-1H-*

benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)óxi)propóxi)-7-metóxi-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-5,10,11,11a-tetra-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato (22)

[0477]Trifenilarsina (42 mg, 0,137 mmol) foi adicionada a uma mistura de PBD-triflato 21 (250 mg, 0,172 mmol), ácido ciclopropilborônico (73,9 mg, 0,86 mmol), óxido de prata (159 mg, 0,688 mmol) e fosfato de potássio tribásico (438 mg, 2,06 mmol) em dioxano seco (10 mL) sob uma atmosfera de argônio. A reação foi fluxada com argônio 3 vezes e cloreto de *bis*(benzonitrila)paládio(II) (13,2 mg, 0,034 mmol) foi adicionado. A reação foi fluxada com Argônio 3 vezes mais antes de ser aquecida a 75 °C e agitada por 10 minutos. A mistura de reação foi filtrada através de uma almofada de celite que foi subsequentemente enxaguada com acetato de etila. O solvente foi removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi submetido à cromatografia em coluna flash (gel de sílica; metanol a 1 %/clorofórmio). As frações puras foram coletadas e combinadas, e o excesso de eluente foi removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida para se obter o produto 22 desejado (132 mg, 50 % de rendimento). LC/MS 3,83 min (ES+) *m/z* (intensidade relativa) 1345,91; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,88 - 7,14 (m, 17H), 6,69 (s, 1H), 6,45 - 6,25 (m, 1H), 5,57 - 5,41 (m, 2H), 5,34 - 5,14 (m, 1H), 4,78 - 4,67 (m, 2H), 4,62 - 4,55 (m, 1H), 4,50 - 4,45 (m, 2H), 4,51 - 4,44 (m, 1H), 4,31 - 4,21 (m, 4H), 4,16 (m, 1H), 3,92 (s, 3H), 3,86 (s, 3H), 3,82 - 3,71 (m, 2H), 3,66 (m, 3H), 3,40 - 3,28 (m, 1H), 3,07 (m, 1H), 2,70 - 2,57 (m, 1H), 2,47 - 2,36 (m, 2H), 2,15 (m, 1H), 1,51 - 1,40 (m, 3H), 1,03 - 0,87 (m, 11H), 0,77 - 0,71 (m, 2H), 0,60 - 0,54 (m, 2H), 0,00 (t, *J* = 3,0 Hz, 18H).

(*e*) (*9H-fluoren-9-il)metil((2S)-1-(((2S)-1-((4-(8-(3-((2-ciclopropil-7-metóxi-5-oxo-5,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)óxi)propóxi)-7-metóxi-5-oxo-5,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato (23)*

[0478]Uma solução de Super-Hidreto[®] (0,5 mL, 1M em THF) foi adicionada, às gotas, a uma solução de SEM dilactama 22 (265 mg g, 0,19 mmol) em THF (10 mL) a -78 °C sob uma atmosfera de argônio. A adição foi concluída ao longo de 5 minutos de modo a manter a temperatura interna da mistura de reação constante. Após 20 minutos, uma alíquota foi resfriada rapidamente com água para análise de LC/MS, que revelou que a reação foi concluída. Água (20 mL) foi adicionada à mistura de reação e o banho frio foi removido. A camada orgânica foi extraída com EtOAc (3 x 30 mL) e os orgânicos combinados foram lavados com salmoura (50 mL), secos com MgSO₄, filtrados e o solvente removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida. O produto bruto foi dissolvido em MeOH (12 mL), CH₂Cl₂ (6 mL), água (2 mL) e gel de sílica suficiente para formar uma suspensão de agitação espessa. Após 5 dias, a suspensão foi filtrada através de um funil sinterizado e lavada com CH₂Cl₂/MeOH (9:1) (200 mL) até a eluição do produto ser concluída. A camada orgânica foi lavada com salmoura (2 x 70 mL), seca com MgSO₄, filtrada e o solvente removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida. Purificação por cromatografia em coluna de gel de sílica (CHCl₃ a 100 % para CHCl₃ a 96 %/MeOH a 4 %) proporcionou o produto 23 como um sólido amarelo (162 mg, 78 %). LC/MS 3,02 min (ES+) *m/z* (intensidade relativa) 1052,37.

(f) (2S)-2-amino-N-((2S)-1-((4-(8-(3-((2-ciclopropil-7-metóxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)óxi)propóxi)-7-metóxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)-3-metilbutanamida (17)

[0479]Piperidina em excesso foi adicionada (0,2 mL, 2 mmol) a uma solução de SEM-dilactama 23 (76 mg, 0,073 mmol) em DMF (1 mL). A mistura foi deixada agitar na temperatura ambiente por 20 min, no ponto em que a reação tinha ido para a conclusão (como monitorada por LC/MS). A mistura de reação foi diluída com CH₂Cl₂ (75 mL) e a fase orgânica foi lavada com H₂O (3 x 75 mL) até concluir a re-

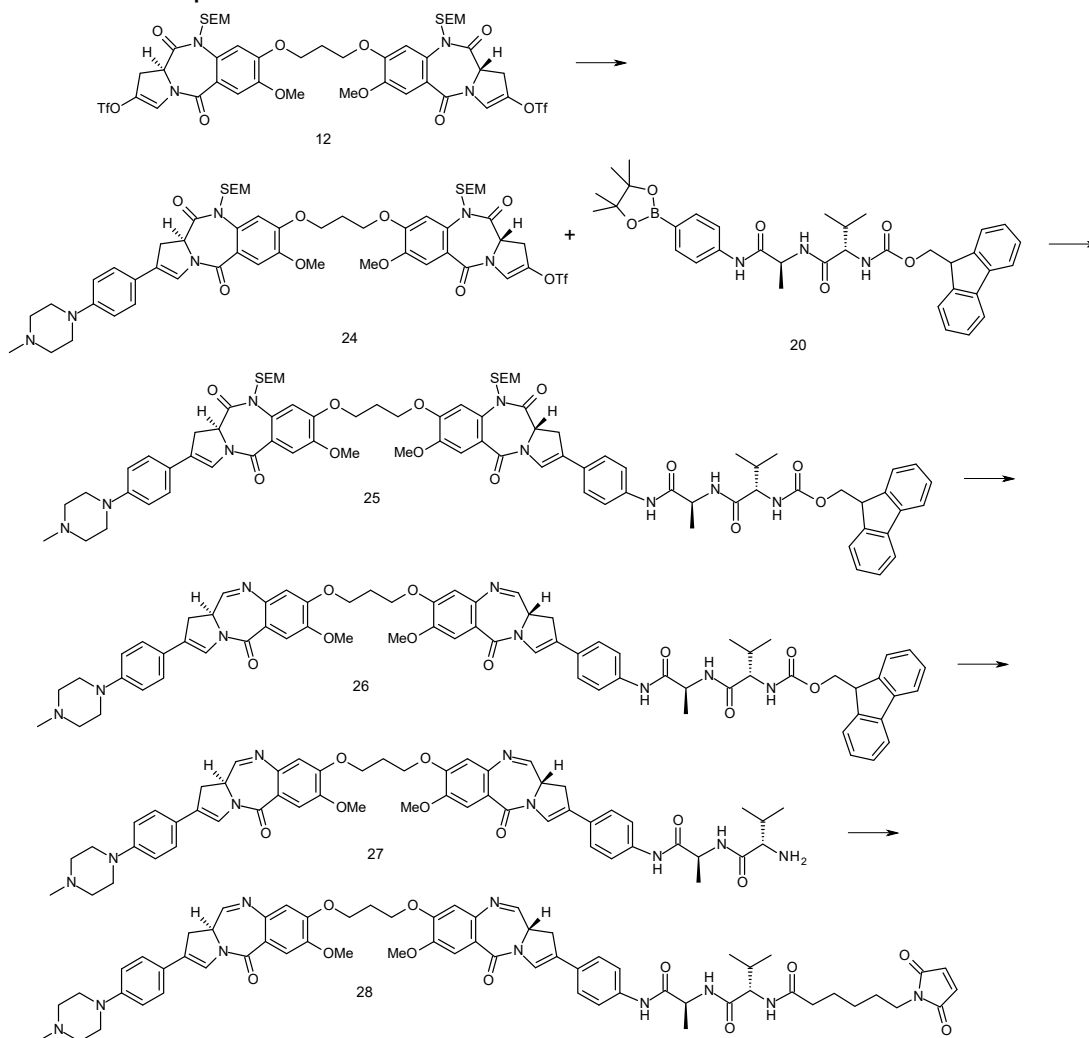
moção de piperidina. A fase orgânica foi seca sobre MgSO₄, filtrada e o excesso de solvente removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida para se obter o produto 17 bruto que foi usado como tal na próxima etapa. LC/MS 2,32 min (ES+) *m/z* (intensidade relativa) 830,00.

(g) *N-(((2S)-1-(((2S)-1-((4-(8-(3-((2-ciclopropil-7-metóxi-5-oxo-5,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)óxi)propóxi)-7-metóxi-5-oxo-5,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-1-(3-(2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxa-heptacosan-27-amida (18)*

[0480]Cloridreto de EDCI (14 mg, 0,0732 mmol) foi adicionado a um suspensão de Maleimida-PEG₈-ácido (43,4 mg, 0,0732 mmol) em CH₂Cl₂ seco (5 mL) sob atmosfera de argônio. A mistura foi agitada por 1 hora na temperatura ambiente antes de PBD 17 (60,7 mg, 0,0732 mmol) ser adicionado. A agitação foi mantida até a reação ser concluída (usualmente 5 horas). A reação foi diluída com CH₂Cl₂ e a fase orgânica foi lavada com H₂O e salmoura antes de ser seca sobre MgSO₄, filtrada e o excesso de solvente removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia de gel de sílica cuidadosa (eluição lenta iniciando com CHCl₃ a 100 % até CHCl₃/MeOH 9:1) seguido por cromatografia de fase reversa para remover maleimida-PEG₈-ácido não reagido. O produto 18 foi isolado em 17,6 % (21,8 mg). LC/MS 2,57 min (ES+) *m/z* (intensidade relativa) 1405,30; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,91 (t, *J* = 3,5 Hz, 1H), 7,80 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H), 7,75 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 7,69 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 7,54 - 7,50 (m, 2H), 7,45 (s, 1H), 7,39 - 7,31 (m, 2H), 6,87 (d, *J* = 10,5 Hz, 2H), 6,76 (s, 1H), 6,72 - 6,68 (m, 2H), 4,74 - 4,62 (m, 1H), 4,45 - 4,17 (m, 7H), 3,95 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 3,67 - 3,58 (m, 34H), 3,54 (m, 2H), 3,42 (dd, *J* = 10,2, 5,2 Hz, 2H), 3,16 - 3,07 (m, 1H), 2,92 (dd, *J* = 16,1, 4,1 Hz, 1H), 2,62 - 2,49 (m, 4H), 2,48 - 2,39 (m, 2H), 2,37 - 2,25 (m, 1H), 1,92 (s, 1H), 1,52 - 1,44 (m, 3H), 1,10 - 0,93 (m, 6H), 0,79 (dd, *J* = 9,2, 5,3 Hz, 2H), 0,57 (dd, *J* = 9,2, 5,3

Hz, 2H), NH não foram observados.

Exemplo 3



(a) *Trifluorometanossulfonato de (S)-7-metóxi-8-(3-(((S)-7-metóxi-2-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-5,10,11,11a-tetra-hidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)óxi)propóxi)-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-5,10,11,11a-tetra-hidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-2-ila (24)*

[0481]Pd(PPh₃)₄ (20,6 mg, 0,018 mmol) foi adicionado a uma mistura agitada do triflato de bis-enol 12 (500 mg, 0,44 mmol), éster borônico de N-metil piperazina (100 mg, 0,4 mmol), Na₂CO₃ (218 mg, 2,05 mmol), MeOH (2,5 mL), tolueno (5 mL) e água (2,5 mL). A mistura de reação foi deixada agitar a 30 °C sob uma atmos-

fera de nitrogênio por 24 horas após o tempo em que todo o éster borônico foi consumido. A mistura de reação depois foi evaporada à secura antes do resíduo ser retomado em EtOAc (100 mL) e lavada com H₂O (2 x 50 mL), salmoura (50 mL), seca (MgSO₄), filtrada e evaporada sob pressão reduzida para fornecer o produto bruto. Purificação por cromatografia flash (eluição por gradiente: Hexano/EtOAc 80:20 v/v para Hexano/EtOAc 60:40 v/v) proporcionou o produto 24 como uma espuma amarelada (122,6 mg, 25 %). LC/MS 3,15 min (ES+) *m/z* (intensidade relativa) 1144 ($[M + H]^+$, 20 %).

(b) ((S)-1-(((S)-1-((4-((S)-7-metóxi-8-(3-(((S)-7-metóxi-2-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-5,10,11,11a-tetra-hidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)óxi)propóxi)-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-5,10,11,11a-tetra-hidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metila (25)

[0482]PBD-triflato 24 (359 mg, 0,314 mmol), éster borônico pinacólico 20 (250 mg, 0,408 mmol) e trietilamina (0,35 mL, 2,51 mmol) foram dissolvidos em uma mistura de tolueno/MeOH/H₂O, 2:1:1 (3 mL). O vaso de micro-ondas foi purgado e enchido com argônio três vezes antes de *tetracis*(trifenilfosfino)paládio(0) (21,7 mg, 0,018 mmol) ser adicionado e a mistura de reação colocada no micro-ondas a 80 °C por 10 minutos. Subsequentemente, CH₂Cl₂ (100 mL) foi adicionado e os orgânicos foram lavados com água (2 x 50 mL) e salmoura (50 mL) antes de serem secos com MgSO₄, filtrados e os voláteis removidos por evaporação rotativa sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica (CHCl₃/MeOH, 100 % a 9:1) para se obter 25 puro (200 mg, 43 % de rendimento). LC/MS 3,27 min (ES+) *m/z* (intensidade relativa) 1478 ($[M + H]^+$, 100 %).

(c) ((S)-1-(((S)-1-((4-((S)-7-metóxi-8-(3-(((S)-7-metóxi-2-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-5-oxo-5,11a-di-hidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)óxi)propóxi)-5-

oxo-5,11a-di-hidro-1H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metila (26)

[0483]Uma solução de Super-Hidreto[®] (0,34 mL, 1M em THF) foi adicionada, às gotas, a uma solução de SEM-dilactama 25 (200 mg, 0,135 mmol) em THF (5 mL) a -78 °C sob uma atmosfera de argônio. A adição foi concluída ao longo de 5 minutos de modo a manter a temperatura interna da mistura de reação constante. Após 20 minutos, uma alíquota foi resfriada rapidamente com água para análise de LC/MS, que revelou que a reação foi concluída. Água (20 mL) foi adicionada à mistura de reação e o banho frio foi removido. A camada orgânica foi extraída com EtOAc (3 x 30 mL) e os orgânicos combinados foram lavados com salmoura (50 mL), secos com MgSO₄, filtrados e o solvente removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida. O produto bruto foi dissolvido em MeOH (6 mL), CH₂Cl₂ (3 mL), água (1 mL) e gel de sílica suficiente para formar uma suspensão de agitação espessa. Após 5 dias, a suspensão foi filtrada através de um funil sinterizado e lavada com CH₂Cl₂/MeOH (9:1) (100 mL) até a eluição do produto ser concluída. A camada orgânica foi lavada com salmoura (2 x 50 mL), seca com MgSO₄, filtrada e o solvente removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida. Purificação por cromatografia em coluna de gel de sílica (CHCl₃ a 100 % a 96 % CHCl₃/MeOH a 4 %) proporcionou o produto 26 como um sólido amarelo (100 mg, 63 %). LC/MS 2,67 min (ES+) *m/z* (intensidade relativa) 1186 ([*M* + H]⁺, 5 %).

(d) *(S)-2-amino-N-((S)-1-((4-((R)-7-metóxi-8-(3-(((R)-7-metóxi-2-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-5-oxo-5,11a-di-hidro-1H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)óxi)propóxi)-5-oxo-5,11a-di-hidro-1H-pirroló[2,1-c][1,4]benzodiazepin-2-il)fenil)-amino)-1-oxopropan-2-il)-3-metilbutanamida (27)*

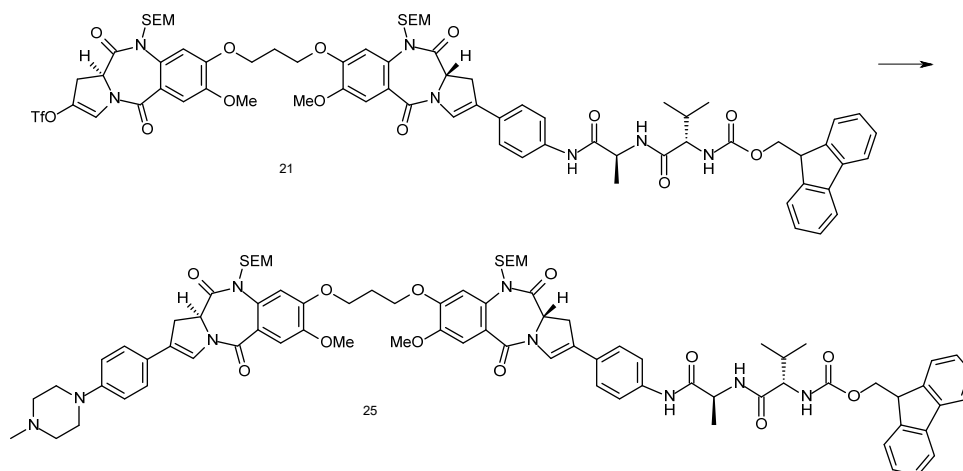
[0484]Piperidina em excesso foi adicionada (0,1 mL, 1 mmol) a uma solução de PBD 26 (36,4 mg, 0,03 mmol) em DMF (0,9 mL). A mistura foi deixada agitar na temperatura ambiente por 20 min, no ponto em que a reação tinha ido para a con-

clusão (como monitorada por LC/MS). A mistura de reação foi diluída com CH₂Cl₂ (50 mL) e a fase orgânica foi lavada com H₂O (3 x 50 mL) até concluir a remoção de piperidina. A fase orgânica foi seca sobre MgSO₄, filtrada e o excesso de solvente removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida para se obter o produto bruto 27 que foi usado como tal na próxima etapa. LC/MS 2,20 min (ES+) *m/z* (intensidade relativa) 964 ([*M* + H]⁺, 5 %).

(e) *6-(2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)-N-((S)-1-(((S)-1-((4-((S)-7-metóxi-8-(3-(((S)-7-metóxi-2-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-5-oxo-5,11a-di-hidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)óxi)propóxi)-5-oxo-5,11a-di-hidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)hexanamida (28)*

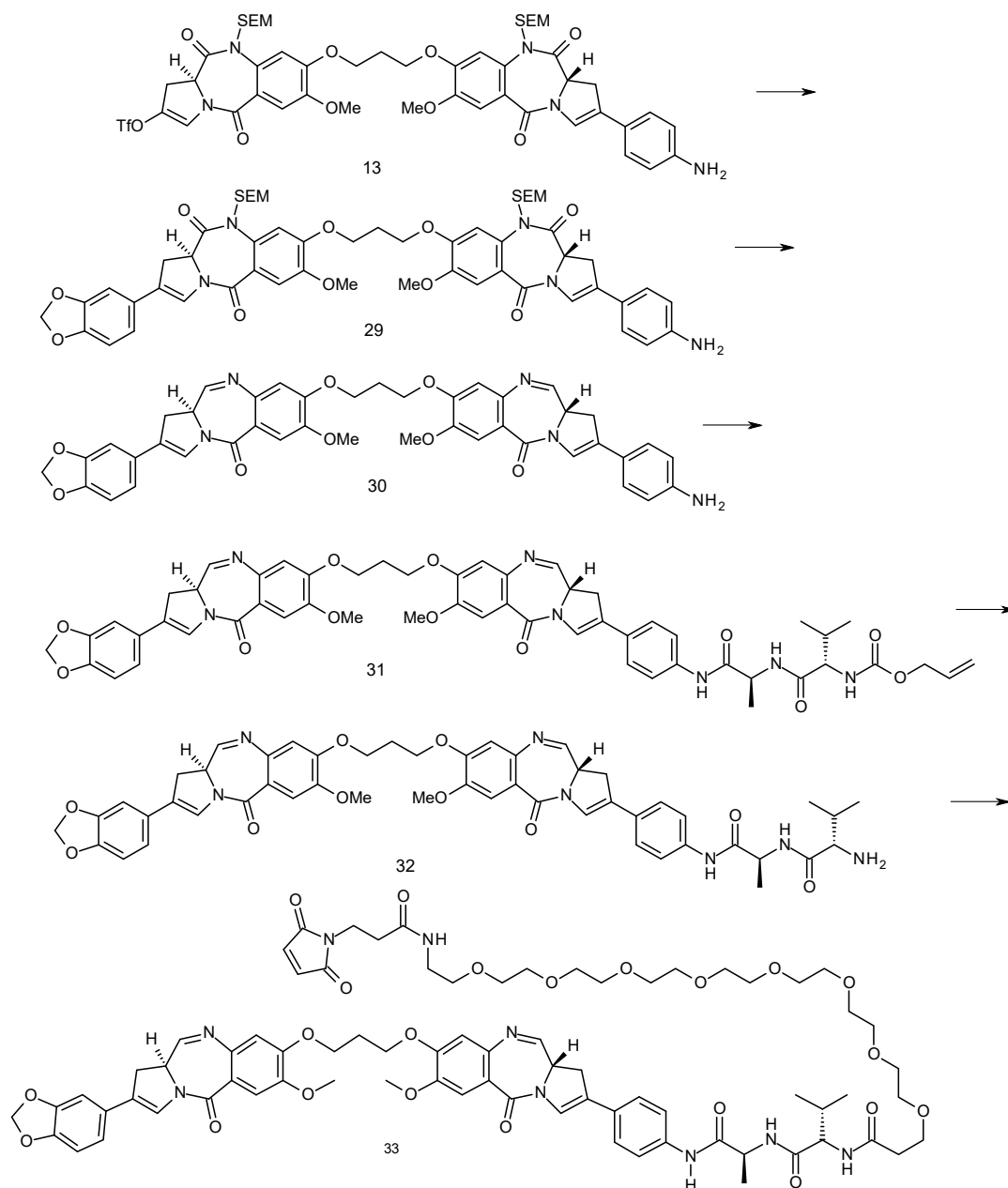
[0485]Cloridreto de EDCI (4,7 mg, 0,03 mmol) foi adicionado a uma suspensão de ácido 6-maleimido-hexanóico (6,5 mg, 0,03 mmol) em CH₂Cl₂ seco (3 mL) sob atmosfera de argônio. A mistura foi agitada por 1 hora na temperatura ambiente antes de PBD 27 (34 mg, bruto) ser adicionado. A agitação foi mantida até a reação ser concluída (6 horas). A reação foi diluída com CH₂Cl₂ e a fase orgânica foi lavada com H₂O e salmoura antes de ser seca sobre MgSO₄, filtrada e o excesso de solvente removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia de gel de sílica cuidadosa (eluição lenta iniciando com CHCl₃ a 100 % até CHCl₃/MeOH 9:1) seguido por cromatografia de fase reversa para remover maleimida-PEG₈-ácido não reagido. O produto 28 foi isolado em 41 % ao longo de duas etapas (14,6 mg). LC/MS 2,40 min (ES+) *m/z* (intensidade relativa) 1157 ([*M* + H]⁺, 5 %)

[0486]Exemplo 4 - síntese alternativa de composto 25



[0487]PBD-triflato 21 (469 mg, 0,323 mmol), éster borônico pinacólico (146,5 mg, 0,484 mmol) e Na_2CO_3 (157 mg, 1,48 mmol) foram dissolvidos em uma mistura de tolueno/MeOH/ H_2O , 2:1:1 (10 mL). O frasco de reação foi purgado com argônio três vezes antes de *tetrakis*(trifenilfosfina)paládio(0) (7,41 mg, 0,0064 mmol) ser adicionado e a mistura de reação aquecida a 30 °C durante a noite. Os solventes foram removidos sob pressão reduzida e o resíduo foi retomado em H_2O (50 mL) e extraído com EtOAc (3 x 50 mL). Os orgânicos combinados foram lavados com salmoura (100 mL), secos com MgSO_4 , filtrados e os voláteis removidos por evaporação rotativa sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica (CHCl_3 a 100 % para $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ a 95 %:5 %) para se obter 25 puro em 33 % de rendimento (885 mg). LC/MS 3,27 min (ES+) m/z (intensidade relativa) 1478 ($[M + H]^+$, 100 %).

Exemplo 5



(a) *(S)*-2-(4-Aminofenil)-8-(3-(((*S*)-2-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)-7-metóxi-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-5,10,11,11a-tetra-hidro-1H-pirrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepin-8-il)óxi)propóxi)-7-metóxi-10-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-1H-pirrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepina-5,11(10*H*,11*aH*)-diona (29)

[0488]Ácido 3,4-(metilenodióxi)fenil borônico (356 mg, 2,1 mmol, 1,3 equiv.), TEA (1,8 mL, 12,9 mmol, 8 equiv.) e triflato/anilina 13 (1,75 g, 1,7 mmol, 1 equiv.) foram dissolvidos em uma mistura de etanol (7 mL), tolueno (13 mL) e água (2 mL)

sob uma atmosfera de Ar. A mistura de reação foi despejada e fluxada com Ar 3 vezes, antes da adição de tetrakis(trifenilfosfino)paládio(0) (114 mg, 0,1 mmol, 0,06 equiv.). O frasco foi novamente esvaziado e fluxado com Ar 3 vezes e aquecido em um micro-ondas a 80 °C por 8 minutos com tempo de pré-agitação de 30 segundos. Análise por TLC (acetato de etila/hexano 80:20 v/v) indicou o consumo completo do material de partida. A mistura de reação foi diluída com diclorometano (50 mL) e lavada com água (50 mL). A camada orgânica foi seca com MgSO₄, filtrada e o solvente removido a vácuo. Purificação por cromatografia em coluna de gel de sílica (hexano/acetato de etila 60:40 a 20:80 v/v) proporcionou o produto 29 como um sólido amarelo (1,21 g, 71 %). LC/MS (3,92 min (ES⁺) *m/z* (intensidade relativa) 1032,44 ([*M* + H]⁺, 100).

(b) *(S)*-2-(4-Aminofenil)-8-(3-(((*S*)-2-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)-7-metóxi-5-oxo-5,11a-di-hidro-1H-pirrolol[2,1-*c*][1,4]benzodiazepin-8-il)óxi)propóxi)-7-metóxi-1H-pirrolol[2,1-*c*][1,4]benzodiazepin-5(11aH)-ona (30)

[0489]SEM dilactama 29 (0,25 g, 0,24 mmol, 1 equiv.) foi dissolvida em THF (8 mL) e esfriada a -78 °C sob uma atmosfera de Ar. Super-Hidreto[®] (0,6 mL, 1 M em THF, 2,5 equiv.) foi adicionado, às gotas, ao longo de 5 minutos enquanto monitorando a temperatura. Após 20 minutos, uma pequena amostra foi tomada e trabalhada por análise de LCMS. Água (50 mL) foi adicionada, o banho frio foi removido e a solução lavada com acetato de etila (50 mL). A camada orgânica foi extraída e lavada com salmoura (60 mL), seca com MgSO₄, filtrada e o solvente removido a vácuo. O produto bruto foi dissolvido em EtOH (15 mL), CH₂Cl₂ (7,5 mL) e água (2,5 mL) e gel de sílica suficiente foi adicionado até ele se tornar uma suspensão espessa. Após 5 dias de agitação, foi filtrada através de um funil sinterizado e lavada com CH₂Cl₂/MeOH (9:1) (100 mL) até o produto cessado ser eluído. A camada orgânica foi lavada com salmoura (2 x 50 mL), seca com MgSO₄, filtrada e o solvente removido a vácuo. Purificação por cromatografia em coluna de gel de sílica (CHCl₃ com

gradiente de MeOH 1 % a 4 %) proporcionou o produto 30 como um sólido amarelo (94 mg, 53 %). LC/MS (2,53 min (ES⁺) *m/z* (intensidade relativa) 739,64 ([M]⁺, 70).

(c) ((S)-1-(((S)-1-((4-((S)-8-(3-(((S)-2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-metóxi-5-oxo-5,11a-di-hidro-1H-pirrol-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de alila (31)

[0490] Sob uma atmosfera de Ar, Alanina-Valina-Alloc (180 mg, 0,66 mmol, 1,2 equiv.) foi agitado com EEDQ (163 mg, 0,66 mmol, 1,2 equiv.) em CH₂Cl₂ anidro (21 mL) e metanol (1 mL) por 1 hora. O PBD 30 (407 mg, 0,55 mmol, 1 equiv.) foi dissolvido em CH₂Cl₂ anidro (21 mL) e metanol (1 mL) e adicionado à reação. LC/MS após 5 dias de agitação na temperatura ambiente mostrou a maioria da formação do produto. O solvente foi removido a vácuo antes da purificação por cromatografia em coluna (CH₂Cl₂ com gradiente de MeOH 1 % a 6 %) para se obter o produto 31 como um sólido amarelo (184 mg, 34 %). LC/MS (2,95 min (ES⁺) *m/z* (intensidade relativa) 994,95 ([M + H]⁺, 60).

(d) (S)-2-Amino-N-(((S)-1-((4-((S)-8-(3-(((S)-2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-metóxi-5-oxo-5,11a-di-hidro-1H-pirrol-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)-3-metilbutanamida (32)

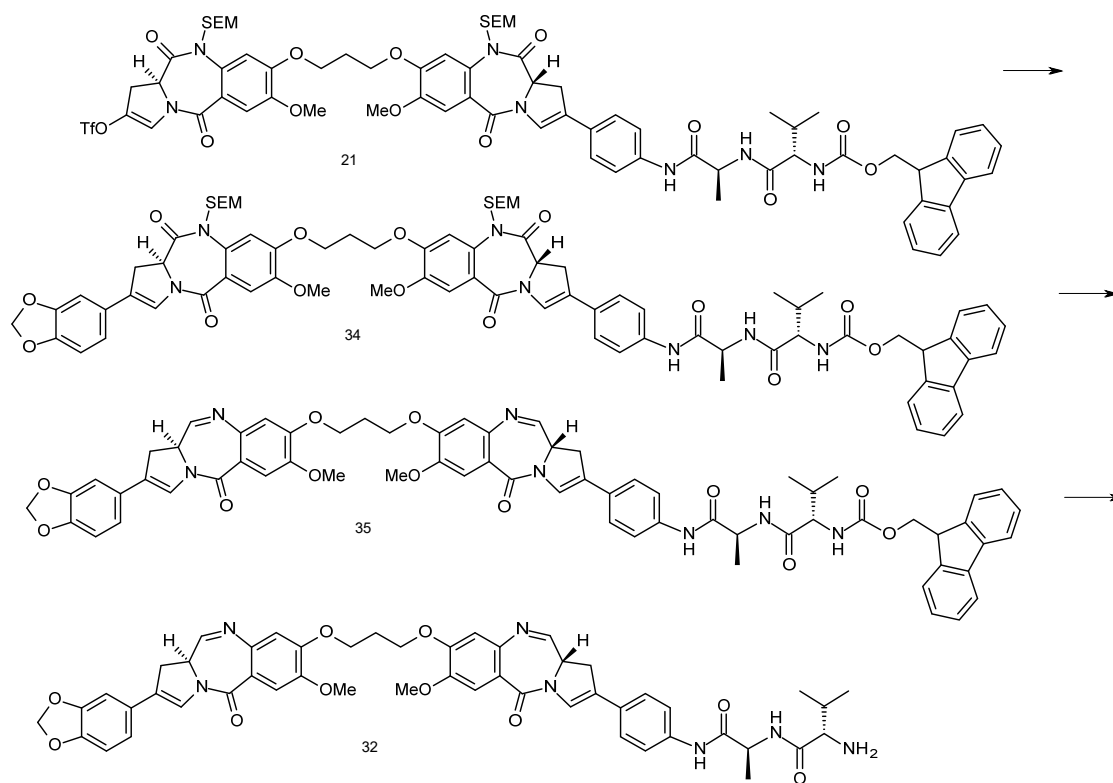
[0491] A imina 31 (100 mg, 0,1 mmol, 1 equiv.) foi dissolvida em DCM anidro (10 mL) (com o auxílio de uma gota de metanol para auxiliar a dissolução) sob uma atmosfera de Ar. Pirrolidina (30 µL, 0,15 mmol, 1,5 equiv.) foi adicionada, às gotas, antes do frasco ser esvaziado e fluxado com Ar três vezes. Pd(PPh₃)₄ (7 mg, 6 µmol, 0,06 equiv.) foi adicionado e o frasco foi esvaziado e fluxado com Ar três vezes. A análise de LC/MS depois de 1 hora indicou a formação do produto e perda completa do material de partida. Et₂O (60 mL) foi adicionado à mistura de reação e foi deixado agitar até todo o produto sair da solução. O precipitado foi filtrado através de um funil

sinterizado e lavado duas vezes com Et₂O (2 x 20 mL). O frasco de coleta foi substituído e o sólido isolado foi dissolvido e lavado através de um sinterizador com CHCl₃ (100 mL). O solvente foi removido a vácuo para se obter o produto 32 bruto como um sólido amarelo que foi usado diretamente na próxima etapa. LC/MS (1,14 min (ES⁺) *m/z* (intensidade relativa) 910,40 ([*M* + *H*]⁺, 67).

(e) *N-((S)-1-(((S)-1-((4-((S)-8-(3-(((S)-2-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-metóxi-5-oxo-5,11a-di-hidro-1H-pirrol-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-1-(3-(2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxa-heptacosan-27-amida (33)*

[0492]A imina 32 (92 mg, 0,1 mmol, 1,1 equiv.) foi dissolvida em CHCl₃ (6 mL) com uma gota de MeOH anidro para auxiliar a dissolução. Maleimida-PEG₈-ácido (53 mg, 0,09 mmol, 1 equiv.) foi adicionado seguido por EEDQ (33 mg, 0,14 mmol, 1,5 equiv.). Este foi deixado agitar vigorosamente na temperatura ambiente sob Ar por 4 dias até a análise de LC/MS mostrar a maioria da formação do produto. O solvente foi removido a vácuo e o produto bruto foi parcialmente purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica (CHCl₃ com gradiente de MeOH 1 % a 10 %) fornecendo 33 (81mg). O material foi purificado ainda por HPLC preparativa para se obter 33 como um sólido amarelo (26,3 mg, 18 %). Rodada Fast Formic: LC/MS (1,39 min (ES⁺) *m/z* (intensidade relativa) 1485,00 ([*M* + *H*]⁺, 64).

Exemplo 6



(a) ((S)-1-(((S)-1-((4-((S)-8-(3-(((S)-2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-metóxi-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etóxi)metil)-5,10,11,11a-tetra-hidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)óxi)propóxi)-7-metóxi-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etóxi)-metil)-5,10,11,11a-tetra-hidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de 9H-fluoren-9-il)metila (34)

[0493]O triflato 21 (0,5 g, 0,35 mmol, 1 equiv.), ácido 3,4-(metilenodióxi)fenil borônico (75 mg, 0,45 mmol, 1,3 equiv.) e Na₂CO₃ (0,17 g, 1,6 mmol, 4,5 equiv.) foram dissolvidos em tolueno (11 mL), EtOH (5,5 mL) e água (5,5 mL) sob uma atmosfera de Ar. O frasco foi esvaziado e fluxada com Ar três vezes. Pd(PPh₃)₄ (24 mg, 0,02 mmol, 0,06 equiv.) foi adicionado e novamente o frasco foi esvaziado e fluxado com Ar três vezes. Este foi aquecido a 30 °C e deixado agitar durante a noite. Análise por LC/MS mostrou a perda completa do material de partida. O solvente foi removido a vácuo e o resíduo dissolvido em água (60 mL) antes de lavar com acetato de

etila (60 mL x 3). As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura (50 mL), secas com MgSO₄, filtradas e o solvente removido a vácuo. Purificação por cromatografia em coluna (hexano/acetato de etila 50:50 a 25:75 v/v) proporcionou o produto 34 como um sólido amarelo (310 mg, 64 %). LC/MS (1,44 min (ES⁻) *m/z* (intensidade relativa) 1423,35 ([*M* - H]⁻; 79).

(b) ((*S*)-1-(((*S*)-1-((4-((*S*)-8-(3-(((*S*)-2-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-*il*)-7-metóxi-5-oxo-5,11a-di-hidro-1*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepin-8-*il*)óxi)propóxi)-7-metóxi-5-oxo-5,11a-di-hidro-1*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepin-2-*il*)fenil)amino)-1-oxopropan-2-*il*)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-*il*)carbamato de (9*H*-fluoren-9-*il*)metila (35)

[0494]SEM dilactama 34 (0,31 g, 0,22 mmol, 1 equiv.) foi dissolvida em THF (10 mL) e esfriada a -78 °C sob uma atmosfera de Ar. Super-Hidreto[®] (0,5 mL, 1 M em THF, 2,5 equiv.) foi adicionado, às gotas, ao longo de 5 minutos enquanto monitorando a temperatura. Após 30 minutos, uma pequena amostra foi tomada e trabalhada para análise de LC/MS. Água (50 mL) foi adicionada, o banho frio foi removido e a solução lavada com acetato de etila (50 mL). A camada orgânica foi extraída e lavada com salmoura (60 mL), seca com MgSO₄, filtrada e o solvente removido a vácuo. O produto bruto foi dissolvido em EtOH (13,2 mL), CH₂Cl₂ (6,6 mL) e água (2,2 mL) e gel de sílica suficiente foi adicionado até ele se tornar uma suspensão espessa. Após 5 dias de agitação, foi filtrada através de um funil sinterizado e lavada com CH₂Cl₂/MeOH (9:1) (100 mL) até o produto cessado ser eluído. A camada orgânica foi lavada com salmoura (2 x 50 mL), seca com MgSO₄, filtrada e o solvente removido a vácuo. Purificação por cromatografia em coluna de gel de sílica (CHCl₃ com gradiente de MeOH 1 % a 4 %) proporcionou o produto 35 puro como um sólido amarelo (185 mg, 75 %). LC/MS (1,70 min (ES⁺) *m/z* (intensidade relativa) 1132,85 ([*M* + H]⁺; 60).

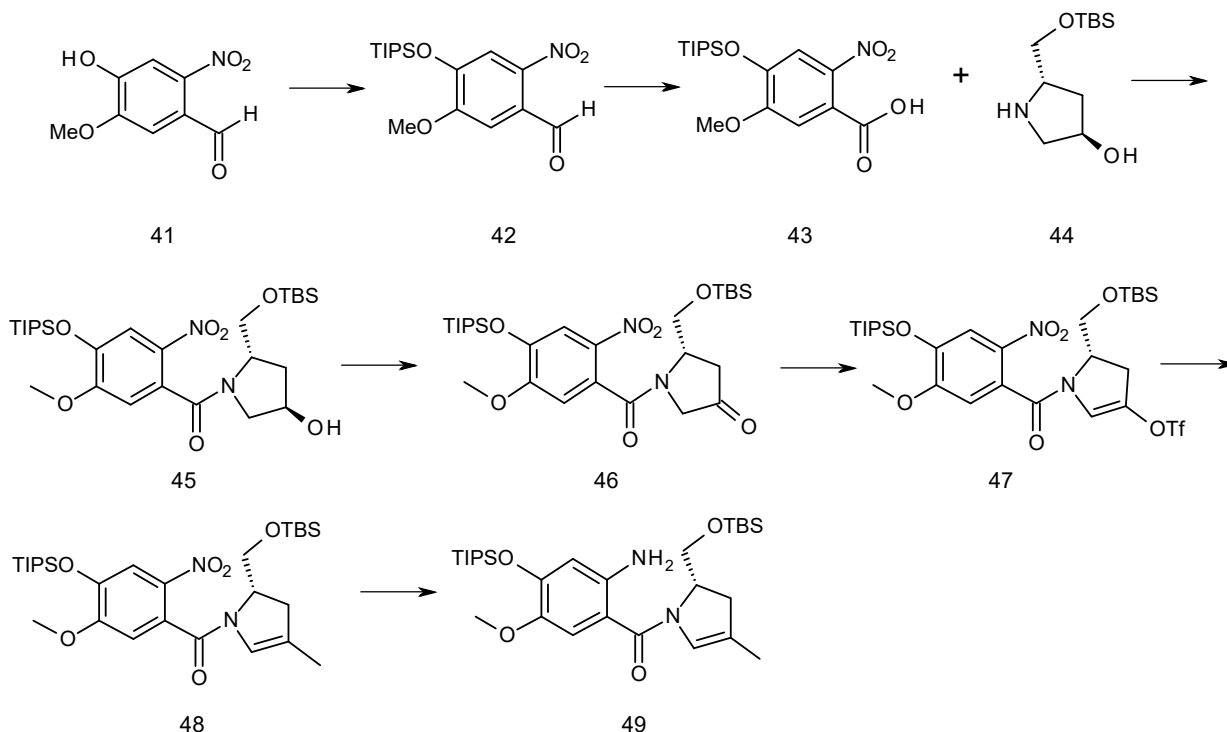
(c) (*S*)-2-Amino-*N*-(((*S*)-1-((4-((*S*)-8-(3-(((*S*)-2-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-*il*)-7-metóxi-5-oxo-5,11a-di-hidro-1*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepin-8-*il*)óxi)propóxi)-7-

metóxi-5-oxo-5,11a-di-hidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)-3-metilbutanamida (32)

[0495]A imina 35 (82 mg, 0,07 mmol, 1 equiv.) foi dissolvida em DMF (1 mL) antes de piperidina (0,2 mL, 2 mmol, excesso) ser adicionada lentamente. Esta solução foi deixada agitar na temperatura ambiente por 20 minutos até a análise de LC/MS mostrar o consumo completo do material de partida. A mistura de reação foi diluída com CH₂Cl₂ (50 mL), lavada com água (50 mL x 4), seca com MgSO₄, filtrada e o solvente removido a vácuo. O produto 33 foi usado sem purificação adicional na próxima etapa. LC/MS (1,15 min (ES⁺) *m/z* (intensidade relativa) 910,60 ([*M* + H]⁺, 58).

Exemplo 7

(i) (S)-(2-amino-5-metóxi-4-((tri-isopropilsilil)óxi)fenil)(2-(((terc-butildimetilsilil)óxi)metil)-4-metil-2,3-di-hidro-1H-pirrol-1-il)metanona (49)



(a) 5-metóxi-2-nitro-4-((tri-isopropilsilil)óxi)benzaldeído (42)

[0496]Tri-isopropilsililcloroeto puro (56,4 mL, 262 mmol) foi adicionado a uma

mistura de imidazol (48,7 g, 715,23 mmol) e 4-hidróxi-5-metóxi-2-nitrobenzaldeído 41 (47 g, 238 mmol) (moído junto). A mistura foi aquecida até o fenol e imidazol fundir e sair da solução (100 °C). A mistura de reação foi deixada agitar por 15 minutos e depois foi deixada esfriar, sobre a qual um sólido foi observado formar no fundo do frasco (cloreto de imidazol). A mistura de reação foi diluída com EtOAc a 5 %/hexanos e carregada diretamente em gel de sílica e a almofada foi eluída com EtOAc a 5 %/hexanos, seguido por EtOAc a 10 %/hexanos (devido ao baixo excesso, muito pouco TIPSCI não reagido foi encontrado no produto). O produto desejado foi eluído com acetato de etila a 5 % em hexano. O excesso de eluente foi removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida, seguido por secagem sob alto vácuo para se obter um sólido cristalino sensível a luz (74,4 g, 88 %). Pureza satisfatória por LC/MS (4,22 min (ES+) m/z (intensidade relativa) 353,88 ($[M + H]^+$, 100)); RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 10,43 (s, 1H), 7,60 (s, 1H), 7,40 (s, 1H), 3,96 (s, 3H), 1,35 - 1,24 (m, 3H), 1,10 (m, 18H).

(b) ácido 5-metóxi-2-nitro-4-((tri-isopropilsilil)óxi)benzoico (43)

[0497]Uma solução de clorito de sódio (47,3 g, 523 mmol, grau técnico a 80 %) e di-hidrogenofosfato de sódio monobásico (35,2 g, 293 mmol) (NaH_2PO_4) em água (800 mL) foi adicionado a uma solução de composto 2 (74 g, 209 mmol) em tetra-hidrofurano (500 mL) na temperatura ambiente. Peróxido de hidrogênio (60 % p/p, 140 mL, 2,93 mol) foi imediatamente adicionado à mistura bifásica vigorosamente agitada. A mistura de reação desenvolveu gás (oxigênio), o material de partida dissolvido e a temperatura da mistura de reação rosa a 45 °C. Após 30 minutos, a LC/MS revelou que a reação foi concluída. A mistura de reação foi esfriada em um banho de gelo e ácido clorídrico (1 M) foi adicionado para baixar o pH para 3 (esta etapa foi desnecessária em muitos casos, como o pH no final da reação já está ácido; por favor, verificar o pH antes de extração). A mistura de reação depois foi extraída com acetato de etila (1 L) e as fases orgânicas lavadas com salmoura (2 x 100

mL) e secas sobre sulfato de magnésio. A fase orgânica foi filtrada e o excesso de solvente removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida para se obter o produto 43 em rendimento quantitativo como um sólido amarelo. LC/MS (3,93 min (ES-) m/z (intensidade relativa) 367,74 ($[M - H]^-$, 100)); RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,36 (s, 1H), 7,24 (s, 1H), 3,93 (s, 3H), 1,34 - 1,22 (m, 3H), 1,10 (m, 18H).

(c) *((2S,4R)-2-(((terc-butildimetilsilil)óxi)metil)-4-hidroxi-pirrolidin-1-il)(5-metóxi-2-nitro-4-((tri-isopropilsilil)óxi)fenil)metanona (45)*

[0498]DCC (29,2 g, 141 mmol, 1,2 eq) foi adicionado a uma solução de ácido 3 (43,5 g, 117,8 mmol, 1eq), e hidrato de hidroxibenzotriazol (19,8 g, 129,6 mmol, 1,1 eq) em diclorometano (200 mL) a 0 °C. O banho frio foi removido e a reação foi deixada proceder por 30 min na temperatura ambiente, no tempo em que uma solução de (2S,4R)-2-*t*-butildimetilsililoximetil-4-hidroxi-pirrolidina 44 (30 g, 129,6 mmol, 1,1 eq) e trietilamina (24,66 mL, 176 mmol, 1,5 eq) em diclorometano (100 mL) foi adicionada rapidamente a -10 °C sob argônio (em larga escala, o tempo de adição pode ser encurtado esfriando a mistura de reação ainda mais. A mistura de reação foi deixada agitar na temperatura ambiente por 40 minutos a 1 hora e monitorada por LC/MS e TLC (EtOAc). Os sólidos foram removidos por filtração em celite e a fase orgânica foi lavada com HCl 0,1 M aquoso frio até o pH ser medido a 4 ou 5. A fase orgânica depois foi lavada com água, seguido por bicarbonato de sódio aquoso saturado e salmoura. A camada orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio, filtrada e o excesso de solvente removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida. O resíduo foi submetido à cromatografia em coluna flash (gel de sílica; gradiente acetato de etila/hexano 40/60 para acetato de etila/hexano 80/20). O excesso de solvente foi removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida proporcionando o produto 45 puro, (45,5 g de produto 6 puro 6 %, e 17 g de produto levemente impuro, 90 % no total). LC/MS 4,43 min (ES+) m/z (intensidade relativa) 582,92 ($[M + H]^+$, 100); RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,66 (s, 1H), 6,74 (s, 1H), 4,54 (s, 1H), 4,40 (s, 1H),

4,13 (s, 1H), 3,86 (s, 3H), 3,77 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H), 3,36 (dd, $J = 11,3, 4,5$ Hz, 1H), 3,14 - 3,02 (m, 1H), 2,38 - 2,28 (m, 1H), 2,10 (ddd, $J = 13,3, 8,4, 2,2$ Hz, 1H), 1,36 - 1,19 (m, 3H), 1,15 - 1,05 (m, 18H), 0,91 (s, 9H), 0,17 - 0,05 (m, 6H), (presença de rotâmeros).

(d) *(S)*-5-(((*tert*-butildimetilsilil)óxi)metil)-1-(5-metóxi-2-nitro-4-((*tri*-isopropilsilil)óxi)benzoil)pirrolidin-3-ona (46)

[0499]TCCA (8,82 g, 40 mmol, 0,7 eq) foi adicionado a uma solução agitada de 45 (31,7 g, 54 mmol, 1 eq) e TEMPO (0,85 g, 5,4 mmol, 0,1 eq) em diclorometano seco (250 mL) a 0 °C. A mistura de reação foi vigorosamente agitada por 20 minutos, no ponto em que TLC (acetato de etila/hexano 50/50) revelou o consumo completo do material de partida. A mistura de reação foi filtrada através de celite e o filtrado lavado com bicarbonato de sódio aquoso saturado (100 mL), tiosulfato de sódio (9 g em 300 mL), salmoura (100 mL) e seco sobre sulfato de magnésio. A evaporação rotativa sob pressão reduzida proporcionou o produto 46 em rendimento quantitativo. LC/MS 4,52 min (ES+) m/z (intensidade relativa) 581,08 ($[M + H]^+$, 100); RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,78 - 7,60 (m, 1H), 6,85 - 6,62 (m, 1H), 4,94 (dd, $J = 30,8, 7,8$ Hz, 1H), 4,50 - 4,16 (m, 1H), 3,99 - 3,82 (m, 3H), 3,80 - 3,34 (m, 3H), 2,92 - 2,17 (m, 2H), 1,40 - 1,18 (m, 3H), 1,11 (t, $J = 6,2$ Hz, 18H), 0,97 - 0,75 (m, 9H), 0,15 - -0,06 (m, 6H), (presença de rotâmeros).

(e) *trifluorometanossulfonato de (S)*-5-(((*tert*-butildimetilsilil)óxi)metil)-1-(5-metóxi-2-nitro-4-((*tri*-isopropilsilil)óxi)benzoil)-4,5-di-hidro-1H-pirrol-3-ila (47)

[0500]Anidrido trifílico (27,7 mL, 46,4 g, 165 mmol, 3 eq) foi injetado (temperatura controlada) a uma suspensão vigorosamente agitada de cetona 46 (31,9 g, 55 mmol, 1 eq) em diclorometano seco (900 mL) na presença de 2,6-lutidina (25,6 mL, 23,5 g, 220 mmol, 4 eq, seco sobre peneiras) a -50 °C (banho de acetona/gelo seco). A mistura de reação foi deixada agitar por 1,5 h quando LC/MS, seguindo um pequeno trabalho (água/diclorometano), revelou a reação ser completa. Água foi

adicionada à mistura de reação ainda fria e a camada orgânica foi separada e lavada com bicarbonato de sódio saturado, salmoura e sulfato de magnésio. A fase orgânica foi filtrada e o excesso de solvente foi removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida. O resíduo foi submetido à cromatografia em coluna flash (gel de sílica; acetato de etila/hexano 10/90 v/v), a remoção do excesso de eluente proporcionou o produto 47 (37,6 g, 96 %) LC/MS, Método 2, 4,32 min (ES+) m/z (intensidade relativa) 712,89 ($[M + H]^+$, 100); RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,71 (s, 1H), 6,75 (s, 1H), 6,05 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H), 4,78 (dd, $J = 9,8, 5,5$ Hz, 1H), 4,15 - 3,75 (m, 5H), 3,17 (ddd, $J = 16,2, 10,4, 2,3$ Hz, 1H), 2,99 (ddd, $J = 16,3, 4,0, 1,6$ Hz, 1H), 1,45 - 1,19 (m, 3H), 1,15 - 1,08 (m, 18H), 1,05 (s, 6H), 0,95 - 0,87 (m, 9H), 0,15 - 0,08 (m, 6H).

(f) (S)-(2-(((*terc-butildimetilsilil*)óxi)metil)-4-metil-2,3-di-hidro-1H-pirrol-1-il)(5-metóxi-2-nitro-4-(((*tri-isopropilsilil*)óxi)fenil)metanona (48)

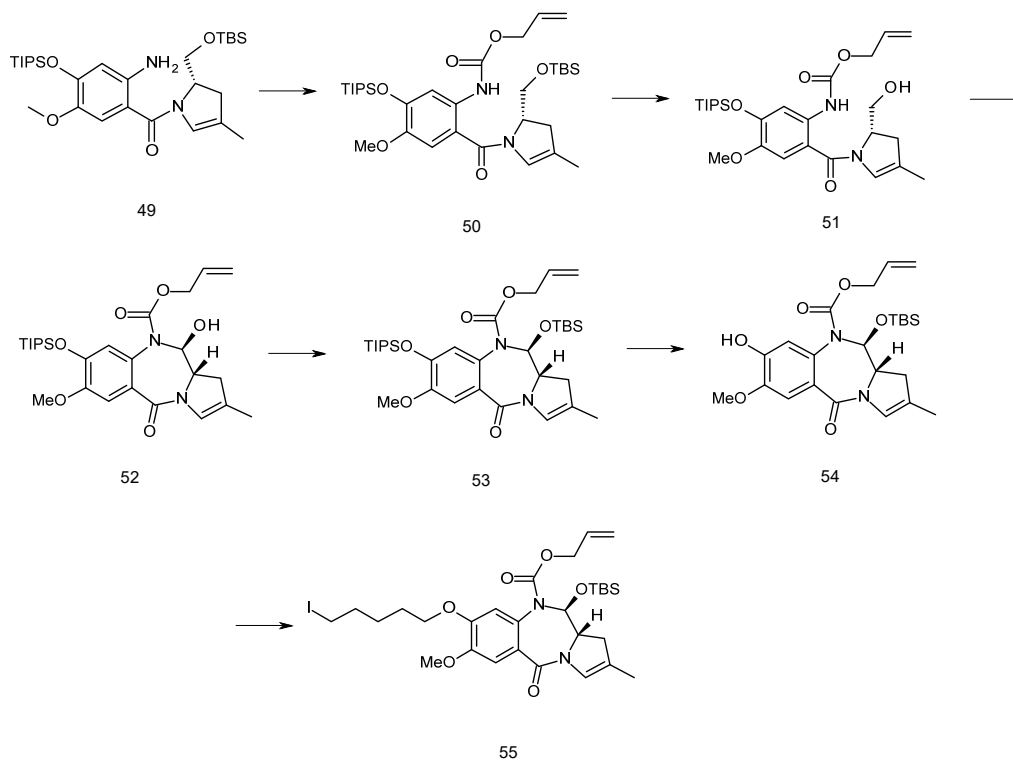
[0501]Trifenilarsina (1,71 g, 5,60 mmol, 0,4 eq) foi adicionada a uma mistura de triflato 47 (10,00 g, 14 mmol, 1 eq), ácido metilborônico (2,94 g, 49,1 mmol, 3,5 eq), óxido de prata (13 g, 56 mmol, 4 eq) e fosfato de potássio tribásico (17,8 g, 84 mmol, 6 eq) em dioxano seco (80 mL) sob uma atmosfera de argônio. A reação foi fluxada com argônio 3 vezes e cloreto de bis(benzonitrila)paládio(II) (540 mg, 1,40 mmol, 0,1 eq) foi adicionado. A reação foi fluxada com argônio 3 vezes mais antes de ser aquecida instantaneamente a 110 °C (o bloco de aquecimento Drysyn foi previamente aquecido a 110 °C antes da adição do frasco). Após 10 min, a reação foi esfriada até a temperatura ambiente e filtrada através de uma almofada de celite. O solvente foi removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi submetido à cromatografia em coluna flash (gel de sílica; acetato de etila a 10 %/hexano). As frações puras foram coletadas e combinadas, e o excesso de eluente foi removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida proporcionando o produto 48 (4,5 g, 55 %). LC/MS, 4,27 min (ES+) m/z (intensidade relativa) 579,18

($[M + H]^+$, 100); RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,70 (s, 1H), 6,77 (s, 1H), 5,51 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H), 4,77 - 4,59 (m, 1H), 3,89 (s, 3H), 2,92 - 2,65 (m, 1H), 2,55 (d, $J = 14,8$ Hz, 1H), 1,62 (d, $J = 1,1$ Hz, 3H), 1,40 - 1,18 (m, 3H), 1,11 (s, 9H), 1,10 (s, 9H), 0,90 (s, 9H), 0,11 (d, $J = 2,3$ Hz, 6H).

(g) *(S)*-(2-amino-5-metóxi-4-((tri-isopropilsilil)óxi)fenil)(2-(((terc-butildimetilsilil)óxi)metil)-4-metil-2,3-di-hidro-1H-pirrol-1-il)metanona (49)

[0502]Pó de zinco (28 g, 430 mmol, 37 eq) foi adicionado a uma solução de composto 48 (6,7 g, 11,58 mmol) em ácido fórmico a 5 % em etanol v/v (70 mL) em torno de 15 °C. A exotermia resultante foi controlada usando um banho de gelo para manter a temperatura da mistura de reação abaixo de 30 °C. Após 30 minutos, a mistura de reação foi filtrada através de uma almofada de celite. O filtrado foi diluído com acetato de etila e a fase orgânica foi lavada com água, bicarbonato de sódio aquoso saturado e salmoura. A fase orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio, filtrada e o excesso de solvente removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi submetido à cromatografia em coluna flash (gel de sílica; acetato de etila a 10 % em hexano). As frações puras foram coletadas e combinadas e o excesso de solvente foi removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida para se obter o produto 49 (5,1 g, 80 %). LC/MS, 4,23 min (ES+) m/z (intensidade relativa) 550,21 ($[M + H]^+$, 100); RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,28 (s, 1H), 6,67 (s, 1H), 6,19 (s, 1H), 4,64 - 4,53 (m, $J = 4,1$ Hz, 1H), 4,17 (s, 1H), 3,87 (s, 1H), 3,77 - 3,69 (m, 1H), 3,66 (s, 3H), 2,71 - 2,60 (m, 1H), 2,53 - 2,43 (m, 1H), 2,04 - 1,97 (m, $J = 11,9$ Hz, 1H), 1,62 (s, 3H), 1,26 - 1,13 (m, 3H), 1,08 - 0,99 (m, 18H), 0,82 (s, 9H), 0,03 - -0,03 (m, $J = 6,2$ Hz, 6H).

(ii) 11-(((terc-butildimetilsilil)óxi)-8-(((5-iodopentil)óxi)-7-metóxi-2-metil-5-oxo-11,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepino-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-alila



(a) *(2-(2-(((*tert*-butildimetilsilil)óxi)metil)-4-metil-2,3-di-hidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metóxi-5-(((*tri*-isopropilsilil)óxi)fenil)carbamato de (*S*)-alila (50)*

[0503]Cloroformiato de alila (0,30 mL, 3,00 mmol, 1,1 eq) foi adicionado a uma solução de amina 49 (1,5 g, 2,73 mmol) na presença de piridina seca (0,48 mL, 6,00 mmol, 2,2 eq) em diclorometano seco (20 mL) a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ (banho de acetona/gelo seco). Após 30 minutos, o banho foi removido e a mistura de reação foi deixada aquecer até a temperatura ambiente. A mistura de reação foi diluída com diclorometano e sulfato de cobre aquoso saturado foi adicionado. A camada orgânica depois foi lavada sequencialmente com bicarbonato de sódio aquoso saturado e salmoura. A fase orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio, filtrada e o excesso de solvente removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida para se obter o produto 50 que foi usado diretamente na próxima reação. LC/MS, 4,45 min (ES+) m/z (intensidade relativa) 632,91 ($[M + H]^+$, 100)

(b) *(2-(2-(*hidroximetil*)-4-metil-2,3-di-hidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metóxi-5-(((*tri*-isopropilsilil)óxi)fenil)carbamato de (*S*)-alila (51)*

[0504]O 50 bruto foi dissolvido em uma mistura 7:1:1:2 de ácido acéti-

co/metanol/tetra-hidrofurano/água (28:4:4:8 mL) e deixado agitar na temperatura ambiente. Após 3 horas, o desaparecimento completo do material de partida foi observado por LC/MS. A mistura de reação foi diluída com acetato de etila e lavada sequencialmente com água (2 x 500 mL), bicarbonato de sódio aquoso saturado (200 mL) e salmoura. A fase orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio, filtrada e o excesso de acetato de etila removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi submetido à cromatografia em coluna flash (gel de sílica, acetato de etila a 25 % em hexano). As frações puras foram coletadas e combinadas e o excesso de eluente foi removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida para se obter o produto 51 desejado (1 g, 71 %). LC/MS, 3,70 min (ES+) m/z (intensidade relativa) 519,13 ($[M + H]^+$, 95); RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,34 (s, 1H), 7,69 (s, 1H), 6,78 (s, 1H), 6,15 (s, 1H), 5,95 (ddt, $J = 17,2, 10,5, 5,7$ Hz, 1H), 5,33 (dq, $J = 17,2, 1,5$ Hz, 1H), 5,23 (ddd, $J = 10,4, 2,6, 1,3$ Hz, 1H), 4,73 (tt, $J = 7,8, 4,8$ Hz, 1H), 4,63 (dt, $J = 5,7, 1,4$ Hz, 2H), 4,54 (s, 1H), 3,89 - 3,70 (m, 5H), 2,87 (dd, $J = 16,5, 10,5$ Hz, 1H), 2,19 (dd, $J = 16,8, 4,6$ Hz, 1H), 1,70 (d, $J = 1,3$ Hz, 3H), 1,38 - 1,23 (m, 3H), 1,12 (s, 10H), 1,10 (s, 8H).

(c) *11-hidróxi-7-metóxi-2-metil-5-oxo-8-((tri-isopropilsilil)óxi)-11,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepino-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-alila (52)*

[0505]Sulfóxido de dimetila (0,35 mL, 4,83 mmol, 2,5 eq) foi adicionado, às gotas, a uma solução de cloreto de oxalila (0,2 mL, 2,32 mmol, 1,2 eq) em diclorometano seco (10 mL) a -78 °C (banho de gelo seco/acetona) sob uma atmosfera de argônio. Após 10 minutos, uma solução de 51 (1 g, 1,93 mmol) em diclorometano seco (8 mL) foi adicionada lentamente com a temperatura ainda a -78 °C. Após 15 min, trietilamina (1,35 mL, seca sobre peneiras moleculares 4Å, 9,65 mmol, 5 eq) foi adicionada, às gotas, e o banho de gelo seco/acetona foi removido. A mistura de reação foi deixada atingir a temperatura ambiente e foi extraída com ácido clorídrico frio (0,1 M), bicarbonato de sódio aquoso saturado e salmoura. A fase orgânica foi

seca sobre sulfato de magnésio, filtrada e o excesso de diclorometano foi removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida para se obter o produto 52 (658 mg, 66 %). LC/MS, 3,52 min (ES+) m/z (intensidade relativa) 517,14 ($[M + H]^+$, 100); RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,20 (s, 1H), 6,75 - 6,63 (m, $J = 8,8, 4,0$ Hz, 2H), 5,89 - 5,64 (m, $J = 9,6, 4,1$ Hz, 2H), 5,23 - 5,03 (m, 2H), 4,68 - 4,38 (m, 2H), 3,84 (s, 3H), 3,83 - 3,77 (m, 1H), 3,40 (s, 1H), 3,05 - 2,83 (m, 1H), 2,59 (d, $J = 17,1$ Hz, 1H), 1,78 (d, $J = 1,3$ Hz, 3H), 1,33 - 1,16 (m, 3H), 1,09 (d, $J = 2,2$ Hz, 9H), 1,07 (d, $J = 2,1$ Hz, 9H).

(d) *11-((terc-butildimetilsilil)óxi)-7-metóxi-2-metil-5-oxo-8-((tri-isopropilsilil)óxi)-11,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepino-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-alila (53)*

[0506] *Terc-butildimetilsililtriflato* (0,70 mL, 3,00 mmol, 3 eq) foi adicionado a uma solução de composto 52 (520 mg, 1,00 mmol) e 2,6-lutidina (0,46 mL, 4,00 mmol, 4 eq) em diclorometano seco (40 mL) a 0 °C sob argônio. Após 10 min, o banho frio foi removido e a mistura de reação foi agitada na temperatura ambiente por 1 hora. A mistura de reação foi extraída com água, bicarbonato de sódio aquoso saturado e salmoura. A fase orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio, filtrada e o excesso foi removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi submetido à cromatografia em coluna flash (gel de sílica; gradiente, acetato de etila a 10 % em hexano para acetato de etila a 20 % em hexano). As frações puras foram coletadas e combinadas e o excesso de eluente foi removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida para se obter o produto 53 (540 mg, 85 %). LC/MS, 4,42 min (ES+) m/z (intensidade relativa) 653,14 ($[M + Na]^+$, 100); RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,20 (s, 1H), 6,71 - 6,64 (m, $J = 5,5$ Hz, 2H), 5,83 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 5,80 - 5,68 (m, $J = 5,9$ Hz, 1H), 5,14 - 5,06 (m, 2H), 4,58 (dd, $J = 13,2, 5,2$ Hz, 1H), 4,36 (dd, $J = 13,3, 5,5$ Hz, 1H), 3,84 (s, 3H), 3,71 (td, $J = 10,1, 3,8$ Hz, 1H), 2,91 (dd, $J = 16,9, 10,3$ Hz, 1H), 2,36 (d, $J = 16,8$ Hz, 1H), 1,75 (s, 3H), 1,31 - 1,16

(m, 3H), 1,12 - 1,01 (m, $J = 7,4, 2,1$ Hz, 18H), 0,89 - 0,81 (m, 9H), 0,25 (s, 3H), 0,19 (s, 3H).

(e) *11-((terc-butildimetilsilil)óxi)-8-hidróxi-7-metóxi-2-metil-5-oxo-11,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepino-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-alila (54)*

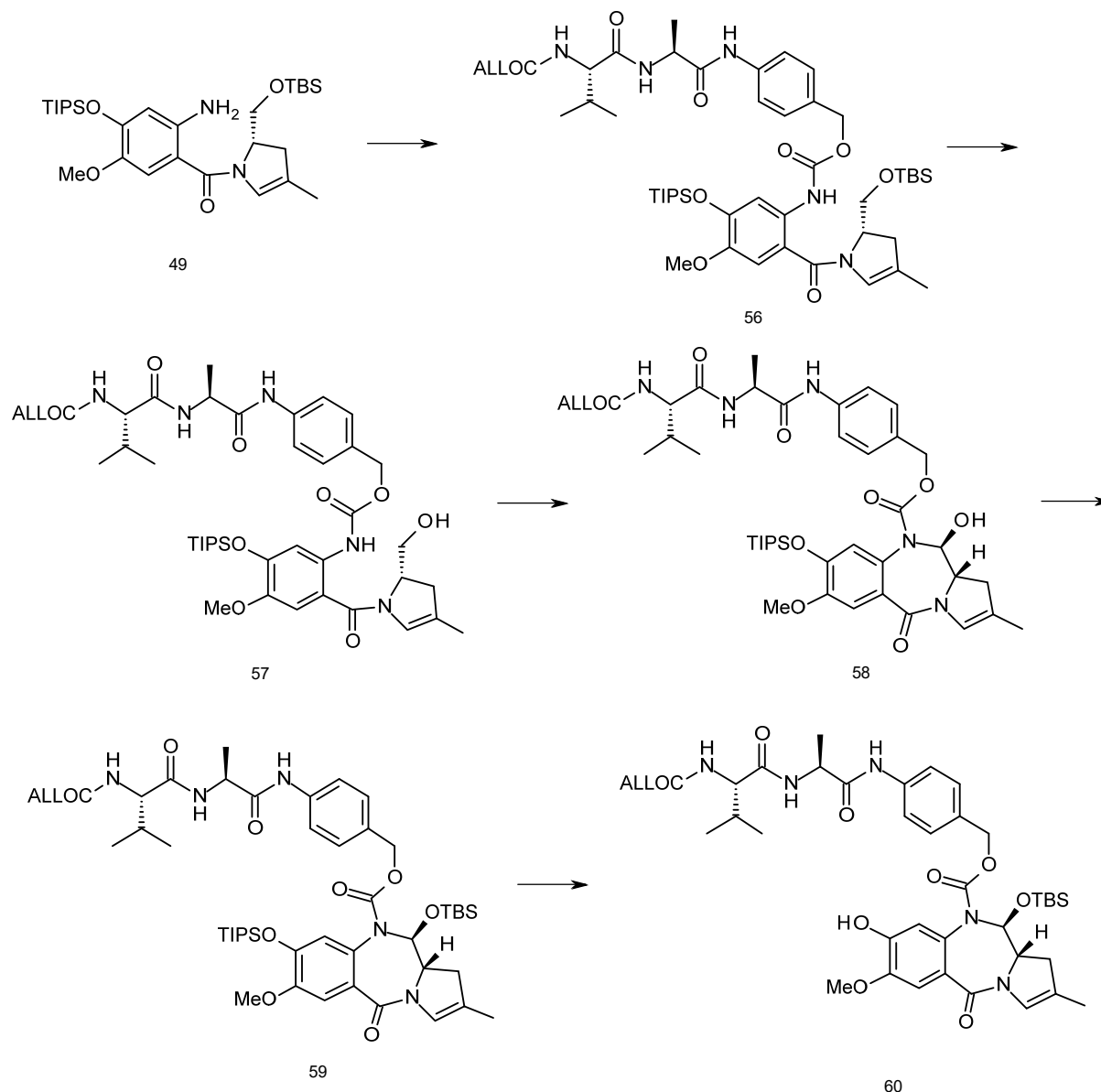
[0507]Acetato de lítio (87 mg, 0,85 mmol) foi adicionado a uma solução de composto 53 (540 mg, 0,85 mmol) em dimetilformamida úmida (6 mL, DMF/água 50:1). Após 4 horas, a reação foi concluída e a mistura de reação foi diluída com acetato de etila (25 mL) e lavada com aquoso solução de ácido cítrico (pH ~ 3), água e salmoura. A camada orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio, filtrada e o excesso de acetato de etila foi removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi submetido à cromatografia em coluna flash (gel de sílica; gradiente, acetato de etila 25 % a 75 % em hexano). As frações puras foram coletadas e combinadas e o excesso de eluente foi removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida para se obter o produto 54 (400 mg, quantitativo). LC/MS, (3,33 min (ES+) m/z (intensidade relativa) 475,26 ($[M + H]^+$, 100).

(f) *11-((terc-butildimetilsilil)óxi)-8-((5-iodopentil)óxi)-7-metóxi-2-metil-5-oxo-11,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepino-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-alila (55)*

[0508]Di-iodopentano (0,63 mL, 4,21 mmol, 5 eq) e carbonato de potássio (116 mg, 0,84 mmol, 1 eq) foram adicionados a uma solução de fenol 54 (400 mg, 0,84 mmol) em acetona (4 mL, seco sobre peneiras moleculares). A mistura de reação depois foi aquecida a 60 °C e agitada por 6 horas. Acetona foi removida por evaporação rotativa sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi submetido à cromatografia em coluna flash (gel de sílica; hexano/acetato de etila 50/50 v/v). As frações puras foram coletadas e combinadas e o excesso de eluente foi removido para fornecer 55 em 90 % de rendimento. LC/MS, 3,90 min (ES+) m/z (intensidade relati-

va) 670,91 ($[M]^+$, 100). RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,23 (s, 1H), 6,69 (s, 1H), 6,60 (s, 1H), 5,87 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 5,83 - 5,68 (m, $J = 5,6$ Hz, 1H), 5,15 - 5,01 (m, 2H), 4,67 - 4,58 (m, 1H), 4,45 - 4,35 (m, 1H), 4,04 - 3,93 (m, 2H), 3,91 (s, 3H), 3,73 (td, $J = 10,0, 3,8$ Hz, 1H), 3,25 - 3,14 (m, $J = 8,5, 7,0$ Hz, 2H), 2,92 (dd, $J = 16,8, 10,3$ Hz, 1H), 2,38 (d, $J = 16,8$ Hz, 1H), 1,95 - 1,81 (m, 4H), 1,77 (s, 3H), 1,64 - 1,49 (m, 2H), 0,88 (s, 9H), 0,25 (s, 3H), 0,23 (s, 3H).

(iii) 11-((terc-butildimetilsilil)óxi)-8-hidróxi-7-metóxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepino-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-(2-(1-((1-(alilóxi)-4-metil-1,2-dioxopentan-3-il)amino)-1-oxopropan-2-il)hidrazinil)benzila (70)



(a) 3-(2-(2-(4-(((2-((S)-2-(((*tert*-butildimetilsilil)óxi)metil)-4-metil-2,3-di-hidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metóxi-5-((*tri*-isopropilsilil)óxi)fenil)carbamoil)óxi)metil)fenil)-hidrazinil)propanamido)-4-metil-2-oxopentanoato de alila (56)

[0509]Trietilamina (2,23 mL, 18,04 mmol, 2,2 eq) foi adicionada a uma solução agitada da amina 49 (4 g, 8,20 mmol) e trifosgeno (778 mg, 2,95 mmol, 0,36 eq) em tetra-hidrofurano seco (40 mL) a 5 °C (banho de gelo). O progresso da reação de isocianato foi monitorado removendo periodicamente as alíquotas a partir da mistura de reação e resfriando rapidamente com metanol e realizando a análise de LC/MS.

Uma vez que a formação do isocianato foi concluída uma solução do alloc-Val-Ala-PABOH (4,12 g, 12,30 mmol, 1,5 eq) e trietilamina (1,52 mL, 12,30 mmol, 1,5 eq) em tetra-hidrofurano seco (40 mL) foi rapidamente adicionada por injeção ao isocianato recentemente preparado. A mistura de reação foi deixada agitar a 40 °C por 4 horas. O excesso de solvente foi removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi submetido à cromatografia em coluna flash (gel de sílica; gradiente, metanol 1 % a 5 % em diclorometano). (Condições alternativas de cromatografia usando EtOAc e Hexano também foram bem sucedidas). As frações puras foram coletadas e combinadas e o excesso de eluente foi removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida para se obter o produto 56 (3,9 g, 50 %). LC/MS, 4,23 min (ES+) m/z (intensidade relativa) 952,36 ($[M + H]^+$, 100); RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,62 (br s, 1H), 8,46 (s, 1H), 7,77 (br s, 1H), 7,53 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,32 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H), 6,76 (s, 1H), 6,57 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 6,17 (s, 1H), 6,03 - 5,83 (m, 1H), 5,26 (dd, $J = 33,8, 13,5$ Hz, 3H), 5,10 (s, 2H), 4,70 - 4,60 (m, 2H), 4,58 (dd, $J = 5,7, 1,3$ Hz, 2H), 4,06 - 3,99 (m, 1H), 3,92 (s, 1H), 3,82 - 3,71 (m, 1H), 3,75 (s, 3H), 2,79 - 2,64 (m, 1H), 2,54 (d, $J = 12,9$ Hz, 1H), 2,16 (dq, $J = 13,5, 6,7$ Hz, 1H), 1,67 (s, 3H), 1,46 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H), 1,35 - 1,24 (m, 3H), 1,12 (s, 9H), 1,10 (s, 9H), 0,97 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H), 0,94 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H), 0,87 (s, 9H), 0,07 - -0,02 (m, 6H).

(b) *3-(2-(2-(4-(((2-((S)-2-(hidroximetil)-4-metil-2,3-di-hidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metóxi-5-((tri-isopropilsilil)óxi)fenil)carbamoil)óxi)metil)fenil)hidrazinil)-propanamido)-4-metil-2-oxopentanoato de alila (57)*

[0510]O éter de TBS 56 (1,32 g, 1,38 mmol) foi dissolvido em uma mistura 7:1:1:2 de ácido acético/metanol/tetra-hidrofurano/água (14:2:2:4 mL) e deixado agitar na temperatura ambiente. Após 3 horas, nenhum material de partida foi observado por LC/MS. A mistura de reação foi diluída com acetato de etila (25 mL) e lavada sequencialmente com água, bicarbonato de sódio aquoso saturado e salmoura. A fase orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio, filtrada e o excesso de acetato de

etila removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi submetido à cromatografia em coluna flash (gel de sílica, metanol a 2 % em diclorometano). As frações puras foram coletadas e combinadas e o excesso de eluente foi removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida para se obter o desejado produto 57 (920 mg, 80 %). LC/MS, 3,60 min (ES+) m/z (intensidade relativa) 838,18 ($[M + H]^+$, 100), RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,55 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 7,68 (s, 1H), 7,52 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 7,31 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 6,77 (s, 1H), 6,71 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 6,13 (s, 1H), 5,97 - 5,82 (m, $J = 5,7$ Hz, 1H), 5,41 - 5,15 (m, 3H), 5,10 (d, $J = 3,5$ Hz, 2H), 4,76 - 4,42 (m, 5H), 4,03 (t, $J = 6,6$ Hz, 1H), 3,77 (s, 5H), 2,84 (dd, $J = 16,7, 10,4$ Hz, 1H), 2,26 - 2,08 (m, 2H), 1,68 (s, 3H), 1,44 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H), 1,30 (dt, $J = 14,7, 7,4$ Hz, 3H), 1,12 (s, 9H), 1,10 (s, 9H), 0,96 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H), 0,93 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H).

(c) *11-hidróxi-7-metóxi-2-metil-5-oxo-8-((tri-isopropilsilil)óxi)-11,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepino-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-(2-(1-((1-(alilóxi)-4-metil-1,2-dioxopentan-3-il)amino)-1-oxopropan-2-il)hidrazinil)benzila (58)*

[0511]Sulfóxido de dimetila (0,2 mL, 2,75 mmol, 2,5 eq) foi adicionado, às gotas, a uma solução de cloreto de oxalila (0,11 mL, 1,32 mmol, 1,2 eq) em diclorometano seco (7 mL) a -78 °C (banho de gelo seco/acetona) sob uma atmosfera de argônio. Após 10 minutos, uma solução de 57 (920 mg, 1,10 mmol) em diclorometano seco (5 mL) foi adicionada lentamente com a temperatura ainda a -78 °C. Após 15 min, trietilamina (0,77 mL, seca sobre peneiras moleculares 4Å, 5,50 mmol, 5 eq) foi adicionado, às gotas, e o banho de gelo seco/acetona foi removido. A mistura de reação foi deixada atingir a temperatura ambiente e foi extraída com ácido clorídrico frio (0,1 M), bicarbonato de sódio aquoso saturado e salmoura. A fase orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio, filtrada e o excesso de diclorometano foi removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi submetido à cromatografia em coluna flash (gel de sílica; gradiente metanol a 2 % para metanol a

5 % em diclorometano). As frações puras foram coletadas e combinadas e a remoção do excesso de eluente por evaporação rotativa sob pressão reduzida proporcionou o produto 58 (550 mg, 60 %). LC/MS, 3,43 min (ES+) m/z (intensidade relativa) 836,01 ($[M]^+$, 100). RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,39 (s, 1H), 7,52 - 7,40 (m, 2H), 7,21 - 7,08 (m, $J = 11,5$ Hz, 2H), 6,67 (s, 1H), 6,60 - 6,47 (m, $J = 7,4$ Hz, 1H), 5,97 - 5,83 (m, 1H), 5,79 - 5,66 (m, 1H), 5,38 - 4,90 (m, 6H), 4,68 - 4,52 (m, $J = 18,4, 5,5$ Hz, 4H), 4,04 - 3,94 (m, $J = 6,5$ Hz, 1H), 3,87 - 3,76 (m, 5H), 3,00 - 2,88 (m, 1H), 2,66 - 2,49 (m, 2H), 2,21 - 2,08 (m, 2H), 1,76 (s, 3H), 1,45 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H), 1,09 - 0,98 (m, $J = 8,9$ Hz, 18H), 0,96 (d, $J = 6,7$ Hz, 3H), 0,93 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H).

(d) *11-((terc-butildimetilsilil)óxi)-7-metóxi-2-metil-5-oxo-8-((tri-isopropilsilil)óxi)-11,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepino-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-(2-(1-((1-(alilóxi)-4-metil-1,2-dioxopentan-3-il)amino)-1-oxopropan-2-il)hidrazinil)benzila (59)*

[0512] *Terc-butildimetilsililtriflato* (0,38 mL, 1,62 mmol, 3 eq) foi adicionado a uma solução de composto 58 (450 mg, 0,54 mmol) e 2,6-lutidina (0,25 mL, 2,16 mmol, 4 eq) em diclorometano seco (5 mL) a 0 °C sob argônio. Após 10 min, o banho frio foi removido e a mistura de reação foi agitada na temperatura ambiente por 1 hora. A mistura de reação foi extraída com água, bicarbonato de sódio aquoso saturado e salmoura. A fase orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio, filtrada e o excesso de solvente foi removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi submetido à cromatografia em coluna flash (gel de sílica; hexano/acetato de etila 50/50 v/v). As frações puras foram coletadas e combinadas e o excesso de eluente foi removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida para se obter o produto 59 (334 mg, 65 %). LC/MS, 4,18 min (ES+) m/z (intensidade relativa) 950,50 ($[M]^+$, 100). RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,53 (s, 1H), 8,02 (s, 1H), 7,44 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H), 7,21 (s, 1H), 7,08 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), 6,72 - 6,61 (m, $J = 8,9$ Hz, 2H), 6,16 (s, 1H), 5,97 - 5,79 (m, $J = 24,4, 7,5$ Hz, 2H), 5,41 - 5,08 (m, 5H), 4,86

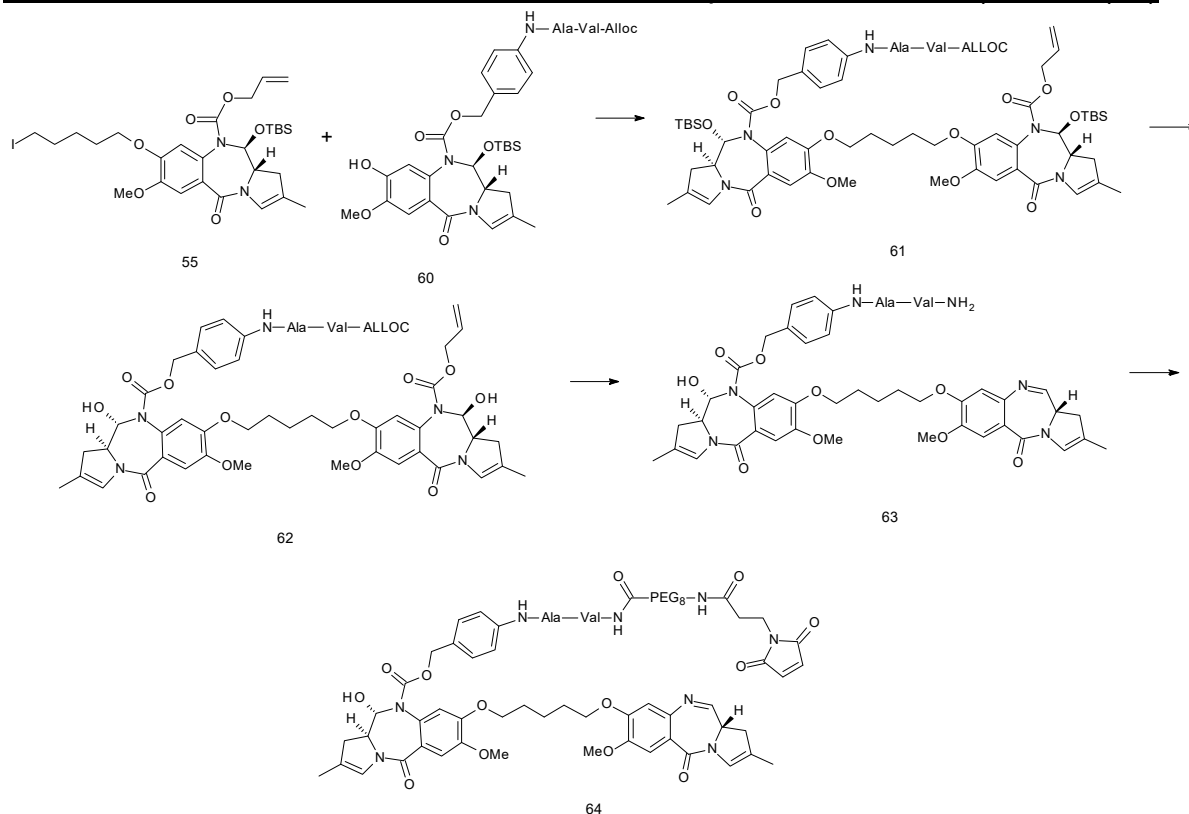
(d, $J = 12,5$ Hz, 1H), 4,69 - 4,60 (m, 1H), 4,57 (s, 1H), 4,03 (t, $J = 6,7$ Hz, 1H), 3,87 (s, 3H), 3,74 (td, $J = 9,6, 3,6$ Hz, 1H), 2,43 - 2,09 (m, $J = 34,8, 19,4, 11,7$ Hz, 3H), 1,76 (s, 3H), 1,43 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H), 1,30 - 1,21 (m, 3H), 0,97 (d, $J = 6,7$ Hz, 3H), 0,92 (t, $J = 8,4$ Hz, 3H), 0,84 (s, 9H), 0,23 (s, 3H), 0,12 (s, 3H).

(e) *11-((terc-butildimetilsilil)óxi)-8-hidróxi-7-metóxi-2-metil-5-oxo-11,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepino-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-(2-(1-((1-(alilóxi)-4-metil-1,2-dioxopentan-3-il)amino)-1-oxopropan-2-il)hidrazinil)benzila (60)*

[0513]Acetato de lítio (50 mg, 0,49 mmol) foi adicionado a uma solução de composto 59 (470 mg, 0,49 mmol) em dimetilformamida úmida (4 mL, DMF/água 50:1). Após 4 horas, a reação foi concluída e a mistura de reação foi diluída com acetato de etila e lavada com ácido cítrico (pH ~ 3), água e salmoura. A camada orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio, filtrada e o excesso de acetato de etila foi removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi submetido à cromatografia em coluna flash (gel de sílica; gradiente, hexano/acetato de etila 50/50 a 25/75 v/v). As frações puras foram coletadas e combinadas e o excesso de eluente foi removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida para se obter o produto 60 (400 mg, quantitativo). LC/MS, 3,32 min (ES+) m/z (intensidade relativa) 794,18 ($[M + H]^+$, 100). RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,53 (s, 1H), 8,02 (s, 1H), 7,44 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H), 7,21 (s, 1H), 7,08 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), 6,72 - 6,61 (m, $J = 8,9$ Hz, 2H), 6,16 (s, 1H), 5,97 - 5,79 (m, $J = 24,4, 7,5$ Hz, 2H), 5,41 - 5,08 (m, 5H), 4,86 (d, $J = 12,5$ Hz, 1H), 4,69 - 4,60 (m, 1H), 4,57 (s, 1H), 4,03 (t, $J = 6,7$ Hz, 1H), 3,87 (s, 3H), 3,74 (td, $J = 9,6, 3,6$ Hz, 1H), 2,43 - 2,09 (m, $J = 34,8, 19,4, 11,7$ Hz, 3H), 1,76 (s, 3H), 1,43 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H), 1,30 - 1,21 (m, 3H), 0,97 (d, $J = 6,7$ Hz, 3H), 0,92 (t, $J = 8,4$ Hz, 3H), 0,84 (s, 9H), 0,23 (s, 3H), 0,12 (s, 3H).

(iv) 11-hidróxi-7-metóxi-8-(((S)-7-metóxi-2-metil-5-oxo-5,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)óxi)pentil)óxi)-2-metil-5-oxo-11,11a-di-hidro-

1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepino-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-((2S,5S)-37-(2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)-5-isopropil-2-metil-4,7,35-trioxo-10,13,16,19,22,25,28,31-octaoxa-3,6,34-triaza-heptatriacontanamido)benzila (64)



(a) 8-((5-(((11S)-10-(((4-(2-(1-((1-(alilóxi)-4-metil-1,2-dioxopentan-3-il)amino)-1-oxopropan-2-il)hidrazinil)benzil)óxi)carbonil)-11-((terc-butildimetilsilil)óxi)-7-metóxi-2-metil-5-oxo-5,10,11,11a-tetra-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)óxi)pentil)óxi)-11-((terc-butildimetilsilil)óxi)-7-metóxi-2-metil-5-oxo-11,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepino-10(5H)-carboxilato de (11S)-alila (61)

[0514]Carbonato de potássio (70 mg, 0,504 mmol, 1 eq) foi adicionado a uma solução de 55 (370 mg, 0,552 mmol, 1,2 eq) e fenol 60 (400 mg, 0,504 mmol) em acetona seca (25 mL). A reação foi agitada por 8 horas a 70 °C. A LC/MS mostrou que todo o material de partida não foi consumido, de modo que a reação foi deixada agitar durante a noite na temperatura ambiente e agitada por um adicional de 2 horas no dia seguinte. Acetona foi removida por evaporação rotativa sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi submetido à cromatografia em coluna flash (gel de

silica; acetato de etila a 80 % em hexano para acetato de etila a 100 %). As frações puras foram coletadas e combinadas e o excesso de eluente foi removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida para se obter o produto 61 (385 mg, 57 %). LC/MS, 4,07 min (ES+) m/z (intensidade relativa) 1336,55 ($[M + H]^+$, 50).

(b) *8-((5-(((11S)-10-(((4-(2-(1-((1-(alilóxi)-4-metil-1,2-dioxopentan-3-il)amino)-1-oxopropan-2-il)hidrazinil)benzil)óxi)carbonil)-11-hidróxi-7-metóxi-2-metil-5-oxo-5,10,11,11a-tetra-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)óxi)pentil)óxi)-11-hidróxi-7-metóxi-2-metil-5-oxo-11,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepino-10(5H)-carboxilato de (11S)-alila (62)*

[0515]Fluoreto de tetra-*n*-butilamônio (1M, 0,34 mL, 0,34 mmol, 2 eq) foi adicionado a uma solução de 61 (230 mg, 0,172 mmol) em tetra-hidrofurano seco (3 mL). O material de partida foi totalmente consumido após 10 minutos. A mistura de reação foi diluída com acetato de etila (30 mL) e lavada sequencialmente com água e salmoura. A fase orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio, filtrada e o excesso de acetato de etila removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida. O resíduo resultante 62 foi usado como uma mistura bruta para a próxima reação. LC/MS, 2,87 min (ES+) m/z (intensidade relativa) 1108,11 ($[M + H]^+$, 100).

(c) *11-hidróxi-7-metóxi-8-((5-((7-metóxi-2-metil-5-oxo-5,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)óxi)pentil)óxi)-2-metil-5-oxo-11,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepino-10(5H)-carboxilato de (11S)-4-(2-(1-((1-amino-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)hidrazinil)benzila (63)*

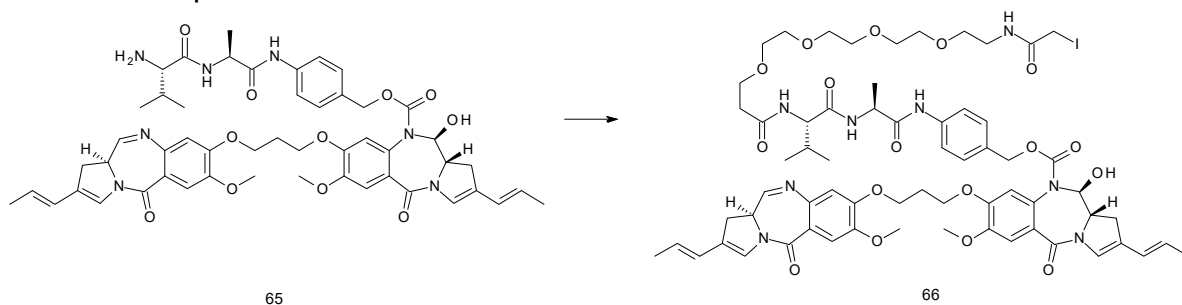
[0516]*Tetrakis*(trifenilfosfino)paládio(0) (12 mg, 0,01 mmol, 0,06 eq) foi adicionado a uma solução de 62 bruto (0,172 mmol) e pirrolidina (36 μ L, 0,43 mmol, 2,5 eq) em diclorometano seco (10 mL). A mistura de reação foi agitada por 20 minutos e diluída com diclorometano e lavada sequencialmente com aquoso cloreto de amônio saturado e salmoura. A fase orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio, filtrada e o excesso de diclorometano removido por evaporação rotativa sob pressão reduzi-

da. O resíduo resultante 63 foi usado como uma mistura bruta para a próxima reação. LC/MS, 2,38 min (ES+) m/z (intensidade relativa) 922,16 ($[M + H]^+$, 40).

(d) 11-hidróxi-7-metóxi-8-((5-(((S)-7-metóxi-2-metil-5-oxo-5,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)óxi)pentil)óxi)-2-metil-5-oxo-11,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepino-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-((2S,5S)-37-(2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)-5-isopropil-2-metil-4,7,35-trioxo-10,13,16,19,22,25,28,31-octaoxa-3,6,34-triaza-heptatriacontanamido)benzila (64)

[0517]1-Etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodi-imida (EDCI, 33 mg, 0,172 mmol) foi adicionada a uma solução de 63 bruto (0,172 mmol) e Mal-(PEG)₈-ácido (100 mg, 0,172 mmol) em diclorometano seco (10 mL). A reação foi agitada por 2 horas e a presença do material de partida não foi observada por LC/MS. A reação foi diluída com diclorometano e lavada sequencialmente com água e salmoura. A fase orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio, filtrada e o excesso de diclorometano removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi submetido à cromatografia em coluna flash (gel de sílica; clorofórmio a 100 % para metanol a 10 % em clorofórmio). As frações puras foram coletadas e combinadas e o excesso de eluente foi removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida para se obter 64 (E) (60 mg, 25 % ao longo de 3 etapas).

Exemplo 8



Composto 65 é o composto 79 de WO 2011/130598

11-hidróxi-7-metóxi-8-(3-((7-metóxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-en-1-il)-5,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)óxi)propóxi)-5-oxo-2-((E)-prop-1-en-1-il)-11,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepino-10(5H)-carboxilato de

(11S)-4-(1-iodo-20-isopropil-23-metil-2,18,21-trioxo-6,9,12,15-tetraoxa-3,19,22-triazatetracosanamido)benzila (66)

[0518]*N,N'*-di-isopropilcarbodi-imida (DIC, 4,71 μ L, 0,0304 mmol) foi adicionada a uma solução de amina 65 (0,0276 mmol) e Iodo-(PEG)₄-ácido (13,1 mg, 0,0304 mmol) em diclorometano seco (0,8 mL). A reação foi agitada por 3 horas e a presença do material de partida não foi observada por LC/MS. A mistura de reação foi diretamente carregada sobre uma placa de cromatografia de camada fina (TLC) e purificado por TLC preparativa (metanol a 10 % em clorofórmio). As bandas puras foram raspadas fora da placa de TLC, tomadas em metanol a 10 % em clorofórmio, filtradas e o excesso de eluente removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida para se obter 66 (D) (20,9 mg, 56 %). LC/MS, Método 2, 3,08 min (ES+) *m/z* (intensidade relativa) 1361,16 ($[M + H]^+$, 100).

Métodos Experimentais Gerais para Exemplo 9

[0519]Dados de LCMS foram obtidos usando uma LC/MS série 1200 Agilent com uma MS quadrupolo 6110 Agilent, com ionização por Electrospray. Fase Móvel A - ácido acético a 0,1 % em água. Fase Móvel B - 0,1 % em acetonitrila. Taxa de fluxo de 1,00 mL/min. Gradiente de 5 % de B variando até 95 % de B ao longo de 3 minutos, remanescente a 95 % de B por 1 minuto e, em seguida, de volta para 5 % de B ao longo de 6 segundos. O tempo total conduzido é 5 minutos. Coluna: Phenomenex Gemini-NX 3 μ m C18, 30 x 2,00 mm. Cromatogramas com base em detecção UV a 254 nm. Espectros de Massas foram obtidos usando a MS em modo positivo. Os valores de desvio químico de RMN de próton foram medidos na escala de delta a 400 MHz usando um AV400 Bruker. As abreviações seguintes foram usadas: s, singlete; d, dublete; t, tripleto; q, quarteto; m, multiplete; br, amplo. As constantes de acoplamento são relatadas em Hz. A menos que de outro modo estabelecido, cromatografia em coluna (pelo procedimento flash) foi realizada em sílica de Merck Kieselgel (Técnica. 9385). Os dados de espectroscopia de massas (MS) foram cole-

tados usando um instrumento de LCT Micromass Waters acoplado a um módulo de separações de HPLC 2795 Waters. Cromatografia de Camada Fina (TLC) foi realizada em placas de alumínio em gel de sílica (Merck 60, F₂₅₄). Todos os outros produtos químicos e solventes foram adquiridos a partir da Sigma-Aldrich ou Fisher Scientific e foram usados como fornecidos sem purificação adicional.

[0520]As rotações ópticas foram medidas em um polarímetro ADP 220 (Bellingham Stanley Ltd.) e concentrações (*c*) são dadas em g/100 mL. Os pontos de fusão foram medidos usando um aparelho de ponto de fusão digital (Electrothermal). Os espectros de IR foram registrados em um Espectrômetro Perkin-Elmer Spectrum 1000 FT IR. Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C foram adquiridos a 300 K usando um espectrômetro de RMN Avance Bruker a 400 e 100 MHz, respectivamente. Os desvios químicos são relatados em relação a TMS ($\delta = 0,0$ ppm), e os sinais são designados como s (singleto), d (dubleto), t (tripleto), dt (duplo tripleto), dd (dubleto de dubletos), ddd (duplo dubleto de dubletos) ou m (multiplete), com acoplamento constante dado em Hertz (Hz). Os dados de espectroscopia de massas (MS) foram coletados usando um instrumento ZQ Micromass Waters acoplado a um HPLC 2695 Waters com um PDA 2996 Waters. Os parâmetros de ZQ Micromass Waters usados foram: Capilar (kV), 3,38; Cone (V), 35; Extrator (V), 3,0; Temperatura fonte (°C), 100; Temperatura de Dessolvatação (°C), 200; Taxa de fluxo de cone (L/h), 50; Taxa de fluxo de dessolvatação (L/h), 250. Os dados de espectroscopia de massas de alta resolução (HRMS) foram registrados em um Waters Micromass QTOF Global em modo W positivo usando pontas de vidro de borossilicato revestidas com metal para introduzir as amostras no instrumento. Cromatografia de Camada Fina (TLC) foi realizada em placas de alumínio em gel de sílica (Merck 60, F₂₅₄), e a cromatografia flash utilizou gel de sílica (Merck 60, malha 230 - 400 ASTM). Exceto para HOBt (NovaBiochem) e reagentes suportados em sólidos (Argonaut), todos os outros produtos químicos e solventes foram adquiridos a partir da Sigma-Aldrich e foram usa-

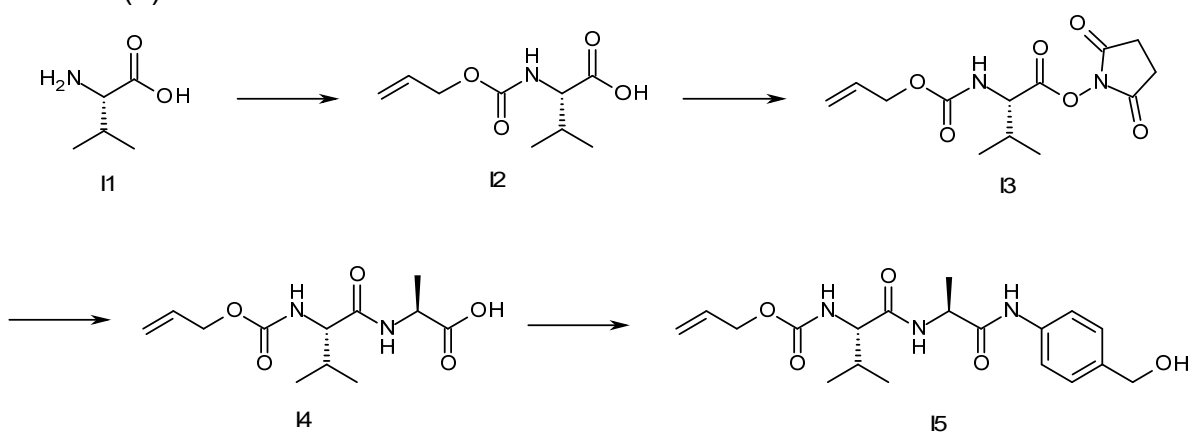
dos como fornecidos sem purificação adicional. Os solventes de anidro foram preparados por destilação sob uma atmosfera de nitrogênio seca na presença de um agente de secagem apropriado, e foram armazenados sobre peneiras moleculares 4Å ou fios de sódio. Éter de petróleo refere-se à fração em ebulição entre 40 a 60 °C.

[0521]Condições de LC/MS gerais: A HPLC (Waters Alliance 2695) foi conduzida usando uma fase móvel de água (A) (ácido fórmico 0,1 %) e acetonitrila (B) (ácido fórmico 0,1 %). Gradiente: composição inicial 5 % de B ao longo de 1,0 min, em seguida, 5 % de B a 95 % de B dentro de 3 min. A composição foi mantida por 0,5 min a 95 % de Be, em seguida, voltou a 5 % de B em 0,3 min. Tempo de gradiente de total conduzido igual a 5 min. Taxa de fluxo 3,0 mL/min, 400 µL foram divididos *via* uma peça em T de volume morto nulo que passa no espectrômetro de massas. Faixa de detecção de comprimento de onda: 220 a 400 nm. Tipo de função: arranjo de diodos (535 varreduras). Coluna: Phenomenex® Onyx Monolithic C18 50 x 4,60 mm.

Exemplo 9

(i) Intermediários Chaves

(a)



(a-i) ácido (S)-2-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanóico (12)

[0522]Cloroformiato de alila (36,2 ml, 340,59 mmol, 1,2 eq) foi adicionado, às gotas, a uma solução agitada de L-valina (11) (33,25 g, 283,82 mmol, 1,0 eq) e car-

bonato de potássio (59,27 g, 425,74 mmol, 1,5 eq) em água (650 mL) e THF (650 mL). A mistura de reação foi agitada na temperatura ambiente por 18 horas, em seguida, o solvente foi concentrado sob pressão reduzida e a solução remanescente extraída com éter dietílico (3 x 100 mL). A porção aquosa foi acidificada ao pH 2 com HCl conc. e extraída com DCM (3 x 100 mL). Os orgânicos combinados foram lavados com salmoura, secos sobre MgSO₄, filtrados e concentrados sob pressão reduzida para se obter o produto como um óleo incolor (57,1 g, considerado 100 % de rendimento). LC/MS (1,966 min (ES⁺)), *m/z*: 202,1 [M + H]⁺. RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12,57 (br s, 1H), 7,43 (d, 1H, *J* = 8,6 Hz), 5,96 - 5,86 (m, 1H), 5,30 (ddd, 1H, *J* = 17,2, 3,4, 1,7 Hz), 5,18 (ddd, 1H, *J* = 10,4, 2,9, 1,6 Hz), 4,48 (dt, 2H, *J* = 5,3, 1,5 Hz), 3,85 (dd, 1H, *J* = 8,6, 6,0 Hz), 2,03 (oct, 1H, *J* = 6,6 Hz), 0,89 (d, 3H, *J* = 6,4 Hz), 0,87 (d, 3H, *J* = 6,5 Hz).

(a-ii) (S)-2,5-dioxopirrolidin-1-il 2-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanoato (I3)

[0523]A uma solução agitada do ácido protegido I2 (60,6 g, 301,16 mmol, 1,0 eq) e N-hidroxissuccinimida (34,66 g, 301,16 mmol, 1,0 eq) em THF seco (800 mL) foi adicionado diciclo-hexilcarbodi-imida (62,14 g, 301,16 mmol, 1 eq). A reação foi agitada por 18 horas na temperatura ambiente. A mistura de reação depois foi filtrada, o sólido lavado com THF e o filtrado combinado foi concentrado sob pressão reduzida. O resíduo foi redissolvido em DCM e deixado repousar a 0 °C por 30 minutos. A suspensão foi filtrada e lavada com DCM frio. A concentração do filtrado sob pressão reduzida proporcionou o produto como um óleo incolor viscoso (84,7 g, considerado 100 % de rendimento) que foi usado na próxima etapa sem purificação adicional. LC/MS (2,194 min (ES⁺)), *m/z*: 321,0 [M + Na]⁺. RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,0 (d, 1H, *J* = 8,3 Hz), 5,97 - 5,87 (m, 1H), 5,30 (ddd, 1H, *J* = 17,2, 3,0, 1,7 Hz), 5,19 (ddd, 1H, *J* = 10,4, 2,7, 1,4 Hz), 4,52 (dt, 2H, *J* = 5,3, 1,4 Hz), 4,32 (dd, 1H, *J* = 8,3, 6,6 Hz), 2,81 (m, 4H), 2,18 (oct, 1H, *J* = 6,7 Hz), 1,00 (d, 6H, *J* = 6,8 Hz).

(a-iii) ácido (S)-2-((S)-2-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanamido)propanoico

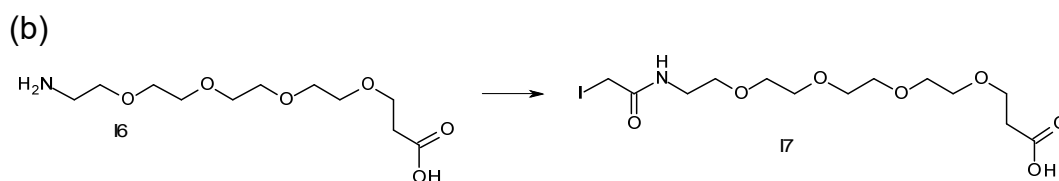
(14)

[0524]Uma solução de éster succinimida I3 (12,99 g, 43,55 mmol, 1,0 eq) em THF (50 mL) foi adicionada a uma solução de L-alanina (4,07 g, 45,73 mmol, 1,05 eq) e NaHCO₃ (4,02 g, 47,90 mmol, 1,1 eq) em THF (100 mL) e H₂O (100 mL). A mistura foi agitada na temperatura ambiente por 72 horas quando o THF foi removido sob pressão reduzida. O pH foi ajustado entre 3 a 4 com ácido cítrico para precipitar uma goma branca. Depois da extração com acetato de etila (6 x 150 mL), os orgânicos combinados foram lavados com H₂O (200 mL), secos sobre MgSO₄, filtrados e concentrados sob pressão reduzida. A trituração com éter dietílico proporcionou o produto como um pó branco que foi coletado por filtração e lavado com éter dietílico (5,78 g, 49 %). LC/MS (1,925 min (ES⁺)), *m/z*: 273,1 [M + H]⁺. RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12,47 (br s, 1H), 8,17 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz), 7,16 (d, 1H, *J* = 9,0 Hz), 5,95 - 5,85 (m, 1H), 5,29 (dd, 1H, *J* = 17,2, 1,7 Hz), 5,17 (dd, 1H, *J* = 10,4, 1,5 Hz), 4,46 (m, 2H), 4,18 (quin, 1H, *J* = 7,2 Hz), 3,87 (dd, 1H, *J* = 9,0, 7,1 Hz), 1,95 (oct, 1H, *J* = 6,8 Hz), 1,26 (d, 3H, *J* = 7,3 Hz), 0,88 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz), 0,83 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz).

(a-iv) (S)-1-((S)-1-(4-(hidroximetil)fenilamino)-1-oxopropan-2-ilamino)-3-metil-1-oxobutan-2-ilcarbamato de alila (15)

[0525]EEDQ (5,51 g, 22,29 mmol, 1,05 eq) foi adicionado a uma solução de álcool *p*-aminobenzílico (2,74 g, 22,29 mmol, 1,05 eq) e ácido I4 (5,78 g, 21,23 mmol, 1 eq) em THF seco (100 mL), e agitada na temperatura ambiente por 72 horas. A mistura de reação depois foi concentrada sob pressão reduzida e o sólido marrom resultante foi triturado com éter dietílico e filtrado com lavagem subsequente com um excesso de éter dietílico para se obter o produto como um sólido branco amarelado (7,1 g, 88 %). LC/MS (1,980 min (ES⁺)), *m/z*: 378,0 [M + H]⁺. RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,89 (br s, 1H), 8,13 (d, 1H, *J* = 7,0 Hz), 7,52 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz), 7,26 (m, 1H), 7,23 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz), 5,91 (m, 1H), 5,30 (m, 1H), 5,17 (m, 1H),

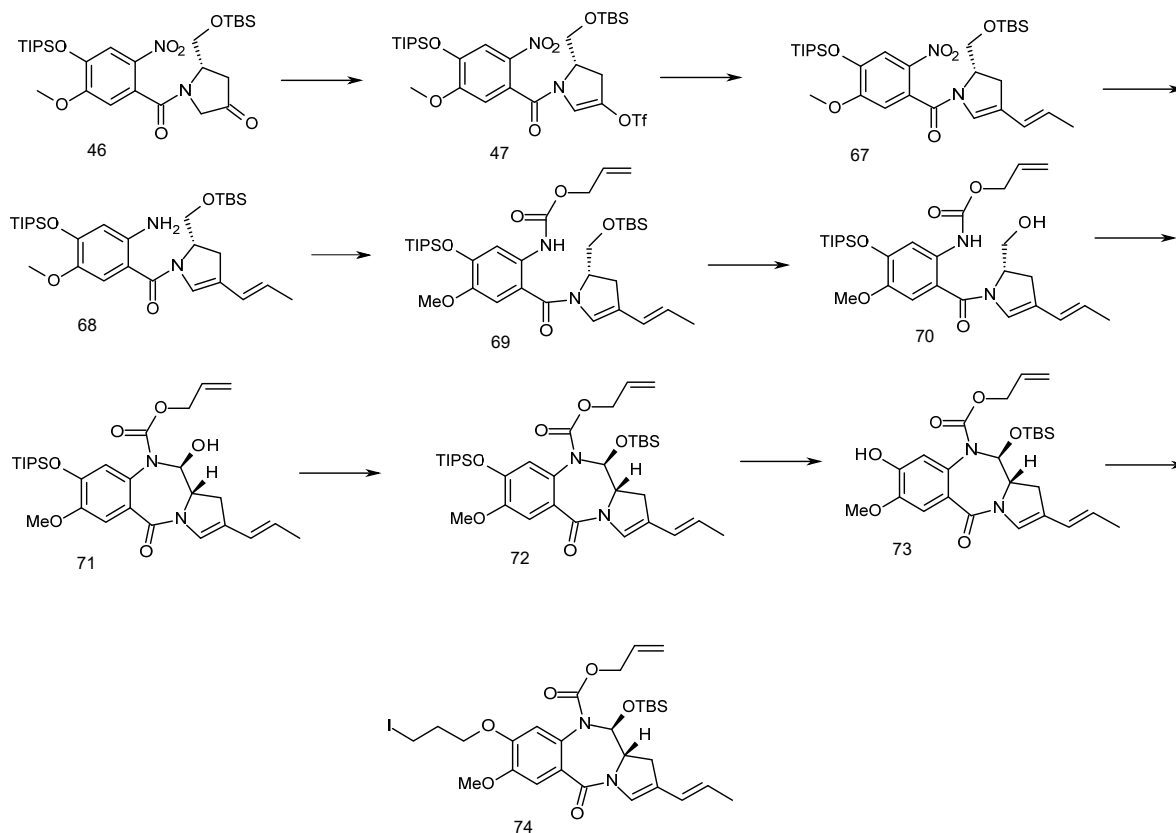
4,46 (m, 2H), 5,09 (t, 1H, $J = 5,6$ Hz), 4,48 (m, 2H), 4,42 (m, 3H), 3,89 (dd, 1H, $J = 8,6, 6,8$ Hz), 1,97 (m, 1H), 1,30 (d, 3H, $J = 7,1$ Hz), 0,88 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz), 0,83 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz).



Ácido 1-iodo-2-oxo-6,9,12,15-tetraoxa-3-azaoctadecan-18-óico (17)

[0526]Uma solução de anidrido iodoacético (0,250 g, 0,706 mmol, 1,1 eq) em DCM seco (1 mL) foi adicionada a amino-PEG₍₄₎-ácido 16 (0,170 g, 0,642 mmol, 1,0 eq) em DCM (1 mL). A mistura foi agitada no escuro na temperatura ambiente durante a noite. A mistura de reação foi lavada com HCl 0,1 M, água, seca sobre MgSO₄, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia flash (gel de sílica, MeOH a 3 % e ácido fórmico a 0,1 % em clorofórmio para MeOH a 10 % e ácido fórmico a 0,1 % em clorofórmio) para se obter o produto como um óleo laranja (0,118 g, 42 %). LC/MS (1,623 min (ES⁺)), m/z : 433.,98 [M + H]⁺. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,069 (s, 1H), 7,22 (br s, 1H), 3,79 (t, 2H, $J = 5,8$ Hz), 3,74 (s, 2H), 3,72 - 3,58 (m, 14H), 3,50 - 3,46 (m, 2H), 2,62 (t, 2H, $J = 5,8$ Hz).

(ii) 11-(terc-butildimetilsililóxi)-8-(3-iodopropóxi)-7-metóxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-11,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepino-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-alila (74)



(a) trifluorometanossulfonato de (S)-5-((terc-butildimetilsililóxi)metil)-1-(5-metóxi-2-nitro-4-(tri-isopropilsililóxi)benzoil)-4,5-di-hidro-1H-pirrol-3-ila (47)

[0527]Anidrido trifílico (28,4 g, 100,0 mmol, 3,0 eq) foi adicionado, às gotas, ao longo de 25 min, a uma solução vigorosamente agitada da cetona 46 (19,5 g, 30,0 mmol, 1,0 eq) em DCM (550 mL) contendo 2,6-lutidina (14,4 g, 130,0 mmol, 4,0 eq) a -50 °C. A mistura de reação foi agitada por 1,5 h quando a LC/MS indicou reação completa. A fase orgânica foi lavada sucessivamente com água (100 mL), bicarbonato de sódio saturado (150 mL), salmoura (50 mL), e a fase orgânica foi seca sobre MgSO₄, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia flash (gel de sílica, *n*-hexano/EtOAc 90/10 v/v) para se obter o produto como um óleo amarelo claro (19,5 g, 82 %). LC/MS (4,391 min (ES⁺)), *m/z*: 713,25 [M + H]⁺. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,68 (s, 1H), 6,72 (s, 1H), 6,02 (t, 1H, *J* = 1,9 Hz), 4,75 (m, 1H), 4,05 (m, 2H), 3,87 (s, 3H), 3,15 (ddd, 1H, *J* = 16,2, 10,3, 2,3 Hz), 2,96 (ddd, 1H, *J* = 16,2, 4,0, 1,6 Hz), 1,28 - 1,21 (m, 3H), 1,07 (d, 18H,

$J = 7,2 \text{ Hz}$, 0,88 (s, 9H), 0,09 (s, 3H), 0,08 (s, 3H).

(b) *(S,E)*-(2-((*terc*-butildimetilsililóxi)metil)-4-(*prop*-1-enil)-2,3-di-hidro-1H-pirrol-1-il)(5-metóxi-2-nitro-4-(*tri*-isopropilsililóxi)fenil)metanona (67)

[0528]Tetrakis(trifenilfosfino)paládio(0) (0,41 g, 0,35 mmol, 0,03 eq) foi adicionado a uma mistura do triflato 47 (8,4 g, 11,8 mmol, 1,0 eq), ácido *E*-1-propeno-1-ilborônico (1,42 g, 16,5 mmol, 1,4 eq) e fosfato de potássio (5,0 g, 23,6 mmol, 2,0 eq) em dioxano seco (60 mL) sob uma atmosfera de nitrogênio. A mistura foi agitada a 25 °C por 120 min quando a LC/MS indicou reação completa. Acetato de etila (120 mL) e água (120 mL) foram adicionados, a fase orgânica foi removida, lavada com salmoura (20 mL), seca sobre MgSO₄, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia flash (gel de sílica, *n*-hexano/EtOAc 95/5 v/v para *n*-hexano/EtOAc 90/10 v/v) para se obter o produto como uma espuma amarela (4,96 g, 70 %). LC/MS (4,477 min (ES⁺)), m/z : 605,0 [M + H]⁺. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,67 (s, 1H), 6,74 (s, 1H), 5,93 (d, 1H, $J = 15,4 \text{ Hz}$), 5,67 (s, 1H), 4,65 (m, 1H), 4,04 (m, 2H), 3,86 (s, 3H), 2,85 (m, 1H), 2,71 (m, 1H), 1,72 (dd, 3H, $J = 6,8, 1,0 \text{ Hz}$), 1,30 - 1,22 (m, 3H), 1,07 (d, 18H, $J = 7,2 \text{ Hz}$), 0,87 (s, 9H), 0,08 (s, 3H), 0,07 (s, 3H).

(c) *(S,E)*-(2-amino-5-metóxi-4-(*tri*-isopropilsililóxi)fenil)(2-((*terc*-butildimetilsililóxi)metil)-4-(*prop*-1-enil)-2,3-di-hidro-1H-pirrol-1-il)metanona (68)

[0529]Pó de zinco (22,0 g, 0,33 mol, 37 eq) foi adicionado, em porções ao longo de 20 min, a uma solução do intermediário de propenila 67 (5,5 g, 9,1 mmol, 1,0 eq) em ácido fórmico/etanol a 5 % v/v (55 mL), usando um banho de gelo para manter a temperatura entre 25 a 30 °C. Após 30 min, a mistura de reação foi filtrada através de um leito curto de celite®. A celite® foi lavada com acetato de etila (65 mL) e os orgânicos combinados foram lavados sucessivamente com água (35 mL), bicarbonato de sódio saturado (35 mL) e salmoura (10 mL). A fase orgânica foi seca sobre MgSO₄, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado

por cromatografia flash (gel de sílica, *n*-hexano/EtOAc 90/10 v/v) para se obter o produto como um óleo amarelo claro (3,6 g, 69,0 %). LC/MS (4,439 min (ES⁺)), *m/z*: 575,2 [M + H]⁺. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 6,75 (m, 1H), 6,40 (br s, 1H), 6,28 (m, 1H), 6,11 (d, 1H, *J* = 15,4 Hz), 5,53 (m, 1H), 4,67 (m, 1H), 4,36 (m, 2H), 3,93 (br s, 1H), 3,84 (br s, 1H), 3,73 (s, 3H), 2,86 (dd, 1H, *J* = 15,7, 10,4 Hz), 2,73 (dd, 1H, *J* = 15,9, 4,5 Hz), 1,80 (dd, 3H, *J* = 6,8, 1,3 Hz), 1,35 - 1,23 (m, 3H), 1,12 (d, 18H, *J* = 7,3 Hz), 0,89 (s, 9H), 0,08 (s, 3H), 0,07 (s, 3H).

(d) *2-(2-((terc-butildimetilsililóxi)metil)-4-(prop-1-enil)-2,3-di-hidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metóxi-5-(tri-isopropilsililóxi)fenilcarbamato de (S,E)-alila (69)*

[0530]Cloroformiato de alila (0,83 g, 6,88 mmol, 1,1 eq) foi adicionado a uma solução da amina 68 (3,6 g, 6,26 mmol, 1,0 eq) em DCM seco (80 mL) contendo piridina seca (1,09 g, 13,77 mmol, 2,2 eq) a -78 °C. O gelo seco foi removido e a mistura de reação deixada aquecer até a temperatura ambiente. Depois da agitação durante mais 15 minutos, LC/MS indicou reação completa. A fase orgânica foi lavada sucessivamente com HCl 0,01N (50 mL), bicarbonato de sódio saturado (50 mL), salmoura (10 mL), seca sobre MgSO₄, filtrada e concentrada sob pressão reduzida para deixar um óleo amarelo claro que foi usado na próxima etapa sem purificação adicional (4,12g, considerado 100 % de rendimento). LC/MS (4,862 min (ES⁺)), *m/z*: 659,2 [M + H]⁺.

(e) *2-(2-(hidroximetil)-4-(prop-1-enil)-2,3-di-hidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metóxi-5-(tri-isopropilsililóxi)fenilcarbamato de (S,E)-alila (70)*

[0531]O intermediário 69 bruto (considerado 100 % de rendimento, 4,12 g, 6,25 mmol, 1,0 eq) foi dissolvido em uma mistura de ácido acético (70 mL), metanol (10 mL), THF (10 mL) e água (20 mL) e deixado agitar na temperatura ambiente. Após 6 horas, a mistura de reação foi diluída com acetato de etila (500 mL) e lavada sucessivamente com água (2 x 500 mL), bicarbonato de sódio saturado (300 mL) e salmoura (50 mL). A fase orgânica foi seca sobre MgSO₄, filtrada e concentrada sob

pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia flash (gel de sílica, metanol/DCM 1/99 v/v para metanol/DCM 5/95 v/v) para se obter o produto como um óleo amarelo e 1 g de material de partida não reagido foi recuperado. Este material foi submetido às mesmas condições de reação como acima, mas foi deixado agitar por 16 h. Depois de processamento e purificação, produto adicional foi isolado (2,7 g, 79 %, 2 etapas) LC/MS (3,742 min (ES⁺)), *m/z*: 545,2 [M + H]⁺. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,38 (m, 1H), 7,72 (m, 1H), 6,81 (s, 1H), 6,37 (m, 1H), 6,10 (d, 1H, *J* = 15,8 Hz), 5,97 (m, 1H), 5,53 (m, 1H), 5,36 (ddd, 1H, *J* = 17,2, 3,1, 1,5 Hz), 5,25 (ddd, 1H, *J* = 10,4, 2,5, 1,3 Hz), 4,78 (m, 1H), 4,65 (dt, 2H, *J* = 5,7, 1,3 Hz), 3,84 (m, 3H), 3,79 (s, 3H), 3,04 (dd, 1H, *J* = 16,7, 10,5 Hz), 2,40 (dd, 1H, *J* = 16,0, 4,5 Hz), 1,82 (dd, 3H, *J* = 6,8, 1,0 Hz), 1,36 - 1,26 (m, 3H), 1,14 (d, 18H, *J* = 7,3 Hz).

(f) *11-hidróxi-7-metóxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-8-(tri-isopropilsililóxi)-11,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepino-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-alila (71)*

[0532]Dimetil sulfóxido seco (1,16 g, 14,87 mmol, 3,0 eq) foi adicionado, às gotas, a uma solução de cloreto de oxalila (0,94 g, 7,43 mmol, 1,5 eq) em DCM (25 mL) a -78 °C sob uma atmosfera de nitrogênio. Mantendo a temperatura a -78 °C, após 10 min uma solução do álcool primário 70 (2,7 g, 4,96 mmol, 1,0 eq) em DCM (20 mL) foi adicionada às gotas. Após 15 min, trietilamina seca (2,5 g, 24,78 mmol, 5,0 eq) foi adicionada, e a mistura de reação deixada aquecer até a temperatura ambiente. A mistura de reação foi lavada sucessivamente com HCl 0,1N frio (50 mL), hidrogenocarbonato de sódio saturado (50 mL) e salmoura (10 mL) e a camada orgânica foi seca sobre MgSO₄, filtrada e concentrada sob pressão reduzida para se obter o produto como um óleo amarelo que foi usado na próxima etapa sem purificação adicional (2,68 g, considerado 100 % de rendimento). LC/MS (3,548 min (ES⁺)), *m/z*: 543,2 [M + H]⁺.

(g) *11-(terc-butildimetilsililóxi)-7-metóxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-8-(tri-*

isopropilsililóxi)-11,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepino-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-alila (72)

[0533]Sulfonato de *terc*-butildimetilsililtrifluorometano (3,93 g, 14,87 mmol, 3,0 eq) foi adicionado a uma solução da carbinolamina 71 (considerado 100 % de rendimento, 2,68 g, 4,96 mmol, 1,0 eq) e 2,6-lutidina (2,12 g, 19,83 mmol, 4,0 eq) em DCM seco (40 mL) a 0 °C sob uma atmosfera de nitrogênio. Após 10 minutos, a mistura de reação foi deixada aquecer até a temperatura ambiente e agitada durante mais 60 minutos. A fase orgânica foi lavada sucessivamente com água (10 mL), bicarbonato de sódio saturado (10 mL) e salmoura (5 mL), seca sobre MgSO₄, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia flash (gel de sílica, clorofórmio para metanol/clorofórmio 2/98 v/v) para se obter o produto como um óleo amarelo (2,0 g, 63 %, 2 etapas). LC/MS (4,748 min (ES⁺)), *m/z*: 657,2 [M + H]⁺. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,19 (s, 1H), 6,86 (m, 1H), 6,66 (s, 1H), 6,22 (d, 1H, *J* = 15,4 Hz), 5,81 (d, 1H, *J* = 8,8 Hz), 5,78 (m, 1H), 5,48 (m, 1H), 5,11 (d, 1H, *J* = 5,0 Hz), 5,08 (m, 1H), 4,58 (dd, 1H, *J* = 13,4, 5,4 Hz), 4,35 (dd, 1H, *J* = 13,2, 5,7 Hz), 3,83 (s, 3H), 3,76 (s, 1H), 3,00 (dd, 1H, *J* = 15,6, 11,0 Hz), 2,53 (m, 1H), 1,81 (dd, 3H, *J* = 6,8, 0,9 Hz), 1,30 - 1,18 (m, 3H), 1,08 (d, 9H, *J* = 2,3 Hz), 1,06 (d, 9H, *J* = 2,3 Hz), 0,86 (s, 9H), 0,25 (s, 3H), 0,18 (s, 3H).

(h) *11-(terc-butildimetilsililóxi)-8-hidróxi-7-metóxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-11,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepino-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-alila (73)*

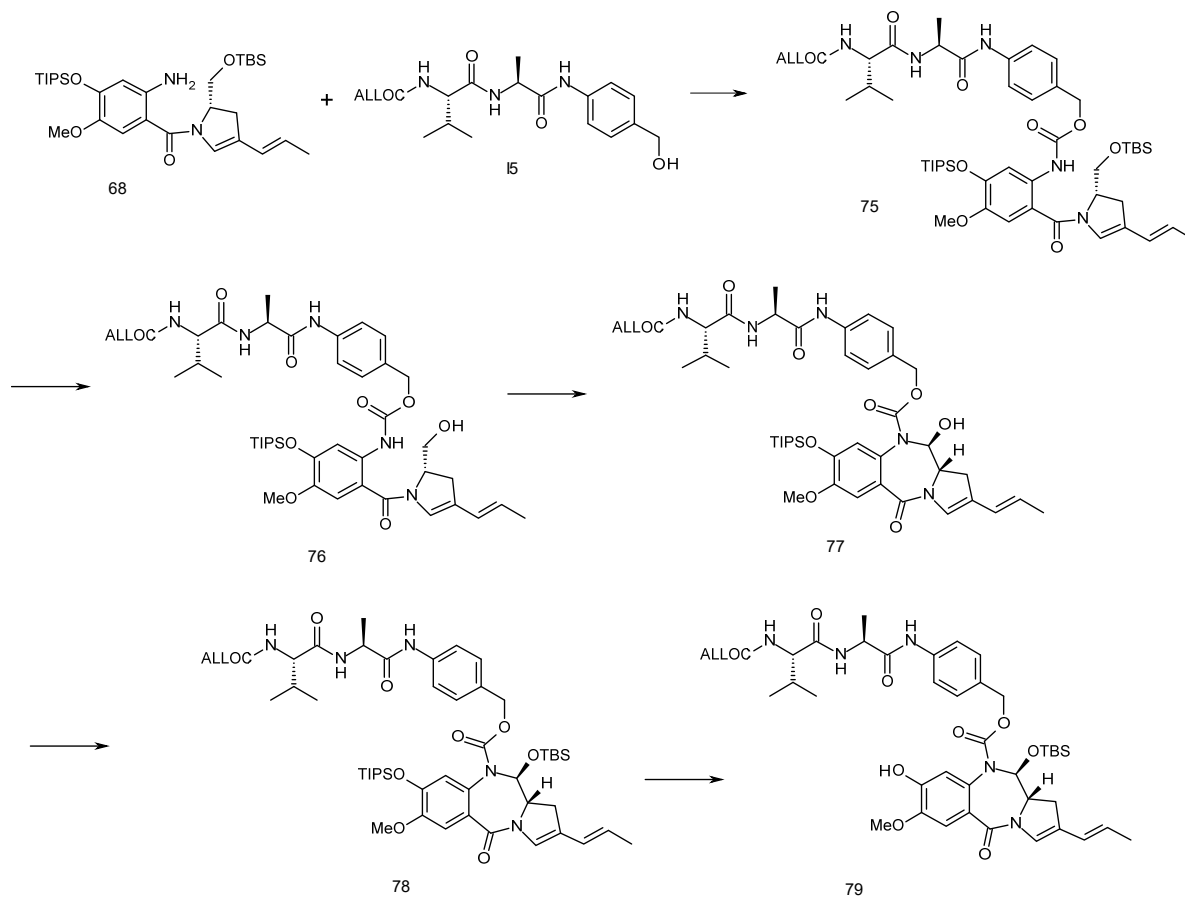
[0534]Acetato de lítio di-hidratado (0,31 g, 3,04 mmol, 1,0 eq) foi adicionado a uma solução da diazepina 72 (2,0 g, 3,04 mmol, 1,0 eq) em DMF úmida (20 mL) a 25 °C e agitada por 4 horas. A mistura de reação foi diluída com acetato de etila (200 mL) e lavada sucessivamente com ácido cítrico 0,1M (50 mL, pH 3), água (50 mL) e salmoura (10 mL), seco sobre MgSO₄, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia flash (gel de sílica, *n*-

hexano/EtOAc 50/50 v/v para *n*-hexano/EtOAc 25/75 v/v) para se obter o produto como um sólido amarelo claro (0,68 g, 45 %). LC/MS (3,352 min (ES⁺)), *m/z*: 501,1 [M + H]⁺. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,02 (s, 1H), 6,66 (m, 1H), 6,53 (s, 1H), 6,03 (d, 1H, *J* = 15,5 Hz), 5,80 (s, 1H), 5,63 (d, 1H, *J* = 8,9 Hz), 5,55 (m, 1H), 5,29 (m, 1H), 4,87 (m, 2H), 4,39 (dd, 1H, *J* = 13,5, 4,2 Hz), 4,20 (dd, 1H, *J* = 13,2, 5,7 Hz), 3,73 (s, 3H), 3,59 (m, 1H), 2,81 (dd, 1H, *J* = 16,1, 10,5 Hz), 2,35 (d, 1H, *J* = 15,7 Hz), 1,61 (d, 3H, *J* = 6,4 Hz), 0,67 (s, 9H), 0,05 (s, 3H), 0,00 (s, 3H).

(i) *11-(terc-butildimetilsililóxi)-8-(3-iodopropóxi)-7-metóxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-11,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepino-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-alila (74)*

[0535]Di-iodopropano (0,295 g, 1,00 mmol, 5,0 eq) e carbonato de potássio (0,028 g, 0,20 mmol, 1,0 eq) foram adicionados a uma solução do fenol 33 (0,100 g, 0,020 mmol, 1,0 eq) em acetona seca (5 mL). A mistura de reação foi aquecida a 60 °C por 6 horas quando a LC/MS mostrou reação completa. A mistura de reação foi concentrada à secura sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado por cromatografia flash (gel de sílica, *n*-hexano/EtOAc 75/25 v/v para *n*-hexano/EtOAc 50/50 v/v) para se obter o produto como um óleo incolor (0,074 g, 56 %). LC/MS (3,853 min (ES⁺)), *m/z*: 669,0 [M + H]⁺. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,26 (s, 1H), 6,90 (s, 1H), 6,68 (s, 1H), 6,24 (d, 1H, *J* = 15,3 Hz), 5,87 (d, 1H, *J* = 8,9 Hz), 5,78 (m, 1H), 5,53 (m, 1H), 5,12 (m, 2H), 4,65 (m, 2H), 4,41 (m, 1H), 4,11 (m, 1H), 3,93 (s, 3H), 3,81 (m, 1H), 3,40 (t, 2H, *J* = 6,7 Hz), 3,05 (dd, 1H, *J* = 16,3, 10,1 Hz), 2,57 (m, 1H), 2,34 (m, 2H), 1,84 (d, 3H, *J* = 6,6 Hz), 0,92 (s, 9H), 0,28 (s, 3H), 0,26 (s, 3H).

(iii) 11-(terc-butildimetilsililóxi)-8-hidróxi-7-metóxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-11,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepino-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-((S)-2-((S)-2-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanamido)propanamido)-benzila 79)



(a) ((S)-1-(((S)-1-(4-(((2-((S)-2-(((*tert*-butildimetilsilil)óxi)metil)-4-((E)-prop-1-en-1-il)-2,3-di-hidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metóxi-5-((tri-isopropilsilil)óxi)fenil)-carbamoil)óxi)metil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-carbamato de alila (75)

[0536]Trietilamina (0,256 mL, 1,84 mmol, 2,2 eq) foi adicionada a uma solução agitada da amina 68 (0,480 g, 0,835 mmol, 1,0 eq) e trifosgeno (0,089 g, 0,301 mmol, 0,36 eq) em THF seco (15 mL) a 5 °C (banho de gelo). O progresso da reação de isocianato foi monitorado removendo periodicamente as alíquotas a partir da mistura de reação e resfriando rapidamente com metanol e realizando a análise de LCMS. Uma vez que a reação de isocianato foi concluída uma solução de Alloc-Val-Ala-PABOH I5 (0,473 g, 1,25 mmol, 1,5 eq) e trietilamina (0,174 mL, 1,25 mmol, 1,5 eq) em THF seco (10 mL) foi rapidamente adicionada por injeção ao isocianato recentemente preparado. A reação foi deixada agitar a 40 °C por 4 horas seguido por

agitação na temperatura ambiente durante a noite. A mistura foi concentrada sob pressão reduzida, e purificada por cromatografia flash (gel de sílica, *n*-hexano/EtOAc 20/80 v/v para *n*-hexano/EtOAc 50/50 v/v, em seguida, DCM/MeOH 1/99 v/v para DCM/MeOH 5/95 v/v) para se obter o produto como um sólido amarelo (0,579 g, 71 %). LC/MS (4,468 min (ES⁺)), *m/z*: 978,55 [M + H]⁺. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,63 (br s, 1H), 8,42 (s, 1H), 7,78 (br s, 1H), 7,53 (d, 2H, *J* = 8,1 Hz), 7,31 (d, 2H, *J* = 8,6 Hz), 6,76 (s, 1H), 6,59 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz), 6,36 (br s, 1H), 6,04 (d, 1H, *J* = 15,9 Hz), 5,90 (m, 1H), 5,55 (m, 1H), 5,33 - 5,21 (m, 3H), 5,10 (s, 2H), 4,66 (m, 2H), 4,57 (dd, 2H, *J* = 5,6, 1,0 Hz), 3,98 (dd, 1H, *J* = 7,3, 6,8 Hz), 3,90 (m, 1H), 3,81 (m, 1H), 3,78 (s, 3H), 2,82 (dd, 1H, *J* = 15,4, 9,6 Hz), 2,72 (dd, 1H, *J* = 15,9, 3,5 Hz), 2,17 (m, 1H), 1,78 (dd, 3H, *J* = 6,5, 0,8 Hz), 1,46 (d, 3H, *J* = 7,1 Hz), 1,29 (m, 3H), 1,11 (d, 18H, *J* = 7,1 Hz), 0,97 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz), 0,92 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz), 0,83 (s, 9H), 0,04 (s, 3H), 0,01 (s, 3H).

(b) ((S)-1-(((S)-1-((4-(((2-((S)-2-(hidroximetil)-4-((E)-prop-1-en-1-il)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metóxi-5-((tri-isopropilsilil)óxi)fenil)carbamoil)óxi)metil)-fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de alila (76)

[0537]O éter silílico 75 (1,49 g, 1,52 mmol, 1,0 eq) foi dissolvido em uma mistura 7:1:1:2 de ácido acético/metanol/tetra-hidrofurano/água (14:2:2:4 mL) e deixado agitar na temperatura ambiente. Após 2 horas, a reação foi diluída com EtOAc (100 mL), lavada sequencialmente com água, bicarbonato de sódio aq., em seguida, com salmoura. A fase orgânica depois foi seca sobre MgSO₄, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia flash (gel de sílica, DCM/MeOH 100/0, em seguida, 99/1 a 92/8 v/v) para se obter o produto como um sólido laranja (1,2 g, 92 %). LC/MS (3,649 min (ES⁺)), *m/z*: 865,44 [M + H]⁺. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,44 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 7,69 (br s, 1H), 7,53 (d, 2H, *J* = 8,7 Hz), 7,32 (d, 2H, *J* = 8,3 Hz), 6,78 (s, 1H), 6,56 (m, 2H), 6,32 (br s, 1H), 6,05 (d, 1H, *J* = 14,9 Hz), 5,90 (m, 1H), 5,56 (m, 1H), 5,30 (m, 2H), 5,22 (m, 1H), 5,10 (d, 2H, *J* =

3,1 Hz), 4,73 (m, 1H), 4,64 (m, 1H), 4,57 (d, 2H, $J = 5,8$ Hz), 4,01 (m, 1H), 3,79 (m, 2H), 3,76 (s, 3H), 2,98 (dd, 1H, $J = 16,3, 10,2$ Hz), 2,38 (dd, 1H, $J = 16,6, 4,1$ Hz), 2,16 (m, 1H), 1,78 (dd, 3H, $J = 6,8, 0,9$ Hz), 1,46 (d, 3H, $J = 7,1$ Hz), 1,29 (m, 3H), 1,11 (d, 18H, $J = 7,4$ Hz), 0,97 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz), 0,92 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz).

(c) *11-hidróxi-7-metóxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-8-(tri-isopropilsililóxi)-11,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepino-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-((S)-2-((S)-2-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanamido)propanamido)-benzila (77)*

[0538]Dimetil sulfóxido seco (0,180 g, 2,3 mmol, 3,0 eq) foi adicionado, às gotas, a uma solução de cloreto de oxalila (0,147 g, 1,1 mmol, 1,5 eq) em DCM (10 mL) a -78 °C sob uma atmosfera de nitrogênio. Mantendo a temperatura a -78 °C, após 20 minutos, uma solução do álcool primário 76 (0,666 g, 0,77 mmol, 1,0 eq) em DCM (10 mL) foi adicionada às gotas. Após 15 minutos, trietilamina seca (0,390 g, 3,85 mmol, 5,0 eq) foi adicionada, e a mistura de reação deixada aquecer até a temperatura ambiente. A mistura de reação foi lavada sucessivamente com HCl 0,1N frio (10 mL), hidrogenocarbonato de sódio saturado (10 mL) e salmoura (5 mL). A camada orgânica depois foi seca sobre $MgSO_4$, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo depois foi purificado por cromatografia flash (gel de sílica, *n*-hexano/EtOAc 50/50 v/v para *n*-hexano/EtOAc 25/75 v/v) para se obter o produto como um sólido branco (0,356 g, 54 %). LC/MS (3,487 min (ES^+)), m/z : 862,2 [$M + H$] $^+$. RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,34 (br s, 1H), 7,47 (d, 2H, $J = 7,6$ Hz), 7,17 (s, 1H), 7,14 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz), 6,86 (br s, 1H), 6,65 (br s, 1H), 6,42 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz), 6,22 (d, 1H, $J = 14,4$ Hz), 5,80 (m, 1H), 5,40 (m, 1H), 5,53 (m, 1H), 5,32 (m, 1H), 5,21 (d, 2H, $J = 9,6$ Hz), 5,06 (d, 1H, $J = 12,3$ Hz), 4,90 (m, 1H), 4,58 (m, 3H), 3,98 (m, 1H), 3,84 (m, 1H), 3,81 (s, 3H), 3,50 (m, 1H), 3,05 (dd, 1H, $J = 16,0, 10,3$ Hz), 2,76 (m, 1H), 2,15 (m, 1H), 1,80 (dd, 3H, $J = 6,7, 0,8$ Hz), 1,44 (d, 3H, $J = 7,1$ Hz), 1,16 (m, 3H), 1,01 (d, 18H, $J = 6,6$ Hz), 0,96 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz), 0,92 (d, 3H, $J = 6,8$

Hz).

(d) *11-(terc-butildimetilsililóxi)-7-metóxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-8-(triisopropilsililóxi)-11,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepino-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-((S)-2-((S)-2-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanamido)-propanamido)benzila (78)*

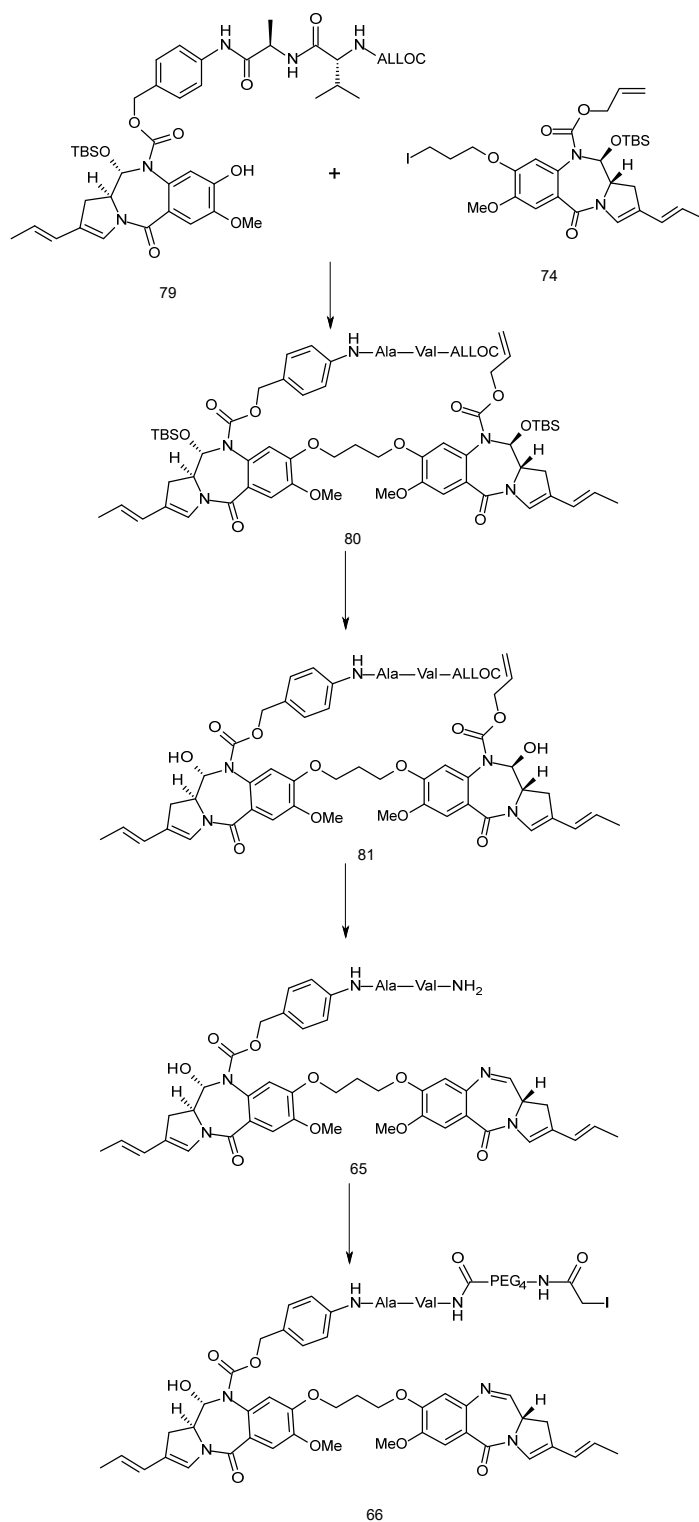
[0539]Sulfonato de *terc*-butildimetilsililtrifluorometano (0,46 g, 1,74 mmol, 3,0 eq) foi adicionado a uma solução de álcool secundário 77 (0,5 g, 0,58 mmol, 1,0 eq) e 2,6-lutidina (0,25 g, 2,32 mmol, 4,0 eq) em DCM seco (10 mL) a 0 °C sob uma atmosfera de nitrogênio. Após 10 minutos, a mistura de reação foi deixada aquecer até a temperatura ambiente e agitada durante mais 120 min. A fase orgânica depois foi lavada sucessivamente com água (10 mL), bicarbonato de sódio saturado (10 mL) e salmoura (5 mL), seca sobre MgSO₄, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia flash (gel de sílica, *n*-hexano/EtOAc 50/50 v/v) para se obter o produto como um sólido branco (0,320 g, 57 %). LC/MS (4,415 min (ES⁺)), *m/z*: 976,52 [M + H]⁺. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,31 (br s, 1H), 7,48 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz), 7,21 (s, 1H), 7,14 (d, 2H, *J* = 8,3 Hz), 6,89 (s, 1H), 6,65 (s, 1H), 6,38 (d, 1H, *J* = 7,3 Hz), 6,25 (d, 1H, *J* = 14,6 Hz), 5,93 (m, 1H), 5,85 (d, 1H, *J* = 8,8 Hz), 5,50 (m, 1H), 5,34 (m, 1H), 5,24 (m, 2H), 5,15 (d, 1H, *J* = 12,5 Hz), 4,86 (d, 1H, *J* = 12,2 Hz), 4,62 (m, 3H), 4,01 (m, 1H), 3,86 (s, 3H), 3,78 (m, 1H), 3,04 (m, 1H), 2,56 (m, 1H), 2,20 (m, 1H), 1,84 (dd, 3H, *J* = 6,6, 0,7 Hz), 1,48 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz), 1,20 (m, 3H), 1,05 (d, 9H, *J* = 2,9 Hz), 1,03 (d, 9H, *J* = 2,9 Hz), 0,99 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz), 0,95 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz), 0,88 (s, 9H), 0,27 (s, 3H), 0,14 (s, 3H).

(e) *11-(terc-butildimetilsililóxi)-8-hidróxi-7-metóxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-11,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepino-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-((S)-2-((S)-2-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanamido)propanamido)-benzila (79)*

[0540]Acetato de lítio di-hidratado (0,010 g, 0,10 mmol, 1,0 eq) foi adicionado

a uma solução do éter silílico 78 (0,100 g, 0,10 mmol, 1,0 eq) em DMF úmida (2 mL) a 25 °C por 3 horas. A mistura de reação depois foi diluída com acetato de etila (20 mL) e lavada sucessivamente com ácido cítrico 0,1M (20 mL, pH 3), água (20 mL) e salmoura (5 mL), seca sobre MgSO₄, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia flash (gel de sílica, metanol/DCM 5/95 v/v) para se obter o produto como um óleo amarelo claro (0,070 g, 83 %). LC/MS (3,362 min (ES⁺)), *m/z*: 820,2 [M + H]⁺. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,39 (s, 1H), 7,48 (d, 2H, *J* = 8,2 Hz), 7,25 (s, 1H), 7,12 (d, 2H, *J* = 8,1 Hz), 6,88 (s, 1H), 6,68 (s, 1H), 6,47 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz), 6,24 (d, 1H, *J* = 15,2 Hz), 6,03 (s, 1H), 5,92 (m, 1H), 5,84 (d, 1H, *J* = 8,9 Hz), 5,50 (m, 1H), 5,34 (m, 1H), 5,26 (m, 2H), 5,18 (d, 1H, *J* = 12,3 Hz), 4,80 (d, 1H, *J* = 12,4 Hz), 4,66 - 4,60 (m, 3H), 4,02 (m, 1H), 3,95 (s, 3H), 3,81 (m, 1H), 3,03 (m, 1H), 2,57 (m, 1H), 2,19 (m, 1H), 1,84 (dd, 3H, *J* = 6,8, 0,8 Hz), 1,48 (d, 3H, *J* = 7,1 Hz), 1,00 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz), 0,95 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz), 0,87 (s, 9H), 0,26 (s, 3H), 0,12 (s, 3H).

(iv) 11-hidróxi-7-metóxi-8-(3-((S)-7-metóxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-5,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-ilóxi)propóxi)-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-11,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepino-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-((20S,23S)-1-iodo-20-isopropil-23-metil-2,18,21-trioxo-6,9,12,15-tetraoxa-3,19,22-triazatetracosanamido)benzila (66, D)



(a) **8-(3-((11S,11aS)-10-((4-((R)-2-((R)-2-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanamido)propanamido)benzilóxi)carbonil)-11-(terc-butildimetilsililóxi)-7-metóxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-5,10,11,11a-tetra-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-ilóxi)propóxi)-11-(terc-butildimetilsililóxi)-7-metóxi-5-oxo-2-((E)-prop-**

1-enil)-11,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepino-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-alila (80)

[0541]Carbonato de potássio (0,030 g, 0,21 mmol, 1,0 eq) foi adicionado a uma solução do fenol 79 (0,175 g, 0,21 mmol, 1,0 eq) e o ligante de iodo 74 (0,214 g, 0,32 mmol, 1,5 eq) em acetona (10 mL). A mistura de reação foi aquecida sob uma atmosfera de nitrogênio a 75 °C em uma frasco vedado por 17 horas. A mistura de reação foi concentrada à securo sob pressão reduzida e purificada por cromatografia flash (gel de sílica, metanol/DCM 2/98 v/v para metanol/DCM 5/95 v/v) para se obter o produto como um sólido amarelo claro (0,100 g, 35 %). LC/MS (4,293 min (ES⁺)), *m/z*: 1359,13 [M]⁺.

(b) *8-(3-((11S,11aS)-10-((4-((R)-2-((R)-2-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanamido)propanamido)benzilóxi)carbonil)-11-hidróxi-7-metóxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-5,10,11,11a-tetra-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-ilóxi)propóxi)-11-hidróxi-7-metóxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-11,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepino-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-alila (81)*

[0542]Fluoreto de tetra-n-butilamônio (1M, 0,22 mL, 0,22 mmol, 2,0 eq) foi adicionado a uma solução de éter silílico 80 (0,150 g, 0,11 mmol, 1,0 eq) em THF seco (2 mL). A mistura de reação foi agitada na temperatura ambiente por 20 minutos, depois de que a LC/MS indicou reação completa. A mistura de reação foi diluída com acetato de etila (10 mL) e lavada sequencialmente com água (5 mL) e salmoura (5 mL). A fase orgânica foi seca sobre MgSO₄, filtrada e concentrada sob pressão reduzida para deixar um sólido amarelo. Purificação por cromatografia flash (gel de sílica, metanol/DCM 6/94 v/v para metanol/DCM 10/90 v/v) proporcionou o produto como um sólido amarelo claro (0,090 g, 73 %). LC/MS (2,947 min (ES⁺)), *m/z*: 1154,0 [M + Na]⁺. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,39 (br s, 1H), 7,39 (d, 2H, *J* = 7,6 Hz), 7,18 (d, 2H, *J* = 10,6 Hz), 7,10 (m, 3H), 6,86 (d, 2H, *J* = 10,0 Hz), 6,74 (s, 1H), 6,55 (s, 1H), 6,22 (dd, 2H, *J* = 15,3, 6,6 Hz), 5,85 (m, 2H), 5,74 (m, 3H), 5,52

(m, 2H), 5,22 (m, 1H), 5,00 (m, 2H), 4,57 (m, 6H), 4,41 (m, 2H), 4,09 (m, 4H), 3,85 (m, 11H), 3,06 (m, 2H), 2,76 (m, 2H), 2,20 (m, 2H), 2,08 (m, 1H), 1,79 (d, 6H, $J = 6,4$ Hz), 1,40 (d, 3H, $J = 6,1$ Hz), 0,90 (m, 6H).

(c) *11-hidróxi-7-metóxi-8-(3-((S)-7-metóxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-5,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-ilóxi)propóxi)-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-11,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepino-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-((R)-2-((R)-2-amino-3-metilbutanamido)propanamido)benzila (65)*

[0543]Tetracis(trifenilfosfeno)paládio(0) (0,005 g, 0,005 mmol, 0,06 eq) foi adicionado a uma solução da bis-carbinolamina 81 (0,090 g, 0,08 mmol, 1,0 eq) e pirrolidina (16 μ L, 0,20 mmol, 2,5 eq) em DCM seco (5 mL). Após 20 minutos, a mistura de reação foi diluída com DCM (10 mL) e lavada sequencialmente com cloreto de amônio saturado (5 mL) e salmoura (5 mL), seca sobre $MgSO_4$, filtrada e o solvente foi removido sob pressão reduzida para deixar o produto bruto como um sólido amarelo claro que foi usado na próxima etapa sem purificação adicional (0,075 g, considerado 100 % de rendimento). LC/MS (2,060 min (ES^+)), m/z : 947,2 $[M + H]^+$.

(d) *11-hidróxi-7-metóxi-8-(3-((S)-7-metóxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-5,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-ilóxi)propóxi)-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-11,11a-di-hidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepino-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-((20S,23S)-1-iodo-20-isopropil-23-metil-2,18,21-trioxo-6,9,12,15-tetraoxa-3,19,22-triazatetracosanamido)benzila (66, D)*

[0544]EDCI (0,015 g, 0,08 mmol, 1,0 eq) foi adicionado a uma solução de amina 65 (considerado 100 % de rendimento 0,075 g, 0,08 mmol, 1,0 eq) e iodoacetamida-PEG₄-ácido I7 (0,034 g, 0,08 mmol, 1,0 eq) em diclorometano seco (5 mL) e a reação foi agitada no escuro. Após 50 minutos, uma outra quantidade de iodoacetamida-PEG₄-ácido I7 (0,007 g, 0,016 mmol, 0,2 eq) foi adicionada junto com uma outra quantidade de EDCI (0,003 g, 0,016 mmol, 0,2 eq). Após um total de 2,5 horas, a mistura de reação foi diluída com diclorometano (15 mL) e lavada sequencialmente

com água (10 mL) e salmoura (10 mL). A fase orgânica foi seca sobre MgSO_4 , filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi purificado por cromatografia flash (gel de sílica, Clorofórmio 100 % para Clorofórmio:Metanol 90:10 v/v). As frações puras foram combinadas para se obter o produto (0,0254 g, 23 %, 2 etapas). As frações brutas foram coletadas e purificadas por TLC preparativa (gel de sílica, Clorofórmio:Metanol 90:10 v/v) para se obter um segundo lote de produto (0,0036 g, 3 %, 2 etapas). LC/MS (2,689 min (ES^+)), m/z : 681,0 $1/2[\text{M}+2\text{H}]^+$.

Exemplo 10: Atividade de compostos liberados

Ensaio de K562

[0545]As células K562 de leucemia mielóide crônica humana foram mantidas em meio RPM1 1640 suplementado com soro fetal de vitelo a 10 % e glutamina 2 mM a 37 °C em uma atmosfera umidificada contendo CO_2 5 % e foram incubadas com uma dose específica de fármaco por 1 hora ou 96 horas a 37 °C no escuro. A incubação foi terminada por centrifugação (5 min, 300 g) e as células foram lavadas uma vez com meio livre de fármaco. Após o tratamento de fármaco apropriado, as células foram transferidas a placas microtituladoras de 96 poços (10^4 células por poço, 8 poços por amostra). As placas foram então mantidas no escuro a 37 °C em uma atmosfera umidificada contendo CO_2 a 5 %. O ensaio é fundamentado na capacidade de células viáveis reduzir um sal de tetrazólio solúvel amarelo, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT, Aldrich-Sigma), a um precipitado de formazana púrpura insolúvel. Após a incubação das placas por 4 dias (para permitir as células controle aumentar em número por aproximadamente 10 vezes), 20 μL de solução de MTT (5 mg/mL em solução salina tamponada com fosfato) foram adicionados a cada poço e as placas ainda incubadas por 5 h. As placas foram então centrifugadas por 5 min a 300 g e a maior parte do meio pipetado a partir de sedimento de células deixando 10 a 20 μL por poço. DMSO (200 μL) foi adicionado a cada poço e as amostras agitadas para medir a mistura completa. A densidade ópti-

ca depois foi lida em um comprimento de onda de 550 nm em um leitor de placa ELISA Titertek Multiscan, e uma curva de dose-resposta foi construída. Para cada curva, um valor de IC₅₀ foi lido como a dose necessária para reduzir a densidade óptica final a 50 % do valor de controle.

Composto RelC tem uma IC₅₀ menor do que 0,1 pM neste ensaio.

Composto RelE tem uma IC₅₀ de 0,425 nM neste ensaio.

Exemplo 11: Formação de conjugados

Procedimento de conjugação de anticorpo geral

[0546]Os anticorpos são diluídos entre 1 a 5 mg/mL em um tampão de redução (exemplos: solução salina tamponada com fosfato PBS, tampão de histidina, tampão de borato de sódio, tampão de TRIS). Uma solução recentemente preparada de TCEP (cloridreto de tris(2-carboxietil)fosfina) é adicionada a pontes de dissulfeto de cisteína seletivamente reduzidas. A quantidade de TCEP é proporcional ao nível alvo de redução, dentro de 1 a 4 equivalentes molares por anticorpo, gerando 2 a 8 tióis reativos. Depois da redução por várias horas a 37 °C, a mistura é resfriada até a temperatura ambiente e o excesso de ligante de fármaco (A, B, C, D, E) adicionado como uma solução de DMSO diluída (teor de DMSO final de até 10 % volume/volume de mistura de reação). A mistura foi suavemente agitada a 4 °C ou temperatura ambiente por um tempo apropriado, geralmente 1 a 3 horas. O excesso de tióis reativos pode ser reagido com um 'reagente de capeamento de tiol' como N-etil maleimida (NEM) no final da conjugação. Os conjugados anticorpo-fármaco são concentrados usando filtros de rotação centrífuga com um peso molecular de corte de 10 kDa ou mais alto, em seguida, purificados por filtração de fluxo tangencial (TFF) ou Cromatografia Líquida de Proteínas Rápida (FPLC). Os conjugados anticorpo-fármaco correspondentes podem ser determinados por análise por Cromatografia Líquida de Alto-Desempenho (HPLC) ou Cromatografia Líquida de Ultra-Alto-Desempenho (UHPLC) para avaliar a razão de fármaco-por-anticorpo (DAR) usando

cromatografia de fase reversa (RP) ou Cromatografia de Interação Hidrofóbica (HIC), acoplada com detecção por UV-Visível, Fluorescência ou Espectrômetro de Massas; nível global e pureza de monômero podem ser analisados por HPLC ou UHPLC usando cromatografia de exclusão de tamanho acoplada com detecção por UV-Visível, Fluorescência ou Espectrômetro de Massas. A concentração de conjugado final é determinada por uma combinação de ensaio espectroscópico (absorvância a 280, 214 e 330 nm) e bioquímico (ensaio de ácido bicinônico BCA; Smith, P.K., *et al.* (1985) *Anal. Biochem.* 150 (1): 76-85; usando um anticorpo de IgG de concentração conhecida como referência). Os conjugados anticorpo-fármaco são geralmente estéreis filtrados usando filtros de 0,2 µm sob condições assépticas, e armazenados a +4 °C, -20 °C ou -80 °C.

Determinação de DAR

[0547]Anticorpo ou ADC (ca. 35 µg em 35 µL) foi reduzido por adição de 10 µL de tampão de borato (100 mM, pH 8,4) e 5 µL de DTT (0,5 M em água), e aquecida a 37 °C por 15 minutos. A amostra foi diluída com 1 volume de acetonitrila:água:ácido fórmico (49 %:49 %:2 % v/v), e injetada em uma coluna (Phenomenex Aeris) Widedpore 3,6µ XB-C18 150 x 2,1 mm (P/N 00F-4482-A) a 80 °C, em um sistema de UPLC (Shimadzu Nexera) com uma taxa de fluxo de 1 ml/min equilibrada em Tampão A a 75 % (Água, Ácido trifluoroacético (0,1 % v/v) (TFA), Tampão B a 25 % (Acetonitrila:água:TFA 90 %:10 %:0,1 % v/v). O material ligado foi eluído usando um gradiente de 25 % a 55 % de Tampão B em 10 min. Os picos de absorção UV a 214 nm foram integrados. Os picos seguintes foram identificados para cada ADC ou anticorpo: cadeia leve de anticorpo nativo (L0), cadeia pesada de anticorpo nativo (H0), e cada uma destas cadeias com ligantes de fármaco adicionados (rotulada de L1 para cadeia leve com um fármaco e H1, H2, H3 para cadeia pesada com 1, 2 ou 3 ligantes de fármaco ligados). O cromatograma de UV a 330 nm foi usado para a identificação de fragmentos contendo ligantes de fármaco (isto é, L1, H1, H2, H3).

[0548] Uma razão molar de PBD/proteína foi calculada tanto para as cadeias leves quanto para as cadeias pesadas:

$$\frac{\text{Fármaco}}{\text{Proteína}} \text{ razão sobre cadeia leve} = \frac{\% \text{ de Área a } 214 \text{ nm para } L1}{\% \text{ de Área a } 214 \text{ nm para } L0 \text{ e } L1}$$

$$\frac{\text{Fármaco}}{\text{Proteína}} \text{ razão sobre cadeia pesada} = \frac{\sum_{n=0}^3 n \times (\% \text{ de Área a } 214 \text{ para } Hn)}{\sum_{n=0}^3 \% \text{ de Área a } 214 \text{ para } Hn}$$

[0549] DAR final é calculada como:

$$DAR = 2 \times \left(\frac{\text{Fármaco}}{\text{Proteína}} \text{ razão sobre cadeia leve} + \frac{\text{Fármaco}}{\text{Proteína}} \text{ razão sobre cadeia pesada} \right)$$

[0550] A medição de DAR é realizada a 214 nm porque minimiza a interferência de absorvância de ligante de fármaco.

Geração de ADCs

[0551] Anticorpo A (compreendendo um domínio variável que é SEQ ID NO. 1 emparelhada com SEQ ID NO. 7) foi conjugado com o ligante de fármaco A para se obter Conj A-A, e a DAR foi medida para ser 2,35.

[0552] Anticorpo B (compreendendo um domínio variável que é SEQ ID NO. 2 emparelhada com SEQ ID NO. 8) foi conjugado com o ligante de fármaco A para se obter Conj B-A, e a DAR foi medida para ser 2,2 (veja a tabela abaixo).

[0553] Anticorpo C (compreendendo um domínio variável que é SEQ ID NO. 6 emparelhada com SEQ ID NO. 12) foi conjugado com o ligante de fármaco A para se obter Conj C-A, e a DAR foi medida para ser 1,97.

[0554] Anticorpo D (compreendendo um domínio variável que é SEQ ID NO. 4 emparelhada com SEQ ID NO. 10) foi conjugado com o ligante de fármaco A para se obter Conj D-A, e a DAR foi medida para ser 1,99.

[0555] Anticorpo E (compreendendo um domínio variável que é SEQ ID NO. 5 emparelhada com SEQ ID NO. 11) foi conjugado com o ligante de fármaco A para se obter Conj E-A, e a DAR foi medida para ser 1,89.

[0556] Anticorpo B (compreendendo um domínio variável que é SEQ ID NO. 2 emparelhada com SEQ ID NO. 8) foi conjugado com o ligante de fármaco D para se obter Conj B-D, e a DAR foi medida para ser 2,18 (veja a tabela abaixo).

[0557]Anticorpo B (compreendendo um domínio variável que é SEQ ID NO. 2 emparelhada com SEQ ID NO. 8) foi conjugado com o ligante de fármaco E para se obter Conj B-E, e a DAR foi medida para ser 1,93 (veja a tabela abaixo).

[0558]RB4v1.2 é um anticorpo anti-CD19 compreendendo um domínio VH tendo a sequência de acordo com a SEQ ID NO. 2 e um domínio VK tendo a sequência de acordo com a SEQ ID NO. 8.

[0559]Como descrito acima, ADCs alvejados para CD19 foram gerados conjugando anticorpos RB4v1.2 ao ligante de fármaco A, E, ou D. Os ADCs resultantes são listados na tabela abaixo, ao lado da DAR medida. O anticorpo B12 anti-HIV gp120 foi usado para gerar os ADCs alvejados não-CD19 controles.

ADC	DAR	Concentração [mg/ml]	Rendimento [%]
RB4v1.2-a	2,2	0,683	56
RB4v1.2-E	1,93	0,636	66
RB4v1.2-D	2,18	0,859	57
B12-A	2,03	0,98	71
B12-E	1,84	0,515	70
RB4v1.2-DM4	3,27	2,62	81

EXEMPLO 12: Citotoxicidade *in vitro* de ADCs

Cultura Celular

[0560]As células WSU-DLCL2 e SU-DHL-1 foram a partir de Coleção Alemã Leibniz Institute DSMZ de Micro-organismos e Culturas Celulares. Células Ramos e Daudi foram a partir de Coleção de Cultura do Tipo Americana. Meio de cultura celular foi RPMI 1640 suplementado com L-Glutamina e FBS a 10 %. As células foram cultivadas a 37 °C, CO₂ a 5 %, em uma incubadora umidificada.

Ensaio de citotoxicidade

[0561]A concentração e viabilidade de culturas de células colocadas em suspensão (em até 1×10^6 /ml) foram determinadas misturando 1:1 com azul de

Trypan e contando as células claras (vivas)/azuis (mortas) com um hemocítômetro. A suspensão celular foi diluída à densidade de semeadura necessária (geralmente 10^5 /ml) e dispensada em placas de fundo plano de 96 poços. Para o ensaio azul de Alamar, 100 µl/poço foram dispensados em placas de poço preto. Para o ensaio de MTS, 50 µl/poço foram dispensados em placas de poço claro. Uma solução de estoque (1 ml) de ADC (20 µg/ml) foi feita por diluição de ADC em filtro estéril em meio de cultura celular. Um conjunto de diluições de 8 x 10 vezes de ADC de estoque foi feito em uma placa de 24 poços por transferência em série de 100 µl para 900 µl de meio de cultura celular. Cada diluição de ADC (100 µl/poço para azul de Alamar, 50 µl/poço para MTS) foi dispensada em 4 poços em replicado da placa de 96 poços, contendo suspensão celular. Os poços de controle receberam o mesmo volume de meio de cultura. Depois da incubação por 4 dias, a viabilidade celular foi medida por ensaio de azul de Alamar ou MTS.

[0562]AlamarBlue® (Invitrogen, número de catálogo DAL1025) foi dispensado (20 µl por poço) em cada poço e incubado por 4 horas a 37 °C na incubadora gaseificada de CO₂. A fluorescência do poço foi medida com excitação a 570 nm, emissão a 585 nm. A sobrevivência celular (%) foi calculada a partir da razão de fluorescência média nos 4 poços tratados com ADC comparada com a fluorescência média nos 4 poços de controle (100 %).

[0563]MTS (Promega, número de catálogo G5421) foi dispensado (20 µl por poço) em cada poço e incubado por 4 horas a 37 °C na incubadora gaseificada de CO₂. A absorvância foi medida a 490 nm. A sobrevivência celular (%) foi calculada a partir da absorvância média nos 4 poços tratados com ADC comparada com a absorvância média nos 4 poços de controle (100 %). As curvas de dose-resposta foram geradas a partir dos dados médios de 3 experimentos em replicado e a EC₅₀ foi determinada ajustando os dados a uma curva de dose-resposta sigmoide com declive variável usando Prisma (GraphPad, San Diego, CA).

Citotoxicidade in vitro

[0564]A eficácia de RB4v1.2-a foi testada contra linhagens de células CD19 +ve, Daudi, Ramos e WSU-DLCL2. Como um controle CD19 -ve, as células SU-DHL-1 foram usadas.

[0565]A Figura 1 mostra a eficácia *in vitro* de RB4v1.2-a. As diluições de 10 vezes em série (µg/mL) de RB4v1.2-a foram incubadas com células Daudi, Ramos, WSU-DLCL2 ou SU-DHL-1. O ensaio de azul de Alamar foi realizado no final do período de incubação e a sobrevivência celular calculada. Os gráficos representam a média de três experimentos em replicado.

[0566]RB4v1.2-a mostrou a citotoxicidade significativa contra células Daudi e Ramos, com citotoxicidade levemente mais baixa contra células WSU-DLCL2 (Figura 1).

RB4v1.2-a	SUDHL1	Daudi	Ramos	WSU-DLCL2
EC50 (µg/mL)	~6,706	0,001115	0,001021	0,1171

[0567]A Figura 2 mostra a eficácia *in vitro* de RB4v1.2-E. As diluições de 10 vezes em série (µg/mL) de RB4v1.2-E foram incubadas com células Daudi, Ramos, WSU-DLCL2 ou SU-DHL-1. O ensaio de azul de Alamar foi realizado no final do período de incubação e a sobrevivência celular calculada. Os gráficos representam a média de três experimentos em replicado.

[0568]RB4v1.2-E mostrou a citotoxicidade significativa contra células Daudi e Ramos, com citotoxicidade levemente mais baixa contra células WSU-DLCL2 (Figura 2).

RB4v1.2-E	SUDHL1	Daudi	Ramos	WSU-DLCL2
EC50 (µg/mL)	0,5390	0,001216	0,001467	0,03099

[0569]Figura 3 mostra a eficácia *in vitro* de RB4v1.2-D. As diluições de 10 vezes em série (µg/mL) de RB4v1.2-D foram incubadas com células Daudi, Ramos, WSU-DLCL2 ou SU-DHL-1. O ensaio de azul de Alamar foi realizado no final do pe-

riodo de incubação e a sobrevivência celular calculada. Os gráficos representam a média de três experimentos em replicado.

[0570]RB4v1.2-D mostrou a citotoxicidade significativa contra células Daudi e Ramos, com citotoxicidade levemente mais baixa contra células WSU-DLCL2 (Figura 3).

RB4v1.2-D	SUDHL1	Daudi	Ramos	WSU-DLCL2
EC50 (µg/mL)	~0,7540	0,001022	0,0007979	0,02190

EXEMPLO 13 - Atividade antitumoral *in vivo* de ADCs

[0571]A linhagem celular derivada de linfoma Burkitt humana CD19 +(ve) Ramos foi usada para determinar o ligante de fármaco de PBD mais potente para RB4v1.2 *in vivo*. O anticorpo foi conjugado a ligantes de fármaco A, E, ou D como descrito acima e testado no modelo de xenoenxerto de Ramos. Como os controles de ligação de não-CD19, o anticorpo gp120 anti-HIV, B12, ligado a A ou E foi usado. Ao mesmo tempo, para investigar qualquer atividade antitumoral potencial observada com o RB4v1.2 sem uma ogiva de PBD, RB4v1.2 foi testado *in vivo* conjugado a DM4, um maitansinóide derivado que age como um inibidor de tubulina.

Projeto de estudo

Fármacos e tratamento:

Nº do Grupo	Animais por grupo	ADC	Nível de dose (mg/kg)	Volume de dose (ml/kg)
1	10	[nenhum tratamento]	-	-
2	10	[veículo apenas]	-	-
3	10	RB4v1.2 [nenhum PBD]	1,0	10
4	10	RB4v1.2-a	0,3	10
5	10	RB4v1.2-a	1,0	10
6	10	RB4v1.2-E	0,3	10
7	10	RB4v1.2-E	1,0	10

8	10	RB4v1.2-D	0,3	10
9	10	RB4v1.2-D	1,0	10
10	10	B12-E	1,0	10
11	10	B12-A	1,0	10

Procedimentos:

- Ajustar CR de camundongos nu/nu NCr fêmeas com I x células tumorais Ramos-SPN em 0 % Matrigel sc em flanco.

- Volume de Injeção Celular é 0,1 mL/camundongo.

- Idade na Data de Início: 8 a 12 semanas.

- Realizar um par igual quando os tumores atingem um tamanho médio de 100 a 150 mm³ e iniciar o tratamento.

- Peso Corpóreo: qd x 5 então bi-wk para terminar

- Medição do Calibrador: bi-wk para terminar

- Comunicar imediatamente quaisquer reações adversas ou morte.

- Qualquer animal individual com uma única observação de >30 % de perda de peso corpóreo ou três medições consecutivas de >25 % de perda de peso corpóreo será sacrificado.

- Qualquer grupo com duas medições de perda de peso corpóreo médio de >20 % ou > 10 % de mortalidade irá parar a dosagem. O grupo não é sacrificado e a recuperação é permitida. Dentro de um grupo com >20 % de perda de peso, os indivíduos que batem o ponto de extremidade de perda de peso corpóreo individual serão sacrificados. Se a perda de peso corpóreo relacionada com grupo de tratamento é recuperada dentro de 10 % dos pesos originais, a dosagem pode resumir em uma dose mais baixa ou esquema de dosagem menos frequente. As exceções a recuperação de % de peso corpóreo de não-tratamento podem ser deixadas em uma base de caso-por-caso.

- Ponto de extremidade de TGD. Os animais devem ser monitorados individualmente. O ponto de extremidade do experimento é um volume tumoral de 2000

mm³ ou 60 dias, o que ocorrer primeiro. Os respondedores podem ser seguidos por mais tempo. Quando o ponto de extremidade é atingido, os animais devem ser sacrificados.

Método metodológico geral

[0572]Para o cálculo de volumes tumorais médios de grupo a seguinte regra foi aplicada: quando um animal saiu do estudo devido ao tamanho de tumor, o volume tumoral final registrado para o animal foi incluído com os dados usados para calcular o volume médio em pontos no tempo subsequentes. As barras de erro indicam o erro padrão da média (SEM). Os valores de volumes tumorais não foram usados para calcular os volumes tumorais médios de grupo quando menos de 50 % dos animais em um grupo permaneceu no estudo. Prisma (GraphPad, San Diego, CA) foi usado para as apresentações gráficas e análises estatísticas.

Resultados

[0573]A Figura 4 mostra a seleção de ligante de fármaco para RB4v1.2-ADCs. Os camundongos foram doseados quando o volume tumoral médio por grupo experimental atingiu 0,1 cm³ e eles foram tratados com uma única dose dos ADCs a 0,3 e 1 mg/kg (para ligar ADCs) e 1 mg/kg (para não ligar ADCs) via IV na veia da cauda. Os dados representam o volume tumoral médio (+/- SEM) de dez camundongos em cada grupo.

[0574]RB4v1.2-a, -E e -D exibiram atividade antitumoral, com RB4v1.2-E e -D aparecendo mais potente do que RB4v1.2-a (veja Figura 4). Nenhum dos controles de ADC sem ligação (B12-A e B12-E) mostrou uma atividade antitumoral significativa.

Abreviações

Ac - acetila

Ac - macetamidometila

Alloc - aliloxicarbonila

Boc - dicarbonato de di-*terc*-butila

t-Bu - *terc*-butila

Bzl - benzila, onde Bzl-OMe é metoxibenzila e Bzl-Me é metilbenzeno

Cbz ou Z - benzilóxi-carbonila, onde Z-Cl e Z-Br são cloro- e bromobenzilóxi carbonila respectivamente

DMF - *N,N*-dimetilformamida

Dnp - dinitrofenila

DTT - ditioneitol

Fmoc - 9*H*-fluoren-9-ilmetoxicarbonila

imp - grupo de proteção imina *N*-10: 3-(2-metoxietóxi)propanoato-Val-Ala-PAB MC-OSumaleimidocaproil-O-*N*-succinimida

Moc - metoxicarbonila

MP - maleimidopropanamida

Mtr - 4-metóxi-2,3,6-trimetilbenzenossulfonila

PAB - para-aminobenziloxicarbonila

PEG - etileno-óxi

PNZ - carbamato de *p*-nitrobenzila

Psec - 2-(fenilsulfonil)etoxicarbonila

TBDMS - *terc*-butildimetilsilila

TBDPS - *terc*-butildifenilsilila

Teoc - 2-(trimetilsilil)etoxicarbonila

Tos - tosila

Troc - cloreto de 2,2,2-tricloretoxicarbonila

Trt - tritila

Xan – xantila

SEQUÊNCIAS

SEQ ID NO. 1 (RB4v1.0 VH):

QVQLVQPGAIEVVKPGASVKLSCKTSGYTFTSNWMHWVKQRPGQGLEWIG
EIDPDSYTNYNQNFKKGKAKLTVDKSTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCARGSNPYYY
AMDYWGQGTSVTVS

SEQ ID NO. 2 (RB4v1.2 VH):

QVQLVQPGAIEVVKPGASVKLSCKTSGYTFTSNWMHWVKQAPGQGLEWIG
EIDPDSYTNYNQNFQGGKAKLTVDKSTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCARGSNPYYY
AMDYWGQGTSVTVS

SEQ ID NO. 3 (B43 VH):

QVQLLESGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNHWVKQRPGQGLEWIG
QIWPGDGDTNYNGKFKGKATLTADESSSTAYMQLSSLRSEDSAVYSCARRETTV
GRYYYAMDYWGQGTTVT

SEQ ID NO. 4 (HD37 VH):

QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNHWVKQRPGQGLEWIG
QIWPGDGDTNYNGKFKGKATLTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTV
GRYYYAMDYWGQGTSVTVS

SEQ ID NO. 5 (4G7 VH):

EVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIG
YINPYNDGTYNEKFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGTYYYGS
RVFDYWGQGTTLTVS

SEQ ID NO. 6 (FMC63 VH):

EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVI
WGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMD
YWGQGTSVTVS

SEQ ID NO,7 (RB4v1.0 VK):

EIVLTQSPAIMSASPGERVMTCSASSGVNYMHWYQQKPGTSPRRWIYDT
SKLASGVPARFSGSGSGTSLTISSMEPEDAATYYCHQRGSYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO. 8 (RB4v1.2 VK):

EIVLTQSPAIMSASPGERVMTMTCSASSGVNYMHWYQQKPGTSPRRWIYDT
SKLASGVPARFSGSGSGTSSYSLTISSMEPEDAATYYCHQRGSYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO. 9 (B43 VK):

ELVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYLNWYQQIPGQPPKLLI
YDASNLVSGIPPRFSGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAATYHCQQSTEDPWTFGGGKLEIK

SEQ ID NO. 10 (HD37 VK):

DILLTQTPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYLNWYQQIPGQPPKLLI
YDASNLVSGIPPRFSGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAATYHCQQSTEDPWTFGGGKLEIK

SEQ ID NO. 11 (4G7 VK):

DIVMTQAAPSIPVTPGESVSISSCRSSKLLNSNGNTYLYWFLQRPGQSPQLL
IYRMSNLAGVPPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGAGTK
LELK

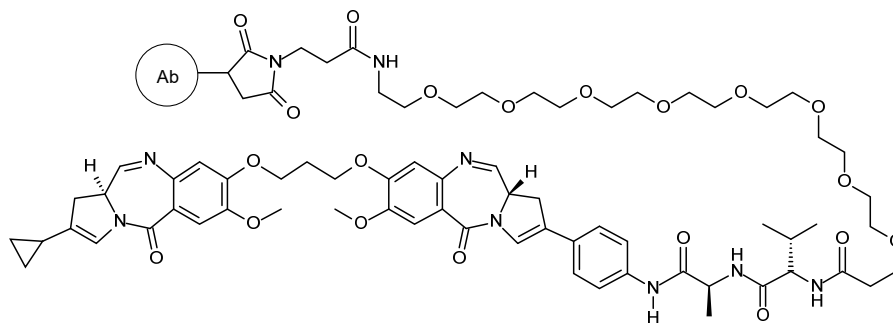
SEQ ID NO. 12 (FMC63 VK):

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTS
RLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT

REIVINDICAÇÕES

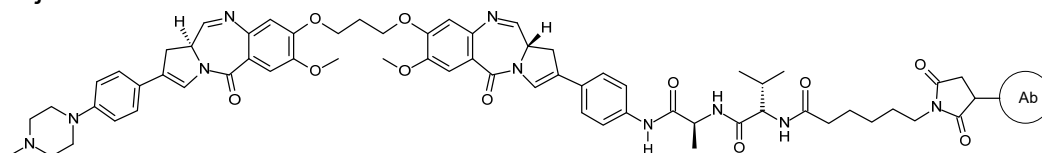
1. Conjugado **CHARACTERIZADO** pelo fato de que apresenta a fórmula Con-

jA:



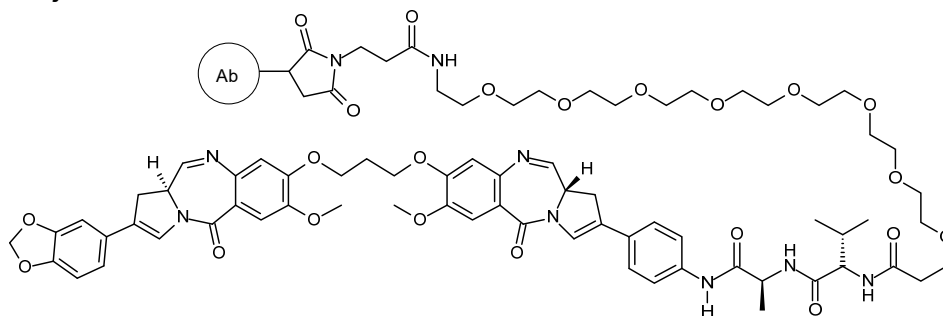
ConjA

ConjB:



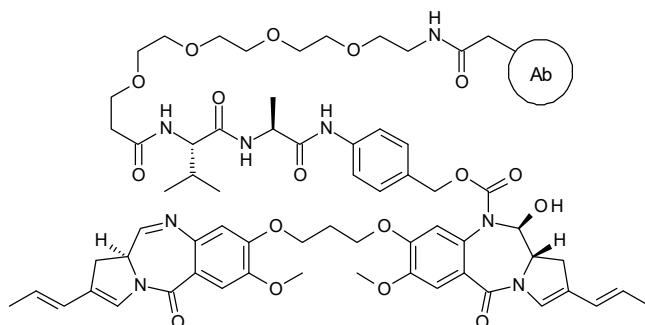
ConjB

ConjC:



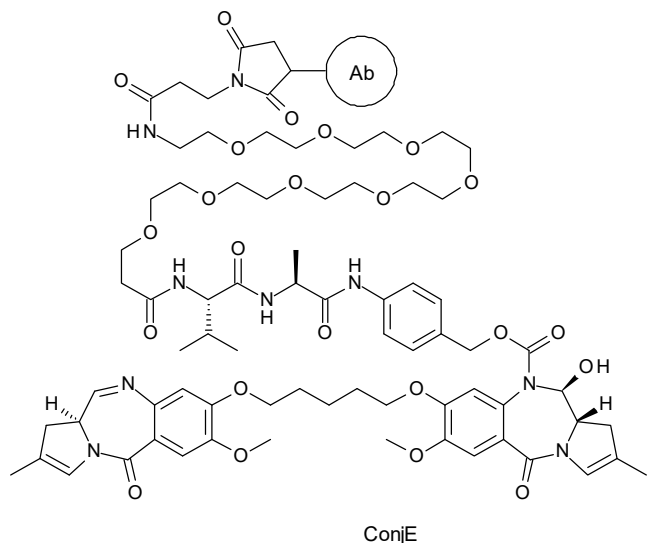
ConjC

ConjD:



ConjD

ou ConjE:



em que Ab é um anticorpo que se liga a CD19, o anticorpo compreendendo um domínio VH tendo a sequência de acordo com a SEQ ID NO: 1 ou 2, opcionalmente compreendendo ainda um domínio VL tendo a sequência de acordo com a SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 ou 12; e em que o carregamento de fármaco (p) dos fármacos (D) para anticorpo (Ab) é um número inteiro de 1 a 8.

2. Conjugado, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo compreende um domínio VH emparelhado com um domínio VL, os domínios VH e VL tendo sequências selecionadas a partir do grupo que consiste em:

SEQ ID NO: 1 emparelhada com qualquer uma das SEQ ID NOs: 7, 8, 9, 10, 11 ou 12; e

SEQ ID NO: 2 emparelhada com qualquer uma das SEQ ID NOs: 7, 8, 9, 10, 11 ou 12.

3. Conjugado, de acordo com a reivindicação 2, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que os domínios VH e VL emparelhados têm as sequências de: SEQ ID NO: 1 emparelhada com SEQ ID NO: 7, ou SEQ ID NO: 2 emparelhada com SEQ ID NO: 8.

4. Conjugado, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fa-

to de que apresenta a fórmula ConjE, em que o anticorpo tem um domínio VH de SEQ ID NO: 2 e um domínio VK de SEQ ID NO: 8.

5. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo intacto.

6. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo é humanizado, desimunizado ou recapeado.

7. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que p é 1, 2, 3 ou 4.

8. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma mistura dos compostos de conjugado anticorpo-fármaco, em que o o carregamento médio de fármaco por anticorpo na mistura de compostos de conjugado anticorpo-fármaco é de 2 a 5.

9. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para o uso em terapia.

10. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para o uso no tratamento de uma doença proliferativa em um paciente.

11. Conjugado, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a doença é câncer.

12. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que, em combinação com rituximabe, é para uso no tratamento de câncer em um paciente.

13. Composição farmacêutica **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende o conjugado, como definido em qualquer uma reivindicações 1 a 8, e um diluente, veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

14. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 13,

CARACTERIZADA pelo fato de que compreende ainda uma quantidade terapêuticamente eficaz de um agente quimioterapêutico.

15. Uso de um conjugado, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para a preparação de um medicamento para o tratamento de uma doença proliferativa em um paciente.

16. Uso de uma composição farmacêutica, como definida na reivindicação 14, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para a fabricação de um medicamento para tratar câncer em um paciente.

17. Uso, de acordo com a reivindicação 16, **CARACTERIZADO** pelo fato de que um agente quimioterapêutico é formulado para ser administrado ao paciente, em combinação com o conjugado.

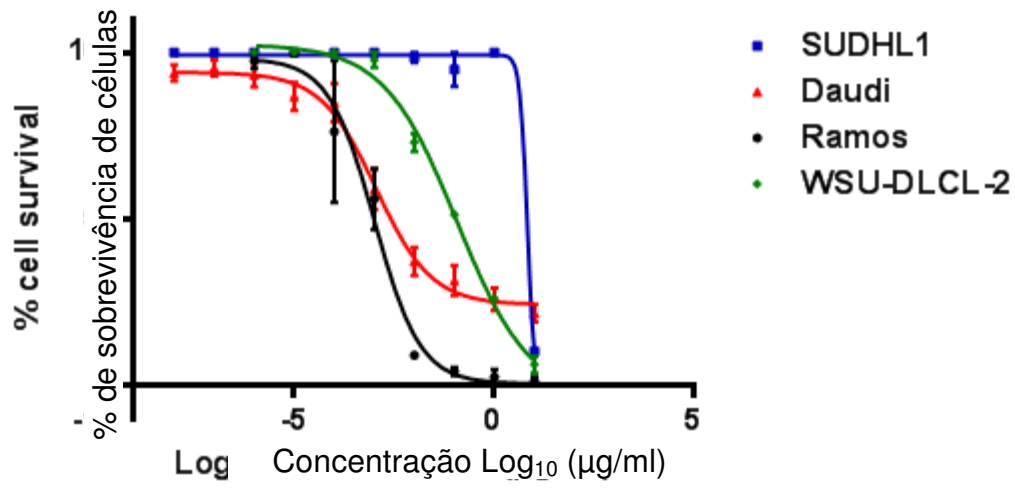


Figura 1

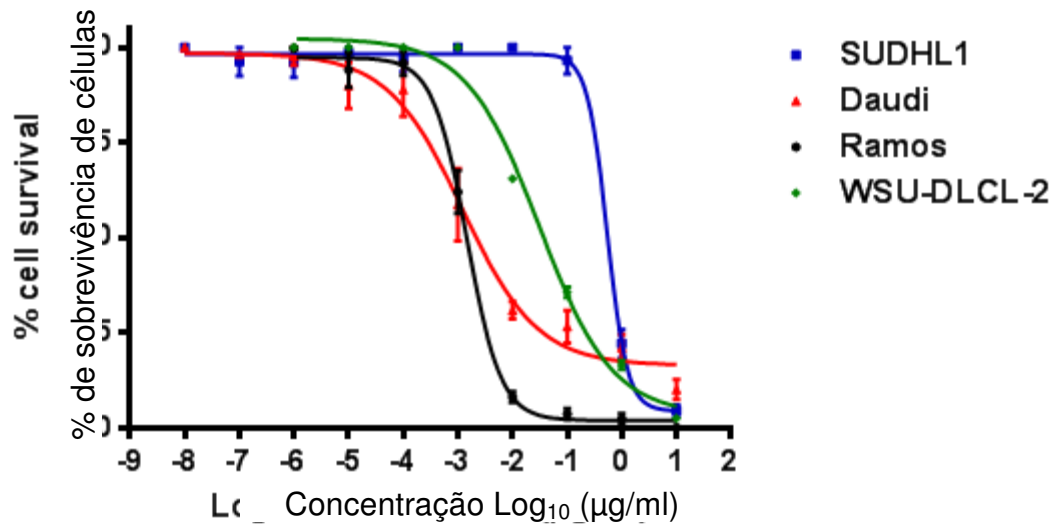


Figura 2

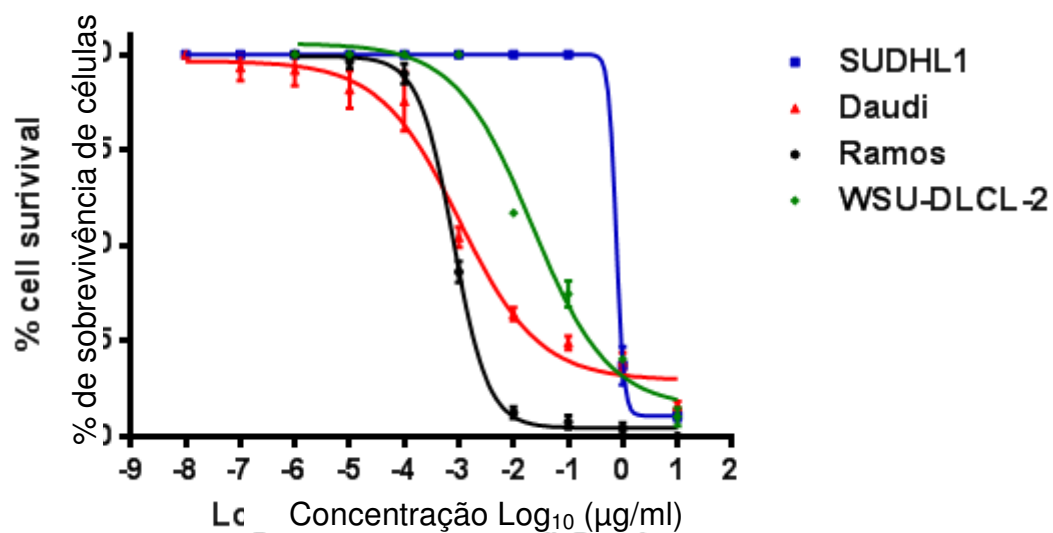


Figura 3

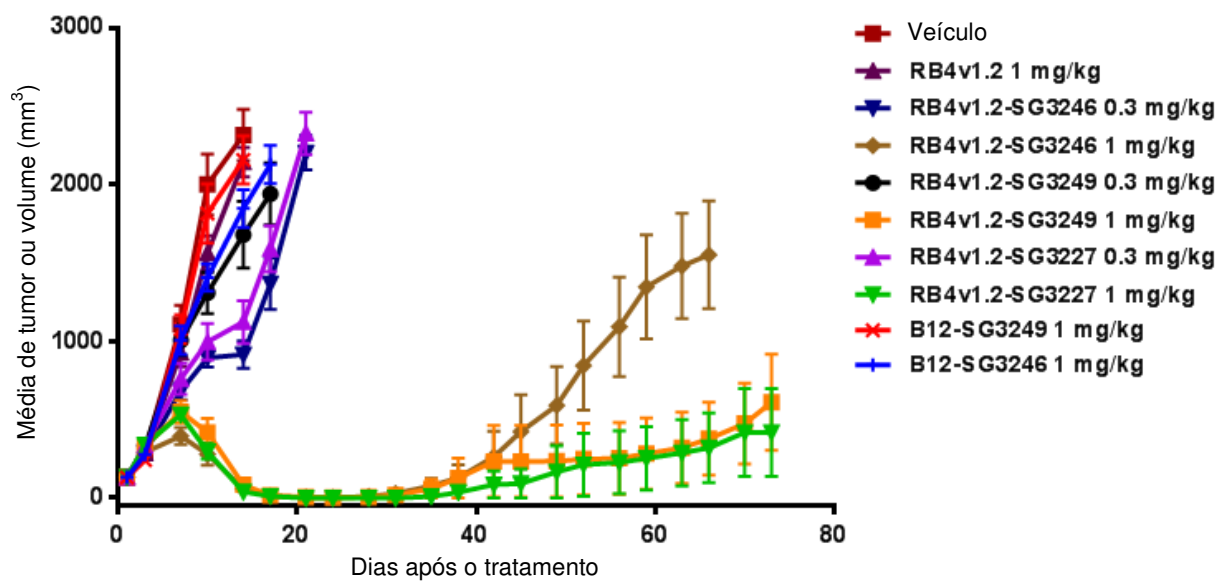


Figura 4