



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

(21) BR 112019028295-5 A2



(22) Data do Depósito: 03/07/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 21/07/2020

(54) Título: COMPOSTOS QUE COMPREENDEM LIGANTE CLIVÁVEL E USOS DOS MESMOS

(51) Int. Cl.: C07H 15/203; C07K 16/40; C07C 305/24; C01B 33/00; A61K 47/22; (...).

(30) Prioridade Unionista: 04/07/2017 KR 10-2017-0084805; 11/12/2017 US 62/597,226.

(71) Depositante(es): INTOCELL, INC..

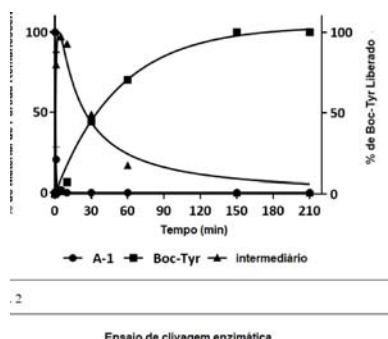
(72) Inventor(es): TAEKYO PARK; SUNG HO WOO; SUNYOUNG KIM; SUHO PARK; JONGUN CHO; DOOHWAN JUNG; DONGHOON SEO; JAEHO LEE; SANGKWANG LEE; SANGHYEON YUN; HYANG SOOK LEE; OKKU PARK; BEOMSEOK SEO.

(86) Pedido PCT: PCT IB2018000847 de 03/07/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/008441 de 10/01/2019

(85) Data da Fase Nacional: 30/12/2019

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a um composto que inclui um ligante clivável, um uso do mesmo e um composto intermediário para preparar o mesmo e, mais particularmente, o composto que inclui um ligante clivável da presente invenção pode incluir um agente ativo (por exemplo, um fármaco, uma toxina, um ligante, uma sonda para detecção, etc.) que tem uma função ou atividade específica, um grupo funcional SO₂ que é capaz de liberar seletivamente o agente ativo e um grupo funcional que desencadeia uma reação química, uma reação fisicoquímica e/ou uma reação biológica por estimulação externa e pode incluir, ainda, um ligante (por exemplo, oligopeptídeo, polipeptídeo, anticorpo, etc.) que tem especificidade de ligação para um receptor alvo desejado.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COM-
POSTOS QUE COMPREENDEM LIGANTE CLIVÁVEL E USOS DOS
MESMOS**".

PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica o benefício de Pedido de Patente Provisório U.S. nº 62/597.226, depositado em 11 de dezembro de 2017, e o Pedido de Patente Coreano nº 10-2017-0084805, depositado em 4 de julho de 2017. O conteúdo de cada um destes pedidos está incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

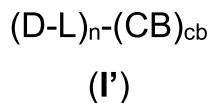
FUNDAMENTOS

[002] Os conjugados de anticorpo-fármaco (ADCs) estão emergindo como uma classe poderosa de agentes antitumorais com eficácia através de uma gama de cânceres. Os ADCs são comumente compostos por recursos distintos: um agente de ligação a célula ou porção química de alvejamento; um ligante; e um agente citotóxico. O componente ligante de ADC é um recurso importante no desenvolvimento de agentes anticâncer alvejados que possuem uma especificidade para alvo desejável, isto é, alta atividade em células tumorais, mas com baixa atividade em células saudáveis.

[003] Portanto, há uma necessidade de ligantes melhorados úteis para preparar ADCs.

SUMÁRIO

[004] São fornecidos no presente documento conjugados de Fórmula (I'):



[005] ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo,

[006] em que:

[007] CB é uma porção química de alvejamento;

[008] cb e n são, cada um, independentemente, números inteiros que têm um valor de 1 a cerca de 20, de preferência, de 1 a cerca de

or; ou

[0022] dois R^b , juntamente com o átomo ao qual estão ligados, formam um anel com 3 a 5 membros, de preferência, um anel com 3 ou 4 membros;

[0023] desde que, quando w for 0, q seja 1.

[0024] A presente invenção também se refere a composições (por exemplo, composições farmacêuticas) que compreendem um composto de Fórmula (I') e um veículo (por exemplo, um veículo farmacêuticamente aceitável).

[0025] Em um aspecto, a invenção fornece conjugados de Fórmula (I'), e composições que compreendem tais conjugados, por exemplo, para uso em terapia, imaginologia, como sensores, como comutadores moleculares, como máquinas moleculares e/ou como nanomáquinas.

[0026] Em outro aspecto, a invenção fornece, ainda, conjugados de Fórmula (I') e composições farmacêuticas dos mesmos, para uso em um método para entregar um agente ativo a uma célula, em que a porção química de alvejamento é selecionada para se ligar a uma molécula associada a uma célula-alvo. Em particular, os presentes compostos, conjugados e composições podem ser úteis para inibir a proliferação de células anormais ou tratar um distúrbio proliferativo em um mamífero (por exemplo, um ser humano), tal como quando a célula-alvo é uma célula cancerosa e a porção química de alvejamento é selecionada para se ligar a uma molécula associada à célula cancerosa (e não associada a células saudáveis ou pelo menos, de preferência, associada a células tumorais em vez de células saudáveis).

[0027] Os presentes conjugados de Fórmula (I') e composições farmacêuticas dos mesmos podem ser úteis para tratar afecções, tal como câncer, artrite reumatoide, esclerose múltipla, doença de enxerto-contra-hospedeiro (GVHD), rejeição de transplante, lúpus, miosite, infecção, deficiência imunológica, tal como AIDS, e doenças inflamató-

rias em um mamífero (por exemplo, ser humano).

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0028] A Figura 1 mostra os resultados de um ensaio de clivagem enzimática de Composto A-1.

[0029] A Figura 2 mostra os resultados de um ensaio de clivagem enzimática de Composto A-2.

[0030] A Figura 3 mostra os resultados de um ensaio de clivagem enzimática de Composto A-3.

[0031] A Figura 4 mostra os resultados de um ensaio de clivagem enzimática de Composto A-4.

[0032] A Figura 5 mostra os resultados de um ensaio de clivagem enzimática de Composto B-1.

[0033] A Figura 6 mostra os resultados de um ensaio de clivagem enzimática de Composto B-3.

[0034] A Figura 7 mostra os resultados de um ensaio de clivagem enzimática (pH 7,4) de Composto B-2.

[0035] A Figura 8 mostra os resultados de um ensaio de clivagem enzimática (pH 5,0) de Composto B-2.

[0036] A Figura 9 mostra os resultados de um ensaio de clivagem enzimática de Composto B-4.

[0037] A Figura 10 mostra os resultados de um ensaio de clivagem enzimática de Composto C-3.

[0038] A Figura 11 mostra os resultados de análise de estabilidade de Composto A-1.

[0039] A Figura 12 mostra os resultados de análise *in vitro* de Composto D-1-AB.

[0040] A Figura 13 mostra os resultados de teste *in vivo* de Composto D-1-AB, D-2-AB, D-8-AB e D-16-AB.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0041] A presente invenção se refere a compostos e conjugados

que compreendem um ligante clivável e usos dos mesmos. Os compostos e conjugados representativos revelados no presente documento compreendem um agente ativo (por exemplo, um fator químico, um fator biológico, um hormônio, um oligonucleotídeo, um fármaco, uma toxina, um ligante, uma sonda para detecção, etc.) que tem uma função ou atividade desejada, um grupo funcional que sofre uma reação química (por exemplo, uma reação físico-química e/ou uma reação biológica) sob condições predeterminadas para liberar um heteroátomo nucleofílico, e um grupo funcional SO_2 posicionado proximal ao heteroátomo nucleofílico de modo que possa reagir com o heteroátomo nucleofílico em uma reação de ciclização intramolecular para liberar o agente ativo. Em algumas modalidades, os compostos e conjugados revelados no presente documento compreendem, ainda, uma porção química de alvejamento (por exemplo, oligopeptídeo, polipeptídeo, anticorpo, etc.) que tem especificidade de ligação para um receptor-alvo desejado ou outra molécula associada a uma célula-alvo.

DEFINIÇÕES

[0042] O significado do termo "alquila" é entendido na técnica. Por exemplo, "alquila" usada sozinha ou como parte de uma porção química maior, tal como "alcóxi", "haloalquila", "cicloalquila", "heterocicloalquila", e similares, pode se referir a um hidrocarboneto de cadeia reta ou ramificado que é completamente saturado. Tipicamente, um grupo alquila de cadeia reta ou ramificado é um grupo acíclico que tem de 1 a cerca de 20 átomos de carbono, de preferência, de 1 a cerca de 10 átomos de carbono, a não ser que definido de outro modo. Os exemplos de grupos alquila de cadeia reta e ramificados incluem, porém sem limitação, metila, etila, propila, isopropila, n-butila, sec-butila, terc-butila, n-pentila, n-hexila, n-heptila e n-octila. Um grupo $\text{C}_1\text{-C}_6$ alquila de cadeia linear ou ramificado é também chamado de grupo "alquila inferior". Os grupos alquila que têm duas valências abertas são algu-

mas vezes denominados com um sufixo "eno", como em alquilenos. Os grupos alquilenos exemplificativos incluem metileno, etileno, propileno e similares.

[0043] Além disto, o termo "alquila" (ou "alquila inferior") pode incluir tanto "alquilas não substituídas" quanto "alquilas substituídas", as últimas das quais se referem a porções químicas alquila que têm substituintes substituindo um hidrogênio em um ou mais carbonos da cadeia principal de hidrocarboneto. Tais substituintes, se não especificados de outro modo, podem incluir, por exemplo, um halogênio, uma hidroxila, uma carbonila (tal como uma carboxila, uma alcóxicarbonila, uma formila ou uma acila), uma tiocarbonila (tal como um tioéster, um tioacetato ou um tioformato), uma alcóxila, uma fosforila, um fosfato, um fosfonato, um fosfinato, um amino, um amido, uma amidina, uma imina, um ciano, um nitro, um azido, uma sulfidril, um alquiltio, um sulfato, um sulfonato, uma sulfamoila, um sulfonamido, uma sulfonila, uma heterociclila, uma aralquila ou uma parte aromática ou heteroaromática. O versado na técnica entenderá que as porções químicas substituídas na cadeia de hidrocarboneto podem ser substituídas, se apropriado. Por exemplo, os substituintes de uma alquila substituída podem incluir formas substituídas e não substituídas de alquila, amino, azido, imino, amido, fosforila (incluindo fosfonato e fosfinato), sulfonila (incluindo sulfato, sulfonamido, sulfamoila e sulfonato) e silila, assim como éteres, alquiltios, carbonilas (incluindo cetonas, aldeídos, carboxilatos e ésteres), $-CF_3$, $-CN$ e similares. As alquilas substituídas exemplificativas são descritas abaixo. As cicloalquilas podem ser, ainda, substituídas com alquilas, alquenilas, alcóxis, alquiltios, aminoalquilas, alquilas substituídas por carbonila, $-CF_3$, $-CN$ e similares.

[0044] O termo " C_x-C_y ", quando usado em conjunto com uma porção química, tal como, por exemplo, acila, acilóxi, alquila, alquenila, alquinila ou alcóxi, pode incluir grupos que contêm de x a y carbonos

na cadeia, em que "x" e "y" são números inteiros selecionados dentre 1 a cerca de 20, e em que x é um número inteiro de valor menor que y, e x e y não são o mesmo valor. Por exemplo, o termo " C_x-C_y -alquila" se refere a grupos hidrocarboneto saturados substituídos ou não substituídos, incluindo grupos alquila de cadeia reta e de cadeia ramificada que contêm de x a y número de carbonos na cadeia, incluindo grupos haloalquila, tal como trifluorometila e 2,2,2-trifluoroetila, etc. Os termos " C_2-C_y -alquenila" e " C_2-C_y -alquinila" se referem a análogos de grupos alifáticos insaturados substituídos ou não substituídos em comprimento e substituição possível às alquilas descritas acima, mas que contêm pelo menos uma ligação dupla ou tripla, respectivamente. Conforme aplicado às heteroalquilas, " C_x-C_y " indica que o grupo contém de x a y número de carbonos e heteroátomos na cadeia. Conforme aplicado às estruturas carbocíclicas, tais como grupos arila e cicloalquila, " C_x-C_y " indica que o anel compreende x a y número de átomos de carbono no anel.

[0045] O significado do termo "alcóxi" é entendido na técnica e, por exemplo, pode se referir a um grupo alquila, de preferência, um grupo alquila inferior, que tem um oxigênio fixado ao mesmo. Grupos alcóxi representativos incluem metóxi, etóxi, propóxi, terc-butóxi e similares.

[0046] Os termos "hal", "halo" e "halogênio" são usados intercambiavelmente por todo o presente documento e se referem a flúor ou fluoro (F), cloro (Cl), bromo (Br) ou iodo (I).

[0047] O significado do termo "cicloalquila" é entendido na técnica e, por exemplo, pode se referir a um hidrocarboneto cíclico substituído ou não substituído que é completamente saturado. "Cicloalquila" inclui anéis monocíclicos e bicíclicos. Tipicamente, um grupo cicloalquila monocíclico tem de 3 a cerca de 10 átomos de carbono, mais tipicamente, 3 a 8 átomos de carbono, exceto se definido de outro modo. O

segundo anel de uma cicloalquila bicíclica pode ser selecionado dentre anéis saturados, insaturados e aromáticos. Cicloalquila inclui moléculas bicíclicas nas quais um, dois ou três ou mais átomos são compartilhados entre os dois anéis. O termo "cicloalquila fundida" se refere a uma cicloalquila bicíclica na qual cada um dos anéis compartilha dois átomos adjacentes com o outro anel. O segundo anel de uma cicloalquila bicíclica fundida pode ser selecionado dentre anéis saturados, insaturados e aromáticos. Um grupo "cicloalquenila" é um hidrocarboneto cíclico contendo uma ou mais ligações duplas.

[0048] O significado do termo "arila" é entendido na técnica e, por exemplo, pode se referir a grupos aromáticos de anel único substituído ou não substituído em que cada átomo do anel é carbono. De preferência, o anel é um anel com 5 a 7 membros, mais preferencialmente, um anel com 6 membros. O termo "arila" também inclui sistemas de anéis policíclicos tendo dois ou mais anéis cíclicos nos quais dois ou mais carbonos são comuns a dois anéis adjacentes em que pelo menos um dentre os anéis é aromático, por exemplo, os outros anéis cíclicos podem ser cicloalquilas, cicloalquenilas, cicloalquilas, arilas, heteroarilas e/ou heterociclilas. Os grupos arila incluem benzeno, naftaleno, fenantreno, fenol, anilina e similares.

[0049] O significado dos termos "heterociclila" e "heterociclo" são entendidos na técnica e, por exemplo, podem se referir a estruturas de anel não aromático substituídas ou não substituídas, de preferência, anéis com 3 a 10 membros, mais preferencialmente, anéis com 3 a 7 membros, cujas estruturas de anel incluem pelo menos um heteroátomo, de preferência, um a quatro heteroátomos, mais preferencialmente, um ou dois heteroátomos. Tais heterociclos também incluem sistemas de anéis policíclicos que têm dois ou mais anéis cíclicos nos quais dois ou mais carbonos são comuns a dois anéis adjacentes, em que pelo menos um dentre os anéis é heterocíclico, por exemplo, os

outros anéis cíclicos podem ser cicloalquilas, cicloalquenilas, cicloalquilas, arilas, heteroarilas e/ou heterociclilas. Os grupos heterociclila incluem, por exemplo, piperidina, piperazina, pirrolidina, morfolina, lactonas, lactamas e similares.

[0050] O significado do termo "heteroarila" é entendido na técnica e, por exemplo, pode se referir a estruturas de anel único aromático substituídas ou não substituídas, de preferência, anéis com 5 a 7 membros, mais preferencialmente, anéis com 5 a 6 membros, cujas estruturas de anel incluem pelo menos um heteroátomo, de preferência, um a quatro heteroátomos, mais preferencialmente, um ou dois heteroátomos. Os termos "heteroarila" e "hetarila" também incluem sistemas de anéis policíclicos que têm dois ou mais anéis cíclicos nos quais dois ou mais carbonos são comuns a dois anéis adjacentes, em que pelo menos um dentre os anéis é heteroaromático, por exemplo, os outros anéis cíclicos podem ser cicloalquilas, cicloalquenilas, cicloalquilas, arilas, heteroarilas e/ou heterociclilas. Os grupos heteroarila incluem, por exemplo, pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, pirazol, piridina, pirazina, piridazina e pirimidina e similares.

[0051] O termo "substituído" se refere a porções químicas que têm substituintes que substituem um hidrogênio em um ou mais carbonos ou heteroátomos da porção química. O versado na técnica entenderá que "substituição" ou "substituído por" inclui a condição implícita que tal substituição está de acordo com a valência permitida do átomo substituído e do substituinte e que a substituição resulta em um composto estável, por exemplo, que não é espontaneamente submetido à transformação tal como por reorganização, ciclização, eliminação, etc. Conforme usado no presente documento, o termo "substituído" é contemplado incluindo todos os substituintes permissíveis de compostos orgânicos.

[0052] Em algumas modalidades, os substituintes permissíveis in-

cluem substituintes acíclicos e cíclicos, ramificado e não ramificados, carbocíclicos e heterocíclicos, aromáticos e não aromáticos de compostos orgânicos. Os substituintes permissíveis podem ser um ou mais e os mesmos ou diferentes para compostos orgânicos apropriados. Para os propósitos desta invenção, os heteroátomos tais como nitrogênio podem ter substituintes de hidrogênio e/ou quaisquer substituintes permissíveis de compostos orgânicos descritos no presente documento que satisfazem as valências dos heteroátomos. Os substituintes podem incluir quaisquer substituintes descritos no presente documento, tal como, por exemplo, um halogênio, uma hidroxila, uma carbonila (tal como uma carboxila, uma alcóxicarbonila, uma formila ou uma acila), uma tiocarbonila (tal como um tioéster, um tioacetato ou um tioformato), uma alcóxila, uma fosforila, um fosfato, um fosfonato, um fosfinato, um amino, um amido, uma amidina, uma imina, um ciano, um nitro, um azido, uma sulfidril, um alquiltio, um sulfato, um sulfonato, uma sulfamoila, um sulfonamido, uma sulfonila, uma heterociclila, uma alquila, uma aralquila ou uma parte aromática ou heteroaromática. O versado na técnica entenderá que os próprios substituintes podem ser substituídos, se adequado. Exceto se especificamente estabelecido como "não substituído", as referências a porções químicas no presente documento são entendidas como incluindo variantes substituídas. Por exemplo, referência a um grupo ou parte de "arila" inclui implicitamente variantes tanto substituídas como não substituídas.

[0053] O termo "indivíduo" ao qual a administração é contemplada inclui, por exemplo, seres humanos (isto é, um homem ou uma mulher de qualquer grupo etário, por exemplo, um indivíduo pediátrico (por exemplo, bebê, criança, adolescente) ou indivíduo adulto (por exemplo, adulto jovem, adulto de meia idade ou adulto sênior)) e/ou outros primatas (por exemplo, macacos cinomolgo, macacos reso); mamíferos, incluindo mamíferos comercialmente relevantes, tal como gado,

porcos, cavalos, ovelhas, cabras, gatos e/ou cães; e/ou aves, incluindo aves comercialmente relevantes, tais como galinhas, patos, gansos, codornas e/ou perus. Os indivíduos preferenciais são seres humanos.

[0054] Conforme usado no presente documento, um agente terapêutico que "evita" um distúrbio ou condição pode se referir, por exemplo, a um composto que, em uma amostra estatística, reduz a ocorrência do distúrbio ou afecção na amostra tratada em relação a uma amostra de controle não tratada ou atrasa o início ou reduz a severidade de um ou mais sintomas do distúrbio ou afecção em relação à amostra de controle não tratada.

[0055] O termo "tratar" inclui tratamento profiláticos e/ou terapêuticos. O termo tratamento "profilático ou terapêutico" é reconhecido na técnica e inclui a administração ao hospedeiro de uma ou mais das presentes composições. Se o mesmo for administrado antes da manifestação clínica da condição indesejada (por exemplo, doença ou outro estado indesejado do animal hospedeiro), então o tratamento é profilático (isto é, protege o hospedeiro contra o desenvolvimento da condição indesejada), enquanto que se for administrado após a manifestação da condição indesejada, o tratamento é terapêutico, (isto é, se destina a diminuir, melhorar ou estabilizar a condição indesejada existente ou efeitos colaterais da mesma).

[0056] Em certas modalidades, compostos e conjugados revelados no presente documento podem ser usados sozinhos ou administrados conjuntamente com outro tipo de agente ou composto terapêutico. Conforme usado no presente documento, a expressão "administração conjunta" se refere a qualquer forma de administração de dois ou mais compostos terapêuticos diferentes de tal modo que o segundo composto seja administrado enquanto o composto terapêutico anteriormente administrado ainda seja eficaz no corpo (por exemplo, os dois compostos são simultaneamente eficazes no paciente, que pode inclu-

ir efeitos sinérgicos dos dois compostos). Por exemplo, os diferentes compostos e conjugados terapêuticos podem ser administrados ou na mesma formulação ou em uma formulação separada, concomitante ou sequencialmente. Em certas modalidades, os diferentes conjugados e compostos terapêuticos podem ser administrados em uma hora, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 72 horas ou uma semana entre si. Assim, um indivíduo que recebe tal tratamento pode se beneficiar de um efeito combinado de diferentes conjugados e compostos terapêuticos.

[0057] Os termos "crescimento celular anormal" e "distúrbio proliferativo" são usados intercambiavelmente neste pedido. "Crescimento celular anormal", conforme usado no presente documento, a não ser que indicado de outro modo, se refere ao crescimento celular que é independente de mecanismos reguladores normais (por exemplo, perda de inibição de contato). Isto inclui, por exemplo, o crescimento anormal de: (1) células tumorais (tumores) que proliferam expressando uma tirosina quinase com mutação ou superexpressão de uma tirosina quinase receptora; (2) células benignas e malignas de outras doenças proliferativas em que ocorre ativação de tirosina quinase aberrante; (3) qualquer tumores que proliferam por tirosina quinases receptoras; (4) quaisquer tumores que proliferam por ativação de serina/treonina quinase aberrante; e (5) células benignas e malignas de outras doenças proliferativas em que ocorre ativação serina/treonina quinase aberrante.

[0058] Os termos "câncer" e "canceroso" se referem ou descrevem a afecção fisiológica em mamíferos que é tipicamente caracterizada pela proliferação não regulada de células. Um "tumor" compreende uma ou mais células cancerosas. Os exemplos de câncer incluem, porém sem limitação, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma e leucemia ou malignidades linfoides. Os exemplos mais particulares de tais cân-

[0067] L' é uma porção química espaçadora ligada ao SO₂ através de um heteroátomo selecionado dentre O, S e N, de preferência, O ou N, e é selecionado de modo que a clivagem da ligação entre L' e SO₂ promova a clivagem da ligação entre L' e Q para liberar o agente ativo;

[0068] X é -O-, -C(R^b)₂- ou -N(R^c)-, de preferência, -O-;

[0069] Ar representa um anel, tal como arila, heteroarila, cicloalquila ou heterocicloalquila, de preferência, arila ou heteroarila;

[0070] Y' é -(CR^b)_yN(R^a)-, -(CR^b)_yO- ou -(CR^b)_yS-, posicionado de modo que o átomo de N, O ou S seja ligado a TG, se y for 1;

[0071] X e Y' estão posicionados em átomos adjacentes de Ar;

[0072] TG é um grupo de desencadeamento que, quando ativado, gera um átomo de N, O ou S capaz de reagir com o SO₂ para deslocar (Q)_q-(L')_w e formar um anel com 5 ou 6 membros, incluindo X-SO₂ e os átomos intermediários de Ar;

[0073] q é um número inteiro que tem um valor de 1 a cerca de 20, de preferência, de 1 a cerca de 10;

[0074] w, x e y são, cada um, independentemente, um número inteiro que tem um valor de 0 ou 1;

[0075] cada R^a e R^c é, independentemente, hidrogênio ou alquila inferior; e

[0076] cada R^b é, independentemente, hidrogênio ou alquila inferior; ou

[0077] dois R^b, juntamente com o átomo ao qual estão ligados, formam um anel com 3 a 5 membros, de preferência, um anel com 3 ou 4 membros,

[0078] desde que, quando w for 0, q seja 1.

[0079] Cada agente ativo pode ser qualquer agente ativo adequado, conforme descrito com mais detalhes abaixo. Embora muitos métodos de conjugação tradicionais exijam ter certos grupos funcionais, tais como aminas ou grupos hidroxila, para formar uma ligação está-

vel, a descrição no presente documento fornece estratégias para formar conexões usando grupos funcionais, tais como fenóis e aminas terciárias, para formar ligações estáveis nos conjugados divulgados no presente documento, enquanto ainda permite a liberação sob as condições predeterminadas que ativam o grupo de desencadeamento.

[0080] Muitos grupos de desencadeamento adequados são conhecidos na técnica e grupos de desencadeamento exemplificativos e as condições que ativam os mesmos são discutidos abaixo, tais como porções químicas descritas para Y abaixo. Alguns grupos de desencadeamento incluem o átomo de N, O ou S, mas em uma forma não nucleofílica. Por exemplo, um grupo NO_2 é um grupo de desencadeamento que, sob condições redutivas, é reduzido a um grupo NH_2 ou NHOH que pode reagir com o SO_2 , e um grupo acetato é um grupo de desencadeamento que, sob condições hidrolíticas, é hidrolisado em um grupo hidroxila que pode reagir com o SO_2 . Outros grupos de desencadeamento não incluem o átomo de N, O ou S, mas, quando ativados, são convertidos em um átomo de N, O ou S nucleofílico. Por exemplo, um grupo boronato é um grupo de desencadeamento que, sob condições oxidantes (tal como peróxido), é convertido em um grupo hidroxila que pode reagir com o SO_2 . De preferência, o grupo de desencadeamento é selecionado de modo que as condições que ativam o mesmo o façam seletivamente, sem clivar ou degradar outras porções do conjugado, tal como a porção química de alvejamento. Uma vez que o átomo de N, O ou S nucleofílico seja gerado, este átomo ataca intramolecularmente a porção química SO_2 para formar um anel, expelindo a porção química $(\text{Q})_q-(\text{L}')_w-\text{H}$, em que o H está ligado ao heteroátomo de Q ou L' que estava anteriormente ligado à porção química SO_2 .

[0081] Nas modalidades em que w é 0, q é 1 e Q está diretamente ligado ao SO_2 através de um heteroátomo. Consequentemente, ativar o grupo de desencadeamento gera um heteroátomo nucleofílico que

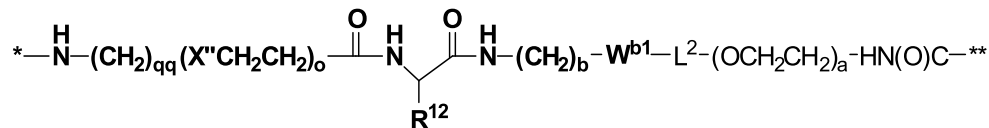
ataca intramolecularmente a porção química SO_2 para formar um anel, expelindo o agente ativo Q-H, em que o H está ligado ao heteroátomo anteriormente ligado a SO_2 .

[0082] Nas modalidades em que w é 1, L' pode ser selecionado para permitir a ligação de múltiplas ocorrências de Q, que podem ser iguais ou diferentes. Consequentemente, cada caso de Q está indiretamente ligado ao SO_2 através de uma porção química espaçadora. Em tais modalidades, ativar o grupo de desencadeamento gera um heteroátomo nucleofílico que ataca intramolecularmente a porção química SO_2 para formar um anel, expelindo a porção química $(Q)_q-L'-H$, em que o H está ligado ao heteroátomo em L' que estava anteriormente ligado a SO_2 . Em tais modalidades, o heteroátomo liberado desencadeia uma reação intramolecular que expelle o agente (ou agentes) ativo Q (tal como se Q tiver uma amina terciária que estava ligada a L' como um amônio quaternário) ou Q-H. Por exemplo, o heteroátomo pode sofrer uma reação de ciclização intramolecular com uma porção química éster formada com uma hidroxila de Q-H, formando um anel e ejetando o agente ativo Q-H. Alternativamente, o heteroátomo pode sofrer uma tautomerização intramolecular que expelle o agente ativo Q ou Q-H.

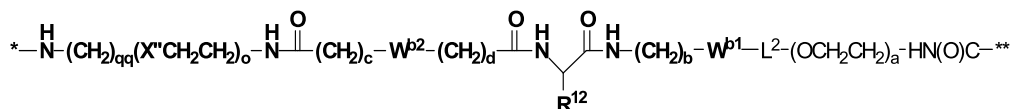
[0083] Ar pode ser qualquer anel adequado, incluindo um anel de um biciclo ou outro policiclo, de modo que as porções químicas que sofrem ciclização intramolecular sejam mantidas em proximidade estreita para facilitar a reação após ativação do grupo de desencadeamento. O caráter plano de anéis aromáticos e heteroaromáticos é preferencial, visto que a geometria rígida de substituintes em tais anéis garante posicionamento favorável das porções químicas reativas, embora outros tipos de anéis, tal como cicloalquenila ou heterocicloalquenila, possam impor geometrias similares. Um anel com cinco ou seis membros, e/ou o número ou identidades de heteroátomos no

anel, e/ou substituintes (por exemplo, substituintes doadores de elétrons ou removedores de elétrons) em outro anel podem ser selecionados para modular a taxa de ciclização com base nos ângulos de ligação resultantes do anel. Similarmente, as conformações mais flexíveis de anéis cicloalquila e heterociclila podem ser úteis quando é desejado reduzir a taxa de ciclização intramolecular.

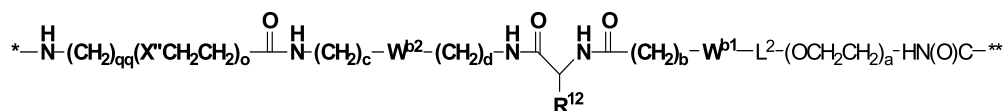
[0084] Z' pode ser qualquer grupo de ligação adequado que conecte Ar a um ou mais grupos CB. Tipicamente, o grupo de ligação deve ser suficientemente hidrofílico para promover a solubilidade em água e desencorajar a agregação do conjugado, tal como incluindo porções químicas, tais como porções químicas polietileno glicol, sequências de peptídeos, porções químicas que portam carga (tais como carboxilatos, aminas, anéis contendo nitrogênio, etc.), etc. para equilibrar o caráter hidrofóbico de quaisquer cadeias alquila que possam estar incluídas. Devido ao fato de que é frequentemente vantajoso preparar conjugados de uma forma modular, Z' pode conter uma unidade de ligação, um grupo funcional que resulta da conjugação de uma porção química reativa a outra. As unidades de ligação representativas são discutidas em mais detalhes abaixo (por exemplo, em conexão com a variável Z), e os grupos de ligação comuns incluem amidas, triazóis, oximas, carbamatos, etc. Os grupos Z' representativos incluem grupos L^{1'}-Z, conforme discutido em mais detalhes abaixo. Em algumas modalidades, todos os grupos D-L ligados a cada CB são idênticos, embora, em outras modalidades, cada CB possa estar ligado a um ou mais grupos D-L distintos. Por exemplo, alguns grupos D-L podem ter um grupo de desencadeamento que é ativado sob uma primeira condição, enquanto outros grupos D-L podem ter um grupo de desencadeamento que é ativado sob uma segunda condição, de modo que, por exemplo, um agente ativo possa ser seletivamente liberado sob a primeira condição, mas um segundo agente ativo possa ser se-



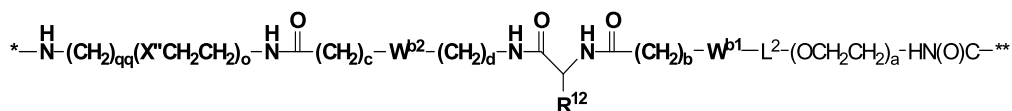
(G)



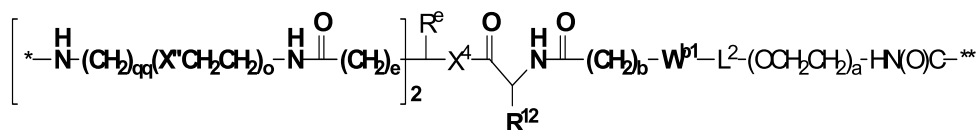
(H)



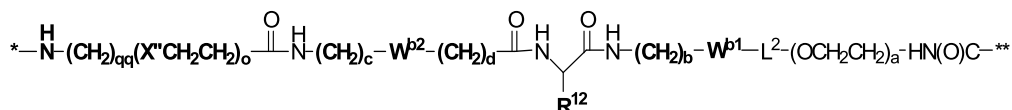
(J)



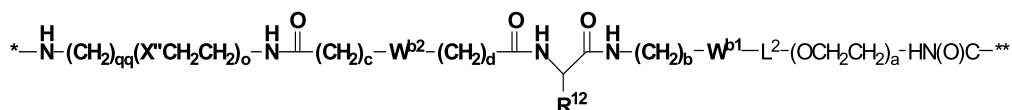
(K)



(L)



(M)



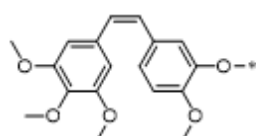
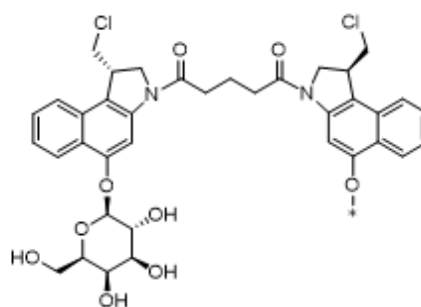
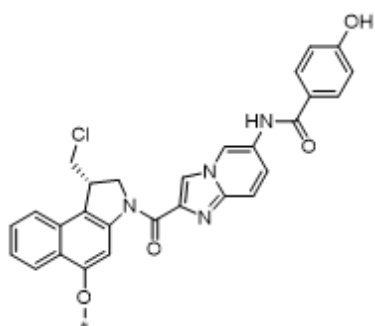
(N)

[00123] em que:

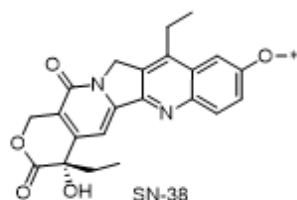
[00124] * é o ponto de ligação a CB;

[00125] ** é o ponto de ligação a Ar;

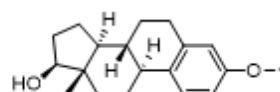
[00126] R^e é alquila;[00127] X'' é -O-, -S-, -NH- ou -CH₂-;[00128] X⁴ é -NHC(O)-(CH₂)_g-NH- ou -C(O)NH-(CH₂)_h-NH-;[00129] W^{b1} e W^{b2} são, cada um, independentemente, -C(O)NH-,



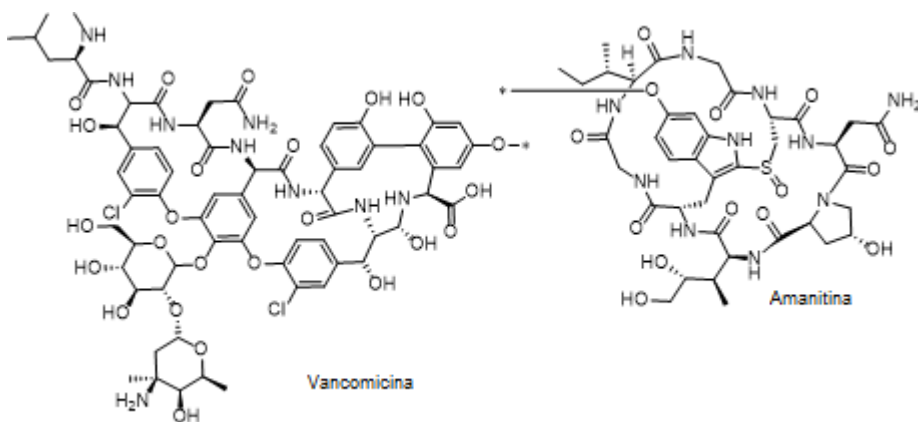
Combrestatina A-4
(CA-4)



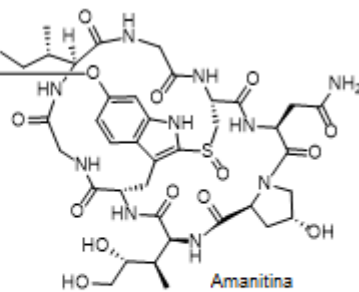
SN-38



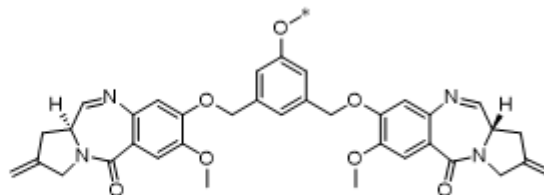
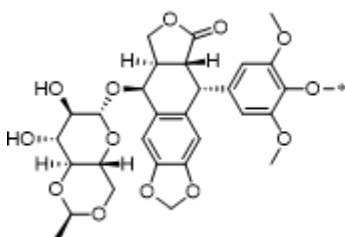
Estradiol



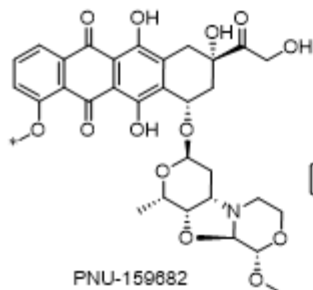
Vancomicina



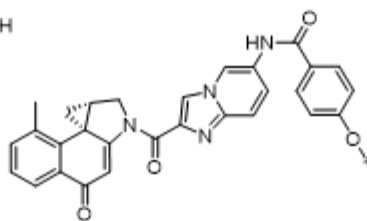
Amanitina



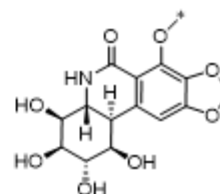
Derivado de dímero de PBD



PNU-159882



Análogo de duocamicina



Pancratistatina

ligação de fosfonato, uma ligação de sulfo ou uma estrutura de dendrímero;

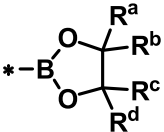
[00142] Z é uma unidade de ligação que conecta CB e L^{1'} ou um grupo reativo (por exemplo, que possibilita a conexão a CB);

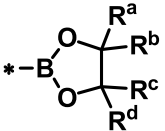
[00143] CB é uma porção química de alvejamento, tal como um ligante que tem uma propriedade em que o mesmo se liga a um receptor;

[00144] cb é um n é um número inteiro que tem um valor de 0, 1 ou 2;

[00145] n é um número inteiro que tem um valor de 1, 2, 3 ou 4;

[00146] Y é -NO₂, -OC(O)(CH₂)_rC(O)R¹, -O(CH₂)_r-Ar¹-NO₂, -NHOH,

-NHNH₂, -BR²R³,  ou -Y'-TG, de preferência, Y é -NO₂,

-OC(O)(CH₂)_rC(O)R¹, -O(CH₂)_r-Ar¹-NO₂, -NHNH₂, -BR²R³,  ou -Y'-TG;

[00147] R¹ é C₁-C₆ alquila;

[00148] r é um número inteiro que tem um valor de 1, 2, 3, 4 ou 5;

[00149] Ar¹ é C₆-C₂₀ arileno;

[00150] R² e R³ são, cada um, independentemente, hidrogênio, C₁-C₆ alquila, C₁-C₆ alcóxi ou hidróxi;

[00151] R^a, R^b, R^c e R^d são, cada um, independentemente, hidrogênio ou C₁-C₆ alquila;

[00152] Y' é -(CH₂)_xNR^{''}-, -(CH₂)_xO- ou -(CH₂)_xS-;

[00153] R^{''} é hidrogênio ou C₁-C₆ alquila;

[00154] x é um número inteiro que tem um valor de 0 ou 1;

[00155] TG é um grupo de desencadeamento;

[00156] Q é -Q¹ ou -L'-(Q¹)_w;

[00157] L' é um espaçador de C₇-C₃₀-hidrocarboneto que tem -O-

ou $-NR'''$ - em uma extremidade e $-O-$, $-OC(O)-$, $-O(CO)O-$, $-OC(O)NR'''$ - ou $-OC(O)NR^4CH_2O-$ na outra extremidade, em que $-O-$, $-OC(O)-$, $-O(CO)O-$ ou $-OC(O)NR'''$ - pode ser, ainda, incluído no espaçador de C_7-C_{30} hidrocarboneto, em que o espaçador de C_7-C_{30} hidrocarboneto é, ainda, substituído por um ou mais substituintes, tal como C_1-C_6 alquila, C_5-C_{14} arila e C_3-C_8 heteroarila, em que a alquila, arila e heteroarila pode ser, ainda, substituída, por exemplo, por um ou mais substituintes selecionados a partir do grupo que consiste em C_1-C_{10} alquila, $-(CH_2)_uNH_2$, $-(CH_2)_uNR^{u1}R^{u2}$, $-(CH_2)_uCO_2H$, $-(CH_2)_uCO_2R^{u1}$ e $-(CH_2)_uSO_2R^{u3}$, em que R^{u1} , R^{u2} e R^{u3} são, cada um, independentemente, hidrogênio, C_1-C_{15} alquila, C_6-C_{20} arila ou C_3-C_{10} heteroarila; e u é um número inteiro que tem um valor de 1 a cerca de 10;

[00158] Q^1 é um agente ativo que inclui pelo menos um grupo funcional de $-OH$, $-NH-$, $-NR_5R_6$, $-SH$, $-SO_2NH_2$ ou $-COOH$;

[00159] R^4 é hidrogênio, C_1-C_6 -alquila, C_5-C_{14} -arila ou C_3-C_8 -heteroarila, em que a alquila, arila e heteroarila são substituídas ou não substituídas;

[00160] R^5 e R^6 são, cada um, independentemente, hidrogênio, C_1-C_6 -alquila, C_3-C_9 -cicloalquila ou C_5-C_{10} -heteroarila, em que a heteroarila é substituída ou não substituída;

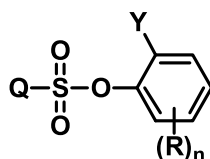
[00161] R''' e R'''' são, cada um, independentemente, hidrogênio ou C_1-C_6 -alquila; e

[00162] w é um número inteiro que tem um valor de 1, 2, 3, 4 ou 5.

[00163] Em algumas modalidades, o composto de Fórmula (I) compreende um grupo funcional (por exemplo, Y) capaz de induzir a ciclição intramolecular por estimulação externa. Em certas modalidades, o dito grupo funcional é introduzido em uma posição orto em relação a X.

[00164] Em algumas modalidades, R' é C_1-C_6 -alquila, C_6-C_{14} -arila ou C_2-C_{20} -heteroarila.

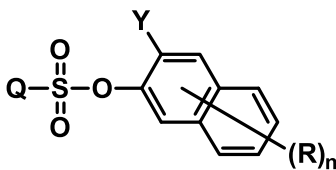
[00165] Em algumas modalidades, Ar é um C₅–C₂₀-anel aromático, um C₂–C₂₀-anel heteroaromático, um C₂–C₃₀-anel fundido ou um C₅–C₂₀-anel aromático-C₂–C₂₀-anel heteroaromático. Por exemplo, Ar pode ser um anel benzeno, um anel naftaleno, um anel piridina ou um anel quinolona. De preferência, Ar é um anel benzeno ou um anel naftaleno. Em algumas modalidades, o composto de Fórmula (I) é um composto que tem uma estrutura de acordo com a Fórmula (II):



(II)

[00166] ou um sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos.

[00167] Em outras modalidades, o composto de Fórmula (I) é um composto que tem uma estrutura de acordo com a Fórmula (III):



(III)

[00168] ou um sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos.

[00169] Em algumas modalidades, o composto é um composto de Fórmula (I), (II) ou (III), em que R é selecionado dentre hidrogênio, halogênio (hal), aldeído, acetal, cetel, -R*, -OR*, -SR*, -NR*R**, -C(hal)₃, -CN, -OCN, -SCN, -N=C=O, -NCS, -NO, -NO₂, -N₃, -NC, -C(O)R*, -OC(O)R*, -OS(O)R*, -S(O)₂R*, -S(O)₂OR*, -OS(O)OR*, -OS(O)₂OR*, -S(O)NR*R**, -S(O)₂NR*R**, -S(O)R*, -OP(O)(OR*)₂, -P(O)(OR*)₂, -OP(OR*)₂, -OP(OR*)N(R**)₂, -OP(O)(OR*)N(R**)₂, -PR*, -P(O)₂, -P(O)R*, -C(O)hal, -C(S)R*, -CO₂R*, -C(S)OR*, -C(O)SR*, -C(S)SR*, -C(O)NR*R**, -C(S)NR*R**, -C(=NR*)NR*R**, -NR*C(O)R**, -NR*S(O)₂OR**, -NR*S(O)R**, -NR*C(O)NR**, -SS-R* ou -R*SSR**, em que: R* e R** são, cada um, independentemente, hidrogênio, C₁-C₁₈

alquila, C₆-C₂₀ arila, C₃-C₁₅ heterociclo ou C₃-C₂₀ heteroarila.

[00170] Em algumas modalidades, o composto é um composto de Fórmula (I), (II) ou (III), em que R é hidrogênio ou $^{*}-(L^a-A_1-L^b-L^c-Z)_m$ -CB; em que:

[00171] L^a é uma ligação simples ou C₁-C₂₀-alquilenos;

[00172] A^1 é -C(O)NR^{*}-, -NR^{*}C(O)-, -NR^{*}-, -O-, -PO₃-, -OPO₃-, -SO-, -SO₂- ou -SO₃-;

[00173] L^b é -(CH₂CH₂O)_a- ou -(CH₂)_a-;

[00174] R^{*} é hidrogênio, C₁-C₁₈-alquila, C₆-C₂₀-arila, C₃-C₁₅-heterociclo ou C₃-C₂₀ heteroarila;

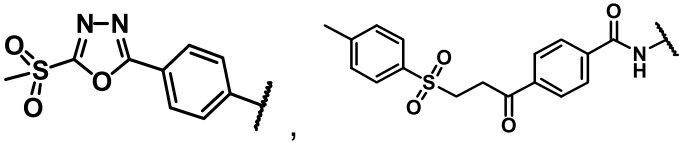
[00175] a é um número inteiro que tem um valor de 1 a cerca de 20;

[00176] L^c é uma ligação simples ou C₁-C₂₀-alquilenos;

[00177] n é um n é um número inteiro que tem um valor de 1 ou 2; e

[00178] Z é uma unidade de ligação que conecta CB e L^c ; ou

[00179] Z é um precursor selecionado dentre isocianeto, isotiocianeto, dissulfeto de 2-piridila, haloacetamida (-NHC(O)CH₂-hal), maleimida, dieno, alceno, haleto, tosilato (TsO⁻), aldeído, sulfonato (R-

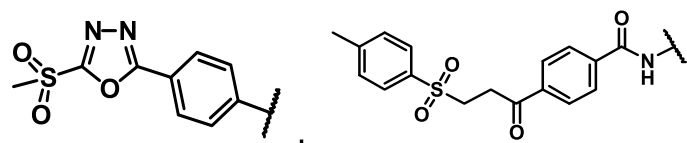
 SO₃⁻), , cetona, C₈-C₁₀ cicloalquinila, -OH, -NHOH, -NHNH₂, -SH, ácido carboxílico (-COOH), acetileno (-C≡CH), azida (-N₃), amino (-NH₂), ácido sulfônico (-SO₃H), um derivado de alquinona (-C(O)C≡C-R^a, em que R^a é C₁-C₁₀-alquila) e fosfato de di-hidrogênio (-OP(=O)(OH)₂);

[00180] CB é uma porção química de alvejamento, tal como um ligante capaz de se ligar a um receptor; e

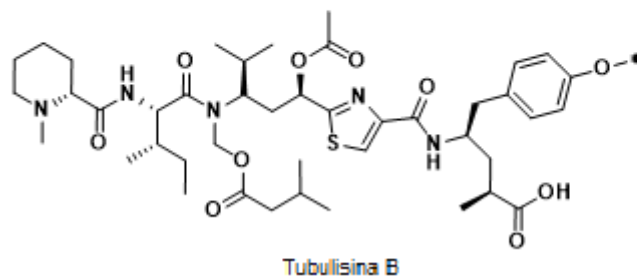
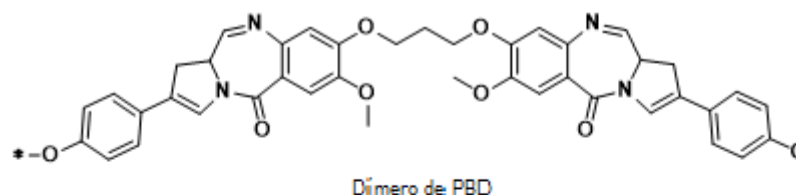
[00181] m é um número inteiro que tem um valor de 0, 1 ou 2.

[00182] Em algumas modalidades, o composto é um composto de Fórmula (I), (II) ou (III), em que R é hidrogênio ou $^{*}-L^a-A_1-L^b-L^c-Z$; em que:

- [00183] L^a é uma ligação simples ou C_1 – C_{20} -alquilenos;
- [00184] A^1 é $-C(O)NR^*$ -, $-NR^*C(O)$ -, $-NR^*$ -, $-O$ -, $-PO_3$ -, $-PO_4$ -, $-SO$ -, $-SO_2$ - ou $-SO_3$ -;
- [00185] L^b é $-(CH_2CH_2O)_a$ - ou $-(CH_2)_a$ -;
- [00186] R^* é hidrogênio, C_1 – C_{18} -alquila, C_6 – C_{20} -arila, C_3 – C_{15} -heterociclo ou C_3 – C_{20} -heteroarila;
- [00187] a é um número inteiro que tem um valor de 1 a cerca de 20;
- [00188] L^c é uma ligação simples ou C_1 – C_{20} -alquilenos;
- [00189] n é um n é um número inteiro que tem um valor de 1 ou 2; e
- [00190] Z é um precursor selecionado dentre isocianeto, isotiocianeto, dissulfeto de 2-piridila, haloacetamida ($-NHC(O)CH_2$ -hal), maleimida, dieno, alceno, haleto, tosilato (TsO^-), aldeído, sulfonato (R -

 SO_3^-), $-P(=O)(OH)_2$, cetona, C_8 – C_{10} cicloalquinila, $-OH$, $-NHOH$, $-NHNH_2$, $-SH$, ácido carboxílico ($-COOH$), acetileno ($-C\equiv CH$), azida ($-N_3$), amino ($-NH_2$), ácido sulfônico ($-SO_3H$), um derivado de alquinona ($-C(O)C\equiv C-R^a$, em que R^a é C_1 – C_{10} -alquila) e fosfato de di-hidrogênio ($-OP(=O)(OH)_2$).

- [00191] Em algumas modalidades, o composto é um composto de Fórmula (I), (II) ou (III), em que R é $^*(-L^a-A_1-L^b-L^c-Z)_m$ -CB; em que:
- [00192] L^a é uma ligação simples ou C_1 – C_{20} -alquilenos;
- [00193] A^1 é $-C(O)NR^*$ -, $-NR^*C(O)$ -, $-NR^*$ -, $-O$ -, $-PO_3$ -, $-PO_4$ -, $-SO$ -, $-SO_2$ - ou $-SO_3$ -;
- [00194] L^b é $-(CH_2CH_2O)_a$ - ou $-(CH_2)_a$ -;
- [00195] R^* é hidrogênio, C_1 – C_{18} -alquila, C_6 – C_{20} -arila, C_3 – C_{15} -heterociclo ou C_3 – C_{20} -heteroarila;
- [00196] a é um número inteiro que tem um valor de 1 a cerca de 20;
- [00197] L^c é uma ligação simples ou C_1 – C_{20} -alquilenos;
- [00198] n é um n é um número inteiro que tem um valor de 1 ou 2;



[00220] Em certas modalidades, é fornecido no presente documento um composto de Fórmula (I), (II) ou (III), em que:

[00221] Y é -NO₂, -OC(O)(CH₂)_rC(O)R¹, -O(CH₂)_r-Ar¹-NO₂, -NHOH, -BR²R³ ou -Y'-TG, de preferência, Y é -NO₂, -OC(O)(CH₂)_rC(O)R¹, -O(CH₂)_r-Ar¹-NO₂, -BR²R³ ou -Y'-TG;

[00222] R¹ é C₁-C₆ alquila;

[00223] r é um número inteiro que tem um valor de 1, 2, 3, 4 ou 5;

[00224] Ar¹ é fenileno, bifenileno ou naftileno;

[00225] R² e R³ são, cada um, independentemente, hidrogênio, C₁-C₆ alquila, C₁-C₆ alcóxi ou hidróxi;

[00226] Y' é -(CH₂)_xNR"-, -(CH₂)_xO- ou -(CH₂)_xS-;

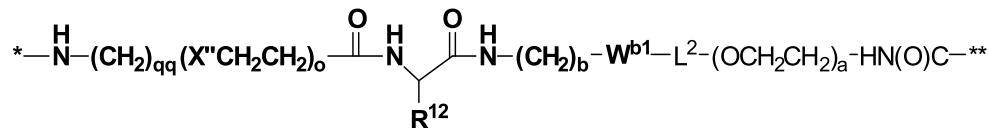
[00227] R" é hidrogênio ou C₁-C₆alquila;

[00228] x é um número inteiro que tem um valor de 0 ou 1;

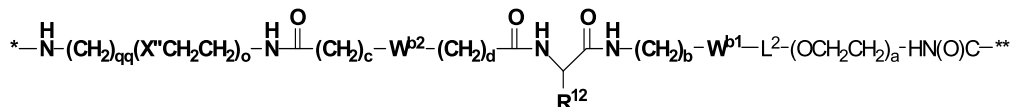
[00229] R" é hidrogênio ou C₁-C₆-alquila; e

[00230] TG é um grupo de desencadeamento, tal como um β-galactosídeo, β-glucuronídeo ou uma combinação de β-galactosídeo e β-glucuronídeo.

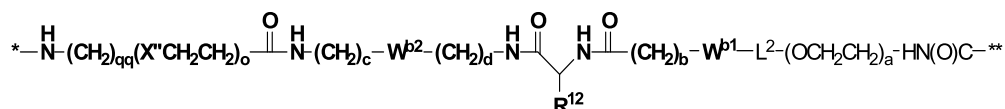
[00231] Em certas modalidades, o composto de Fórmula (I), (II), ou (III) é selecionado dentre:



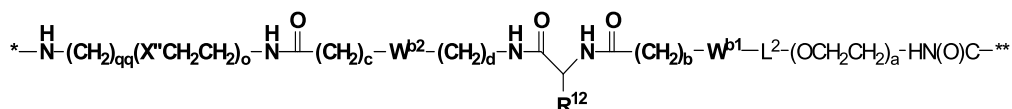
(G)



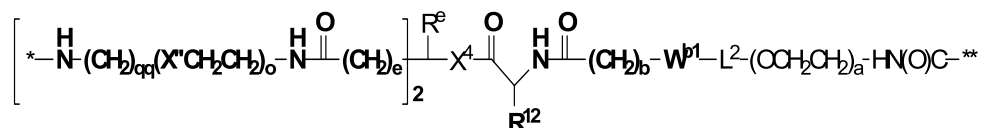
(H)



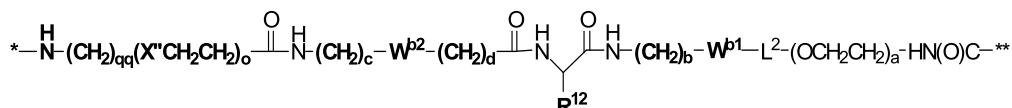
(J)



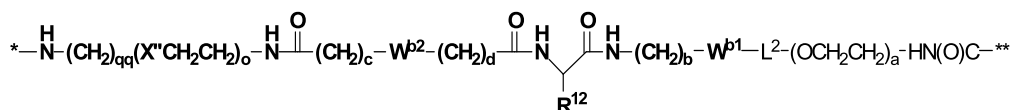
(K)



(L)



(M)



(N)

[00236] L^a é uma ligação simples ou $\text{C}_1\text{-C}_{20}$ alquilenos;

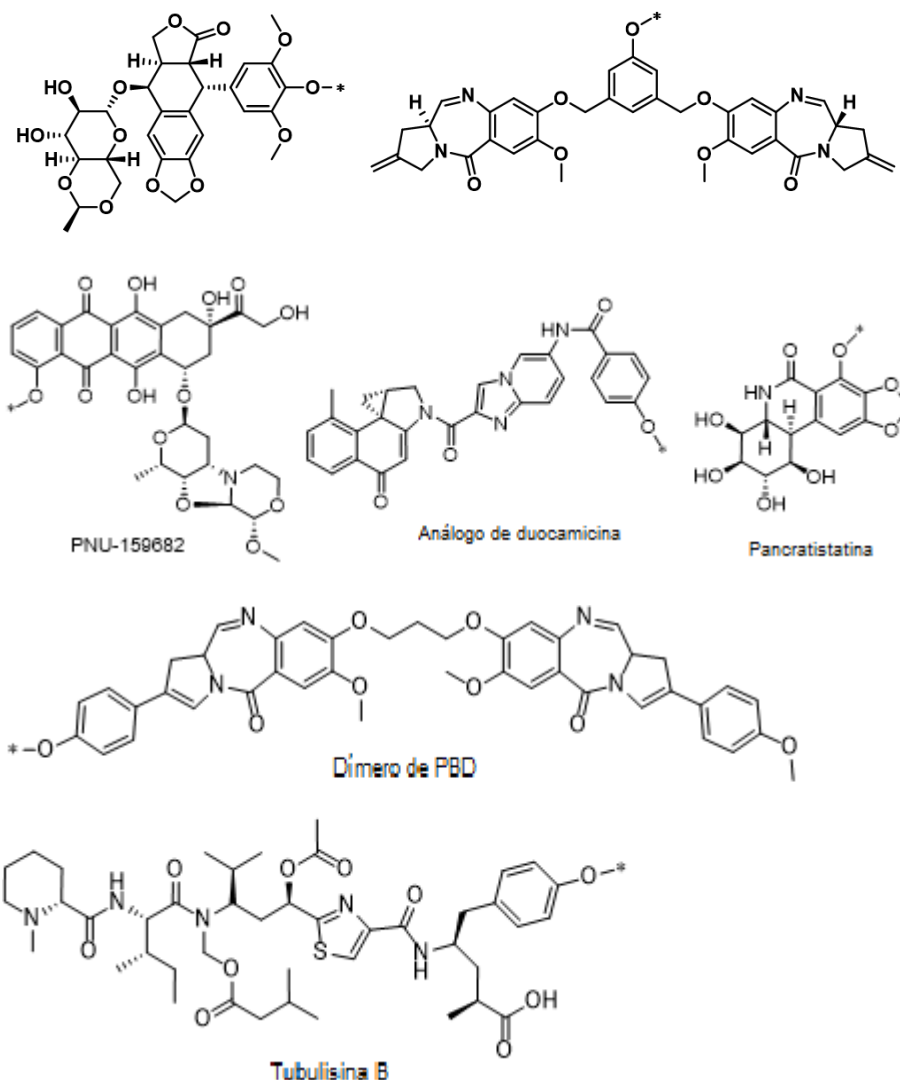
[00237] A^1 é $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$, $-\text{NHC}(\text{O})-$, $-\text{NH}-$, $-\text{O}-$, $-\text{PO}_3^-$, $-\text{PO}_4^-$, $-\text{SO}-$, $-\text{SO}_2-$ ou $-\text{SO}_3^-$;

[00238] L^b é $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_a-$ ou $-(\text{CH}_2)_a-$;

[00239] a é um número inteiro que tem um valor de 1 a cerca de 20;

[00240] L^c é $\text{C}_1\text{-C}_{20}$ alquilenos;

[00241] X'' é $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{NH}-$ ou $-\text{CH}_2-$;



LIBERAÇÃO DO AGENTE ATIVO

[00257] Conforme descrito acima, em certas modalidades, os compostos e conjugados divulgados no presente documento são capazes de dissociar um ou mais agentes ativos (representados por Q, Q¹, Q²) através de uma reação de ciclização intramolecular após uma reação química que ativa o grupo de desencadeamento. Em certas modalidades, a reação química é uma reação físico-química e/ou uma reação bioquímica.

[00258] Em algumas modalidades, os compostos e conjugados divulgados no presente documento compreendem um grupo funcional nucleofílico (Y ou Y') introduzido em um átomo adjacente em Ar em relação a X (por exemplo, O). Tipicamente, o grupo funcional nucleofí-

gado a um composto conforme descrito no presente documento pelo -OH, -NH-, -SH e -COOH, por exemplo, através de um grupo funcional selecionado dentre éster, amida, tioéster, carbamato, ureia, oxima, hidrazona, etc. Em algumas tais modalidades, Q^2 é usado no lugar de Q^1 , e Q^2 é um fármaco contendo grupo amina. Em outras modalidades, Q^2 é um agente ativo capaz de se ligar a uma unidade de amônio. Em ainda outras modalidades, Q^2 é capaz de ser dissociado em sua forma original que tem um grupo amina mediante liberação de Q^2 , em que o agente ativo pode ser um fármaco, uma toxina, um ligante por afinidade, uma sonda para detecção ou uma combinação dos mesmos.

[00264] Em algumas modalidades, os compostos e conjugados divulgados no presente documento são química e fisiologicamente estáveis. Em algumas tais modalidades, os compostos e conjugados divulgados no presente documento atingem uma célula-alvo desejada em um estado em que há pouca dissociação do agente ativo no sangue, liberando, assim, seletivamente o fármaco.

GRUPOS DE DESENCADEAMENTO (TGs)

[00265] Em algumas modalidades, os conjugados da presente invenção incluem um grupo de desencadeamento (TG). TGs são grupos capazes de ser clivados, de preferência, clivados seletivamente, por uma reação química, tal como uma reação biológica. De modo geral, os grupos de desencadeamento sirvam para mascarar a natureza nucleofílica do grupo Y ou Y', fornecendo assim, estabilidade (por exemplo, impedindo a autoimolação ou ciclização intramolecular antes de o conjugado atingir uma localização-alvo ou experimentar uma condição de desencadeamento predeterminada) aos compostos e conjugados divulgados no presente documento. Mediante ativação, o grupo de desencadeamento libera o grupo Y ou Y' nucleofílico para autoimolação ou ciclização intramolecular ocorrer, conforme descrito acima.

[00266] Em algumas modalidades, o TG compreende uma sequência (tal como uma sequência de peptídeos) ou uma porção química reconhecida por TEV, tripsina, trombina, catepsina B, catepsina D, catepsina K, caspase 1, metaloproteinase de matriz (MMP), e similares, que pode ser hidrolisada por uma enzima (por exemplo, uma oxidoreductase, uma transferase, uma hidrolase, uma liase, uma isomerase, uma ligase, etc.) e/ou pode incluir uma porção química selecionada dentre um fosfodiéster, um fosfolipídio, um éster, uma β -galactose, uma β -glicose, uma fucose, um oligoaçúcar e similares.

[00267] Em algumas modalidades, o TG compreende uma porção química reativa ou grupo funcional que pode ser clivado sob condições de reagente nucleofílico (por exemplo, um éter silílico, uma 2-N-acil nitrobenzenossulfonamida, um sulfeto de vinila insaturado, um sulfonamida após ativação, um derivado de malondialdeído-indol, um éster levulinoílico, uma hidrazona ou uma acil hidrazona).

[00268] Em algumas modalidades, o TG pode compreender uma porção química reativa ou grupo funcional que pode ser clivado sob condições de reagente básico (por exemplo, um éster 2-cianoetílico, um dissuccinato de etileno glicolila, um éster 2-sulfonietílico, um alquil tioéster ou um éster tiofenílico).

[00269] Em algumas modalidades, o TG pode compreender uma porção química reativa ou grupo funcional que pode ser clivado por fotoirradiação (por exemplo, derivado de 2-nitrobenzila, éster fenacílico, benzenossulfonato de 8-quinolinila, cumarina, fosfotriéster, bis-aril-hidrazona ou derivado de ácido bimano bi-tiopropiônico).

[00270] Em algumas modalidades, o TG pode compreender uma porção química reativa ou grupo funcional que pode ser clivado por condições de agente redutor (por exemplo, hidroxilamina, dissulfeto, levulinato, nitro ou derivado de 4-nitrobenzila).

[00271] Em algumas modalidades, o TG pode compreender uma

porção química reativa ou um grupo funcional que pode ser clivado usando condições ácidas (por exemplo, sacarídeos, análogo de terc-butilcarbamato, dialquil ou diaril dialcoxissilano, ortoéster, acetal, aconitila, hidrazona, β -tiopropionato, fosforamidato, imina, tritila, éter vinílico, policetal e derivado de 2-(difenilfosfino)benzoato de alquila; éster alquílico, éster de 8-hidroxiquinolinae éster de picolinato).

[00272] Em algumas modalidades, o TG pode compreender uma porção química reativa ou grupo funcional que pode ser clivado sob condições oxidantes (por exemplo, um boronato, um diol vicinal, derivado de parametoxibenzila ou um composto de selênio).

[00273] Em certas modalidades preferenciais, o TG compreende um sacarídeo, que pode ser clivado sob condições ácidas ou enzimáticas. Em certas modalidades preferenciais, o grupo de desencadeamento é $-\text{NO}_2$, que pode ser clivado sob condições de redução. Em certas modalidades preferenciais, o grupo de desencadeamento é um boronato, que pode ser clivado sob condições oxidantes. Em certas modalidades preferenciais, o grupo de desencadeamento é um éster, que pode ser clivado sob condições ácidas, básicas ou enzimáticas. Em certas modalidades preferenciais, o grupo de desencadeamento é uma hidrazona, que pode ser clivado sob condições nucleofílicas ou sob condições ácidas. Em certas modalidades preferenciais, o grupo de desencadeamento é uma hidroxilamina, que pode ser clivado sob condições de redução.

GRUPOS DE DESENCADEAMENTO DE SACARÍDEO

[00274] Em algumas modalidades, os compostos e conjugados divulgados no presente documento compreendem um grupo de desencadeamento de sacarídeo, por exemplo, um grupo de desencadeamento selecionado dentre:

ser clivado por uma reação química, uma reação físico-química e/ou uma reação biológica. Em certas modalidades, TG é um grupo protetor. Em algumas tais modalidades, o grupo protetor é um grupo protetor de grupo amina, um grupo protetor álcool ou um grupo protetor tiol.

GRUPOS PROTETORES AMINA

[00277] Em certas modalidades, o grupo protetor amina é um grupo protetor geral que é capaz de ser usado na síntese orgânica, incluindo, porém sem limitação: carbamato de m-nitrofenila, carbamato de 3,5-dimetoxibenzila, carbamato de o-nitrobenzila, carbamato de fenil(o-nitrofenil)metila, carbamato de alquila, carbamato de 9-fluorenilmetila, carbamato de 2,2,2-tricloroetila, carbamato de 2-trimetilsililetila (Teoc), carbamato de t-butila (Boc), carbamato de vinila (Voc), carbamato de alila (Alloc), carbamato de 1-isopropilalila (Ipaoc), carbamato de 8-quinolila, carbamato de N-hidroxipiperidinila, carbamato de benzila, carbamato de p-metoxibenzila, carbamato de p-nitrobenzila, carbamato de difenil metila, acetamida, cloroacetamida, tricloroacetamida, fenilacetamida, benzamida, N-ftalimida, N-2,3-difenilmaleimida, N-2,5-dimetilpirrol, N-1,1-dimetiltiometilenoamina, N-benzilidenoamina, benzenossulfenamida, o-nitrobenzenossulfenamida, trifenilmetilsulfenamida, p-toluenossulfonamida, metanossulfonamida, etc., mas sem limitação aos mesmos.

GRUPOS PROTETORES ÁLCOOL

[00278] Em certas modalidades, o grupo protetor álcool é um grupo protetor geral que é capaz de ser usado em síntese orgânica, incluindo, porém sem limitação: éter metílico, éter metoximetílico (éter MOM), éter benziloximetílico (éter BOM), éter de 2-(trimetilsilil)etoximetílico (éter SEM), éter feniltiometílico (PTM ether), éter de 2,2-dicloro-1,1-difluoroetílico, éter p-bromofenacílico, éter cloropropilmetílico, éter isopropílico, éter ciclo-hexílico, 4-metoxibenzila, éter 2,6-diclorobenzílico, éter 4-(dimetilaminocarbonil)benzílico, éter 9-antrilmetílico, éter 4-

picolílico, éter metiltiometílico (éter MTM), éter 2-metoxietoximetílico (éter ME), éter bis(2-cloroetoxi)metílico, éter tetra-hidropiranílico (éter THP), éter tetra-hidrotiopiranílico, éter 4-metoxitetra-hidropiranílico, éter 4-metoxitetra-hidrotiopiranílico, éter tetra-hidrofuranílico, éter 1-etoxietílico, éter 1-metil-1-metoxietílico, éter 2-(fenilselenil)etílico, éter t-butílico, éter alílico, éter benzílico, éter o-nitrobenzílico, éter trifenilmetílico, éter α -naftildifenilmetílico, éter p-metoxifenildifenilmetílico, éter 9-(9-fenil-10-oxo)antrílico, éter trimetilsilílico (éter TM), éter isopropildimetilsilílico, éter t-butildimetilsilílica (éter TBDMS), éter t-butildifenil silílico, éter tribenzilsilílico, éter tri-isopropilsilílico, éster de formato, éster de acetato, éster de tricloroacetato, éster de fenoxiacetato, éster de isobutirato, éster de pivaloato, éster de adamantato, éster de benzoato, éster de 2,4,6-trimetilbenzoato (Mesitoato), carbonato de metila, carbonato de 2,2,2-trichloroetila, carbonato de alila, carbonato de p-nitrofenila, carbonato de benzila, carbonato de p-nitrobenzila, tiocarbonato de S-benzila, N-fenilcarbamato, éster de nitrato, éster de 2,4-dinitrofenilsulfenato, éster dimetilfosfinílico (éster DMP), éster dimetiltiofosfinílico (éster MPT), metanossulfonato de arila, toluenossulfonato de arila, etc., porém sem limitação aos mesmos.

GRUPOS PROTETORES TIOL

[00279] Em certas modalidades, o grupo protetor tiol é capaz de ser usado em síntese orgânica, incluindo, porém sem limitação: Tioéter S-benzílico, tioéter S-p-metoxibenzílico, tioéter S-o- ou p-hidroxil ou acetoxibenzílico, tioéter S-p-nitrobenzílico, tioéter S-4-picolílico, tioéter de N-óxido de S-2-picolila, tioéter S-9-antrilmetílico, tioéter S-9-fluorenilmetílico, S-metoximetil monotioacetato, derivado de A-acetila, derivado de S-benzoíla, S-(N-etilcarbamato), S-(N-metoxometilcarbamato), etc., porém sem limitação aos mesmos.

GRUPO DE LIGAÇÃO

[00280] Em algumas modalidades, os compostos e conjugados di-

vulgados no presente documento compreendem um grupo de ligação que conecta cada CB e Ar através de uma ligação covalente. Os grupos de ligação típicos são estáveis, porções químicas não hidrolisáveis, tal como, por exemplo, um C₁₀–C₁₀₀ alquilenos saturado ou insaturado, linear ou ramificado. Em certas modalidades, a unidade de ligação satisfaz pelo menos dois e, mais preferencialmente, pelo menos três, dentre quatro dos seguintes critérios:

[00281] (i) pelo menos um -CH₂- na porção química alquilenos é substituído por (isto é, é trocado por) um ou mais heteroátomos selecionados dentre -NH-, -C(=O), -O-, -S- e -P-;

[00282] (ii) pelo menos um heteroarileno está incluído na porção química alquilenos;

[00283] (iii) pelo menos uma porção química aminoácido, ligação de açúcar, ligação de peptídeo ou ligação de amida está incluída na porção química alquilenos; e

[00284] (iv) o alquilenos pode ser, ainda, substituído por um ou mais substituintes selecionados a partir do grupo que consiste em C₁-C₂₀ alquila, C₆-C₂₀ aril C₁-C₈ alquila, -(CH₂)_sCOOH e -(CH₂)_pNH₂, em que s é um número inteiro que tem um valor de 0 a 10, e p é um número inteiro que tem um valor de 1 a cerca de 10.

[00285] Em certas modalidades, a unidade de ligação compreende pelo menos dois e, mais preferencialmente, pelo menos três dentre os seguintes:

[00286] (i) pelo menos um heteroátomo selecionado dentre -NH-, -C(=O), -O-, -S- e -P-;

[00287] (ii) pelo menos um heteroarileno;

[00288] (iii) pelo menos uma porção química aminoácido, ligação de açúcar, ligação de peptídeo ou ligação de amida; e

[00289] (iv) o alquilenos pode ser, ainda, substituído por um ou mais substituintes selecionados a partir do grupo que consiste em C₁-C₂₀

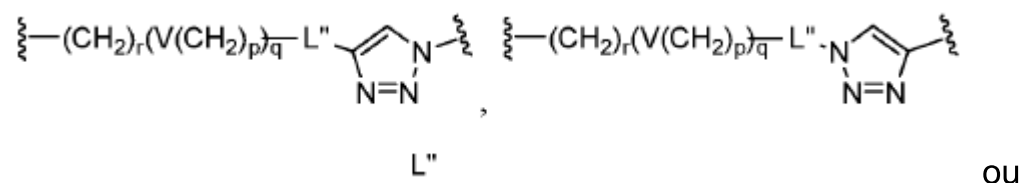
alquila, C₆-C₂₀ aril C₁-C₈ alquila, -(CH₂)_sCOOH e -(CH₂)_pNH₂, em que s é um número inteiro que tem um valor de 0 a 10, e p é um número inteiro que tem um valor de 1 a cerca de 10.

[00290] Em outras modalidades, o grupo de ligação que conecta cada CB e Ar compreende um grupo funcional produzido através de uma reação química click.

[00291] Em modalidades alternativas, a unidade de ligação compreende um grupo funcional reativo capaz de participar em uma reação química click.

[00292] Uma reação química click é uma reação que pode ser realizada sob condições moderadas e é extremamente seletiva para grupos funcionais que não são comumente encontrados em moléculas biológicas (por exemplo, um grupo azida, um grupo acetileno, etc.). Consequentemente, esta reação pode ser executada na presença de grupos de desencadeamento complexos, porções químicas de alveamento, etc. Ademais, a química click tem alta especificidade de reação. Por exemplo, a reação química click entre um grupo azida e um grupo acetileno prossegue seletivamente sem interferência de outros grupos funcionais presentes na molécula. Por exemplo, a química click de azida-acetileno pode proporcionar uma porção química triazol em alto rendimento.

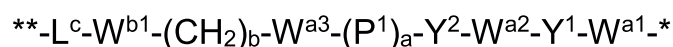
[00293] Assim, em algumas modalidades, o grupo de ligação que conecta cada CB e Ar compreende



$\xi-(\text{CH}_2)_r(\text{V}(\text{CH}_2)_p)_q-\text{N}=\text{N}-\text{C}=\text{C}-\text{N}-\text{L}_1$, V pode ser uma ligação simples, -O-, -S-, -NR²¹-, -C(O)NR²²-, -NR²³C(O)-, -NR²⁴SO₂- ou -SO₂NR²⁵-, R²¹ a R²⁵ podem ser, cada um, independentemente, hidrogênio, (C₁-C₆)alquila,

(C₁-C₆)alquil(C₆-C₂₀)arila ou (C₁-C₆)alquil(C₃-C₂₀)heteroarila, r pode ser um número inteiro que tem um valor de 1 a cerca de 10, p pode ser um número inteiro que tem um valor de 0 a cerca de 10, q pode ser um número inteiro que tem um valor de 1 a cerca de 10, e L" pode ser uma ligação simples.

[00294] Em outras modalidades, a unidade de ligação que conecta cada CB e Ar é um grupo de ligação representado pela Fórmula (A):



(A)

[00295] em que:

[00296] * é o ponto de ligação a CB;

[00297] ** é o ponto de ligação a Ar;

[00298] W^{a1}, W^{a2} e W^{a3} são, cada um, independentemente, -NH-, -C(=O)- ou (-CH₂-)_b;

[00299] W^{b1} é uma ligação de amida ou triazolileno;

[00300] P¹ é um ligante que conecta W^{a3} e Y² e é uma porção química aminoácido, uma ligação de peptídeo ou uma ligação de amida;

[00301] L^c é alquileno;

[00302] Y² é uma ligação simples, -W^{a4}-(CH₂)_c-W^{b2}-(CH₂)_d-W^{a5}- ou -W^{a6}-(CH₂)_e-CR^eR^f-X-;

[00303] R^e é C₁-C₈ alquila ou CB-W_{a7}-Y₃-W_{c1}-(CH₂)_f;

[00304] R^f é B-W^{a7}-Y³-W^{c1}-(CH₂)_f;

[00305] X é -NHC(=O)-(CH₂)_g-W^{a8}- ou -C(=O)NH-(CH₂)_h-W^{a9}-;

[00306] W^{a4}, W^{a5}, W^{a6}, W^{a7}, W^{a8} e W^{a9} são, cada um, independentemente, -NH-, -C(=O)- ou -CH₂-;

[00307] W^{b2} é uma ligação de amida ou triazolileno;

[00308] W^{c1} é -NHC(=O)- ou -C(=O)NH-;

[00309] Y³ é -(CH₂)_i-(X'CH₂CH₂)_j-(CH₂)_k-;

[00310] X' é -O-, -S-, -NH- ou -CH₂-;

[00311] CB é igual conforme definido acima;

de 10;

[00326] s' é um número inteiro que tem um valor de 1 a cerca de 10; e

[00327] m é um número inteiro que tem um valor de 0 ou 1.

[00328] Em algumas modalidades, de fórmula (B) ou (C):

[00329] R^{12} é hidrogênio, alquila, uma cadeia lateral de aminoácido, $-(CH_2)_sC(O)R^{13}$ ou $-(CH_2)_pNR^{14}R^{15}$;

[00330] p é um número inteiro que tem um valor de 1 a cerca de 10;

[00331] s é um número inteiro que tem um valor de 0 a cerca de 10;

[00332] R^{13} é OH ou $-NH(CH_2)_s(X'''CH_2CH_2)_sZ''-(CB)_m$;

[00333] R^{14} e R^{15} são, cada um, independentemente, hidrogênio ou $-C(O)(CH_2)_s(X'''CH_2CH_2)_sZ''-(CB)_m$;

[00334] s'' é um número inteiro que tem um valor de 0 a cerca de 10;

[00335] s' é um número inteiro que tem um valor de 1 a cerca de 10;

[00336] m é um número inteiro que tem um valor de 0 ou 1;

[00337] X''' é -O-, -S-, -NH- ou $-CH_2-$; e

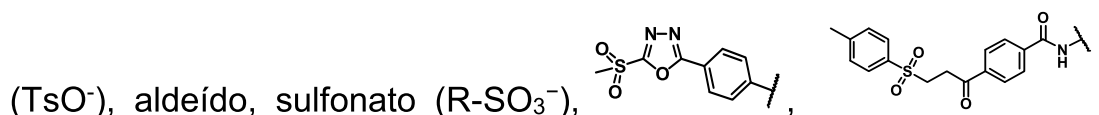
[00338] Z'' é um grupo de ligação que conecta CB ao restante de R^{14} ou R^{15} ; ou Z'' é um grupo de ligação que compreende um grupo reativo.

[00339] Em algumas tais modalidades de fórmula (B) ou (C):

[00340] R^{13} é OH ou $-NH(CH_2)_s(X'''CH_2CH_2)_sZ''$;

[00341] R^{14} e R^{15} são, cada um, independentemente, hidrogênio ou $-C(O)(CH_2)_s(X'''CH_2CH_2)_sZ''$; e

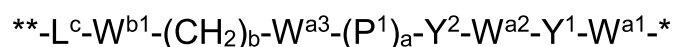
[00342] Z'' é um precursor reativo de uma unidade de ligação selecionado dentre isocianeto, isotiocianeto, dissulfeto de 2-piridila, haloacetamida ($-NHC(O)CH_2-hal$), maleimida, dieno, alceno, haleto, tosilato



[00368] o e q são, cada um, independentemente, um número inteiro que tem um valor de 1 a cerca de 10.

[00369] Em algumas modalidades, R^{12} é uma cadeia lateral de aminoácido natural. Em outras modalidades, R^{12} é uma cadeia lateral de aminoácido não natural.

[00370] Em algumas modalidades, a unidade de ligação que conecta cada CB e Ar é um grupo de ligação representado pela Fórmula (A):



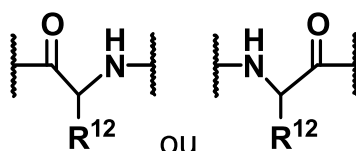
(A)

[00371] em que:

[00372] * é o ponto de ligação a CB; e

[00373] ** é o ponto de ligação a Ar.

[00374] Em algumas tais modalidades, P^1 é



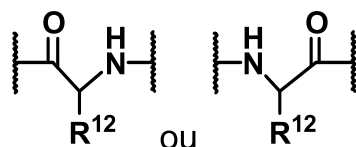
[00375] em que:

[00376] R^{12} é hidrogênio, alquila, uma cadeia lateral de aminoácido, $\text{-(CH}_2\text{)}_s\text{COOH}$ ou $\text{-(CH}_2\text{)}_p\text{NH}_2$;

[00377] p é um número inteiro que tem um valor de 1 a cerca de 10; e

[00378] s e s'' são, cada um, independentemente, um número inteiro que tem um valor de 0 a cerca de 10.

[00379] Em algumas modalidades, P^1 é



[00380] em que:

[00381] R^{12} é hidrogênio, alquila, uma cadeia lateral de aminoácido, $\text{-(CH}_2\text{)}_s\text{C(O)R}^{13}$ ou $\text{-(CH}_2\text{)}_p\text{NR}^{14}\text{R}^{15}$;

[00382] p é um número inteiro que tem um valor de 1 a cerca de 10;

[00383] s é um número inteiro que tem um valor de 0 a cerca de 10;

[00384] R^{13} é OH ou $-NH(CH_2)_s(X'''CH_2CH_2)_sZ''-(CB)_m$;

[00385] R^{14} e R^{15} são, cada um, independentemente, hidrogênio ou $-C(O)(CH_2)_s(X'''CH_2CH_2)_sZ''-(CB)_m$;

[00386] s'' é um número inteiro que tem um valor de 0 a cerca de 10;

[00387] s' é um número inteiro que tem um valor de 1 a cerca de 10;

[00388] m é um número inteiro que tem um valor de 0 ou 1;

[00389] X''' é -O-, -S-, -NH- ou $-CH_2-$; e

[00390] Z'' é um grupo de ligação que conecta CB ao restante de R^{14} ou R^{15} ; ou Z'' é um grupo de ligação que compreende um grupo reativo.

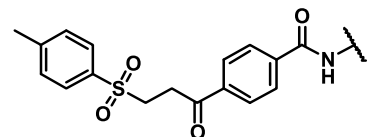
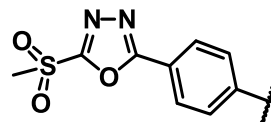
[00391] Em algumas tais modalidades de P^1 :

[00392] R^{13} é OH ou $-NH(CH_2)_s(X'''CH_2CH_2)_sZ''$;

[00393] R^{14} e R^{15} são, cada um, independentemente, hidrogênio ou $-C(O)(CH_2)_s(X'''CH_2CH_2)_sZ''$; e

[00394] Z é um precursor reativo de uma unidade de ligação selecionado dentre isocianeto, isotiocianeto, dissulfeto de 2-piridila, haloacetamida ($-NHC(O)CH_2-hal$), maleimida, dieno, alceno, haleto, tosilato

(TsO^-), aldeído, sulfonato ($R-SO_3^-$),



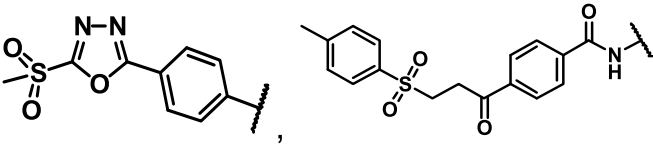
, ácido fosfônico ($-P(=O)(OH)_2$), cetona, C_8-C_{10} cicloalquinila, -OH, -NHOH, -NHNH₂, -SH, ácido carboxílico ($-COOH$), acetileno ($-C\equiv CH$), azida ($-N_3$), amino ($-NH_2$), ácido sulfônico ($-SO_3H$), um derivado de alquinona ($-C(O)C\equiv C-R^a$, em que R^a é C_1-C_{10} -alquila) e fosfato de di-hidrogênio ($-OP(=O)(OH)_2$).

[00395] Em outras tais modalidades de P^1 :

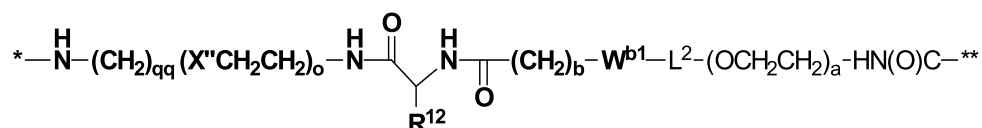
[00396] R^{13} é OH ou $-\text{NH}(\text{CH}_2)_s(\text{X}'''\text{CH}_2\text{CH}_2)_s\text{Z}''\text{CB}$;

[00397] R^{14} e R^{15} são, cada um, independentemente, hidrogênio ou $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_s(\text{X}'''\text{CH}_2\text{CH}_2)_s\text{Z}''\text{CB}$; e

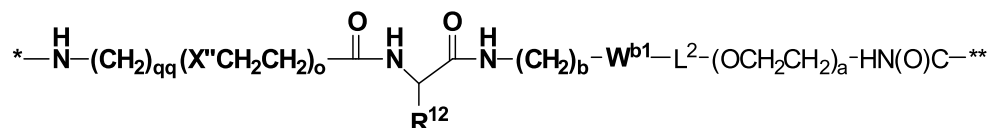
[00398] Z'' é uma unidade de ligação que conecta CB ao restante de R^{14} ou R^{15} formados a partir de um precursor selecionado dentre isocianeto, isotiocianeto, dissulfeto de 2-piridila, haloacetamida ($-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{-hal}$), maleimida, dieno, alceno, haleto, tosilato (TsO^-), al-

deído, sulfonato (R-SO_3^-),

 ácido fosfônico ($-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})_2$), cetona, $\text{C}_8\text{-C}_{10}$ cicloalquinila, $-\text{OH}$, $-\text{NHOH}$, $-\text{NHNH}_2$, $-\text{SH}$, ácido carboxílico ($-\text{COOH}$), acetileno ($-\text{C}\equiv\text{CH}$), azida ($-\text{N}_3$), amino ($-\text{NH}_2$), ácido sulfônico ($-\text{SO}_3\text{H}$), um derivado de alquinona ($-\text{C}(\text{O})\text{C}\equiv\text{C-R}^a$, em que R^a é $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -alquila) e fosfato de dihidrogênio ($-\text{OP}(=\text{O})(\text{OH})_2$).

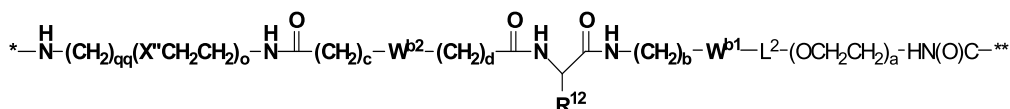
[00399] Em modalidades alternativas, a unidade de ligação que conecta CB e Ar é um grupo de ligação representado pela Fórmula (F), (G), (H), (J), (K), (L), (M) ou (N):



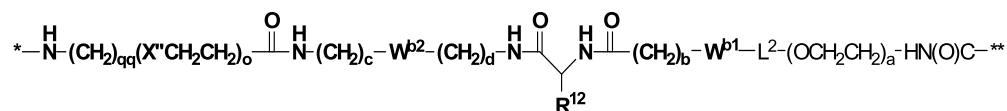
(F)



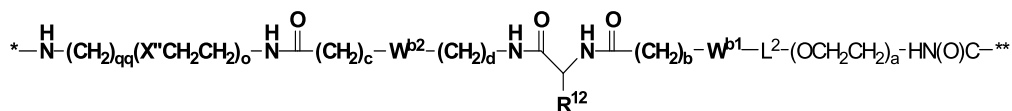
(G)



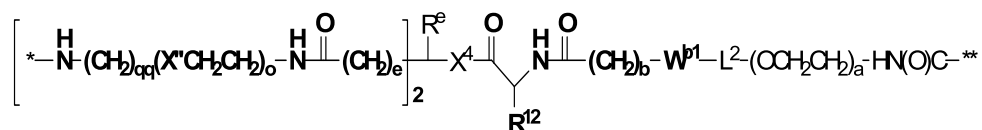
(H)



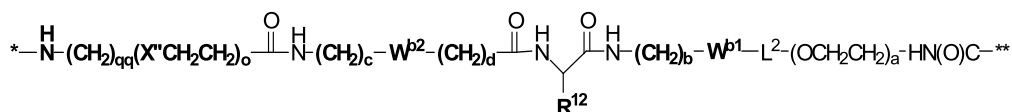
(J)



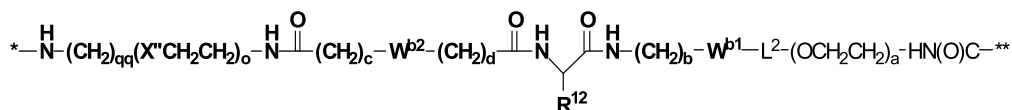
(K)



(L)



(M)



(N)

[00400] em que:

[00401] R^e é alquila;[00402] X^4 é $\text{--NHC(O)--(CH}_2)_g\text{--NH--}$ ou $\text{--C(O)NH--(CH}_2)_h\text{--NH--}$;

[00403] e, g, e h são, cada um, independentemente, um número inteiro que tem um valor de 1 a cerca de 10; e

[00404] s' é um número inteiro que tem um valor de 1 a cerca de 10.

[00405] Em algumas modalidades de Fórmula (F), (G), (H), (I), (J), (K), (L) ou (M):

[00406] R^{12} é hidrogênio, alquila, uma cadeia lateral de aminoácido, $\text{--(CH}_2)_s\text{C(O)R}^{13}$ ou $\text{--(CH}_2)_p\text{NR}^{14}\text{R}^{15}$;

[00407] p é um número inteiro que tem um valor de 1 a cerca de 10;

[00408] s é um número inteiro que tem um valor de 0 a cerca de 10;

[00409] R^{13} é OH ou $\text{--NH(CH}_2)_{s'}(\text{X}'''\text{CH}_2\text{CH}_2)_{s''}\text{Z''--(CB)}_m$;[00410] R^{14} e R^{15} são, cada um, independentemente, hidrogênio ou $\text{--C(O)(CH}_2)_{s'}(\text{X}'''\text{CH}_2\text{CH}_2)_{s''}\text{Z''--(CB)}_m$;

[00411] s'' é um número inteiro que tem um valor de 0 a cerca de 10;

[00412] s' é um número inteiro que tem um valor de 1 a cerca de 10;

[00413] m é um número inteiro que tem um valor de 0 ou 1;

[00414] X''' é -O-, -S-, -NH- ou -CH₂-; e

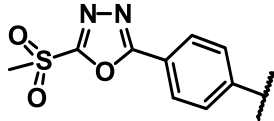
[00415] Z'' é um grupo de ligação que conecta CB ao restante de R^{14} ou R^{15} ; ou Z'' é um grupo de ligação que compreende um grupo reativo.

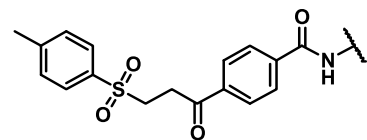
[00416] Em algumas tais modalidades de Fórmula (F), (G), (H), (I), (J), (K), (L) ou (M):

[00417] R^{13} é OH ou $-NH(CH_2)_{s'}(X'''CH_2CH_2)_{s''}Z''$;

[00418] R^{14} e R^{15} são, cada um, independentemente, hidrogênio ou $-C(O)(CH_2)_{s'}(X'''CH_2CH_2)_{s''}Z''$; e

[00419] Z é um precursor reativo de uma unidade de ligação selecionado dentre isocianeto, isotiocianeto, dissulfeto de 2-piridila, haloacetamida ($-NHC(O)CH_2\text{-hal}$), maleimida, dieno, alceno, haleto, tosilato

(TsO⁻), aldeído, sulfonato ($R\text{-SO}_3^-$), ,



, ácido fosfônico ($-P(=O)(OH)_2$), cetona, C₈-C₁₀ cicloalquinila, -OH, -NHOH, -NHNH₂, -SH, ácido carboxílico ($-COOH$), acetileno ($-C\equiv CH$), azida ($-N_3$), amino ($-NH_2$), ácido sulfônico ($-SO_3H$), um derivado de alquinona ($-C(O)C\equiv C-R^a$, em que R^a é C₁-C₁₀-alquila) e fosfato de di-hidrogênio ($-OP(=O)(OH)_2$).

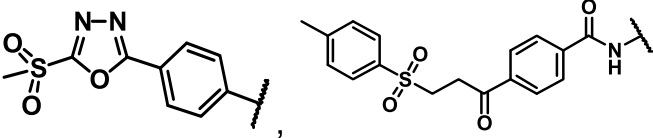
[00420] Em algumas tais modalidades de Fórmula (F), (G), (H), (I), (J), (K), (L) ou (M):

[00421] R^{13} é OH ou $-NH(CH_2)_{s'}(X'''CH_2CH_2)_{s''}Z''CB$;

[00422] R^{14} e R^{15} são, cada um, independentemente, hidrogênio ou

$-C(O)(CH_2)_s(X''''CH_2CH_2)_sZ''CB$; e

[00423] Z'' é uma unidade de ligação que conecta CB ao restante de R^{14} ou R^{15} formados a partir de um precursor selecionado dentre isocianeto, isotiocianeto, dissulfeto de 2-piridila, haloacetamida ($-NHC(O)CH_2-hal$), maleimida, dieno, alceno, haleto, tosilato (TsO^-), al-

deído, sulfonato ($R-SO_3^-$),

 ácido fosfônico ($-P(=O)(OH)_2$), cetona, C_8-C_{10} cicloalquinila, $-OH$, $-NHOH$, $-NHNH_2$, $-SH$, ácido carboxílico ($-COOH$), acetileno ($-C\equiv CH$), azida ($-N_3$), amino ($-NH_2$), ácido sulfônico ($-SO_3H$), um derivado de alquinona ($-C(O)C\equiv C-R^a$, em que R^a é C_1-C_{10} -alquila) e fosfato de di-hidrogênio ($-OP(=O)(OH)_2$).

PORÇÕES QUÍMICAS DE ALVEJAMENTO

[00424] Os compostos e conjugados da presente invenção pode compreender, ainda, um ligante ou porção química de alvejamento, CB. Em algumas modalidades, o ligante ou porção química de alvejamento é qualquer elemento de reconhecimento molecular, que pode sofrer uma interação específica com pelo menos uma outra molécula através, por exemplo, de ligação não covalente, tal como ligação de hidrogênio, coordenação de metal, forças hidrofóbicas, forças de van der Waals, interações π - π , ligação de halogênio, efeitos eletrostáticos e/ou eletromagnéticos. Em certas modalidades, CB é selecionado dentre uma nanopartícula, uma imunoglobulina, um ácido nucleico, uma proteína, um oligopeptídeo, um polipeptídeo, um anticorpo, um fragmento de um polipeptídeo antigênico, um repecorpo e similares.

[00425] Os compostos e conjugados da presente invenção podem compreender uma ou mais porções químicas de alvejamento. Ou seja, a variável cb pode ter um valor de número inteiro selecionado dentre 1, 2, 3, 4, 5, 1 a 10 ou 1 a 20.

[00426] Em algumas modalidades, CB compreende dois ou mais

aminoácidos naturais independentemente selecionados ou aminoácidos não naturais conjugados por ligações covalentes (por exemplo, ligações peptídicas), e o peptídeo pode incluir 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais aminoácidos naturais ou aminoácidos não naturais que são conjugados por ligações peptídicas. Em algumas modalidades, o ligante compreende sequências de aminoácidos mais curtas (por exemplo, fragmentos de proteínas naturais ou fragmentos de polipeptídeos sintéticos) assim como proteínas de comprimento completo (por exemplo, proteínas pré-modificadas geneticamente).

[00427] Em algumas modalidades, CB é selecionado dentre um anticorpo, um hormônio, um fármaco, um análogo de anticorpo (por exemplo, não IgG), proteína, um oligopeptídeo, um polipeptídeo, etc., que se liga a um receptor. Em certas modalidades, CB alveja seletivamente o fármaco em um órgão, tecido ou célula específica. Em outras modalidades, CB se liga especificamente a um receptor superexpresso em células cancerosas em comparação com células normais e pode ser classificado em um anticorpo monoclonal (mAb) ou um fragmento de anticorpo e um não anticorpo de baixo peso molecular. De preferência, CB é selecionado dentre peptídeos, peptídeos específicos para célula tumoral, aptâmeros específicos para célula tumoral, carboidratos específicos para célula tumoral, anticorpos monoclonais específicos para célula tumoral, anticorpos policlonais e fragmentos de anticorpo que são identificados em uma triagem de biblioteca.

[00428] Os ligantes exemplificativos ou porções químicas de alvejamento incluem, porém sem limitação, carnitina, inositol, ácido lipoico, piridoxal, ácido ascórbico, niacina, ácido pantotênico, ácido fólico, riboflavina, tiamina, biotina, vitamina B₁₂, outras vitaminas solúveis em água (vitamina B), vitaminas solúveis em gordura (vitamina A, D, E, K), RGD (Arg-Gly-Asp), NGR (Asn-Gly-Arg), transferrina, receptor de VIP

(peptídeo intestinal vasoativo), peptídeo APRPG (Ala-Pro-Arg-Pro-Gly), TRX-20 (tioredoxina-20), integrina, nucleolina, aminopeptidase N (CD13), endoglina, receptor de fator de crescimento epitelial vascular, receptor de lipoproteína de baixa densidade, receptor de transferrina, receptor de somatostatina, bombesina, neuropeptídeo Y, receptor de hormônio de liberação de hormônio luteinizante, receptor de ácido fólico, epidermal growth factor receptor de receptor de crescimento epidérmico, fator de crescimento de transformação, receptor de fator de crescimento de fibroblast, receptor de asialoglicoproteína, receptor de galectina-3, receptor de E-selectina, receptor de ácido hialurônico, antígeno de membrana específico para próstata (PSMA), receptor de colecistoquinina A, receptor de colecistoquinina B, receptor de domínio de discoidina, receptor de mucina, receptor de opioide, receptor de plasminogênio, receptor de bradiquinina, receptor de insulina, receptor de fator de crescimento semelhante à insulina, receptor de angiotensina AT1, receptor de angiotensina AT2, receptor de fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos (receptor de GM-CSF), receptor de galactosamina, receptor de sigma-2, delta-semelhante 3 (DLL-3), aminopeptidase P, melanotransferrina, leptina, toxina de tétano Tet1, toxina de tétano G23, peptídeo de RVG (Glicoproteína do Vírus da Raiva), HER2 (receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2), GPNMB (glicoproteína não metastática b), Ley, CA6, CanAng, SLC44A4(membro 4 da família 44 de veículo de soluto), CEACAM5 (molécula de adesão celular relacionada a antígeno carcinoembrionário 5), Nectina-4, Anidrase Carbônica 9, TNNB2, 5T4, CD30, CD37, CD74, CD70, PMEL17, EphA2(receptor de efrina A2), Trop-2, SC-16, fator de tecido, ENPP-3(AGS-16), SLITRK6 (membro 6 da família semelhante a SLIT e NTRK), CD27, antígeno Y de Lewis, LIV1, GPR161 (Receptor acoplado à proteína G 161), PBR (receptor de benzodiazepina do tipo periférico), receptor MERTK (tirosina quinase receptora de

Mer), CD71, LLT1 (transcrito 1 semelhante a lecitina ou CLED2D), receptor de interleucina 22, receptor de sigma 1, receptor ativado por proliferador de peroxissomo, DLL3, C4,4a, cKIT, Efrina A, CTLA4 (Proteína 4 Associada a Linfócito T Citotóxico), FGFR2b (receptor de fator de crescimento de fibroblasto 2b), receptor de N-acetilcolina, receptor de hormônio de liberação de gonadotropina, receptor de peptídeo de liberação de gastrina, receptor de proteína morfogenética óssea do tipo 1B (BMPR1B), E16 (LAT1, SLC7A5), STEAP1 (antígeno epitelial de transmembrana seis da próstata), 0772P (CA125, MUC16), MPF (MSLN, mesotelina), Napi3b (SLC34A2), Sema5b (semaforina 5b), ETBR(receptor do tipo B de endotelina), MSG783(RNF124), STEAP2 (antígeno epitelial de transmembrana seis da próstata 2), TrpM4 (canal de cátion 5 potencial de receptor temporário, subfamília M, membro 4), CRIPTO (fator de crescimento derivado de teratocarcinoma), CD21, CD79b, FcRH2 (IFGP4), HER2 (ErbB2), NCA (CEACM6), MDP (DPEP1), IL20R-alfa (IN20Ra), Brevicano (BCAN), EphB2R, ASLG659 (B7h), CD276, PSCA (precursor de antígeno de célula-tronco da próstata), GEDA, BAFF-R (BR3), CD22 (BL-CAM), CD79a, CXCR5, HLA-DOB, P2X5, CD72, LY64, FcRH1, IRTA2, TENB2, SSTR2, SSTR5, SSTR1, SSTR3, SSTR4, ITGAV (Integrina, alfa 5), ITGB6 (Integrina, beta 6), MET, MUC1, EGFRvIII, CD33, CD19, IL2RA (receptor de interleucina 2, alfa), AXL, BCMA, CTA (antígenos tetis de câncer), CD174, CLEC14A, GPR78, CD25, CD32, LGR5 (GPR49), CD133 (Prominina), ASG5, ENPP3 (ectonucleotídeo Pirofosfatase/Fosfodiesterase 3), PRR4 (proteína rica em prolina 4), GCC (guanilato ciclase 2C), Liv-1 (SLC39A6), CD56, CanAg, TIM-1, RG-1, B7-H4, PTK7, CD138, Claudinas, Her3 (ErbB3), RON (MST1R), CD20, TNC (Tenascina C), FAP, DKK-1, CD52, CS1 (SLAMF7), Anexina A1, V-CAM, gp100, MART-1, MAGE-1 (gene 1 de codificação de antígeno de melanoma), MAGE-3 (antígeno 3 associado a melanoma), BAGE, GAGE-1, MUM-

1(oncogene 1 de mieloma múltiplo), CDK4, TRP-1(gp75), TAG-72 (glicoproteína 72 associada a tumor), gangliosídeo GD2, GD3, GM2, GM3, VEP8, VEP9, My1, VIM-D5, D156-22, OX40, RNAK, PD-L1, TNFR1, TNFR2, etc.

ALVOS

[00429] Em algumas modalidades, o alvo ou alvos do elemento de reconhecimento molecular são especificamente associados a um ou mais tipos de célula ou tecido particular. Em algumas modalidades, os alvos são especificamente associados a um ou mais estados doentes particulares. Em algumas modalidades, os alvos são especificamente associados a um ou mais estágios de desenvolvimento particulares. Por exemplo, um marcador específico para tipo de célula é tipicamente expresso em níveis pelo menos 2 vezes maiores neste tipo de célula do que em uma população de células. Em algumas modalidades, o marcador específico de tipos de célula está presente em níveis pelo menos 3 vezes, pelo menos 4 vezes, pelo menos 5 vezes, pelo menos 6 vezes, pelo menos 7 vezes, pelo menos 8 vezes, pelo menos 9 vezes, pelo menos 10 vezes, pelo menos 50 vezes, pelo menos 100 vezes ou pelo menos 1000 vezes maiores que sua expressão média em uma população de referência. A detecção ou medição de um marcador específico do tipo de célula pode tornar possível distinguir o tipo ou tipos de célula de interesse de células de muitos, da maioria ou de todos os outros tipos. Em algumas modalidades, um alvo pode compreender uma proteína, um carboidrato, um lipídio e/ou um ácido nucleico, conforme descrito no presente documento.

[00430] Em algumas modalidades, uma substância é considerada como sendo "alvejada" se a mesma se ligar especificamente a uma porção química de alveamento, tal como uma porção química de alveamento de ácido nucleico. Em algumas modalidades, uma porção química de alveamento, tal como uma porção química de alveamento

de ácido nucleico se liga especificamente a um alvo sob condições es-
tringentes.

[00431] Em certas modalidades, os conjugados e compostos descri-
tos no presente documento compreendem uma porção química de al-
veamento que se liga especificamente a um ou mais alvos (por exem-
plo, antígenos) associados a um órgão, tecido, célula, componente de
matriz extracelular e/ou compartimento intracelular. Em algumas mo-
dalidades, os conjugados e compostos descritos no presente docu-
mento compreendem uma porção química de alveamento que se liga
especificamente a alvos associados a um órgão ou sistema de órgãos
particular. Em algumas modalidades, os conjugados e compostos des-
critos no presente documento compreendem uma porção química de
alveamento que se liga especificamente a um ou mais alvos intracelu-
lares (por exemplo, organela, proteína intracelular). Em algumas mo-
dalidades, os conjugados e compostos descritos no presente docu-
mento compreendem uma porção química de alveamento que se liga
especificamente a alvos associados a órgãos, tecidos, células, com-
ponentes de matriz extracelular e/ou compartimentos intracelulares
doentes. Em algumas modalidades, os conjugados e compostos des-
critos no presente documento compreendem uma porção química de
alveamento que se liga especificamente a alvos associados a tipos de
célula particulares (por exemplo, células endoteliais, células cancero-
sas, células malignas, células de câncer de próstata, etc.).

[00432] Em algumas modalidades, os conjugados e compostos
descritos no presente documento compreendem uma porção química
de alveamento que se liga a um alvo que é específico para um ou
mais tipos particulares de tecido (por exemplo, tecido do fígado vs. te-
cido da próstata). Em algumas modalidades, os conjugados e compos-
tos descritos no presente documento compreendem uma porção quí-
mica de alveamento que se liga a um alvo que é específico para um

ou mais tipos particulares de célula (por exemplo, células T vs. células B). Em algumas modalidades, os conjugados e compostos descritos no presente documento compreendem uma porção química de alveijamento que se liga a um alvo que é específico para um ou mais estados doentios particulares (por exemplo, células tumorais vs. células saudáveis). Em algumas modalidades, os conjugados e compostos descritos no presente documento compreendem uma porção química de alveijamento que se liga a um alvo que é específico para um ou mais estágios particulares de desenvolvimento (por exemplo, células-tronco vs. células diferenciadas).

[00433] Em algumas modalidades, um alvo pode ser um marcador que é exclusiva ou principalmente associado a um ou alguns tipos de célula, a uma ou algumas doenças e/ou a um ou alguns estágios de desenvolvimento. Um marcador específico para tipo de célula é tipicamente expresso em níveis pelo menos 2 vezes maiores neste tipo de célula do que em uma população de células de referência, que pode consistir, por exemplo, em uma mistura contendo células de uma pluralidade (por exemplo, 5 a 10 ou mais) de diferentes tecidos ou órgãos em quantidades aproximadamente iguais. Em algumas modalidades, o marcador específico de tipos de célula está presente em níveis pelo menos 3 vezes, pelo menos 4 vezes, pelo menos 5 vezes, pelo menos 6 vezes, pelo menos 7 vezes, pelo menos 8 vezes, pelo menos 9 vezes, pelo menos 10 vezes, pelo menos 50 vezes, pelo menos 100 vezes ou pelo menos 1000 vezes maiores que sua expressão média em uma população de referência. A detecção ou medição de um marcador específico do tipo de célula pode tornar possível distinguir o tipo ou tipos de célula de interesse de células de muitos, da maioria ou de todos os outros tipos.

[00434] Em algumas modalidades, um alvo compreende uma proteína, um carboidrato, um lipídio e/ou um ácido nucleico. Em algumas

modalidades, um alvo compreende uma proteína e/ou porção característica da mesma, tal como um marcador tumoral, integrina, receptor de superfície celular, proteína transmembranar, proteína intercelular, canal iônico, proteína transportadora membranar, enzima, anticorpo, proteína quimérica, glicoproteína, etc. Em algumas modalidades, um alvo compreende um carboidrato e/ou porção característica do mesmo, tal como uma glicoproteína, açúcar (por exemplo, monossacarídeo, dissacarídeo, polissacarídeo), glicocálix (isto é, a zona periférica rica em carboidrato na superfície externa da maioria das células eucarióticas), etc. Em algumas modalidades, um alvo compreende um lipídio e/ou proteína característica do mesmo, tal como um óleo, ácido graxo, glicerídeo, hormônio, esteroide (por exemplo, colesterol, ácido biliar), vitamina (por exemplo, vitamina E), fosfolipídio, esfingolipídio, lipoproteína, etc. Em algumas modalidades, um alvo compreende um ácido nucleico e/ou porção característica do mesmo, tal como um ácido nucleico de DNA; ácido nucleico de RNA; ácido nucleico de DNA modificado; ácido nucleico de RNA modificado; ácido nucleico que inclui qualquer combinação de DNA, RNA, DNA modificado e RNA modificado.

[00435] Numerosos marcadores são conhecidos na técnica. Os marcadores típicos incluem proteínas da superfície celular, por exemplo, receptores. Os receptores exemplificativos incluem, porém sem limitação, o receptor de transferrina; receptor de LDL; receptores de fator de crescimento, tal como membros da família de receptor de fator de crescimento epidérmico (por exemplo, EGFR, Her2, Her3, Her4) ou receptores de fator de crescimento endotelial vascular, receptores de citocina, moléculas de adesão celular, integrinas, selectinas e moléculas de CD. O marcador pode ser uma molécula que está presente exclusivamente ou em quantidades mais altas em uma molécula maligna, por exemplo, um antígeno tumoral.

NANOPARTÍCULAS

[00436] Em algumas modalidades, a porção química de alvejamento compreende uma partícula (por exemplo, partícula-alvo), de preferência, nanopartícula, opcionalmente uma nanopartícula alvejada ligada a uma molécula de alvejamento que pode se ligar especificamente ou de preferência a um alvo. Em algumas modalidades, a partícula de alvejamento por si mesma guia o composto da presente invenção (tal como por enriquecimento em células ou tecido tumoral) e não há moléculas de alvejamento adicionais ligados à mesma.

[00437] "Nanopartícula" no presente documento significa qualquer partícula que tenha um diâmetro menor que 1000 nm. Em algumas modalidades, um agente terapêutico e/ou molécula de alvejamento podem estar associados ao corpo da partícula, por exemplo, em uma matriz polimérica. Em algumas modalidades, a molécula de alvejamento pode ser associada covalentemente à superfície da matriz polimérica. Em algumas modalidades, a associação covalente é mediada por um ligante. Em algumas modalidades, o agente terapêutico pode estar associado à superfície de, ser encapsulado dentro, circundado por e/ou dispersado através da matriz polimérica. Consultar, por exemplo, a Patente US nº 8.246.968, que está incorporada ao presente documento em sua totalidade.

[00438] Em geral, as nanopartículas da presente invenção compreendem qualquer tipo de partícula. Qualquer partícula pode ser usada em conformidade com a presente invenção. Em algumas modalidades, as partículas são biodegradáveis e biocompatíveis. Em geral, uma substância biocompatível não é tóxica às células. Em algumas modalidades, uma substância é considerada como sendo biocompatível se sua adição às células for menor que um certo limite de morte celular. Em algumas modalidades, uma substância é considerada como sendo biocompatível se sua adição a células não induzir efeitos adversos.

Em geral, uma substância biodegradável é aquela que sofre decomposição sob condições fisiológicas durante o curso de um período de tempo terapeuticamente relevante (por exemplo, semanas, meses ou anos). Em algumas modalidades, uma substância biodegradável é uma substância que pode ser decomposta pelo maquinário celular. Em algumas modalidades, uma substância biodegradável é uma substância que pode ser decomposta por processos químicos. Em algumas modalidades, uma partícula é uma substância que é tanto biocompatível quanto biodegradável. Em algumas modalidades, uma partícula é uma substância que é biocompatível, mas não biodegradável. Em algumas modalidades, uma partícula é uma substância que é biodegradável, mas não biocompatível.

[00439] É frequentemente desejável usar uma população de partículas que é relativamente uniforme em termos de tamanho, formato e/ou composição de modo que cada partícula tenha propriedades similares. Por exemplo, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou pelo menos 95% das partículas podem ter um diâmetro ou dimensão maior que está dentro de 5%, 10% ou 20% do diâmetro médio ou dimensão maior. Em algumas modalidades, uma população de partículas pode ser heterogênea em relação ao tamanho, formato e/ou composição. Uma variedade de partículas diferentes pode ser usada em conformidade com a presente invenção. Em algumas modalidades, as partículas são esferas ou esferoides. Em algumas modalidades, as partículas são esferas ou esferoides. Em algumas modalidades, as partículas são planas ou em formato de placa. Em algumas modalidades, as partículas são cubos ou cuboides. Em algumas modalidades, as partículas são ovais ou elipses. Em algumas modalidades, as partículas são cilindros, cones ou pirâmides.

[00440] Em algumas modalidades, as partículas são micropartículas (por exemplo, microesferas). Em geral, uma "micropartícula" se refere

a qualquer partícula que tem um diâmetro menor que 1000 μm . Em algumas modalidades, as partículas são picopartículas (por exemplo, picoesferas). Em geral, uma "picopartícula" se refere a qualquer partícula que tem um diâmetro menor que 1 nm. Em algumas modalidades, as partículas são lipossomos. Em algumas modalidades, as partículas são micelas.

[00441] As partículas podem ser sólidas ou ocas e podem compreender uma ou mais camadas (por exemplo, nanocascas, nanoanéis). Em algumas modalidades, cada camada tem uma composição única e propriedades únicas relativas às outras camadas. Por exemplo, as partículas podem ter uma estrutura de núcleo/casca, em que o núcleo é uma camada e a casca é uma segunda camada. As partículas podem compreender uma pluralidade de camadas diferentes. Em algumas modalidades, uma camada pode ser substancialmente reticulada, uma segunda camada não é substancialmente reticulada e assim por diante. Em algumas modalidades, uma, algumas ou todas as camadas diferentes podem compreender um ou mais agentes terapêuticos ou diagnósticos a serem distribuídos. Em algumas modalidades, uma camada compreende um agente a ser distribuído, uma segunda camada não compreender um agente a ser distribuído e assim por diante. Em algumas modalidades, cada camada individual compreende um agente diferente ou conjunto de agentes a serem distribuídos.

[00442] Em algumas modalidades, uma partícula é porosa, o que significa que a partícula contém furos ou canais, que são tipicamente pequenos em comparação com o tamanho de uma partícula. Por exemplo, uma partícula pode ser uma partícula de sílica porosa, por exemplo, uma nanopartícula de sílica mesoporosa ou pode ter um revestimento de sílica mesoporosa (Lin et al., 2005, J. Am. Chem. Soc, 127:4570). As partículas podem ter poros na faixa de cerca de 1 nm a cerca de 50 nm de diâmetro, por exemplo, entre cerca de 1 e 20 nm de

diâmetro. Entre cerca de 10% e 95% do volume de uma partícula podem consistir em espaços vazios dentro dos poros ou canais.

[00443] As partículas podem ter uma camada de revestimento. O uso de uma camada de revestimento biocompatível pode ser vantajoso, por exemplo, se as partículas contiverem materiais que são tóxicos às células. Os materiais de revestimento adequados incluem, porém sem limitação, proteínas naturais, tal como albumina sérica bovina (BSA), polímeros hidrofílicos biocompatíveis, tal como polietileno glicol (PEG) ou um derivado de PEG, fosfolipídio-(PEG), sílica, lipídios, polímeros, carboidratos, tal como dextrano, outras nanopartículas que podem ser associadas a nanopartículas da invenção, etc. Revestimentos podem ser aplicados ou montados de uma variedade de formas, tal como por imersão, usando uma técnica de camada por camada, por automontagem, conjugação, etc. A automontagem se refere a um processo de montagem espontânea de uma estrutura de ordem mais alta que se baseia na atração natural dos componentes da estrutura de ordem mais alta (por exemplo, moléculas) uns pelos outros. Isto tipicamente ocorre através de movimentos aleatórios das moléculas e a formação de ligações com base no tamanho, formato, composição ou propriedades químicas.

[00444] Os exemplos de polímeros incluem polialquilenos (por exemplo, polietilenos), policarbonatos (por exemplo, poli(1,3-dioxan-2-ona)), polianidridos (por exemplo, poli(anidrido sebácico)), polihidroxiácidos (por exemplo, poli(3-hidroxiálcanoato)), polifumaratos, policaprolactonas, poliamidas (por exemplo, policaprolactama), poliacetais, poliéteres, poliésteres (por exemplo, polilactídeo, poliglicolídeo), poli(ortoésteres), álcoois polivinílicos, poliuretanos, polifosfazenos, poliacrilatos, polimetacrilatos, policianoacrilatos, poliureias, poliestirenos e poliaminas. Em algumas modalidades, polímeros de acordo com a presente invenção incluem polímeros os quais foram aprovados para o

uso em humanos pela Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA) nos termos de 21 C.F.R. § 177.2600, o que inclui mas não se limita a poliésteres (por exemplo, ácido polilático, ácido poliglicólico, poli(ácido láctico-co-glicólico), policaprolactona, polivalerolactona, poli(1,3-dioxan-2ona)); polianidridos (por exemplo, poli(anidrido sebácico)); poliéteres (por exemplo, polietileno glicol); poliuretanos; polimetacrilatos; poliacrilatos e policianoacrilatos.

[00445] Em algumas modalidades, as partículas podem ser partículas não poliméricas (por exemplo, partículas de metal, pontos quânticos, partículas de cerâmica, polímeros que compreendem materiais inorgânicos, materiais derivados de osso, substitutos de osso, partículas virais, etc.). Em algumas modalidades, um agente terapêutico ou diagnóstico a ser distribuído pode estar associado à superfície de tal partícula não polimérica. Em algumas modalidades, uma partícula não polimérica é um agregado de componentes não poliméricos, tal como um agregado de átomos de metal (por exemplo, átomos de ouro). Em algumas modalidades, um agente terapêutico ou diagnóstico a ser distribuído pode estar associado à superfície de e/ou encapsulado dentro, circundado por e/ou disperso através de um agregado de componentes não poliméricos.

[00446] As partículas (por exemplo, nanopartículas, micropartículas) podem ser preparadas usando qualquer método conhecido na técnica. Por exemplo, as formulações particuladas podem ser formadas por métodos como nanoprecipitação, canais fluidicos de focalização de fluxo, secagem por atomização, evaporação de solvente por emulsão singular e dupla, extração de solvente, separação de fases, moer, procedimentos de microemulsão, microfabricação, nanofabricação, camadas sacrificiais, coacervação complexa e simples e outros métodos adequados. Alternativa ou adicionalmente, a síntese de solvente orgânico e aquoso para nanopartículas semicondutores monodispersos,

condutivos, magnéticos, orgânicos e outros foram descritos (Pellegrino *et al.*, 2005, *Small*, 1:48; Murray *et al.*, 2000, *Ann. Rev. Mat. Sci.*, 30:545; e Trindade *et al.*, 2001, *Chem. Mat.*, 13:3843).

[00447] Os métodos para produzir micropartículas para distribuição de agentes encapsulados são descritos na literatura (consultar, por exemplo, Doubrow, Ed., "Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy," CRC Press, Boca Raton, 1992; Mathiowitz *et al.*, 1987, *J. Control. Release*, 5:13; Mathiowitz *et al.*, 1987, *Reactive polymers*, 8: 275; e Mathiowitz *et al.*, 1988, *J. Appl. Polymer Sci.*, 35:755).

PORÇÕES QUÍMICAS DE ALVEJAMENTO DE ÁCIDO NUCLEICO

[00448] Em algumas modalidades, a porção química de alvejamento compreende uma porção química de alvejamento de ácido nucleico.

[00449] Em geral, uma porção química de alvejamento de ácido nucleico é qualquer polinucleotídeo que se liga a um componente associado a um órgão, tecido, célula, componente de matriz extracelular e/ou compartimento intracelular (o alvo).

[00450] Em algumas modalidades, as porções químicas de alvejamento de ácido nucleico são aptâmeros. Um aptâmero é tipicamente um polinucleotídeo que se liga a uma estrutura-alvo específica que está associada a um órgão, tecido, célula, componente de matriz extracelular e/ou compartimento intracelular particular. Em geral, a função de alvejamento do aptâmero é baseada na estrutura tridimensional do aptâmero. Em algumas modalidades, a ligação de um aptâmero a um alvo é tipicamente mediada pela interação entre as estruturas bidimensionais e/ou tridimensionais tanto do aptâmero quanto do alvo. Em algumas modalidades, a ligação de um aptâmero a um alvo não é unicamente baseada na sequência primária do aptâmero, mas depende da estrutura (ou estruturas) tridimensional do aptâmero e/ou alvo. Em algumas modalidades, o aptâmero se liga a seus alvos através de pareamento de bases de Watson-Crick complementar que é interrompido

por estruturas (por exemplo, laços em forma de grampo) que interrompem o pareamento de bases.

[00451] Em algumas modalidades, as porções químicas de alvejamento de ácido nucleico são spiegelmers (Publicações PCT WO 98/08856, WO 02/100442 e WO 06/117217). Em geral, spiegelmers são ácidos nucleicos de imagem espelhada, sintéticos que podem se ligar especificamente a um alvo (isto é, aptâmeros de imagem espelhada). Os spiegelmers são caracterizados por características estruturais que tornam os mesmos não suscetíveis a exonucleases e endonucleases.

[00452] Um versado na técnica reconhecerá que qualquer porção química de alvejamento de ácido nucleico (por exemplo, aptâmero ou spiegelmer) que é capaz de se ligar especificamente a um alvo pode ser usada em conformidade com a presente invenção. Em algumas modalidades, as porções químicas de alvejamento de ácido nucleico a serem usadas em conformidade com a presente invenção podem alvejar um marcador associado a uma doença, distúrbio e/ou afecção. Em algumas modalidades, as porções químicas de alvejamento de ácido nucleico a serem usadas em conformidade com a presente invenção podem alvejar alvos associados a câncer. Em algumas modalidades, as porções químicas de alvejamento de ácido nucleico a serem usadas em conformidade com a presente invenção podem alvejar marcadores tumorais. Qualquer tipo de câncer e/ ou qualquer marcador tumoral pode ser alvejado usando porções químicas de alvejamento de ácido nucleico em conformidade com a presente invenção. Para fornecer apenas alguns exemplos, as porções químicas de alvejamento de ácido nucleico podem alvejar marcadores associado a câncer de próstata, câncer de pulmão, câncer de mama, câncer colorretal, câncer de bexiga, câncer pancreático, câncer endometrial, câncer de ovário, câncer ósseo, câncer de esôfago, câncer de fígado, câncer de estô-

mago, tumores cerebrais, melanoma cutâneo e/ou leucemia.

[00453] Os ácidos nucleicos da presente invenção (incluindo porções químicas de alvejamento de ácido nucleico e/ou RNAs funcionais a serem distribuídos, por exemplo, entidades de indução de RNAi, ribozimas, tRNAs, etc., descritos em mais detalhes abaixo) podem ser preparados de acordo com qualquer técnica disponível, incluindo, porém sem limitação, síntese química, síntese enzimática, clivagem enzimática ou química de um precursor mais longo, etc.

[00454] Os métodos para sintetizar RNAs são conhecidos na técnica (consultar, por exemplo, Gait, M. J. (ed.) *Oligonucleotide synthesis: a practical approach*, Oxford [Oxfordshire], Washington, D.C.: IRL Press, 1984; e Herdewijn, P. (ed.) *Oligonucleotide synthesis: methods e applications*, *Methods in molecular biology*, v. 288 (Clifton, NJ.) Totowa, N.J.: Humana Press, 2005).

[00455] O ácido nucleico que forma a porção química de alvejamento de ácido nucleico pode compreender nucleosídeos de ocorrência natural, nucleosídeos modificados, nucleosídeos de ocorrência natural com ligantes de hidrocarboneto (por exemplo, um alquileno) ou um ligante poliéter (por exemplo, um ligante PEG) inserido entre um ou mais nucleosídeos, nucleosídeos modificados com ligantes de hidrocarboneto ou PEG inseridos entre um ou mais nucleosídeos ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, os nucleotídeos ou nucleotídeos modificados da porção química de alvejamento de ácido nucleico podem ser substituídos por um ligante de hidrocarboneto ou um ligante de poliéter contanto que a afinidade e a seletividade de ligação da porção química de alvejamento de ácido nucleico não sejam substancialmente reduzidas pela substituição (por exemplo, a constante de dissociação da porção química de alvejamento de ácido nucleico em relação ao alvo não deve ser maior que cerca de 1×10^{-3} M).

[00456] Será entendido por aqueles versados na técnica que os

ácidos nucleicos em conformidade com a presente invenção podem compreender nucleotídeos inteiramente dos tipos encontrados em ácidos nucleicos de ocorrência natural ou podem, em vez disto, incluir um ou mais análogos de nucleotídeo ou ter uma estrutura que difere de outro modo daquela de um ácido nucleico de ocorrência natural. As Patentes U.S. nºs 6.403.779; 6.399.754; 6.225.460; 6.127.533; 6.031.086; 6.005.087; 5.977.089; e as referências nas mesmas divulgam uma ampla variedade de análogos de nucleotídeo específicos e modificações que podem ser usadas. Consultar Crooke, S. (ed.) *Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications* (1ª edição), Marcel Dekker; ISBN: 0824705661; 1ª edição (2001) e referências no mesmo. Por exemplo, as modificações 2' incluem grupos halo, alcóxi e alilóxi. Em algumas modalidades, o grupo 2'-OH é substituído por um grupo selecionado dentre H, OR, R, halo, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ ou CN, em que R é C₁-C₆ alquila, alquenila ou alquinila, e halo é F, Cl, Br ou I. Os exemplos de ligações modificadas incluem fosforotioato e ligações de 5'-N-fosforamidita.

[00457] Os ácidos nucleicos que compreendem uma variedade de análogos de nucleotídeo diferentes, cadeias principais modificadas ou ligações internucleosídeo de ocorrência não natural podem ser utilizados em conformidade com a presente invenção. Os ácidos nucleicos da presente invenção podem incluir nucleosídeos naturais (isto é, adenosina, timidina, guanosina, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina e desoxicitidina) ou nucleosídeos modificados. Os exemplos de nucleotídeos modificados incluem nucleosídeo modificado com base (por exemplo, aracitidina, inosina, isoguanosina, nebularina, pseudouridina, 2,6-diaminopurina, 2-aminopurina, 2-tiotimidina, 3-deaza-5-azacitidina, 2'-desoxiuridina, 3-nitorpirrol, 4-metilindol, 4-tiouridina, 4-tiotimidina, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, 2-tiouridina, 5-bromocitidina, 5-iodouridina, inosina, 6-azauridina, 6-

cloropurina, 7-deazaadenosina, 7-deazaguanosina, 8-aza-adenosina, 8-azidoadenosina, benzimidazol, M1-metiladenosina, pirrolo-pirimidina, 2-amino-6-cloropurina, 3-metil adenosina, 5-propinilcitidina, 5-propiniluridina, 5-bromouridina, 5-fluorouridina, 5-metilcitidina, 7-deazaadenosina, 7-deazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina e 2-tiocitidina), bases química ou biologicamente modificadas (por exemplo, bases metiladas), açúcares modificados (por exemplo, 2'-fluororibose, 2'-aminoribose, 2'-azidoribose, 2'-O-metilribose, nucleotídeos L-enantioméricos arabinose e hexose), grupos fosfato modificados (por exemplo, ligações de fosforotioatos e 5'-N-fosforamidita) e combinações dos mesmos. Monômeros de nucleotídeo naturais e modificados para a síntese química de ácidos nucleicos estão prontamente disponíveis. Em alguns casos, os ácidos nucleicos que compreendem tais modificações exibem propriedades aprimoradas em relação a ácidos nucleicos que consistem apenas em nucleotídeos de ocorrência natural. Em algumas modalidades, as modificações de ácido nucleico descritas no presente documento são utilizadas para reduzir e/ou impedir digestão por nucleases (por exemplo, exonucleases, endonucleases, etc.). Por exemplo, a estrutura de um ácido nucleico pode ser estabilizada incluindo-se análogos de nucleotídeo na extremidade 3' de uma ou ambas as fitas a fim de reduzir a digestão.

[00458] Os ácidos nucleicos modificados não precisam ser uniformemente modificados ao longo do comprimento inteiro da molécula. Diferentes modificações de nucleotídeo e/ou estruturas de cadeia principal podem existir em várias posições no ácido nucleico. Um versado na técnica entenderá que os análogos de nucleotídeo ou outra modificação (ou modificações) podem estar localizados em qualquer posição (ou posições) de um ácido nucleico, de modo que a função do ácido nucleico não seja substancialmente afetada. Para fornecer apenas um exemplo, as modificações podem estar localizadas em qualquer posi-

ção de uma porção química de alvejamento de ácido nucleico, de modo que a capacidade da porção química de alvejamento de ácido nucleico de se ligar especificamente ao alvo não seja substancialmente afetada. A região modificada pode estar na extremidade 5' e/ou na extremidade 3' de uma ou ambas as fitas. Por exemplo, as porções químicas de alvejamento de ácido nucleico modificadas em que aproximadamente 1 a 5 resíduos na extremidade 5' e/ou 3' de qualquer uma de ambas as fitas são análogos de nucleotídeo e/ou têm uma modificação de cadeia principal foram empregadas. A modificação pode ser uma modificação terminal 5' ou 3'. Uma ou ambas as fitas de ácido nucleico podem compreender pelo menos 50% de nucleotídeos não modificados, pelo menos 80% de nucleotídeos não modificados, pelo menos 90% de nucleotídeos não modificados ou 100% de nucleotídeos não modificados.

[00459] Os ácidos nucleicos em conformidade com a presente invenção podem, por exemplo, compreender uma modificação a uma ligação de açúcar, nucleosídeo ou internucleosídeo, tais como aqueles descrito nas Publicações de Pedido de Patente U.S. 2003/0175950, 2004/0192626, 2004/0092470, 2005/0020525 e 2005/0032733. A presente invenção abrange o uso de qualquer ácido nucleico que tem qualquer uma ou mais das modificações descritas no presente documento. Por exemplo, foi relatado que diversos conjugados terminais, por exemplo, lipídios, tal como colesterol, ácido litocólico, ácido alúrico ou cadeias ramificadas de alquila longas, melhoram a absorção celular. Análogos e modificações podem ser testados usando, por exemplo, qualquer ensaio adequado conhecido na técnica, por exemplo, para selecionar aqueles que resultam em distribuição melhorada de um agente terapêutico ou diagnóstico, ligação específica melhorada de uma porção química de alvejamento de ácido nucleico a um alvo, etc. Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos em conformidade com

a presente invenção podem compreender uma ou mais ligações de nucleosídeo não naturais. Em algumas modalidades, um ou mais nucleotídeos internos na extremidade 3', extremidade 5' ou ambas as extremidades 3' e 5' da porção química de alvejamento de ácido nucleico são invertidos para produzir uma ligação, tal como uma ligação 3'-3' ou uma ligação 5'-5'.

[00460] Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos em conformidade com a presente invenção não são sintéticos, mas são entidades de ocorrência natural que foram isoladas de seus ambientes naturais.

[00461] Qualquer método pode ser usado para projetar porções químicas de alvejamento de ácido nucleico inovadoras (consultar, por exemplo, as Patentes U.S. nºs 6.716.583; 6.465.189; 6.482.594; 6.458.543; 6.458.539; 6.376.190; 6.344.318; 6.242.246; 6.184.364; 6.001.577; 5.958.691; 5.874.218; 5.853.984; 5.843.732; 5.843.653; 5.817.785; 5.789.163; 5.763.177; 5.696.249; 5.660.985; 5.595.877; 5.567.588; e 5.270.163; e Publicações de Pedido de Patente U.S. nºs 2005/0069910, 2004/0072234, 2004/0043923, 2003/0087301, 2003/0054360 e 2002/0064780).

[00462] As porções químicas de alvejamento de ácido nucleico que se ligam a uma proteína, um carboidrato, um lipídio e/ou um ácido nucleico podem ser projetadas e/ou identificadas. Em algumas modalidades, as porções químicas de alvejamento de ácido núcleo podem ser projetadas e/ou identificadas para uso nos complexos da invenção que se ligam a proteínas e/ou porções características das mesmas, tais como marcadores tumorais, integrinas, receptores de superfície celular, proteínas transmembranares, proteínas intercelulares, canais iônicos, proteínas transportadoras membranares, enzimas, anticorpos, proteínas quiméricas, etc. Em algumas modalidades, as porções químicas de alvejamento de ácido nucleico podem ser projetadas e/ou

identificadas para uso nos complexos da invenção que se ligam a carboidratos e/ou porções características dos mesmos, tais como glicoproteínas, açúcares (por exemplo, monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos), glicocálix (isto é, a zona periférica rica em carboidrato na superfície externa da maioria das células eucarióticas), etc. Em algumas modalidades, as porções químicas de alvejamento de ácido nucleico podem ser projetadas e/ou identificadas para uso nos complexos da invenção que se ligam a lipídios e/ou porções características dos mesmos, tais como óleos, ácidos graxos saturados, ácidos graxos insaturados, glicerídeos, hormônios, esteroides (por exemplo, colesterol, ácidos biliares), vitaminas (por exemplo, vitamina E), fosfolipídios, esfingolipídios, lipoproteínas, etc. Em algumas modalidades, as porções químicas de alvejamento de ácido nucleico podem ser projetadas e/ou identificadas para uso nos complexos da invenção que se ligam a ácidos nucleicos e/ou porções características dos mesmos, tais como ácidos nucleicos de DNA; ácidos nucleicos de RNA; ácidos nucleicos de DNA modificados; ácidos nucleicos de RNA modificados; e ácidos nucleicos que incluem qualquer combinação de DNA, RNA, DNA modificado e RNA modificado; etc.

[00463] As porções químicas de alvejamento de ácido nucleico (por exemplo, aptâmeros ou spiegelmers) podem ser projetadas e/ou identificadas usando qualquer método disponível. Em algumas modalidades, as porções químicas de alvejamento de ácido nucleico são projetadas e/ou identificadas identificando-se porções químicas de alvejamento de ácido nucleico de uma mistura candidata de ácidos nucleicos.

MÉTODOS PARA PREPARAR OS COMPOSTOS DA INVENÇÃO

[00464] Os compostos e conjugados divulgados no presente documento podem ser preparados através de métodos de preparação simples (consultar, por exemplo, os Exemplos 1 a 78). Tais métodos de

o átomo de N, O ou S seja ligado a TG, se y for 1;

[00483] O e Y' estão posicionados em átomos adjacentes de Ar;

[00484] TG é um grupo de desencadeamento que, quando ativado, resulta na formação de um átomo de N, O ou S capaz de reagir com o SO₂ para deslocar (Q)_q-(L')_w e formar um anel com 5 ou 6 membros, incluindo X-SO² e os átomos intermediários de Ar;

[00485] w, x e y são, cada um, independentemente, um número inteiro que tem um valor de 0 ou 1;

[00486] cada R^a e R^c é, independentemente, hidrogênio ou alquila inferior; e

[00487] cada R^b é, independentemente, hidrogênio ou alquila inferior; ou

[00488] dois R^b, juntamente com o átomo de carbono ao qual estão ligados, formam um anel com 3 a 5 membros, de preferência, um anel com 3 ou 4 membros.

[00489] O grupo reativo do grupo de ligação pode ser uma porção química capaz de participar de reações de cicloadição 1,3-dipolar, reações de hetero-Diels-Alder, reações de substituição nucleofílica, reações de carbonila do tipo não aldol, adições a múltiplas ligações carbono-carbono, reações de oxidação, reações click ou qualquer outra reação de acoplamento intermolecular. De preferência, o grupo reativo é selecionado para participar de uma reação seletiva com um parceiro de reação que não é comum em moléculas biológicas, tal como uma cicloadição 1,3-dipolar, hetero-Diels-Alder, condensação de oxima/hidrazona ou reação click.

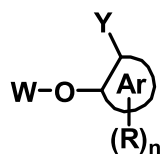
[00490] Em certas modalidades preferenciais, o grupo de ligação pode compreender um alcino ou azida (que reage para formar um triazol), um alcino e um óxido de nitrila (que reagem para formar um isoxazol) ou uma carbonila (por exemplo, um aldeído ou cetona) ou uma hidrazina ou hidroxilamina (que reage para formar uma oxima ou

do acima para os conjugados de Fórmula (I') ou os compostos de Fórmula (Ia).

[00514] A invenção fornece, ainda, os compostos descritos acima, que são úteis nesses métodos.

COMPOSTOS INTERMEDIÁRIOS

[00515] Em algumas modalidades, os compostos e conjugados revelados no presente documento podem ser preparados por um método que utiliza um composto intermediário que tem a estrutura de acordo com a Fórmula (IV):



(IV)

[00516] ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que:

[00517] W é hidrogênio, $-\text{SiR}^{16}\text{R}^{17}\text{R}^{18}$ ou $-\text{SO}_2\text{-G}$;

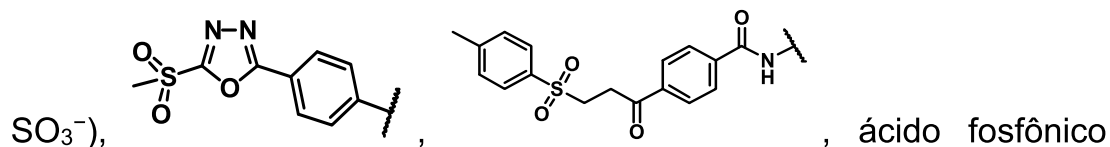
[00518] R^{16} , R^{17} e R^{18} são, cada um, independentemente, $\text{C}_1\text{--C}_6$ -alquila;

[00519] G é halogênio (de preferência, flúor), imidazol ou N-metilimidazólio;

[00520] R é um substituinte ou $-\text{L}^{1'}\text{-Z}$;

[00521] $\text{L}^{1'}$ é um $\text{C}_1\text{--C}_{200}$ -alquileno que compreende opcionalmente pelo menos uma dentre uma ligação de peptídeo, uma ligação de amino, uma ligação de éter, uma ligação de triazol, uma ligação de tetrazol, uma ligação de açúcar, uma ligação de sulfonamida, uma ligação de fosfonato, uma ligação de sulfo ou uma estrutura de dendrímero;

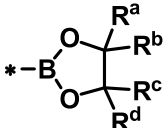
[00522] Z é um precursor selecionado dentre isocianeto, isotiocianeto, dissulfeto de 2-piridila, haloacetamida ($-\text{NHC(O)CH}_2\text{-hal}$), maleimida, dieno, alceno, haleto, tosilato (TsO^-), aldeído, sulfonato (R-

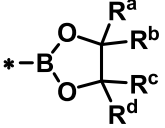


(-P(=O)(OH)₂), cetona, C₈-C₁₀ cicloalquila, -OH, -NHOH, -NHNH₂, -SH, ácido carboxílico (-COOH), acetileno (-C≡CH), azida (-N₃), amino (-NH₂), ácido sulfônico (-SO₃H), um derivado de alquinona (-C(O)C≡C-R^a, em que R^a é C₁-C₁₀-alquila) e fosfato de di-hidrogênio (-OP(=O)(OH)₂);

[00523] n é um n é um número inteiro que tem um valor de 1 a 4;

[00524] Y é -NO₂, -OC(O)(CH₂)_rC(O)R₁, -O(CH₂)_r-Ar₁-NO₂, -NHOH,

-NHNH₂, -BR₂R₃,  ou -Y'-TG, tal como -NO₂,

-OC(O)(CH₂)_rC(O)R₁, -O(CH₂)_r-Ar₁-NO₂, -NHNH₂, -BR₂R₃, 
ou -Y'-TG;

[00525] R¹ é C₁-C₆ alquila;

[00526] r é um número inteiro de 1 a 5;

[00527] Ar¹ é C₆-C₂₀-arileno;

[00528] R² e R³ são, cada um, independentemente, hidrogênio, C₁-C₆ alquila, C₁-C₆ alcóxi ou hidróxi;

[00529] R^a, R^b, R^c e R^d são, cada um, independentemente, hidrogênio ou C₁-C₆ alquila;

[00530] Y' é -(CH₂)_xNR"-, -(CH₂)_xO- ou -(CH₂)_xS-;

[00531] R" é hidrogênio ou C₁-C₆ alquila;

[00532] x é um número inteiro de 0 ou 1; e

[00533] TG é um grupo de desencadeamento.

[00534] Em algumas modalidades, os compostos e conjugados revelados no presente documento podem ser preparados por um método que utiliza um composto intermediário que tem a estrutura de acordo com a Fórmula (V):

no presente documento podem ser usados para conjugar um anticorpo a uma porção química de fármaco para formar um conjugado de anticorpo-fármaco (ADC). Os conjugados de anticorpo-fármaco (ADCs) podem aumentar a eficácia terapêutica no tratamento de doença, por exemplo, câncer, devido à capacidade do ADC de entregar seletivamente uma ou mais porções químicas de fármaco a tecidos-alvo, tal como um antígeno associado a tumor. Assim, em certas modalidades, a invenção fornece ADCs para uso terapêutico, por exemplo, tratamento de câncer.

[00575] Os ADCs da invenção compreendem um anticorpo ligado a uma ou mais porções químicas de fármaco. A especificidade do ADC é definida pela especificidade do anticorpo. Em uma modalidade, um anticorpo está ligado a um ou mais fármacos citotóxicos, que são distribuídos internamente a uma célula cancerosa.

[00576] Os exemplos de fármacos que podem ser usados no ADC da invenção são fornecidos abaixo. Os termos "fármaco", "agente" e "porção química de fármaco" são usados intercambiavelmente no presente documento. Os termos "ligado" e "conjugado" também são usados intercambiavelmente no presente documento e indicam que o anticorpo ou porção química estão ligados covalentemente.

[00577] Em algumas modalidades, o ADC tem a seguinte fórmula (Fórmula VII):



[00578] em que Ab é o anticorpo e (D-L) é uma porção química Ligante-Fármaco. A porção química Ligante-Fármaco é constituída por um ligante L e uma porção química de fármaco D. A porção química de fármaco pode ter, por exemplo, atividade citostática, citotóxica ou terapêutica de outro modo contra uma célula-alvo. n é um número inteiro que tem um valor de 1 a cerca de 20, de preferência, de 1 a cerca de 10. De preferência, D-L é tem a estrutura de Fórmula (I''):

1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 a 2, ou é um número inteiro que tem um valor de 1. Quando cb é 1 e n é 1, a razão entre fármaco e anticorpo (DAR) de um ADC é equivalente ao número de fármacos presentes em (D-L). Quando cb é diferente de 1, a razão entre fármaco e anticorpo (DAR) de um ADC é equivalente à razão entre o número de fármacos presentes em (D-L) e o número de anticorpos presentes no conjugado.

FÁRMACOS EXEMPLIFICATIVOS PARA CONJUGAÇÃO

[00592] Os ADCs da invenção fornecem uma terapia alvejada que pode, por exemplo, reduzir os efeitos colaterais frequentemente vistos com terapias anticâncer, conforme o um ou mais agente ativo ou fármaco é distribuído a uma célula específica.

[00593] Por exemplo, o fármaco pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em erlotinib (TARCEVA; Genentech/OSI Pharm.); bortezomib (VELCADE; MilleniumPharm.); fulvestrant (FASLODEX; AstraZeneca); sutent (SU11248; Pfizer); letrozol (FEMARA; Novartis); mesilato de imatinib (GLEEVEC; Novartis); PTK787/ZK 222584 (Novartis); oxaliplatina (Eloxatin; Sanofi); 5-fluorouracila (5-FU); leucovorina; rapamicina (Sirolimus, RAPAMUNE; Wyeth); lapatinib (TYKERB, GSK572016; GlaxoSmithKline); lonafarnib (SCH 66336); sorafenib (BAY43-9006; Bayer Labs.); gefitinib (IRESSA; Astrazeneca); AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen); agente alquilante (por exemplo, tiotepa ou ciclofosfamida CYTOXAN®); sulfonato de alquila (por exemplo, bussulfano, improssulfano ou pipossulfano); aziridina (por exemplo, benzydopa, carboquona, meturedopa ou uredopa); etilenimina, metilmelamina, altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida, trimetilolmelamina; acetogeninas (por exemplo, bulatacina ou bulatacinona); camptotecina, incluindo o análogo sintético topotecano; briostatina; calistatina; CC-1065 (incluindo análogos sintéticos adozelesina, carzelesina ou bizelesina do mesmo); criptoficinas (por

exemplo, criptoficina 1 ou criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluindo um análogo sintético, KW-2189, e CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; sarcodictina; espongiostatina; mostarda de nitrogênio (por exemplo, clorambucila, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, cloridrato de óxido de mecloretamina, mel-falano, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida ou mostarda de uracila); nitroureia (por exemplo, carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina ou ranimustina); antibióticos (por exemplo, caliqueamicina selecionada dentre caliqueamicina gamma 1 I e caliqueamicina ômega I 1 ou dinemicina, incluindo dinemicina A como antibióticos de enedina); bisfosfonato (por exemplo, clodronato); esperamicina, cromóforo de neocarzinostatina ou cromóforos antibióticos de enedina relacionados a cromoproteína, aclacinomicina, actinomicina, antramicina, azaserina, bleomicina, cactinomicina, carabicina, carninomicina, carzinofilina, cromomicina, dactinomicina, daunorubicina, detorubucina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRLIMICINA® (por exemplo, morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina, doxorubicina lipossômica ou desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, marcelomicina, mitomicina (por exemplo, mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicina, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptomigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinos-tatina ou zorubicina); anti-metabólitos (por exemplo, 5-fluorouracila (5-FU)); análogos de ácido fólico (por exemplo, denopterina, metotrexato, pteropterina ou trimetrexato); análogos de purina (por exemplo, fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina ou tiguanina); análogos de pirimidina (por exemplo, ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina ou floxuridina); andrógeno (por exemplo, calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano ou testolactona); anti-adrenal (por exemplo,

aminoglutetimida, mitotano ou trilostano); repositor de ácido fólico (por exemplo, ácido folínico); aceglatona; aldofosfamida glicosídeo; ácido aminolevulínico; eniluracila; ansacrina; bestrabucila; bisantreno; edatratrato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptínio; epotilona; etoglucid; nitrato de gálio; hidroxureia; lentinano; lonidainina; maitansinoide (por exemplo, maitansina ou ansamitocina; tricoteceno (por exemplo, toxina T-2, verracurina A, roridina A ou anguidina); mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etil-hidrazida; procarbazona; polissacarídeo PSK®; razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermânio; ácido tenuazônico; triaziquona; 2,2',2"-triclortrietilamina; tricoteceno (particularmente, toxina T-2, verracurina A, roridina A ou anguidina); uretao; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinosídeo ('Ara-C'); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides (por exemplo, paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.), ABRAXANE™ formulação de nanopartícula geneticamente modificada com albumina, sem cremóforo de paclitaxel, American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, IL ou TAXOTERE® doxetaxel ((Rhone-Poulenc Rorer, Antony, França))); cloranbucila; gencitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; análogo de platina (por exemplo, cisplatina ou carboplatina); vinblastina; platina; etoposídeo, ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; NAVELBINE® vinorelbina; novantrona; teniposídeo; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inibidor de topoisomerase RFS 2000; difluorometilornitina (DFMO); retinoide (por exemplo, ácido retinoico); capecitabina; e um sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos, um solvato dos mesmos, um ácido dos mesmos ou um derivado dos mesmos.

INIBIDORES MITÓTICOS

[00594] Em algumas modalidades, os ligantes da invenção podem

ser usados para conjugar um anticorpo a um ou mais inibidores mitóticos para formar um ADC para o tratamento de câncer. O termo "inibidor mitótico", conforme usado no presente documento, se refere a um agente citotóxico e/ou terapêutico que bloqueia a mitose ou divisão celular, um processo biológico particularmente importante para células cancerosas. O inibidor mitótico rompe microtúbulos, de modo que a divisão celular seja impedida, frequentemente afetando a polimerização de microtúbulo ou despolimerização de microtúbulo. Assim, em certas modalidades, um anticorpo é conjugado a um ou mais inibidores mitóticos que interrompem a formação de microtúbulo inibindo a polimerização de tubulina. Em uma modalidade, o inibidor mitótico usado nos ADCs da invenção é Taxol[®] (paclitaxel), Taxotere[®] (docetaxel) ou Ixempra[®] (ixabepilona). Os exemplos de inibidores mitóticos que podem ser usados nos ADCs divulgados no presente documento são fornecidos abaixo. Estão incluídas no gênero de inibidores mitóticos as auristatinas, descritas acima.

AURISTATINAS

[00595] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos uma auristatina. As auristatinas representam um grupo de análogos de dolastatina que mostra, de modo geral, possuir atividade anticâncer por interferência na dinâmica de microtúbulo e hidrólise de GTP, inibindo, assim, a divisão celular. Por exemplo, Auristatina E (Patente U.S. nº 5.635.483) é um análogo sintético do produto natural marinho dolastatina 10, um composto que inibe a polimerização de tubulina por ligação ao mesmo sítio na tubulina que o fármaco anticâncer vincristina (G. R. Pettit, Prog. Chem. Org. Nat. Prod, 70: 1-79 (1997)). Dolastatina 10, auristatina PE e auristatina E são peptídeos lineares que têm quatro aminoácidos, três dos quais são exclusivos para a classe dolastatina de compostos. As modalidades exemplificativas da subclasse auristatina de inibidores mitóticos

incluem, porém sem limitação, monometil auristatina D (MMAD ou derivado de auristatina D), monometil auristatina E (MMAE ou derivado de auristatina E), monometil auristatina F (MMAF ou derivado de auristatina F), auristatina F fenilenodiamina (AFP), auristatina EB (AEB), auristatina EFP (AEFP) e éster AE de ácido 5-benzoilvalérico (AEVB). A síntese e a estrutura de derivados de auristatina são descritas nas Publicações de Pedido de Patente U.S. nºs 2003-0083263, 2005-0238649 e 2005-0009751; Publicação de Patente Internacional nº WO 04/010957, Publicação de Patente Internacional nº WO 02/088172 e Patentes U.S. nºs 6.323.315; 6.239.104; 6.034.065; 5.780.588; 5.665.860; 5.663.149; 5.635.483; 5.599.902; 5.554.725; 5.530.097; 5.521.284; 5.504.191; 5.410.024; 5.138.036; 5.076.973; 4.986.988; 4.978.744; 4.879.278; 4.816.444; e 4.486.414; cada uma das quais está incorporada a título de referência no presente documento.

DOLASTATINAS

[00596] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos uma dolastatina para formar um ADC. As dolastatinas são compostos peptídicos curtos isolados da lebre do mar do oceano da Índia *Dolabella auricularia* (consultar Pettit et al., J. Am. Chem. Soc., 1976, 98, 4677). Os exemplos de dolastatinas incluem dolastatina 10 e dolastatina 15. A dolastatina 15, um depsipeptídeo com sete subunidades derivado de *Dolabella auricularia*, e é um potente agente antimetabólico estruturalmente relacionado ao agente antitubulina dolastatina 10, um peptídeo com cinco subunidades obtido do mesmo organismo. Assim, em uma modalidade, o ADC da invenção compreende um anticorpo, um ligante, conforme descrito no presente documento, e pelo menos uma dolastatina. As auristatinas, descritas acima, são derivados sintéticos de dolastatina 10.

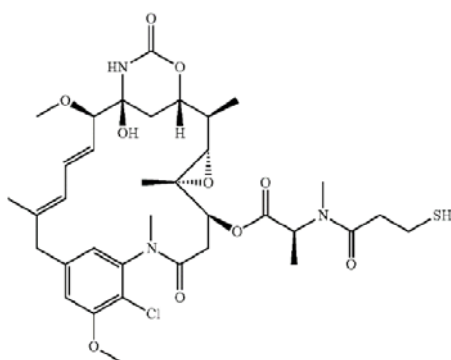
MAITANSINOIDES

[00597] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar

um anticorpo a pelo menos um maitansinoide para formar um ADC. Os maitansinoides são agentes antitumorais potentes que foram originalmente isolados de membros das famílias de plantas superiores Celas-traceae, Rhamnaceae e Euphorbiaceae, assim como algumas espécies de musgos (Kupchan et al, J. Am. Chem. Soc. 94:1354-1356 [1972]; Wani et al, J. Chem. Soc. Chem. Commun 390: [1973]; Powell et al, J. Nat. Prod. 46:660-666 [1983]; Sakai et al, J. Nat. Prod. 51:845-850 [1988]; e Suwanborirux et al, Experientia 46:117-120 [1990]). A evidência sugere que os maitansinoides inibem mitose inibindo a polimerização da proteína de microtúbulo tubulina, impedindo, assim, a formação de microtúbulos (consultar, por exemplo, a Patente U.S. nº 6.441.163 e Remillard et al., Science, 189, 1002-1005 (1975)). Os maitansinoides mostraram inibir o crescimento de células tumorais *in vitro* usando modelos de cultura celular e *in vivo* usando sistemas de animais de laboratório. Além disto, a citotoxicidade de maitansinoides é 1000 vezes maior que os agentes quimioterápicos convencionais, tal como, por exemplo, metotrexato, daunorubicina e vincristina (consultar, por exemplo, Patente U.S. nº 5.208.020).

[00598] Os maitansinoides incluem maitansina, maitansinol, C-3 ésteres de maitansinol e outros análogos e derivados de maitansinol (consultar, por exemplo, as Patentes U.S. nºs 5.208.020 e 6.441.163, cada uma das quais está incorporada ao presente documento a título de referência). C-3 ésteres de maitansinol podem ser de ocorrência natural ou derivados sinteticamente. Além disto, C-3 ésteres de maitansinol tanto de ocorrência natural quanto sintéticos podem ser classificados como um C-3 éster com ácidos carboxílicos simples, ou um C-3 éster com derivados de N-metil-L-alanina, em que o último é mais citotóxico que o anterior. Os análogos de maitansinoide sintéticos são descritos, por exemplo, em Kupchan et al., J. Med. Chem., 21, 31-37 (1978).

[00599] Os maitansinoides adequados para uso em ADCs da invenção podem ser isolados de fontes naturais, sinteticamente produzidos ou semissinteticamente produzidos. Além disto, o maitansinoide podem ser modificados de qualquer maneira adequada, contanto que citotoxicidade suficiente seja preservada na molécula de conjugado final. A estrutura de um maitansinoide exemplificativo, mertansina (DM1), é fornecida abaixo.



Mertansina (DM1)

[00600] Os exemplos representativos de maitansinoides incluem, porém sem limitação, DM1 (N2'-deacetil-N2'-(3-mercaptopropil)-maitansina; também denominado mertansina, maitansinoide farmacêutico 1; ImmunoGen, Inc.; consultar também Chari et al. (1992) Cancer Res 52:127), DM2, DM3 (N2'-deacetil-N2'-(4-mercaptopentil)-maitansina), DM4 (4-metil-4-mercaptopentil)-maitansina) e maitansinol (um análogo sintético de maitansinoide). Outros exemplos de maitansinoides são descritos na Patente U.S. nº 8.142.784, incorporada ao presente documento a título de referência.

[00601] As ansamitocinas são um grupo de antibióticos de maitansinoide que foram isolados de várias fontes bacterianas. Estes compostos têm atividades antitumorais potentes. Os exemplos representativos incluem, porém sem limitação, ansamitocina P1, ansamitocina P2, ansamitocina P3 e ansamitocina P4.

ALCALOIDES DE PLANTA

[00602] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar

um anticorpo a pelo menos um alcaloide de planta, por exemplo, um taxano ou vinca alcaloide. Os alcaloides de planta são tratamentos quimioterápicos derivados produzidos a partir de certos tipos de plantas. Os vinca alcaloides são produzidos a partir da vinca-de-gato (*Catharanthus rosea*), enquanto os taxanos são produzidos a partir da casca do teixo do pacífico). Tanto os vinca alcaloides quanto os taxanos são também conhecidos como agentes antimicrotúbulo e são descritos em mais detalhes abaixo.

TAXANOS

[00603] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos um taxano. O termo "taxano", conforme usado no presente documento, se refere à classe de agentes antineoplásticos que têm um mecanismo de ação de microtúbulo e que têm uma estrutura que inclui a estrutura de anel de taxano e uma cadeia lateral estereoespecífica que é necessária para atividade citostática. Está também incluída no termo "taxano" uma variedade de derivados conhecidos, incluindo tanto derivados hidrofílicos quanto derivados hidrofóbicos. Os derivados de taxano incluem, porém sem limitação, derivados de galactose e manose descritos no Pedido de Patente Internacional nº WO 99/18113; piperazino e outros derivados descritos no documento nº WO 99/14209; derivados de taxano descritos nos documentos nºs WO 99/09021, WO 98/22451 e Patente U.S. nº 5.869.680; derivados de 6-tio descritos no documento nº WO 98/28288; derivados de sulfenamida descritos na Patente U.S. nº 5.821.263; e derivado de taxol descrito na Patente U.S. nº 5.415.869, cada uma das quais está incorporada ao presente documento a título de referência. Os compostos de taxano foram também anteriormente descritos nas Patentes U.S. nºs 5.641.803, 5.665.671, 5.380.751, 5.728.687, 5.415.869, 5.407.683, 5.399.363, 5.424.073, 5.157.049, 5.773.464, 5.821.263, 5.840.929, 4.814.470, 5.438.072, 5.403.858, 4.960.790, 5.433.364,

4.942.184, 5.362.831, 5.705.503 e 5.278.324, todas as quais estão expressamente incorporadas a título de referência. Outros exemplos de taxanos incluem, porém sem limitação, docetaxel (Taxotere®; Sanofi Aventis), paclitaxel (Abraxane® ou Taxol®; Abraxis Oncology) e paclitaxel em nanopartícula (ABI-007/Abraxene®; Abraxis Bioscience).

[00604] Em uma modalidade, os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos um docetaxel. Em uma modalidade, os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos um paclitaxel.

VINCA ALCALOIDES

[00605] Em uma modalidade, os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos um vinca alcaloide. Vinca alcaloides são uma classe de fármacos específicos para ciclo celular que funcionam inibindo a capacidade das células cancerosas de se dividir atuando sobre a tubulina e impedindo a formação de microtúbulos. Os exemplos de vinca alcaloides que podem ser usados nos ADCs da invenção incluem, porém sem limitação, sulfato de vindesina, vincristina, vinblastina e vinorelbina.

ANTIBIÓTICOS ANTITUMORAIS

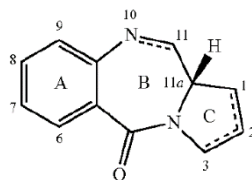
[00606] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a um ou mais antibióticos antitumorais para o tratamento de câncer. Conforme usado no presente documento, o termo "antibiótico antitumoral" significa um fármaco antineoplástico que bloqueia o crescimento celular por interferência no DNA e é produzido a partir de um micro-organismo. Frequentemente, os antibióticos antitumorais quebram as fitas de DNA ou retardam ou interrompem a síntese de DNA. Os exemplos de antibióticos antitumorais que podem estar incluídos nos ADCs divulgados no presente documento incluem, porém sem limitação, actinomicinas (por exemplo, pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepinas), antraciclinas, caliqueamicinas e duocarmicinas, descritas em

mais detalhes abaixo.

ACTINOMICINAS

[00607] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos uma actinomicina. As actinomicinas são uma subclasse de antibióticos antitumorais isolados de bactérias do gênero *Streptomyces*. Os exemplos representativos de actinomicinas incluem, porém sem limitação, actinomicina D (Cosmegen [também conhecido como actinomicina, dactinomicina, actinomicina IV, actinomicina C1], Lundbeck, Inc.), antramicina, quicamicina A, DC-81, mazedramicina, neotramicina A, neotramicina B, porotramicina, protractarcina B, SG2285, sibanicina, sibiromicina e tomamicina. Em uma modalidade, D é pirrolobenzodiazepina (PBD). Os exemplos de PBDs incluem, porém sem limitação, antramicina, quicamicina A, DC-81, mazedramicina, neotramicina A, neotramicina B, porotramicina, protractarcina B, SG2000 (SJG-136), SG2202 (ZC-207), SG2285 (ZC-423), sibanicina, sibiromicina e tomamicina. Assim, em uma modalidade, D é actinomicina, por exemplo, actinomicina D, ou PBD, por exemplo, um dímero de pirrolobenzodiazepina (PBD).

[00608] As estruturas de PBDs podem ser encontradas, por exemplo, nas Publicações de Pedido de Patente U.S. nºs 2013/0028917 e 2013/0028919 e no documento nº WO 2011/130598 A1, cada um dos quais estão incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade. A estrutura genérica de uma PBD é fornecida abaixo.



[00609] As PBDs diferem no número, tipo e posição de substituintes, em ambos seus anéis A aromáticos e anéis C pirrolo, e no grau de saturação do anel C. No anel B, há, de modo geral, 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 pelo DNA alquilante. Todos os produtos naturais conhecidos têm uma configuração (S) na posição C11 α quiral que fornece aos mesmos uma torção à direita quando vistos a partir do anel C em direção ao anel A. Outros exemplos de PBDs que podem ser conjugados a anticorpos através dos ligantes divulgados no presente documento podem ser encontrados, por exemplo, nas Publicações de Pedido de Patente U.S. nºs 2013/0028917 A1 e 2013/0028919 A1, na Patente U.S. nº 7.741.319 B2 e nos documentos nºs WO 2011/130598 A1 e WO 2006/111759 A1, cada um dos quais está incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

ANTRACICLINAS

[00610] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos uma antraciclina. As antraciclinas são uma subclasse de antibióticos antitumorais isolados de bactérias do gênero *Streptomyces*. Os exemplos representativos incluem, porém sem limitação, daunorubicina (Cerubidina, Bedford Laboratories), doxorubicina (Adriamicina, Bedford Laboratories; também denominada cloridrato de doxorubicina, hidroxidaunorubicina e Rubex), epirubicina (Ellence, Pfizer) e idarubicina (Idamicina; Pfizer Inc.). Assim, em uma modalidade, D é antraciclina, por exemplo, doxorubicina.

CALIQUEAMICINAS

[00611] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos uma caliqueamicina. As caliqueamicinas são uma família de antibióticos de enediína derivados do organismo do solo *Micromonospora echinospora*. As caliqueamicinas se ligam ao sulco menor do DNA e induzem quebras de DNA de fita dupla, resultando em morte celular com um aumento de 100 vezes em relação a outros quimioterápicos (Damle et al. (2003) *Curr Opin Pharmacol*

3:386). A preparação de caliqueamicinas que podem ser usadas como conjugados de fármaco na invenção foi descrita, consultar as Patentes U.S. nºs 5.712.374; 5.714.586; 5.739.116; 5.767.285; 5.770.701; 5.770.710; 5.773.001; e 5.877.296. Os análogos estruturais de caliqueamicina que podem ser usados incluem, porém sem limitação, γ 1 I, α 2 I, α 3 I, N-acetil- γ 1 I, PSAG e θ 1 I (Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998) e as Patente U.S. anteriormente mencionadas nºs 5.712.374; 5.714.586; 5.739.116; 5.767.285; 5.770.701; 5.770.710; 5.773.001; e 5.877.296. Assim, em uma modalidade, D é caliqueamicina.

DUOCARMICINAS

[00612] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos uma duocarmicina. As duocarmicinas são uma subclasse de antibióticos antitumorais isolados de bactérias do gênero *Streptomyces*. (consultar Nagamura e Saito (1998) Chemistry of Heterocyclic compostos, Volume 34, nº 12). As duocarmicinas se ligam ao sulco menor do DNA e alquilam a nucleobase adenina na posição N3 (Boger (1993) Pure and Appl Chem 65(6):1123; e Boger e Johnson (1995) PNAS USA 92:3642). Os análogos sintéticos de duocarmicinas incluem, porém sem limitação, adozelesina, bizelesina e carzelesina. Assim, em uma modalidade, o D é duocarmicina.

OUTROS ANTIBIÓTICOS ANTITUMORAIS

[00613] Adicionalmente ao anterior, os antibióticos antitumorais adicionais que podem ser usados nos ADCs da invenção incluem bleomicina (Blenoxano, Bristol-Myers Squibb), mitomicina e plicamicina (também conhecida como mitramicina).

AGENTES DE IMUNOMODULAÇÃO

[00614] Em algumas modalidades, os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos um agente de imunomodulação. Conforme usado no presente documento, o termo

"agente de imunomodulação" se refere a um agente que pode estimular ou modificar uma resposta imunológica. Em uma modalidade, um agente de imunomodulação é um imunoestimulador que aumenta a resposta imunológica de um indivíduo. Em algumas modalidades, um agente de imunomodulação é um imunossupressor, que impede ou diminui a resposta imunológica do indivíduo. Um agente de imunomodulação pode modular células mieloides (monócitos, macrófagos, células dendríticas, megacariócitos e granulócitos) ou células linfoides (células T, células B e células exterminadoras naturais (NK)) e qualquer outra célula diferenciada das mesmas. Os exemplos representativos incluem, porém sem limitação, bacillus calmette-guerin (BCG) e levamisol (Ergamisol). Outros exemplos de agentes de imunomodulação que podem ser usados nos ADCs da invenção incluem, porém sem limitação, vacinas contra câncer, citocinas e terapia gênica de imunomodulação.

VACINAS CONTRA CÂNCER

[00615] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a uma vacina contra câncer. Conforme usado no presente documento, o termo "vacina contra câncer" se refere a uma composição (por exemplo, um antígeno tumoral e uma citocina) que elicitava uma resposta imunológica específica para tumor. A resposta é elicitada a partir do próprio sistema imunológico do indivíduo por administração da vacina contra câncer ou, no caso da presente invenção, administração de um ADC que compreende um anticorpo e uma vacina contra câncer. Nas modalidades preferenciais, a resposta imunológica resulta na erradicação de células tumorais no corpo (por exemplo, células tumorais primárias ou metastáticas). O uso de vacinas contra câncer envolve, de modo geral, a administração de um antígeno particular ou grupo de antígenos que estão, por exemplo, presentes na superfície de uma célula cancerosa particular ou presentes na superfície

de um agente infeccioso particular que mostrou facilitar a formação de câncer. Em algumas modalidades, o uso de vacinas contra câncer é para propósitos profiláticos, enquanto, em outras modalidades, o uso é para propósitos terapêuticos. Os exemplos não limitantes de vacinas contra câncer que podem ser usadas nos ADCs divulgados no presente documento incluem vacina contra papilomavírus bivalente recombinante (HPV) tipos 16 e 18 (Cervarix, GlaxoSmithKline), vacina contra papilomavírus quadrivalente recombinante (HPV) tipos 6, 11, 16, e 18 (Gardasil, Merck & Company) e sipuleucel-T (Provenge, Dendreon). Assim, em uma modalidade, D é uma vacina contra câncer que é um imunostimulador ou é um imunossupressor.

CITOCINAS

[00616] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos uma citocina. O termo "citocina", de modo geral, se refere a proteínas liberadas por uma população de células que atuam sobre outra célula como mediadores intercelulares. As citocinas estimulam diretamente as células efetoras imunes e as células estromais no sítio tumoral e intensificam o reconhecimento de célula tumoral por células efetoras citotóxicas (Lee e Margolin (2011) *Cancers* 3:3856). Inúmeros estudos de modelo tumoral em animais demonstraram que as citocinas têm ampla atividade antitumoral e isto foi traduzido em diversas abordagens à base de citocina para terapia contra câncer (Lee e Margoli, *supra*). Recentemente diversas citocinas, incluindo GM-CSF, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18 e IL-21, entraram em testes clínicos para pacientes com câncer avançado (Lee e Margoli, *supra*).

[00617] Os exemplos de citocinas que podem ser usadas nos ADCs da invenção incluem, porém sem limitação, hormônio da paratireoide; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormônios de glicoproteína, tal como hormônio estimulante de folículo (FSH), hormônio estimulante da tireoide (TSH) e hormônio luteinizante (LH); fator de

crescimento hepático; fator de crescimento de fibroblasto; prolactina; lactogênio placentar; fator de necrose tumoral; substância inibidora mulleriana; peptídeo associado a gonadotropina de camundongo; inhibina; activina; fator de crescimento endotelial vascular; integrina; trombopoietina (TPO); fatores de crescimento de nervo, tal como NGF; fator de crescimento de plaqueta; fatores de crescimento transformante (TGFs); fator de crescimento semelhante a insulina I e II; eritropoietina (EPO); fatores osteoindutivos; interferons, tal como interferon α , β e γ , fatores estimulantes de colônia (CSFs); granulócito-macrófago-CSF (GM-CSF); e granulócito-CSF (G-CSF); interleucinas (ILs), tal como IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; fator de necrose tumoral; e outros fatores de polipeptídeo, incluindo LIF e ligante kit (KL). Conforme usado no presente documento, o termo "citocina" inclui proteínas de fontes naturais ou de cultura celular recombinante e equivalentes biologicamente ativos das citocinas de sequência nativa. Assim, em uma modalidade, D é uma citocina.

FATORES ESTIMULANTES DE COLÔNIA (CSFs)

[00618] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos um fator estimulante de colônia (CSF). Os fatores estimulantes de colônia (CSFs) são fatores de crescimento que auxiliam a medula óssea a produzir glóbulos vermelhos. Devido ao fato de que alguns tratamentos contra câncer (por exemplo, quimioterapia) podem afetar os glóbulos brancos (que ajudam a combater infecções), fatores estimulantes de colônia podem ser introduzidos para ajudar a suportar os níveis de glóbulos brancos e reforçar o sistema imunológico. Os fatores estimulantes de colônia podem ser também usados após um transplante de medula óssea para ajudar a nova medula a começar a produzir glóbulos brancos. Os exemplos representativos de CSFs que podem ser usados em ADCs divulgados no presente documento incluem, porém sem limitação, eritropoietina (Epoetins),

filgrastim (Neopogen (também conhecido como fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF); Amgen, Inc.), sargramostim (leucina (fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos e GM-CSF); Genzyme Corporation), promegapoiatina e Oprelvekin (IL-11 recombinante; Pfizer, Inc.). Assim, em uma modalidade, D é um CSF.

TERAPIA GÊNICA

[00619] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos um ácido nucleico (direta ou indiretamente através de um veículo) para terapia gênica. A terapia gênica, de modo geral, se refere à introdução de material genético em uma célula, de modo que o material genético seja projetado para tratar uma doença. No que se refere aos agentes imunomoduladores, a terapia gênica é usada para estimular uma capacidade natural do indivíduo para inibir a proliferação de células cancerosas ou exterminar células cancerosas. Em uma modalidade, o ADC da invenção compreende um ácido nucleico que codifica um gene terapêutico funcional, que é usado para substituir um gene com mutação ou disfuncional de outro modo (por exemplo, truncado) associado a câncer. Em outras modalidades, o ADC da invenção compreende um ácido nucleico que codifica ou fornece de outro modo a produção de uma proteína terapêutica para tratar câncer. O ácido nucleico que codifica o gene terapêutico pode ser diretamente conjugado ao anticorpo ou, alternativamente, pode ser conjugado ao anticorpo através de um veículo. Os exemplos de veículos que podem ser usados para distribuir um ácido nucleico para terapia gênica incluem, porém sem limitação, vetores virais ou lipossomos.

AGENTES ALQUILANTES

[00620] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a um ou mais agentes alquilantes. Os agentes alquilantes são uma classe de compostos antineoplásticos que liga um grupo alquila a DNA. Os exemplos de agentes alquilantes que podem ser

usados nos ADCs da invenção incluem, porém sem limitação, sulfonatos de alquila, etileniminas, derivados de metilamina, epóxidos, mostardas de nitrogênio, nitrosoureias, triazinas e hidrazinas.

SULFONATOS DE ALQUILA

[00621] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos um sulfonato de alquila. Os sulfonatos de alquila são uma subclasse de agentes alquilantes com uma fórmula geral: $R-SO_2-O-R^1$, em que R e R^1 são tipicamente grupos alquila ou arila. Um exemplo representativo de um sulfonato de alquila é busulfano (Myleran[®], GlaxoSmithKline; Busulfex IV[®], PDL BioPharma, Inc.).

MOSTARDAS DE NITROGÊNIO

[00622] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos uma mostarda de nitrogênio. Os exemplos representativos desta subclasse de compostos anticâncer incluem, porém sem limitação, clorambucila (Leukeran[®], GlaxoSmithKline), ciclofosfamida (Cytoxan[®], Bristol-Myers Squibb; Neosar, Pfizer, Inc.), estramustina (fosfato sódico de estramustina ou Estracyt[®], Pfizer, Inc.), ifosfamida (Ifex[®], Bristol-Myers Squibb), mecloretamina (Mustargen[®], Lundbeck Inc.), e melfalano (Alkeran[®] ou L-Pam[®] ou mostarda de fenilalanina; GlaxoSmithKline).

NITROSOREIAS

[00623] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos uma nitrosoureia. As nitrosoureias são uma subclasse de agentes alquilantes que são solúveis em lipídio. Os exemplos representativos incluem, porém sem limitação, carmustina (BCNU [também conhecido como BiCNU, N,N-bis(2-cloroetil)-N-nitrosoureia ou 1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosoureia], Bristol-Myers Squibb), fotemustina (também conhecido como Muphoran[®]), lomustina (CCNU ou 1-(2-cloro-etil)-3-ciclo-hexil-1-nitrosoureia, Bristol-Myers

Squibb), nimustina (também conhecido como ACNU) e estreptozocina (Zanosar[®], Teva Pharmaceuticals).

TRIAZINAS E HIDRAZINAS

[00624] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos uma triazina ou hidrazina. As triazinas e hidrazinas são uma subclasse de agentes alquilantes contendo nitrogênio. Em algumas modalidades, estes compostos se decompõem espontaneamente ou podem ser metabolizados para produzir intermediários de alquil diazônio que facilitam a transferência de um grupo alquila a ácidos nucleicos, peptídeos e/ou polipeptídeos, causando, assim, efeitos mutagênico, carcinogênicos ou citotóxicos. Os exemplos representativos incluem, porém sem limitação dacarbazina (DTIC-Dome, Bayer Healthcare Pharmaceuticals Inc.), procarbazina (Mutalane[®], Sigma-Tau Pharmaceuticals, Inc.) e temozolomida (Temodar[®], Schering Plough).

OUTROS AGENTES ALQUILANTES

[00625] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos uma etilenimina, derivado de metilamina ou epóxido. As etileniminas são uma subclasse de agentes alquilantes que tipicamente contêm pelo menos um anel aziridina. Os epóxidos representam uma subclasse de agentes alquilantes que são caracterizados como éteres cíclicos com apenas três átomos de anel.

[00626] Os exemplos representativos de etileniminas incluem, porém sem limitação tiopeta (Thioplex, Amgen), diaziquona (também conhecida como aziridinil benzoquinona (AZQ)) e mitomicina C. A mitomicina C é um produto natural que contém um anel aziridina e parece induzir a citotoxicidade através de reticulação de DNA (Dorr R T, et al. Cancer Res. 1985; 45:3510; Kennedy K A, et al Cancer Res. 1985; 45:3541). Os exemplos representativos de derivados de metilamina e seus análogos incluem, porém sem limitação, altretamina (Hexalen,

MGI Pharma, Inc.), que é também conhecida como hexametilamina e hexastato. Os exemplos representativos de epóxidos desta classe de composto anticâncer incluem, porém sem limitação, dianidrogallactitol. O dianidrogallactitol(1,2:5,6-dianidroglucitol) está quimicamente relacionado às aziridinas e, de modo geral, facilita a transferência de um grupo alquila através de um mecanismo similar, conforme descrito acima. O dibromoglucitol é hidrolisado em dianidrogallactitol e, assim, é um pró-fármaco para um epóxido (Sellei C, et al. Cancer Chemother Rep. 1969; 53:377).

AGENTES ANTIANGIOGÊNICOS

[00627] Em algumas modalidades, os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos um agente anti-angiogênico. Os antiangiogênicos inibem o crescimento de novos vasos sanguíneos. Os antiangiogênicos exercem seus efeitos de uma variedade de formas. Em algumas modalidades, estes agentes interferem na capacidade de um fator de crescimento de atingir seu alvo. Por exemplo, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é uma das proteínas primárias envolvidas no início da angiogênese por ligação a receptores particulares em uma superfície celular. Assim, certos anti-angiogênicos, que impedem a interação de VEGF com seu receptor cognato, impedem que VEGF inicie a angiogênese. Em outras modalidades, estes agentes interferem nas cascatas de sinalização intracelular. Por exemplo, um receptor particular em uma superfície celular foi desencadeado, uma cascata de outros sinais químicos é iniciada para promover o crescimento de vasos sanguíneos. Assim, certas enzimas, por exemplo, algumas tirosina quinases, que são conhecidas por facilitar as cascatas de sinalização intracelular que contribuem para, por exemplo, proliferação celular, são alvos para tratamento de câncer. Em outras modalidades, estes agentes interferem nas cascatas de sinalização intercelular. Ainda assim, em outras modalidades, estes

agentes desabilitam alvos específicos que ativam e promovem o crescimento celular ou interferem diretamente no crescimento de vasos sanguíneos. As propriedades inibidoras de angiogênese foram descobertas em mais de 300 substâncias com inúmeros efeitos inibidores diretos e indiretos.

[00628] Os exemplos representativos de agentes anticariogênicos que podem ser usados nos ADCs da invenção incluem, porém sem limitação, angiostatina, ABX EGF, C1-1033, PKI-166, vacina EGF, EKB-569, GW2016, ICR-62, EMD 55900, CP358, PD153035, AG1478, IMC-C225 (Erbix, ZD1839 (Iressa), OSI-774, Erlotinib (tarceva), angiostatina, arrestina, endostatina, BAY 12-9566 e com fluorouracila ou doxorubicina, canstatina, carboxiamidotriazol e com paclitaxel, EMD121974, S-24, vitaxina, dimetilxantenona, ácido acético, IM862, Interleucina-12, Interleucina-2, NM-3, HuMV833, PTK787, RhuMab, angiozima (ribozima), IMC-1C11, Neovastat, marimstat, prinomastat, BMS-275291, COL-3, MM1270, SU101, SU6668, SU11248, SU5416, com paclitaxel, com gencitabina e cisplatina e com irinotecano e cisplatina e com radiação, tecogalano, temozolomida e PEG interferon $\alpha 2b$, tetratiomolibdato, TNP-470, talidomida, CC-5013 e com taxotero, tumstatina, 2-metoxiestradiol, aprisionamento de VEGF, inibidores de mTOR (deforolimo, everolimo (Afinitor, Novartis Pharmaceutical Corporation) e temsirolimo (Torisel, Pfizer, Inc.)), inibidores de tirosinase quinase (por exemplo, erlotinibe (Tarceva, Genentech, Inc.), imatinibe (Gleevec, Novartis Pharmaceutical Corporation), gefitinibe (Iressa, AstraZeneca Pharmaceuticals), dasatinibe (Sprycel, Bristol-Myers Squibb), sunitinibe (Sutent, Pfizer, Inc.), nilotinibe (Tasigna, Novartis Pharmaceutical Corporation), lapatinibe (Tykerb, GlaxoSmithKline Pharmaceuticals), sorafenibe (Nexavar, Bayer e Onyx), fosfoinositídeo 3-quinases (PI3K).

ANTIMETABÓLITOS

[00629] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos uma antimetabólito. Os antimetabólitos são tipos de tratamentos quimioterápicos que são muito similares a substâncias normais dentro da célula. Quando as células incorporam um antimetabólito no metabolismo celular, o resultado é negativo para a célula, por exemplo, a célula é incapaz de se dividir. Os antimetabólitos são classificados de acordo com as substâncias com as quais interferem. Os exemplos de antimetabólitos que podem ser usados nos ADCs da invenção incluem, porém sem limitação, um antagonista de ácido fólico (por exemplo, metotrexato), um antagonista de pirimidina (por exemplo, 5-Fluorouracila, Foxuridina, Citarabina, Capecitabina e Gencitabina), um antagonista de purina (por exemplo, 6-Mercaptopurina e 6-Tioguanina) e um inibidor de adenosina desaminase (por exemplo, Cladribina, Fludarabina, Nelarabina e Pentostatina), conforme descrito em mais detalhes abaixo.

ANTIFOLATOS

[00630] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos uma antifolato. Os antifolatos são uma subclasse de antimetabólitos que são estruturalmente similares a folato. Os exemplos representativos incluem, porém sem limitação, metotrexato, ácido 4-amino-fólico (também conhecido como aminopterina e ácido 4-aminopteroico), lometrexol (LMTX), pemetrexed (Alimpta, Eli Lilly and Company) e trimetrexato (Neutrexin, Ben Venue Laboratories, Inc.)

ANTAGONISTAS DE PURINA

[00631] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos um antagonista de purina. Os análogos de purina são uma subclasse de antimetabólitos que são estruturalmente similares ao grupo de compostos conhecidos como purinas. Os exemplos representativos de antagonistas de purina incluem, porém sem

limitação, azatioprina (Azasan, Salix; Imuran, GlaxoSmithKline), cladribina (Leustatin [also known as 2-CdA], Janssen Biotech, Inc.), mercaptopurina (Purineto [também conhecido como 6-mercaptopetanol], GlaxoSmithKline), fludarabina (Fludara, Genzyme Corporation), pentostatina (Nipent, também conhecido como 2'-desoxicoformicina (DCF)), 6-tioguanina (Lanvis [também conhecido como tioguanina], GlaxoSmithKline).

ANTAGONISTAS DE PIRIMIDINA

[00632] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos um antagonista de pirimidina. Os antagonistas de pirimidina são uma subclasse de antimetabólitos que são estruturalmente similares ao grupo de compostos conhecidos como purinas. Os exemplos representativos de antagonistas de pirimidina incluem, porém sem limitação, azacitidina (Vidaza, Celgene Corporation), capecitabina (Xeloda, Roche Laboratories), Citarabina (também conhecido como citosina arabinosídeo e arabinosilcitosina, Bedford Laboratories), decitabina (Dacogen, Eisai Pharmaceuticals), 5-fluorouracila (Acrucil, Teva Pharmaceuticals; Efudex, Valeant Pharmaceuticals, Inc), 5'-fosfato de 5-fluoro-2'-desoxiuridina (FdUMP), trifosfato de 5-fluorouridina e gencitabina (Gemzar, Eli Lilly and Company).

AGENTES CONTENDO BORO

[00633] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos um agente contendo boro. Os agentes contendo boro compreendem uma classe de compostos terapêuticos contra câncer que interferem na proliferação celular. Os exemplos representativos de agentes contendo boro incluem, porém sem limitação, boroficina e bortezomibe (Velcade, Millenium Pharmaceuticals).

AGENTES QUIMIOPROTETORES

[00634] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos um agente quimioprotetor. Os fármacos

quimioprotetores são uma classe de compostos, que ajudam a proteger o corpo contra efeitos tóxicos específicos da quimioterapia. Os fármacos quimioprotetores podem ser administrados com várias quimioterapias a fim de proteger células saudáveis contra efeitos tóxicos de fármacos quimioterápicos, enquanto simultaneamente permitem que as células cancerosas sejam tratadas com o agente quimioterápico administrado. Os fármacos quimioprotetores representativos incluem, porém sem limitação, amifostina (Ethyol, Medimmune, Inc.), que é usada para reduzir a toxicidade renal associada a doses cumulativas de cisplatina, dexrazoxana (Totect, Apricus Pharma; Zinecard), para o tratamento de extravasação causada pela administração de antraciclina (Totect) e para o tratamento de complicações relacionadas ao coração causadas pela administração do antibiótico antitumoral doxorubicina (Zinecard), e mesna (Mesnex, Bristol-Myers Squibb), que é usada para prevenir a cistite hemorrágica durante o tratamento quimioterápico com ifosfamida.

AGENTES HORMONAIS

[00635] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos um agente hormonal. Um agente hormonal (incluindo hormônios sintéticos) é um composto que interfere na produção ou atividade de hormônios endogenamente produzidos do sistema endócrino. Em algumas modalidades, estes compostos interferem na proliferação celular ou produzem um efeito citotóxico. Os exemplos não limitantes incluem androgênios, estrogênios, acetato de medroxiprogesterona (Provera, Pfizer, Inc.) e progestinas.

AGENTES ANTI-HORMONAIS

[00636] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos um agente anti-hormonais. Um agente "anti-hormonal" é um agente que suprime a produção e/ou impede a função de certos hormônios endógenos. Em uma modalidade, o agente

anti-hormonal interfere na atividade de um hormônio selecionado a partir do grupo que compreende androgênios, estrogênios, progesterona e hormônio de liberação de goanadotropina, interferindo, assim, o crescimento de várias células cancerosas. Os exemplos representativos de agentes anti-hormonais incluem, porém sem limitação, aminoglutetimida, anastrozol (Arimidex, AstraZeneca Pharmaceuticals), bicalutamida (Casodex, AstraZeneca Pharmaceuticals), acetato de ciproterona (Cyprostat, Bayer PLC), degarelix (Firmagon, Ferring Pharmaceuticals), exemestano (Aromasin, Pfizer Inc.), flutamida (Drogenil, Schering-Plough Ltd), fulvestrant (Faslodex, AstraZeneca Pharmaceuticals), goserelina (Zolodex, AstraZeneca Pharmaceuticals), letrozol (Femara, Novartis Pharmaceuticals Corporation), leuprolida (Prostap), lupron, acetato de medroxiprogesterona (Provera, Pfizer Inc.), acetato de megestrol (Megace, Bristol-Myers Squibb Company), tamoxifeno (Nolvadex, AstraZeneca Pharmaceuticals) e triptorelina (Decapetyl, Ferring).

CORTICOSTEROIDES

[00637] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos um corticosteroide. Os corticosteroides podem ser usados nos ADCs da invenção para diminuir inflamação. Um exemplo de um corticosteroide inclui, porém sem limitação, um glicocorticoide, por exemplo, prednisona (Deltasone, Pharmacia & Upjohn Company, uma divisão da Pfizer, Inc.).

AGENTES TERAPÊUTICOS FOTOATIVOS

[00638] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos um agente terapêutico fotoativo. Os agentes terapêuticos fotoativos incluem compostos que podem ser empregados para exterminar células tratadas mediante exposição a radiação eletromagnética de um comprimento de onda particular. Os compostos terapeuticamente relevantes absorvem a radiação eletromagnética em comprimentos de onda que penetram tecido. Em modalidades prefe-

renciais, o composto é administrado em uma forma não tóxica que é capaz de produzir um efeito fotoquímico que é tóxico a células ou tecido mediante ativação suficiente. Em outras modalidades preferenciais, estes compostos são retidos por tecido canceroso e são prontamente liberados de tecidos normais. Os exemplos não limitantes incluem vários cromogênios e corantes.

OLIGONUCLEOTÍDEOS

[00639] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos um oligonucleotídeo. Os oligonucleotídeos são constituídos por cadeias de ácido nucleico curtas que funcionam interferindo no processamento de informações genéticas. Em algumas modalidades, os oligonucleotídeos para uso em ADCs são moléculas de DNA ou RNA de fita simples e/ou de fita dupla, enquanto, em outras modalidades, estes oligonucleotídeos terapêuticos são moléculas de DNA ou RNA de fita simples e/ou de fita dupla quimicamente modificadas. Em uma modalidade, os oligonucleotídeos usados nos ADCs são relativamente curtos (19 a 25 nucleotídeos) e se hibridizam a uma sequência de ácidos nucleicos exclusiva no agrupamento total de alvos de ácido nucleico presentes nas células. Algumas das tecnologias de oligonucleotídeo importantes incluem os oligonucleotídeos antissenso (incluindo interferência de RNA (RNAi)), aptâmeros, oligonucleotídeos CpG e ribozimas.

OLIGONUCLEOTÍDEOS ANTISSENSENTO

[00640] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos um oligonucleotídeo antissenso. Os oligonucleotídeos antissenso são projetados para ligação a RNA através de hibridização de Watson-Crick. Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo antissenso é complementar a um nucleotídeo que codifica uma região, domínio, porção ou segmento do anticorpo conjugado. Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo antissenso compreende de

cerca de 5 a cerca de 100 nucleotídeos, de cerca de 10 a cerca de 50 nucleotídeos, de cerca de 12 a cerca de 35 e de cerca de 18 a cerca de 25 nucleotídeos

[00641] Há múltiplos mecanismos que podem ser explorados para inibir a função do RNA uma vez que o oligonucleotídeo se ligue ao RNA alvo (Crooke ST. (1999). *Biochim. Biophys. Acta*, 1489, 30-42). O mecanismo antissenso melhor caracterizado resulta em clivagem do RNA alvejado por nucleases celulares endógenas, tal como RNase H ou a nuclease associada ao mecanismo de interferência de RNA. Entretanto, os oligonucleotídeos que inibem a expressão do gene-alvo por mecanismos não catalíticos, tal como modulação de splicing ou parada de tradução, podem ser também moduladores potentes e seletivos da função de gene.

[00642] Outro mecanismo antissenso dependente de RNase que recebeu recentemente muita atenção é RNAi (Fire et al. (1998). *Nature*, 391, 806-811; Zamore PD. (2002). *Science*, 296, 1265-1269.). A interferência de RNA (RNAi) é um processo pós-transcricional em que um RNA de fita dupla inibe a expressão gênica de uma forma específica para sequência. Em algumas modalidades, O efeito de RNAi é atingido através da introdução de RNA de fita dupla relativamente mais longo (dsRNA), enquanto, em modalidades preferenciais, este efeito de RNAi é atingido pela introdução de RNAs de fita dupla mais curtos, por exemplo, RNA interferente pequeno (siRNA) e/ou microRNA (miRNA). Em ainda outra modalidade, o RNAi pode ser também atingido por introdução de plasmídeo que gera dsRNA complementar ao gene-alvo. Em cada uma das modalidades anteriores, o RNA de fita dupla é projetado para interferir na expressão gênica de uma sequência-alvo particular dentro das células. De modo geral, o mecanismo envolve a conversão de dsRNA em RNAs curtos que direcionam ribonucleases a alvos de mRNA homólogos (sumarizados, Ruvkun, *Science* 2294:797

(2001)), que, então, degradam o mRNA endógeno correspondente, resultando, assim, na modulação da expressão gênica. Notavelmente, foi relatado que dsRNA tem propriedades antiproliferativas, o que torna possível também visar aplicações terapêuticas (Aubel et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 88:906 (1991)). Por exemplo, o dsRNA sintético mostrou inibir o crescimento tumoral em camundongos (Levy et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 62:357-361 (1969)), é ativo no tratamento de camundongos com leucemia (Zelevnick et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 130:126-128 (1969)) e inibe tumorigênese quimicamente induzida na pele de camundongo (Gelboin et al., Science 167:205-207 (1970)). Assim, em modalidades preferenciais, a invenção fornece o uso de oligonucleotídeos antissenso em ADCs para o tratamento de câncer de mama. Em outras modalidades, a invenção fornece composições e métodos para iniciar o tratamento com oligonucleotídeo antissenso, em que o dsRNA interfere na expressão de célula-alvo de EGFR no nível de mRNA. dsRNA, conforme usado acima, se refere a RNA de ocorrência natural, RNA parcialmente purificado, RNA recombinantemente produzido, RNA sintético, assim como RNA alterado que difere de RNA de ocorrência natural pela inclusão de nucleotídeos não padrão, material não nucleotídeo, análogos de nucleotídeo (por exemplo, ácido nucleico bloqueado (LNA)), desoxirribonucleotídeos e qualquer combinação dos mesmos. O RNA da invenção precisa apenas ser suficientemente similar a RNA natural que tenha a capacidade de mediar a modulação à base de oligonucleotídeo antissenso descrita no presente documento.

APTÂMEROS

[00643] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos um aptâmero. Um aptâmero é uma molécula de ácido nucleico que foi selecionada dentre agrupamentos aleatórios com base em sua capacidade de se ligar a outras moléculas.

Como anticorpos, os aptâmeros podem se ligar a moléculas-alvo com afinidade e especificidade extraordinárias. Em muitas modalidades, os aptâmeros assumem formatos complexos, dependentes de sequência, tridimensionais que permitem que os mesmos interajam com uma proteína-alvo, resultando em um análogo complexo firmemente ligado a uma interação anticorpo-antígeno, interferindo, assim, na função da dita proteína. A capacidade particular de aptâmeros se ligarem de modo firme e específico a sua proteína-alvo acentua seu potencial como terapias moleculares alvejadas.

Oligonucleotídeos CpG

[00644] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos um oligonucleotídeo CpG. DNA bacteriano e viral são conhecidos por serem ativadores fortes da imunidade tanto inata quanto específica em seres humanos. Estas características imunológicas foram associadas a motivos de dinucleotídeo CpG não metilados encontrados em DNA bacteriano. Devido ao fato de que estes motivos são raros em seres humanos, o sistema imunológico humano envolveu a capacidade de reconhecer estes motivos como uma indicação precoce de infecção e subsequentemente iniciar respostas imunológicas. Portanto, os oligonucleotídeos contendo este motivo CpG podem ser explorados para iniciar uma resposta imunológica antitumoral.

RIBOZIMAS

[00645] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos uma ribozima. As ribozimas são moléculas de RNA catalíticas que variam de cerca de 40 a 155 nucleotídeos de comprimento. A capacidade das ribozimas de reconhecer e cortar moléculas de RNA específicas torna as mesmas candidatos potenciais para agentes terapêuticos. Um exemplo representativo inclui angiozima.

AGENTES DE RADIONUCLÍDEO (ISÓTOPOS RADIOATIVOS)

[00646] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos um agente de radionuclídeo. Os agentes de radionuclídeo compreendem agentes que são caracterizados por um núcleo instável que é capaz de ser submetido a decaimento radioativo. A base para tratamento com radionuclídeo bem-sucedido depende de concentração suficiente e retenção prolongada do radionuclídeo pela célula cancerosa. Outros fatores a serem considerados incluem a meia-vida de radionuclídeo, a energia das partículas emitidas e a faixa máxima que a partícula emitida pode percorrer. Em modalidades preferenciais, o agente terapêutico é um radionuclídeo selecionado a partir do grupo que consiste em ^{111}In , ^{177}Lu , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{211}At , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{33}P , ^{47}Sc , ^{111}Ag , ^{67}Ga , ^{142}Pr , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{212}Pb , ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{77}As , ^{89}Sr , ^{99}Mo , ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{143}Pr , ^{149}Pm , ^{169}Er , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au e ^{211}Pb . São também preferenciais radionuclídeos que decaem substancialmente com partículas emissoras de Auger. Por exemplo, Co-58 , Ga-67 , Br-80m , Tc-99m , Rh-103m , Pt-109 , In-111 1 , Sb-119 , $^{1-125}$, Ho-161 , Os-189m e Ir-192 . As energias de decaimento de nuclídeos emissores de partícula beta úteis são, de preferência, Dy-152 , At-211 , Bi-212 , Ra-223 , Rn-219 , Po-215 , Bi-21 1 , Ac-225 , Fr-221 , At-217 , Bi-213 e Fm-255 . As energias de decaimento de radionuclídeos emissores de partícula alfa úteis são, de preferência, 2000 a 10000 keV, mais preferencialmente, 3000 a 8,000 keV e, com máxima preferência, 4000 a 7000 keV. Os radioisótopos potenciais adicionais de uso incluem ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{75}Br , ^{198}Au , ^{95}Ru , ^{97}Ru , ^{103}Ru , ^{105}Ru , ^{107}Hg , ^{203}Hg , ^{121}mTe , ^{122}mTe , ^{125}mTe , ^{165}Tm , ^{167}Tm , ^{168}Tm , ^{197}Pt , ^{109}Pd , ^{105}Rh , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{166}Ho , ^{199}Au , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{51}Cr , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{201}Tl , ^{225}Ac , ^{76}Br , ^{169}Yb e similares.

RADIOSENSIBILIZADORES

[00647] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos um radiosensibilizador. O termo "radiosensibilizador", conforme usado no presente documento, é definido como uma molécula, de preferência, uma molécula de baixo peso molecular, administrada a animais em quantidades terapeuticamente eficazes para aumentar a sensibilidade das células radiosensibilizadas para radiação eletromagnética e/ou para promover o tratamento de doenças que são tratáveis com radiação eletromagnética. Os radiosensibilizadores são agentes que tornam as células cancerosas mais sensíveis à radioterapia, embora tipicamente tenham muito menos efeito sobre células normais. Assim, o radiosensibilizador pode ser usado em combinação com um anticorpo radiomarcado ou ADC. A adição do radiosensibilizador pode resultar em eficácia aumentada em comparação com o tratamento com o anticorpo radiomarcado ou fragmento de anticorpo sozinho. Os radiosensibilizadores são descritos em D. M. Goldberg (ed.), *Cancer Therapy with Radiolabeled Antibodies*, CRC Press (1995). Os exemplos de radiosensibilizadores incluem gencitabina, 5-fluorouracila, taxano e cisplatina.

[00648] Os radiosensibilizadores podem ser ativados pela radiação eletromagnética de raios X. Os exemplos representativos de radiosensibilizadores ativados por raios X incluem, porém, sem limitação, os seguintes: metronidazol, misonidazol, desmetilmisonidazol, pimonidazol, etanidazol, nimorazol, mitomicina C, RSU 1069, SR 4233, E09, RB 6145, nicotinamida, 5-bromodesoxiuridina (BUdR), 5-iododesoxiuridina (IUdR), bromodesoxicitidina, fluorodesoxiuridina (FUdR), hidroxiiureia, cisplatina e análogos e derivados terapeuticamente eficazes dos mesmos. Alternativamente, os radiosensibilizadores podem ser ativados usando terapia fotodinâmica (PDT). Os exemplos representativos de radiosensibilizadores fotodinâmicos incluem, porém

sem limitação, derivados de hematoporfirina, fotofrina(r), derivados de benzoporfirina, NPe6, etioporfirina de estanho (SnET2), feoborbida a, bacterioclorofila a, naftalocianinas, ftalocianinas, ftalocianina de zinco e análogo e derivados terapeuticamente eficazes dos mesmos.

INIBIDORES DE TOPOISOMERASE

[00649] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos um inibidor de topoisomerase. Os inibidores de topoisomerase são agentes quimioterápicos projetados para interferir na ação de enzimas topoisomerase (topoisomerase I e II), que são enzimas que controlam as alterações em estrutura de DNA por catálise, então, quebra e reunião da cadeia principal de fosfodiéster de fitas de DNA durante o ciclo celular normal. Os exemplos representativos de inibidores de DNA topoisomerase I incluem, porém sem limitação, camptotecinas e seus derivados irinotecano (CPT-11, Campotosar, Pfizer, Inc.) e topotecano (Hycamtin, GlaxoSmithKline Pharmaceuticals). Os exemplos representativos de inibidores de DNA topoisomerase II incluem, porém sem limitação, amsacrina, daunorubicina, doxorubicina, epipodofilotoxinas, elipticinas, epirubicina, etoposídeo, razoxano e teniposídeo.

INIBIDOR DE TIROSINA QUINASE

[00650] Os ligantes da invenção podem ser usados para conjugar um anticorpo a pelo menos um inibidor de tirosina quinase. As tirosina quinases são enzimas dentro da célula que funcionam para fixar grupos fosfato ao aminoácido tirosina. Bloqueando-se a capacidade de proteínas tirosina quinases de funcionar, o crescimento tumoral pode ser inibido. Os exemplos de tirosina quinases que podem ser usadas nos ADCs da invenção incluem, porém sem limitação, Axitinibe, Bosutinibe, Cediranibe, Dasatinibe, Erlotinibe, Gefitinibe, Imatinibe, Lapatinibe, Lestaurtinibe, Nilotinibe, Semaxanibe, Sunitinibe e Vandetanibe.

OUTROS AGENTES

[00651] Os exemplos de outros agentes que podem ser usados nos ADCs da invenção incluem, porém sem limitação, abrina (por exemplo, cadeia A de abrina), toxina alfa, proteínas de *Aleurites fordii*, amatoxina, crotina, curcina, proteínas diantina, toxina de difteria (por exemplo, cadeia A de difteria e fragmentos ativos não ligantes de toxida da difteria), desoxirribonuclease (Dnase), gelonina, mitogelina, cadeia A de modeccina, inibidor de *Momordica charantia*, neomicina, onconase, fenomicina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, e PAP-S), proteína antiviral de erva-tintureira, endotoxina de *Pseudomonas*, exotoxina de *Pseudomonas* (por exemplo, cadeia A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*)), restrictocina, cadeia A de ricina, ribonuclease (Rnase), inibidor de *Sapaonaria officinalis*, saporina, alfa-sarcina, enterotoxina A de *Staphylococcal*, toxina de tétano, cisplatina, carboplatina e oxaliplatina (Eloxatin, Sanofi Aventis), inibidores de proteasome (por exemplo, PS-341 [bortezomibe ou Velcade]), inibidores de HDAC (vorinostat (Zolinza, Merck & Company, Inc.)), belinostat, entinostat, mocetinostat e panobinostat), inibidores de COX-2, ureias substituídas, inibidores de proteína de choque térmico (por exemplo, Geldanamicina e seus inúmeros análogos), supressores adrenocorticais e os tricotecenos. (Consultar, por exemplo, o documento nº WO 93/21232). Outros agentes também incluem asparaginase (Espar, Lundbeck Inc.), hidroxiureia, levamisol, mitotano (Lysodren, Bristol-Myers Squibb) e tretinoína (Renova, Valeant Pharmaceuticals Inc.).

[00652] Deve-se perceber que os grupos mencionados anteriormente de porções químicas de fármaco que podem ser usados nos ADCs da invenção não são exclusivos, pelo fato de que certos exemplos de fármacos podem ser encontrados em mais de uma categoria, por exemplo, ansamitocinas, são tanto inibidores mitóticos quanto antibióticos antitumorais.

[00653] Todos os estereoisômeros das porções químicas de fárma-

co são contemplados para os compostos da invenção, isto é, qualquer combinação de configurações R e S nos carbonos quirais de D.

[00654] Uma "porção química detectável" ou a "marcador" se refere a uma composição que é detectável por meios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, imunoquímicos, radioativos ou químicos. Por exemplo, uma identificação útil inclui ^{32}P , ^{35}S , corantes fluorescentes, reagentes com densidade de elétrons, enzimas (por exemplo, enzimas que são, de modo geral, usadas em ELISA), biotina-estreptavidina, dioxigenina, hapteno e proteínas para as quais antissoros ou anticorpos monoclonais estão disponíveis, ou moléculas de ácido nucleico com uma sequência complementar a um alvo. A porção química detectável frequentemente gera um sinal mensurável, por exemplo, um sinal radioativo, um sinal colorido ou um sinal fluorescente, que é usável para quantificar uma quantidade da porção química detectável que se liga na amostra. A quantificação do sinal pode ser realizada, por exemplo, por contagem de cintilação, medidor de densidade, análise de célula de fluxo, ELISA ou análise direta por espectroscopia de massa de peptídeos circulares ou subsequentemente digeridos (um ou mais peptídeos podem ser avaliados). Aqueles versados na técnica estão familiarizados com técnicas e meios de detecção para um composto de identificação de interesse. Estas técnicas e métodos são convencionais e bem conhecidos na técnica.

[00655] A sonda para detecção se refere a (i) um material capaz de fornecer um sinal detectável, (ii) um material capaz de interagir com uma primeira sonda ou uma segunda sonda para alterar um sinal detectável fornecido pela primeira sonda ou pela segunda sonda, tal como transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET), (iii) um material capaz de estabilizar uma interação com um antígeno ou um ligante ou aumentar a afinidade de ligação, (iv) um material capaz de afetar a mobilidade elétrica ou ação de invasão celular por pa-

râmetros físicos, tal como carga, hidrofobicidade, etc., ou (v) um material capaz de ajustar a afinidade de ligante, ligação antígeno-anticorpo ou formação de complexo iônico.

ANTICORPOS

[00656] O anticorpo de um ADC pode ser qualquer anticorpo que se liga, tipicamente, mas não de modo necessariamente específico, um antígeno expresso na superfície de uma célula-alvo de interesse. O antígeno não precisa, mas, em algumas modalidades, é capaz de internalizar um ADC ligado ao mesmo na célula. As células-alvo de interesse podem incluir células em que a indução de apoptose é desejável. Os antígenos-alvo podem ser qualquer proteína, glicoproteína, polissacarídeo, lipoproteína, etc. expressa na célula-alvo de interesse, mas serão tipicamente proteínas que são exclusivamente expressas na célula-alvo e não em células normais ou saudáveis ou que são superexpressas na célula-alvo em comparação com células normais ou saudáveis, de modo que os ADCs alvejem seletivamente células específicas de interesse, tal como, por exemplo, células tumorais. Conforme será percebido pelo versados na técnica, o antígeno específico e, portanto, anticorpo, selecionado dependerá da identidade da célula-alvo desejada de interesse. Em modalidades específicas, o anticorpo do ADC é um anticorpo adequado para administração a seres humanos.

[00657] Os anticorpos (Abs) e imunoglobulinas (Igs) são glicoproteínas que têm as mesmas características estruturais. Embora os anticorpos exibam especificidade de ligação a um alvo específico, as imunoglobulinas incluem tanto anticorpos quanto outras moléculas similares a anticorpo que carecem de especificidade ao alvo. Anticorpos e imunoglobulinas nativas são usualmente glicoproteínas heterotetraméricas de cerca de 150000 daltons, compostas por duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas (H) idênticas. Cada cadeia pesa-

da tem em uma extremidade um domínio variável (VH) seguido por diversos domínios constantes. Cada cadeia leve tem um domínio variável em uma extremidade (VL) e um domínio constante em sua outra extremidade.

[00658] As referências a "VH" se referem à região variável de uma cadeia pesada de imunoglobulina de um anticorpo, incluindo a cadeia pesada de um Fv, scFv ou Fab. As referências a "VL" se referem à região variável de uma cadeia leve de imunoglobulina, incluindo a cadeia leve de um Fv, scFv, dsFv ou Fab.

[00659] O termo "anticorpo" no presente documento é usado no sentido mais amplo e se refere a uma molécula de imunoglobulina que se liga especificamente a, ou é imunologicamente reativa com, um antígeno particular, e inclui formas policlonais, monoclonais, geneticamente modificadas e modificadas de outro modo de anticorpos, incluindo, porém sem limitação, murinos, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpos heteroconjugados (por exemplo, anticorpos biespecíficos, diacorpos, triacorpos e tetracorpos) e fragmento de ligação a antígeno de anticorpos, incluindo, por exemplo, fragmentos Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rIgG e scFv. O termo "scFv" se refere a um anticorpo Fv de cadeia única em que os domínios variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve de um anticorpo tradicional foram unidos para formar uma cadeia.

[00660] Os anticorpos podem ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos ou derivados de outras espécies. Um anticorpo é uma proteína gerada pelo sistema imunológico que tem capacidade para reconhecer e ligar-se a um antígeno específico. (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology*, 5ª Edição, Garland Publishing, New York). Um antígeno alvo, de modo geral, tem inúmeros sítios de ligação, também chamados de epitopos, reconhecidos por CDRs ou múltiplos anticorpos. Cada anticorpo que se liga especifica-

mente a um epítopo diferente tem uma estrutura diferente. Assim, um antígeno pode ter mais de um anticorpo correspondente. Um anticorpo inclui uma molécula de imunoglobulina de comprimento completo ou uma porção imunologicamente ativa de uma molécula de imunoglobulina de comprimento completo, isto é, uma molécula que contém um sítio de ligação de antígeno que liga imuno especificamente um antígeno de um alvo de interesse ou parte do mesmo, em que tais alvos incluem, porém, sem limitação, célula ou células cancerosas que produzem anticorpos autoimunes associados a uma doença autoimune. A imunoglobulina revelada no presente documento 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 de molécula de imunoglobulina. As imunoglobulinas podem ser derivadas de qualquer espécie. Em um aspecto, no entanto, a imunoglobulina é de origem humana, murina ou de coelho.

[00661] O termo "fragmento de anticorpo" se refere a uma porção de um anticorpo de comprimento completo, de modo geral, a região variável ou de ligação a alvo. Os exemplos de fragmentos de anticorpo incluem fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ e Fv. Um fragmento "Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um sítio de reconhecimento de alvo completo. Esta região consiste em um dímero de um domínio variável de cadeia pesada e leve em uma associação não covalente estreita (dímero VH-VL). Nessa configuração, as três CDRs de cada domínio variável interagem para definir um sítio de ligação alvo na superfície do dímero VH-VL. Frequentemente, as seis CDRs conferem especificidade de ligação alvo ao anticorpo. Entretanto, em alguns casos, mesmo um domínio variável único (ou metade de um Fv que compreende apenas três CDRs específicas para um alvo) pode ter a capacidade de reconhecer um alvo de ligação. Os fragmentos de anticorpo "Fv de cadeia única" ou "scFv" compreendem os domínios VH e

VL de um anticorpo em uma cadeia de polipeptídeo única. De modo geral, o polipeptídeo de Fv compreende, ainda, um ligante de polipeptídeo entre os domínios VH e VL que possibilita que o scFv forme a estrutura desejada para ligação alvo. "Anticorpos de domínio único" são compostos por um domínio VH ou VL único que exibe afinidade suficiente ao alvo. Em uma modalidade específica, o anticorpo de domínio único é um anticorpo camelizado (consultar, por exemplo, Riechmann, 1999, *Journal of Immunological Methods* 231:25-38).

[00662] O fragmento Fab contém o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada. Os fragmentos Fab' diferem-se de fragmentos Fab pela adição de alguns resíduos no terminal carboxila do domínio de CH1 de cadeia pesada incluindo uma ou mais cisteínas da região de dobradiça de anticorpo. Os fragmentos F(ab') são produzidos por clivagem da ligação de dissulfeto nas cisteínas de dobradiça do produto de digestão de pepsina F(ab')₂. Acoplamentos químicos adicionais de fragmentos de anticorpo são conhecidos por aqueles de habilidade comum na técnica.

[00663] Ambos os domínios de cadeia leve e cadeia pesada têm regiões determinantes de complementaridade (CDRs), também conhecidas como regiões hipervariáveis. As porções mais altamente conservadas de domínios variáveis são chamadas framework (FR). Conforme é conhecido na técnica, a posição/limite de aminoácido que delineia uma região hipervariável de um anticorpo pode variar dependendo do contexto e das várias definições conhecidas na técnica. Algumas posições dentro de um domínio variável podem ser vistas como posições hipervariáveis híbridas pelo fato de que estas posições podem ser consideradas como estando dentro de uma região hipervariável sob um conjunto de critérios enquanto são consideradas como estando fora de uma região hipervariável sob um conjunto diferente de critérios. Uma ou mais destas posições podem ser também encontra-

das em regiões hipervariáveis estendidas. As CDRs em cada cadeia são mantidas juntas em estreita proximidade pelas regiões FR e, com as CDRs da outra cadeia, contribuem para a formação do sítio de ligação alvo de anticorpos (consultar Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institute of Health, Bethesda, Md. 1987). Conforme usado no presente documento, a numeração de resíduos de aminoácidos de imunoglobulina é realizada de acordo com o sistema de numeração de resíduos de aminoácidos de imunoglobulina de Kabat et al., a não ser que indicado de outro modo.

[00664] Em certas modalidades, os anticorpos dos ADCs da presente descrição são anticorpos monoclonais. O termo "anticorpo monoclonal" (mAb) se refere a um anticorpo que é derivado de uma única cópia ou clone, incluindo, por exemplo, qualquer clone eucariótico, procariótico ou de fago, e não ao método pelo qual o mesmo é produzido. De preferência, um anticorpo monoclonal da descrição existe em uma população homogênea ou substancialmente homogênea. O anticorpo monoclonal inclui tanto moléculas intactas assim como fragmentos de anticorpo (tal como, por exemplo, fragmentos Fab e F(ab')₂), que são capazes de se ligar especificamente a uma proteína. Os fragmentos Fab e F(ab')₂ não têm o fragmento Fc de anticorpo intacto, são eliminados mais rapidamente da circulação do animal e podem ter menos ligação de tecido não específica do que um anticorpo intacto (Wahl et al., 1983, *J. Nucl. Med* 24:316). Os anticorpos monoclonais úteis com a presente descrição podem ser preparados usando uma ampla variedade de conjuntos de procedimentos conhecidos na técnica incluindo o uso de conjuntos de procedimentos de apresentação em fago, recombinantes e de hibridoma ou uma combinação dos mesmos. Os anticorpos da descrição incluem anticorpos quiméricos, primatizados, humanizados ou humanos.

[00665] Embora, na maioria dos casos, os anticorpos são compos-

tos apenas pelos aminoácidos geneticamente codificados, em algumas modalidades, aminoácidos não codificados podem ser incorporados especificamente. Os exemplos de aminoácidos não codificados que podem ser incorporados em anticorpos para uso no controle de estequiometria e localização de ligação, assim como métodos para produzir tais anticorpos modificados são discutidos em Tian et al., 2014, Proc Nat'l Acad Sci USA 111(5):1766-1771 e Axup et al., 2012, Proc Nat'l Acad Sci USA 109(40):16101-16106, cujo conteúdo inteiro está incorporado ao presente documento a título de referência.

[00666] Em certas modalidades, o anticorpo dos ADCs descritos no presente documento é um anticorpo quimérico. O termo anticorpo "quimérico" conforme usado no presente documento se refere a um anticorpo que tem sequências variáveis derivadas de uma imunoglobulina não humana, tal como anticorpo de rato ou camundongo, e regiões constantes de imunoglobulina humana, tipicamente escolhidas dentre um modelo de imunoglobulina humana. Os métodos para produzir os anticorpos quiméricos são conhecidos na técnica. Consultar, por exemplo,, Morrison, 1985, Science 229(4719):1202-7; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214-221; Gillies et al., 1985, J. Immunol. Methods 125:191-202; Patente U.S. 5.807.715; 4.816.567; e 4,816.397, que estão incorporadas ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[00667] Em certas modalidades, o anticorpo dos ADCs descritos no presente documento é um anticorpo humanizado. As formas "humanizadas" de anticorpos não humanos (por exemplo, murinos) são imunoglobulinas quiméricas, cadeias de imunoglobulina ou fragmentos das mesmas (tais como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ ou outros subdomínios de ligação alvo de anticorpos) que contêm sequências mínimas derivadas de imunoglobulina não humana. Geralmente, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos dentre pelo menos um e

tipicamente dois domínios variáveis, em que todos ou substancialmente todas as regiões CDR correspondem àqueles de uma imunoglobulina não humana, e todas ou substancialmente todas as regiões FR são aqueles de uma sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado pode também compreender pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente aquela de uma sequência consenso de imunoglobulina humana. Os métodos de humanização de anticorpo são conhecidos na técnica. Consultar, por exemplo, Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-7; Patente U.S. nº 5.530.101; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; e Patente U.S. nº 6.180.370 por Queen et al.; EP239400; publicação PCT WO 91/09967; Patente U.S. nº 5.225.539; EP592106; EP519596; Padlan, 1991, Mol. Immunol., 28:489-498; Studnicka et al., 1994, Prot. Eng. 7:805-814; Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973; e Patente U.S. 5.565.332, todos os quais estão incorporados ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[00668] Em certas modalidades, o anticorpo dos ADCs descritos no presente documento é um anticorpo humano. Anticorpos completamente "humanos" podem ser desejáveis para o tratamento terapêutico de pacientes humanos. Conforme usado no presente documento, "anticorpos humanos" incluem anticorpos que têm a sequência de aminoácidos de uma imunoglobulina humana e incluem anticorpos isolados de bibliotecas de imunoglobulinas humanas ou de animais transgênicos para uma ou mais imunoglobulinas humanas e que não expressam imunoglobulinas endógenas. Os anticorpos humanos podem ser feitos por uma variedade de métodos conhecidos na técnica incluindo os métodos de apresentação em fago usando bibliotecas de anticorpos derivadas das sequências de imunoglobulina humana. Consultar as Patentes U.S. nº 4.444.887, 4.716.111, 6.114.598, 6.207.418, 6.235.883, 7.227.002, 8.809.151 e Pedido de Publicação U.S. nº

2013/189218, cujo conteúdo está incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade. Anticorpos humanos podem ser também produzidos usando camundongos transgênicos que incapazes de expressar imunoglobulinas endógenas funcionais, mas que podem expressar genes de imunoglobulina humana. Consulte, por exemplo, as Patentes U.S. nº 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; 5.885.793; 5.916.771; 5.939.598; 7.723.270; 8.809.051 e Pedido Publicado U.S. nº 2013/117871, que estão incorporados a título de referência ao presente documento em sua totalidade. Adicionalmente, empresas como Medarex (Princeton, N.J.), Astellas Pharma (Deerfield, Ill.) e Regeneron (Tarrytown, N.Y.) podem estar engajadas em fornecer anticorpos humanos direcionados contra um antígeno selecionado usando tecnologia similar àquela descrita acima. Os anticorpos completamente humanos que reconhecem um epítipo selecionado podem ser gerados usando uma técnica denominada "detecção guiada". Nesta abordagem, um anticorpo monoclonal não humano selecionado, por exemplo, um anticorpo de camundongo, é usado para guiar a seleção de um anticorpo completamente humano que reconhece o mesmo epítipo (Jespers et al., 1988, Biotechnology 12:899-903).

[00669] Em certas modalidades, o anticorpo dos ADCs descritos no presente documento é um anticorpo primatizado. O termo "anticorpo primatizado" se refere a um anticorpo que compreende regiões variáveis de macaco e regiões constantes humanas. Os métodos para produzir os anticorpos primatizados são conhecidos na técnica. Consultas, por exemplo, as Patentes U.S. nºs 5.658.570; 5.681.722; e 5.693.780, que estão incorporadas ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[00670] Em certas modalidades, o anticorpo dos ADCs descritos no presente documento é um anticorpo biespecífico ou um anticorpo de

domínio variável duplo (DVD). Os anticorpos biespecíficos e DVD são monoclonais, frequentemente humanos ou humanizados, anticorpos que têm especificidades de ligação para pelo menos dois antígenos diferentes. DVDs são descritos, por exemplo, na Patente U.S. nº 7.612.181, cuja descrição está incorporada ao presente documento a título de referência.

[00671] Em certas modalidades, o anticorpo dos ADCs descritos no presente documento é um anticorpo derivatizado. Por exemplo, porém sem limitação, os anticorpos derivatizados são tipicamente modificados por glicosilação, acetilação, peguilação, fosforilação, amidação, derivatização por grupos protetores/bloqueadores conhecidos, clivagem proteolítica, ligação a um ligante celular ou outra proteína, etc. Qualquer uma dentre as inúmeras modificações químicas pode ser executada por técnicas conhecidas, incluindo, porém sem limitação, clivagem química específica, acetilação, formulação, síntese metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, o derivado pode conter um ou mais aminoácidos não naturais, por exemplo, usando tecnologia ambrx (consultar, por exemplo, Wolfson, 2006, Chem. Biol. 13(10):1011-2).

[00672] Em certas modalidades, o anticorpo dos ADCs descritos no presente documento tem uma sequência que foi modificada para alterar pelo menos uma função efetora biológica mediada por região constante em relação à sequência de tipo selvagem correspondente. Por exemplo, em algumas modalidades, o anticorpo pode ser modificado para reduzir pelo menos uma função efetora biológica mediada por região constante em relação a um anticorpo não modificado, por exemplo, ligação reduzida ao receptor de Fc (FcR). A ligação a FcR pode ser reduzida por mutação do segmento de região constante de imunoglobulina do anticorpo em regiões particulares necessárias para interações de FcR (consultar, por exemplo, Canfield e Morrison, 1991, J. Exp. Med 173:1483-1491; e Lund et al., 1991, J. Immunol.

147:2657-2662).

[00673] Em certas modalidades, o anticorpo dos ADCs descritos no presente documento é modificado para adquirir ou melhorar pelo menos uma função efetora biológica mediada por região constante em relação a um anticorpo não modificado, por exemplo, para melhorar interações de FcγR (consultar, por exemplo, o documento nº US 2006/0134709). Por exemplo, um anticorpo com uma região constante que liga FcγRIIA, FcγRIIB e/ou FcγRIIIA com maior afinidade que a região constante do tipo selvagem correspondente pode ser produzido de acordo com os métodos descritos no presente documento.

[00674] Em certas modalidades específicas, o anticorpo dos ADCs descritos no presente documento é um anticorpo que liga células tumorais, tal como um anticorpo contra um receptor de superfície celular ou um antígeno associado a tumor (TAA). Nas tentativas de revelar alvos celulares eficazes para diagnóstico e terapia de câncer, os pesquisadores buscaram identificar polipeptídeos de transmembrana ou de outro modo associados a tumor que são especificamente expressos na superfície de um ou mais tipos particulares de célula cancerosa em comparação a uma ou mais células não cancerosas normais. Frequentemente, tais polipeptídeos associados a tumor são mais abundantemente expressos na superfície das células cancerosas em comparação à superfície das células não cancerosas. Tal receptor de superfície celular e antígenos associados a tumor são conhecidos na técnica e podem ser preparados para uso na geração de anticorpos usando métodos e informações que são bem conhecidos na técnica.

RECEPTORES DE SUPERFÍCIE CELULAR E TAAS EXEMPLIFICATIVOS

[00675] Os exemplos de receptor de superfície celular e TAAs aos quais o anticorpo dos ADCs descritos no presente documento pode ser alvejado incluem, porém sem limitação, os vários receptores e

TAAAs listados abaixo na Tabela 1. Para conveniência, as informações relacionadas a estes antígenos, todos os quais são conhecidos na técnica, são listadas abaixo e incluem nomes, nomes alternativos, números de acesso ao Genbank e referência(s) primária(s), seguindo convenções de identificação de sequência de proteínas e ácidos nucleicos do Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (NCBI). As sequências de proteínas e ácidos nucleicos que correspondem aos receptores de superfície celular e TAAAs listados estão disponíveis em bancos de dados públicos, tal como o GenBank.

TABELA 1.

4-1BB
5AC
5T4
Alfa-fetoproteína
angiopoietina 2
ASLG659
TCL1
BMPR1B
Brevican (BCAN, BEHAB)
antígeno C2-42
C5
CA-125
CA-125 (imitação)
CA-IX (anidrase carbônica 9)
CCR4
CD140a
CD152
CD19
CD20
CD200
CD21 (C3DR) 1)
CD22 (isoforma CD22-B de receptor de células B)
CD221
CD23 (receptor de gE)
CD28
CD30 (TNFRSF8)

CD33
CD37
CD38 (ADP ribose hidrolase cíclica)
CD4
CD40
CD44 v6
CD51
CD52
CD56
CD70
CD72 (Lyb-2, antígeno de diferenciação de células B CD72)
CD74
CD79a (CD79A, CD79 α , alfa associado a imunoglobulina) número de acesso ao Genbank NP_001774,10)
CD79b (CD79B, CD79 β , B29)
CD80
CEA
antígeno relacionado a CEA
ch4D5
CLDN18,2
CRIPTO (fator de crescimento derivado de teratocarcinoma CR, CR1, CRGF, TDGF1)
CTLA-4
CXCR5
DLL4
DR5
E16 (LAT1, SLC7A5) EGFL7
EGFR
EpCAM
EphB2R (DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5)
Episialina
ERBB3
ETBR (Receptor de endotelina do tipo B)
FCRH1 (proteína 1 semelhante a receptor de Fc)
FcRH2 (domínio IFGP4, IRTA4, SPAP1, SPAP1B, SPAP1C, SH2 contendo proteína âncora de fosfatase
Domínio B extra de fibronectina
Receptor de folato 1
Receptor frisado
GD2

[0260]
gangliosídeo GD3
GEDA
GPNMB
HER1
HER2 (ErbB2)
HER2/neu
HER3
HGF
HLA-DOB
HLA-DR
Quinase receptora de fator difusor humano
receptor de IGF-1
IgG4
IL-13
IL20R α (IL20Ra, ZCYTOR7)
IL-6
ILGF2
ILFR1R
integrina α
integrina $\alpha 5\beta 1$
integrina $\alpha v\beta 3$
IRTA2 (Translocação de receptor de superfamília da imunoglobulina associada 2, Cromossomo de Gene 1q21)
antígeno de Lewis-Y
LY64 (RP105)
MCP-1
MDP (DPEP1)
MPF (MSLN, SMR, mesotelina, fator potenciador de megacariócito)
MS4A1
MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315)
MUC1
Mucina CanAg
Napi3 (NAPI-3B, NPTIIb, SLC34A2, transportador de fosfato dependente de sódio tipo II 3b)
NCA (CEACAM6)
P2X5 (Canal de íons acionado por ligante P2X de receptor purinérgico 5)
PD-1
PDCD1

PDGF-R α
Antígeno de membrana específico para próstata
PSCA (Precursor de antígeno de células-tronco de próstata)
PSCA hlg
RANKL
RON
SDC1
Sema 5b
SLAMF7 (CS-1)
STEAP1
STEAP2 (HGNC_8639, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gene associado a câncer de próstata 1)
TAG-72
TEM1
Tenascina C
TENB2, (TMEFF2, tomoregulina, TPEF, HPP1, TR)
TGF- β
TRAIL-E2
TRAIL-R1
TRAIL-R2
TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, subfamília de canal de cátion potencial de receptor transitório M, membro 4)
TA CTAA16,88
TWEAK-R
TYRP1 (glicoproteína 75)
VEGF
VEGF-A
EGFR-1
VEGFR-2
Vimentina

ANTICORPOS EXEMPLIFICATIVOS

[00676] Os anticorpos exemplificativos a serem usados com ADCs da descrição incluem, porém sem limitação, 3F8 (GD2), Abagovomab (CA-125 (imitação)), Adecatumumab (EpCAM), Afutuzumab (CD20), Alacizumab pegol (VEGFR2), ALD518 (IL-6), Alemtuzumnab (CD52), Altumomab pentetate (CEA), Amatuximab (Mesotelina), Anatumomnab

mafenatox (TAG-72), Apolizumab (HLA-DR), Arcitumomab (CEA), Baviximab (Fosfatidilserina), Bectumomab (CD22), Belimumab (BAFF), Besilesomab (antígeno relacionado a CEA), Bevacizumab (VEGF-A), Bivatuzumab mertansina (CD44 v6), Blinatumomab (CD19), Brentuximab vedotina ((CD30 (TNFRSF8))), Cantuzumab mertansina (Mucin CanAg), Cantuzumab raptansina (MUC1), Capromab pendetideo (Células de carcinoma prostático), Carlumab (MCP-1), Catumaxomab (EpCAM, CD3), CC49 (Tag-72), cBR96-DOX ADC (antígeno Lewis-Y), Cetuximab (EGFR), Citatuzumab bogatox (EpCAM), Cixutumumab (receptor de IGF-1), Clivatuzumab tetraxetano (MUC1), Conatumumab (TRAIL-E2), Dacetuzumab (CD40), Dalotuzumab (receptor de fator de crescimento 1 similar a insulina), Deratumumab ((CD38 (ribose hidrolase ADP cíclica))), Demcizumab (DLL4), Denosumab (RANKL), Detumomab (célula de linfoma B), Drozitumab (DR5), Dusigitumab (ILGF2), Ecomeximab (D3 gangliosídeo), Eculizumab (C5), Edrecolomab (EpCAM), Elotuzumab (SLAMF7), Elsilimomab (IL-6), Enavatuzumab (receptor de TWEAK), Enoticumab (DLL4), Ensituximab (5AC), Eptumomab cituxetano (Episialina), Epratuzumab (CD22), Ertumaxomab ((HER2/neu, CD3)), Etancizumab (Integrina $\alpha\beta 3$), Farletuzumab (receptor de folato 1), FBTA05 (CD20), Ficlaturumab (HGF), Figitumumab (receptor de IGF-1), Flanvotumab ((TYRP1 (glicoproteína 75))), Fresolimumab (TGF-1), Galiximab (CD80), Ganitumab (IGF-I), Gemtuzumab ozogamicina (CD33), Girentuximab ((anidrase carbônica 9 (CA-IX))), Glembatumumab vedotina (GPNMB), Ibritumomab tiuxetano (CD20) Icrucumab (VEGFR-1), Igovomab (CA-125), IMAB362 (CLDN18,2), Imgatuzumab (EGFR), Indatuximab raptansina (SDC1), Intetumumab (CD51), Inotuzumab ozogamicina (CD22), Ipilimumab (CD152), Iratumumab ((CD30 (TNFRSF8))), Labetuzumab (CEA), Lamlizumab (PDCD1), Lexatumumab (TRAIL-R2), Lintuzumab (CD33), Lorvotuzumab mertansina (CD56), Lucatumumab (CD40), Lumiliximab

((CD23 (IgE receptor)), Mapatumumab (TRAIL-R1), Margetuximab (ch4DS), Matuzumab (EGFR), Milatuzumab (CD74), Mitumomab (GD3 gangliosídeo), Mogamulizumab (CCR4), Moxetumomab pasudotox (CD22), Nacolomab tafenatox (antígeno C2-42), Naptumomab estafenatox (5T4), Narnatumab (RON), Natalizumab (integrina $\alpha 4$), Necitumumab (EGFR), Nesvacumab (angiopoietina 2), Nimotuzumab (EGFR), Nivolumab (IgG4), Ocaratuzumab (CD20), Ofatumumab (CD20), Olaratumab (PDGF-R α), Onartuzumab (quinase receptora de fator difusor humano), Ontuxizumab (TEM1), Oportuzumab monato (EpCAM), Oregovomab (CA-125), Otlertuzumab (CD37), Panitumumab (EGFR) Pankomab (glicosilação específica para tumor de MUC1), Parsatuzumab (EGFL7), Patritumab (HER3), Pemtumomab (MUC1), Pertuzumab (HER2/neu), Pidilizumab (PD-1), Pinatuzumab vedotina (CD22), Pritumumab (Vimentina), Racotumomab (ácido N-glicolilneuramínico), Radretumab (domínio extra de fibronectina-B), Ramucirumab (VEGFR2), Rilotumumab (HGF), Rituximab (CD20), Robatumumab (receptor de IGF-1), Samalizumab (CD200), Satumomab pendetídeo (TAG-72), Seribantumab (ERBB3), Sibrotuzumab (FAP), SGN-CD19A (CD19), SGN-CD33A (CD33), Siltuximab (IL-6), Solitomab (EpCAM), Sonepcizumab (Esfingosina-1-fosfato), Tabalumb (BAFF), Tacatuzumab tetraxetano (Alfa-fetoproteína), Taplitumomab paptox (CD19), Tenatumomab (Tenascin C), Teprotumumab (CD221), TGN1412 (CD28), Ticilimumab (CTLA-4), Tigatuzumab (TRAIL-R2), TNX-650 (IL-13), Tovetumab (CD40a), Trastuzumab (HER2/neu), TRBS07 (GD2), Tremelimumab (CTLA-4), Tucotuzumab celmoleucina (EpCAM), Ublituximab (MS4A), Urelumab (4-1BB), Vandetanib (VEGF), Vantictumab (receptor Frizzled), Volociximab (integrina $\alpha 5\beta 1$), Vorsetuzumab mafodotina (CD70), Votumumab (antígeno tumoral CTA16,88), Zalutumumab (EGFR), Zanolimumab (CD4) e Zatuximab (HER1).

MÉTODOS PARA PRODUZIR ANTICORPOS

[00677] O anticorpo de um ADC pode ser preparado por expressão recombinante de genes de cadeia leve e pesada de imunoglobulina em uma célula hospedeira. Por exemplo, para expressar um anticorpo recombinantemente, uma célula hospedeira é transfectada com um ou mais vetores de expressão recombinante que portam fragmentos de DNA que codificam as cadeias leve e pesada de imunoglobulina do anticorpo de modo que as cadeias leve e pesada sejam expressas na célula hospedeira e, opcionalmente, secretadas no meio em que as células hospedeiras são cultivadas, de cujo meio os anticorpos podem ser recuperados. As metodologias de DNA recombinante padrão são usadas para obter genes de cadeia pesada e leve de anticorpo, incorporar estes genes em vetores de expressão recombinante e introduzir os vetores em células hospedeiras, tais como aquelas descritas em *Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition* (Sambrook, Fritsch e Maniatis (eds), Cold Spring Harbor, N. Y., 1989), *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F. M. et al., eds., Greene Publishing Associates, 1989) e na Patente U.S. nº 4.816.397.

[00678] Em uma modalidade, os anticorpos variantes Fc são similares a seus equivalentes do tipo selvagem, exceto por alterações em seus domínios Fc. Para gerar ácidos nucleicos que codificam tais anticorpos variantes Fc, um fragmento de DNA que codifica o domínio Fc ou uma porção do domínio Fc do anticorpo do tipo selvagem (denominado o "domínio Fc do tipo selvagem") pode ser sintetizado e usado como um modelo para mutagênese para gerar um anticorpo conforme descrito no presente documento usando técnicas de mutagênese de rotina; alternativamente, um fragmento de DNA que codifica o anticorpo pode ser diretamente sintetizado.

[00679] Uma vez que os fragmentos de DNA que codificam domínios Fc do tipo selvagem são obtidos, estes fragmentos de DNA po-

dem ser, ainda, manipulados por técnicas de DNA recombinante padrão, por exemplo, para converter os genes de região constante em genes de cadeia de anticorpo de comprimento completo. Nessas manipulações, um fragmento de DNA que codifica CH é operacionalmente ligado a outro fragmento de DNA que codifica outra proteína, tal como uma região variável de anticorpo ou um ligante flexível. O termo "operacionalmente ligado", conforme usado neste contexto, se destina a significar que dois fragmentos de DNA são unidos de modo que as sequências de aminoácidos codificadas pelos dois fragmentos de DNA permaneçam em quadro.

[00680] Para expressar os anticorpos variantes Fc, os DNAs que codificam cadeias pesada e leve de comprimento parcial ou completo, obtidos conforme descrito acima, são inseridos em vetores de expressão de modo que os genes sejam ligados operacionalmente a sequências de controle transcricional e traducional. Neste contexto, o termo "ligado operacionalmente" se destina a significar que um gene de anticorpo está ligado em um vetor de modo que as sequências de controle transcricional e traducional dentro do vetor sirvam à sua função de regular a transcrição e a tradução do gene de anticorpo. O vetor de expressão e as sequências de controle de expressão são escolhidas para serem compatíveis com a célula hospedeira de expressão usada. Um gene de cadeia leve de anticorpo variante e o gene de cadeia pesada de anticorpo podem ser inseridos em vetores separados ou, mais tipicamente, ambos os genes são inseridos no mesmo vetor de expressão.

[00681] Os genes de anticorpo são inseridos no vetor de expressão por métodos-padrão (por exemplo, ligação de sítios de restrição complementares no fragmento de gene de anticorpo ou vetor, ou ligação de extremidade cega se nenhum sítio de restrição estiver presente). Antes da inserção das sequências de domínio Fc variante, o vetor de

expressão pode já portar sequências de região variável de anticorpo. Adicional ou alternativamente, o vetor de expressão recombinante pode codificar um peptídeo de sinalização que facilita a secreção da cadeia de anticorpo de uma célula hospedeira. O gene de cadeia de anticorpo pode ser clonado no vetor de modo que o peptídeo de sinalização esteja ligado em quadro à terminação amino do gene de cadeia de anticorpo. O peptídeo de sinalização pode ser um peptídeo de sinalização de imunoglobulina ou um peptídeo de sinalização heterólogo (isto é, um peptídeo de sinalização de uma proteína não imunoglobulina).

[00682] Adicionalmente aos genes de cadeia de anticorpo, os vetores de expressão recombinante portam sequências reguladoras que controlam a expressão dos genes de cadeia de anticorpo em uma célula hospedeira. O termo "sequência reguladora" se destina a incluir promotores, intensificadores e outros elementos de controle de expressão (por exemplo, sinais de poliadenilação) que controlam a transcrição ou a tradução dos genes de cadeia de anticorpo. Tais sequências reguladoras são descritas, por exemplo, em Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185 (Academic Press, San Diego, Calif., 1990). Será entendido por aqueles versados na técnica que o projeto do vetor de expressão, incluindo a seleção de sequências reguladoras, pode depender de tais fatores como a escolha da célula hospedeira a ser transformada, o nível de expressão de proteína desejada, etc. Sequências reguladoras adequadas para expressão de célula hospedeira de mamífero incluem elementos virais que direcionar altos níveis de expressão de proteína em células de mamífero, tais como promotores e/ou intensificadores derivados de citomegalovírus (CMV) (tal como o promotor/intensificador de CMV), Vírus Símio 40 (SV40) (tal como promotor/intensificador de SV40), adenovírus (por exemplo, o promotor tardio principal de adenovírus

(AdMLP)) e polioma. Para descrição adicional de elementos reguladores virais e sequências dos mesmos, consultar, por exemplo, a Patente U.S. nº 5.168.062 por Stinski, Patente U.S. nº 4.510.245 por Bell et al. e Patente U.S. nº 4.968.615 por Schaffner et al.

[00683] Adicionalmente aos genes de cadeia de anticorpo e sequências reguladoras, os vetores de expressão recombinante podem portar sequências adicionais, tais como sequências que regulam a replicação do vetor em células hospedeiras (por exemplo, origens de replicação) e genes marcadores selecionáveis. O gene marcador selecionável facilita a seleção de células hospedeiras em que o vetor foi introduzido (consultar, por exemplo, as Patentes U.S. nº 4.399.216, 4.634.665 e 5.179.017, todas por Axel et al.). Por exemplo, tipicamente, o gene marcador selecionável confere resistência a fármacos, tal como G418, puromicina, blasticidina, higromicina ou metotrexato, em uma célula hospedeira em que o vetor foi introduzido. Os genes marcadores selecionáveis adequados incluem o gene de di-hidrofolato redutase (DHFR) (para uso em DHFR- células hospedeiras com seleção/amplificação de metotrexato) e o gene neo (para seleção de G418). Para expressão das cadeias leve e pesada, o vetor (ou vetores) de expressão que codifica as cadeias pesada e leve é transfectado em uma célula hospedeira por técnicas-padrão. As várias formas do termo "transfecção" são destinadas a abranger uma ampla variedade de técnicas comumente usadas para a introdução de DNA exógeno em uma célula hospedeira procariótica ou eucariótica, por exemplo, eletroporação, lipofecção, precipitação de fosfato de cálcio, transfecção de DEAE-dextrano e similares.

[00684] É possível expressar os anticorpos em célula hospedeira procariótica ou eucariótica. Em certas modalidades, a expressão de anticorpos é realizada em células eucarióticas, por exemplo, células hospedeiras de mamífero, para secreção ideal de um anticorpo ativo

adequadamente enovelado e imunologicamente ativo. As células hospedeiras de mamífero exemplificativas para expressar os anticorpos recombinantes incluem Ovário de Hamster Chinês (células CHO) (incluindo células DHFR- CHO, descritas em Urlaub e Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, usadas com um marcador selecionável de DHFR, por exemplo, conforme descrito em Kaufman e Sharp, 1982, Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NS0, células COS, células 293 e células SP2/0. Quando vetores de expressão recombinante que codificam genes de anticorpo são introduzidos em células hospedeiras de mamífero, os anticorpos são produzidos por cultura das células hospedeiras por um período de tempo suficiente para permitir a expressão do anticorpo nas células hospedeiras ou secreção do anticorpo no meio de cultura em que as células hospedeiras são cultivadas. Os anticorpos podem ser recuperados do meio de cultura usando métodos de purificação de proteína padrão. As células hospedeiras podem ser também usadas para produzir porções de anticorpos intactos, tais como fragmentos Fab ou moléculas scFv.

[00685] Em algumas modalidades, o anticorpo de um ADC pode ser um anticorpo bifuncional. Tais anticorpos, em que uma cadeia pesada e uma leve são específicas para um antígeno e a outra cadeia pesada e leve é específica para um segundo antígeno, podem ser produzidos por reticulação de um anticorpo a um segundo anticorpo por métodos de reticulação química padrão. Os anticorpos bifuncionais podem ser também produzidos por expressão de um ácido nucleico geneticamente modificado para codificar um anticorpo bifuncional.

[00686] Em certas modalidades, anticorpos duplo-específicos, isto é, anticorpos que ligam um antígeno e um segundo antígeno não relacionado usando o mesmo sítio de ligação, podem ser produzidos por mutação de resíduos de aminoácido nas CDRs de cadeia leve e/ou cadeia pesada. Os segundos antígenos exemplificativos incluem uma

citocina pró-inflamatória (tal como, por exemplo, linfotóxina, interferon- γ ou interleucina-1). Os anticorpos duplo-específicos podem ser produzidos, por exemplo, por mutação de resíduos de aminoácido na periferia do sítio de ligação a antígeno (consultar, por exemplo, Bostrom et al., 2009, Science 323:1610-1614). Os anticorpos duplo-funcionais podem ser produzidos por expressão de um ácido nucleico geneticamente modificado para codificar um anticorpo duplo-específico.

[00687] Os anticorpos podem ser também produzidos por síntese química (por exemplo, pelos métodos descritos em Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª edição, 1984 The Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.). Os anticorpos podem ser também gerados usando uma plataforma sem célula (consultar, por exemplo, Chu et al., Biochemia No. 2, 2001 (Roche Molecular Biologicals)).

[00688] Os métodos para expressão recombinante de proteínas de fusão Fc são descritos em Flanagan et al., Methods in Molecular Biology, volume 378: Anticorpos Monoclonais: Methods and Protocols.

[00689] Uma vez que um anticorpo tenha sido produzido por expressão recombinante, o mesmo pode ser purificado por qualquer método conhecido na técnica para purificação de uma molécula de imunoglobulina, por exemplo, por cromatografia (por exemplo, troca iônica, afinidade, particularmente por afinidade a antígeno após seleção de Proteína A ou Proteína G e cromatografia em coluna de dimensionamento), centrifugação, solubilidade diferencial ou por qualquer outra técnica padrão para a purificação de proteínas.

[00690] Uma vez isolado, um anticorpo pode ser, se for desejado, adicionalmente purificado, por exemplo, por cromatografia líquida de alto desempenho (consultar, por exemplo, Fisher, Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology (Work e Burdon, eds., Elsevier, 1980)) ou por cromatografia de filtração em gel em uma coluna Superdex™ 75 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suécia).

COMPOSTOS DE IMAGINOLOGIA E SENSORES

[00691] Em certas modalidades, são fornecidos no presente documento usos para os compostos divulgados em composições de imagiologia e como sensores.

[00692] O sensor pode ser um biossensor, um sensor químico ou um comutador molecular. Os biossensores são capazes de identificar a presença ou a quantidade de um material específico por reação de materiais específicos (por exemplo, células cancerosas, vírus, vários produtos químicos, etc.) com biorreceptores (porções projetadas para serem capazes de absorver e reagir com biomateriais, tal como DNA, RNA, anticorpos, proteínas enzimáticas, células, membranas biológicas, receptores de hormônio, etc.) que têm especificidade de seleção e realizando medição usando um transdutor de sinal (um dispositivo que converte reação entre o material específico e um receptor biológico em um sinal elétrico usando vários métodos) e podem ser utilizados para indústrias médica, ambiental, de processo, militar (guerra química), recurso, alimento, etc. (consultar, por exemplo, Biosensors and Bioelectronics, 2016, 32-45; Pol. J. Environ. Stud. 2015, 19-25; Analytica Chimica Acta 568 (2006) 200–210; Biosensors and Bioelectronics 2017, 217–231; ACS Appl. Mater. Interfaces 2015, 7, 20190–20199; Journal of Coastal Life Medicine 2016; 4(3): 200-202; Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology, 39: 281–288; Journal of Controlled Release 159 (2012) 154–163).

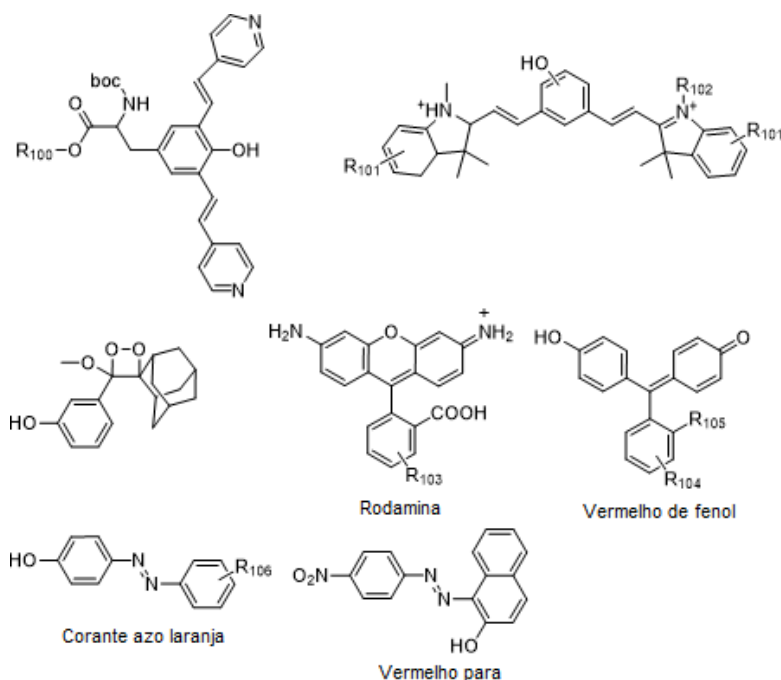
[00693] Sensores químicos monitora rápida de precisamente materiais específicos em muitos campos, tal como diagnóstico clínico, pesquisa médica, medição de material químico, medição ambiental, etc., por um método para usar propriedades elétricas, tal como eletricidade, resistência, diferença de potencial, etc., e propriedades ópticas, tal como cor, fluorescência, etc., e inclui um sensor de gás (hidrogênio, oxigênio, monóxido de carbono), um sensor de íon (cátion, ânion, íon

sensível a gás), um sensor de componente (fase de vapor, fase líquida, componente luminescente), um sensor de umidade (umidade relativa, umidade absoluta, condensação), sensor de poeira/fuligem (poeira em flutuação, poeira de sujeira, fuligem, turvação), etc. (consultar, por exemplo, Chem. Soc. Rev., 2015, 44, 3358; Journal of the Korean Chemical Society, 2010, 451-459; Chem. Sci., 2015, 6, 1150–1158; KR 10-1549347; J. Phys. Chem. B 2016, 120, 7053–7061; ACS Appl. Mater. Interfaces 2015, 7, 704–712; J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 10960–10965; J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 20412–20420; Org. Lett. 2014, 16, 1680–1683; J. Org. Chem. 2013, 78, 702-705; J. Org. Chem. 2015, 80, 12129–12136; ACS Macro Lett. 2014, 3, 1191–1195; New J. Chem., 2012, 36, 386-393; Chem. Commun., 2010, 46, 6575-6577; 2013).

[00694] Um comutador molecular é uma molécula que pode ser reversivelmente comutada entre dois ou mais estados estáveis. As moléculas podem ser comutadas entre estados em resposta a estímulos ambientais, tais como alterações em ambiente químico (tal como pH), irradiação de luz (por exemplo, luz de um comprimento de onda particular), temperatura, uma corrente elétrica, microambiente ou a presença de um ligante. Em alguns casos, a comutação entre estados pode ser dependente de uma combinação de estímulos. As formas mais antigas de comutadores moleculares sintéticos são indicadores de pH, que exibem cores distintas como uma função de pH. Os comutadores moleculares sintéticos podem ser aplicados em computadores moleculares ou sistemas de liberação de fármaco responsivos. Os comutadores moleculares são também importantes devido ao fato de que muitas funções biológicas são baseadas nos mesmos, por exemplo, visão e regulação alostérica.

[00695] Tais biossensores, sensores químicos e comutadores moleculares podem compreender, ainda, porções químicas fotorreativas

adicionais, tal como rodamina, vermelho de fenol, corante azo laranja, vermelho papa, cianina não sulfonatada, cianina sulfonatada, sensor de fluoreto quimioluminescente (derivado de 1,2-dioxetano) e corantes D2A (corantes de fluorescência NIR). Alternativamente, a porção química fotorreativa pode ser selecionada a partir de um composto que tem grupos funcionais e estruturas similares ao seguinte:



[00696] em que:

[00697] R_{100} é H ou C_1-C_6 alquila;

[00698] R_{101} é H ou SO_3H ; R_{102} é C_1-C_6 alquila ou $-(CH_2)_zCOOH$;

[00699] z é um número inteiro de 3 a 8;

[00700] R_{103} e R_{104} são, cada um, independentemente, H ou C_1-C_6 alquila; e

[00701] R_{105} e R_{106} são, cada um, independentemente, hidrogênio, $COOH$ ou SO_3H .

[00702] Porções químicas fotorreativas adicionais são conhecidas na técnica. Consultar, por exemplo, Org. Lett. 2014, 16, 1680-1683; J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 10960–10965; Dye Lasers, 3rd Ed. (Springer-Verlag, Berlin, 1990); J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 20412-20420).

MÉTODOS DE TRATAMENTO

TRATAMENTOS ORIENTADOS PARA ALVO

[00703] A porção química de alvejamento do conjugado pode ser reconhecida por uma célula, fornecendo, assim, um assim chamado tratamento orientado para alvo.

[00704] Em algumas modalidades, o conjugado compreende um agente ativo para uso em um tratamento orientado para alvo para tratar uma doença autoimune. Em algumas tais modalidades, o agente ativo é selecionado dentre: ciclosporina, ciclosporina A, micofenilato mofetil, sirolimo, tacrolimo, enanercepte, prednisona, azatioprina, metotrexato ciclofosfamida, ácido aminocaproico, cloroquina, hidroxiclo- roquina, hidrocortisona, dexametasona, clororambucila, DHEA, dana- zol, bromocriptina, meloxicam, infliximab, etc.

[00705] Em algumas modalidades, o composto compreende um agente ativo Q para uso em um tratamento orientado para alvo para tratar uma doença infecciosa. Em algumas tais modalidades, Q é sele- cionado dentre: séries de beta-lactama (penicilina G, penicilina V, cloxacilina, dicloxacilina, meticilina, nafcilina, oxacilina, ampicilina, amoxicilina, becampicilina, azlocilina, carbenicilina, mezlocilina, piper- racilina, ticarcilina), séries de aminoglicosídeo (amicacina, gentamici- na, canamicina, neomicina, netilmicina, estreptomicina, tobramicina), séries de macrolídeo (azithromicina, claritromicina, eritromicina, linc- micina, clindamicina), séries de tetraciclina (demeclociclina, doxicilina, minociclina, tetraciclina), séries de quinolona (cinoxacina, ácido nali- dístico), séries de fluoroquinolona (ciprofloxacina, enoxacina, grepa- floxacina, levofloxacina, lomefloxacina, norfloxacina, ofloxacina, espar- floxacina, trovafloxicina), séries de polipeptídeo (bacitracina, colistina, polimixina B), séries de sulfonamida (sulfisoxazol, sulfametoxazol, sul- fadiazina, sulfametizol, sulfacetamida), outros antibióticos (trimetoprim, silfametazol, cloranfenicol, vancomicina, metronidazol, quinupristina, dalfopristina, rifampicina, espectinomicina, nitrofurantoína), agente an-

tiviral geral (idoxuradina, vidarabina, aciclovir, famciclovir, penciclovir, valaciclovir, ganciclovir, foscarnet, ribavirina, amantadina, rimantadina, cidofovir, oligonucleotídeos antissenso, imunoglobulinas, interferonas), agente terapêutico para infecção por HIV (tenofovir, entricitabina, zidovudina, didanosina, zalcitabina, estavudina, lamivudina, nevirapina, delaviridina, saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir), etc.

[00706] Em algumas modalidades, os compostos e conjugados divulgados no presente documento compreendem um agente ativo Q para uso em um método para liberar um agente ativo para uma célula para tratar um tumor, em que a porção química de alvejamento é selecionada para ligação com uma célula-alvo (isto é, uma célula cancerosa). Em particular, os presentes compostos, conjugados e composições podem ser úteis para inibir a proliferação de células anormais ou tratar um distúrbio proliferativo em um mamífero (por exemplo, um ser humano), tal como quando a célula-alvo é uma célula cancerosa e a porção química de alvejamento é selecionada para se ligar a uma molécula associada à célula cancerosa (e não associada a células saudáveis ou pelo menos, de preferência, associada a células tumorais em vez de células saudáveis).

[00707] Em algumas tais modalidades, o agente ativo é selecionado dentre: um agente citotóxico ou imunomodulador, um agente anticâncer, um agente antitubulina, um agente citotóxico, etc. De preferência, o agente citotóxico ou imunomodulador inclui um agente antitubulina, auristatina, um ligante de sulco menor de DNA, um inibidor de transcrição de DNA, um agente alquilante, antraciclina, antibiótico, antifolato, antimetabólito, um inibidor de calmodulina, um sensibilizador a quimioterapia, duocarmicina, etoposídeo, pirimidina fluorada, ionóforo, lexitropsina, maitansinoide, nitrosourea, platinol, um composto formador de poro, antimetabólito de purina, puromicina, sensibilizador a radiação, rapamicina, esteroide, taxano, inibidor de topoisomerase, vinca

alcaloide, etc.; o agente anticâncer inclui metotrexato, taxol, L-asparaginase, mercaptopurina, tioguanina, hidroxureia, citarabina, ciclofosfamida, ifosfamida, nitrosoureas, cisplatina, carboplatina, mitomicina, dacarbazina, procarbizina, topotecano, mortardas de nitrogênio, citoxano, etoposídeo, 5-fluorouracila, BCNU, irinotecano, camptotecinas, bleomicina, doxorubicina, idarubicina, daunorubicina, dactinomicina, plicamicina, mitoxantrona, asparaginase, vinblastina, vincristina, vinorelbina, paclitaxel, docetaxel, etc.; o agente antitubulina inclui taxano (por exemplo, paclitaxel, docetaxel), T67, vinca alquiloide (por exemplo, vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina), um derivado de baccatina, um derivado de taxano, epotiolona (por exemplo, epotiolona A, epotiolona B), nocodazol, colquicina, colcimid, estramustina, critofininas, cemadotina, maitansinoides, combrestatinas, discodermolida, eleuterobina, um derivado de auristatina (AFP, MMAF, MMAE), etc.; o agente citotóxico inclui androgênio, antramicina (AMC), asparaginase, 5-azacitidina, azatioprina, bleomicina, bussulfano, butionina sulfoximina, caliqueamicina, derivado de caliqueamicina, camptotecina, carboplatina, carmustina (BSNU), CC-1065, clorambucina, cisplatina, colquicina, ciclofosfamida, citarabina, citidina arabinoside, citocalasina B, dacarbazina, dactinomicina (actinomicina), daunorubicina, decarbazina, DM1, DM4, docetaxel, doxorubicina, etoposídeo, estrogênio, 5-fluordesoxiuridina, 5-fluorouracila, gencitabina, gramicidina D, hidroxureia, idarubicina, ifosfamida, irinotecano, lomustina (CCNU), maitansina, mecloretamina, melfalano, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitramicina, mitomicina C, mitoxantrona, nitroimidazol, paclitaxel, palitoxina, plicamicina, procarbizina, rizoxina, estreptozotocina, tenoposídeo, 6-tioguanina, tioTEPA, topotecano, vinblastina, vincristina, vinorelbina, VP-16, VM-26; ligante de sulco menor de DNA (por exemplo, enediina, lexitropsina, composto CBI), duocarmicina, taxano (por exemplo, paclitaxel, docetaxel), puromicinas, vinca alcaloides, CC-1065, SN-38, to-

potecano, morfolino-doxorubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorubicina, equinomicina, combretastatina, netropsina, epotilona A, epotilona B, estramustina, criptoficinas, cemadotina, maitansinoides, discodermolida, eleutherobina, mitoxantrona, etc..

PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE

[00708] Os compostos e conjugados divulgados no presente documento podem ser usados em métodos para induzir a apoptose em células.

[00709] A apoptose desregulada foi implicada em uma variedade de doenças, incluindo, por exemplo, distúrbios autoimunes (por exemplo, lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, doença de enxerto-contrahospedeiro, miastenia grave ou síndrome de Sjögren), infecções inflamatórias crônicas (por exemplo, psoríase, asma ou doença de Crohn), distúrbios de hiperproliferação (por exemplo, câncer de mama, câncer de pulmão), infecções virais (por exemplo, herpes, papiloma ou HIV) e outras afecções, tal como osteoartrite e aterosclerose. Os compostos, conjugados e composições descritos no presente documento podem ser usados para tratar ou atenuar qualquer uma dessas doenças. Tais tratamentos, de modo geral, envolvem administrar a um indivíduo que sofre da doença uma quantidade de um composto, conjugado ou composição descrita no presente documento suficiente para fornecer o benefício terapêutico. A identidade do anticorpo do composto, conjugado ou composição administrada dependerá da doença que é tratada—assim, o anticorpo deve se ligar a um antígeno de superfície celular expresso no tipo de célula em que a inibição seria benéfica. O benefício terapêutico atingido também dependerá da doença específica que é tratada. Em certos casos, os compostos e composições divulgados no presente documento podem tratar ou atenuar a própria doença, ou sintomas da doença, quando administradas como monoterapia. Em outros casos, os compostos e composições divulga-

dos no presente documento podem ser parte de um regime de tratamento global, incluindo outros agentes que, juntamente com o inibidor ou os compostos e composições divulgados no presente documento, tratam ou atenuam a doença que é tratada, ou sintomas da doença. Os agentes úteis para tratar ou atenuar doenças específicas que podem ser administrados adjuvante a, ou com, os compostos e composições divulgados no presente documento serão evidentes àqueles versados na técnica.

[00710] Embora a cura absoluta seja sempre desejável em qualquer regime terapêutico, atingir uma cura não é necessário para fornecer benefício terapêutico. O benefício terapêutico pode incluir interromper ou retardar a progressão da doença, retroceder a doença sem curar e/ou atenuar ou retardar a progressão de sintomas da doença. Sobrevida prolongada em comparação com médias estatísticas e/ou qualidade de vida melhorada podem ser também consideradas benefício terapêutico.

[00711] Uma classe particular de doenças que envolvem apoptose desregulada e que são uma carga de saúde significativa em todo o mundo são cânceres. Em uma modalidade específica, os compostos e as composições divulgados no presente documento podem ser usados para tratar cânceres. O câncer pode ser, por exemplo, tumores sólidos ou tumores hematológicos. Os cânceres que podem ser tratados com os compostos e composições divulgados no presente documento incluem, porém sem limitação, câncer de bexiga, câncer cerebral, câncer de mama, câncer de medula óssea, câncer cervical, leucemia linfocítica crônica, câncer colorretal, câncer de esôfago, câncer hepatocelular, leucemia linfoblástica, linfoma folicular, malignidades linfoides de origem em célula T ou célula B, melanoma, leucemia mielógena, mieloma, câncer oral, câncer de ovário, câncer de pulmão de célula não pequena, leucemia linfocítica crônica, mieloma, câncer de prósta-

ta, câncer de pulmão de célula pequena e câncer de baço. Os compostos e as composições divulgados no presente documento podem ser especificamente benéficos no tratamento de cânceres devido ao fato de que o anticorpo pode ser usado para alvejar célula tumoral especificamente, evitando ou atenuando, assim, potencialmente efeitos colaterais e/ou toxicidades indesejáveis que podem estar associados à administração sistêmica de inibidores não conjugados. Uma modalidade se refere a um método para tratar uma doença que envolve apoptose intrínseca desregulada que compreende administrar a um sujeito que tem uma doença que envolve apoptose desregulada uma quantidade de um composto e uma composição divulgados no presente documento eficaz para fornecer benefício terapêutico, em que o ligante dos compostos e composições divulgados no presente documento se liga a um receptor de superfície celular em uma célula cuja apoptose intrínseca está desregulada. Uma modalidade se refere a um método para tratar câncer que compreende administrar a um indivíduo que tem câncer um composto e uma composição divulgados no presente documento, em que o ligante é capaz de se ligar a um receptor de superfície celular ou um antígeno associado a tumor expresso na superfície das células cancerosas, em uma quantidade eficaz para fornecer benefício terapêutico.

[00712] No contexto de cânceres tumorigênicos, benefício terapêutico, além de incluir os efeitos discutidos acima, pode também incluir especificamente interromper ou retardar a progressão de crescimento tumoral, retroceder o crescimento tumoral, erradicar um ou mais tumores e/ou aumentar a sobrevida do paciente em comparação com as médias estatísticas para o tipo e estágio do câncer que tratado. Em uma modalidade, o câncer que é tratado é um câncer tumorigênico.

[00713] Os compostos e conjugados divulgados no presente documento podem ser administrados como monoterapia para fornecer be-

nefício terapêutico ou podem ser administrados adjunto a ou com outros agentes quimioterápicos e/ou radioterapia. Os agentes quimioterápicos com os quais os compostos e composições divulgados no presente documento podem ser utilizados como terapia adjunta podem ser alvejados (por exemplo, ADCs, inibidores de proteína quinase, etc.) ou não alvejados (por exemplo, agentes citotóxicos não específicos, tais como radionucleotídeos, agentes alquilantes e agentes intercalantes). Os agentes quimioterápicos não alvejados com os quais os compostos e composições divulgados no presente documento podem ser administrados de modo adjunto incluem, porém sem limitação, metotrexato, taxol, L-asparaginase, mercaptopurina, tioguanina, hidroxiureia, citarabina, ciclofosfamida, ifosfamida, nitrosoureas, cisplatina, carboplatina, mitomicina, dacarbazina, procarbizina, topotecano, mostardas de nitrogênio, Citoxano, etoposídeo, 5-fluorouracila, BCNU, irinotecano, camptotecinas, bleomicina, doxorubicina, idarubicina, daunorubicina, dactinomicina, plicamicina, mitoxantrona, asperaginase, vinblastina, vincristina, vinorelbina, paclitaxel, caliqueamicina e docetaxel.

[00714] Os compostos e os conjugados divulgados no presente documento que podem não ser eficazes como monoterapia para tratar câncer podem ser administrados adjuntos a ou com outros agentes quimioterápicos ou radioterapia para fornecer benefício terapêutico. Uma modalidade se refere a um método em que um composto ou composição divulgados no presente documento é administrado em uma quantidade eficaz de sensibilizar as células tumorais a quimioterapia e/ou radioterapia padrão. Consequentemente, no contexto de tratamento de cânceres, "benefício terapêutico" inclui administrar os compostos e composições divulgados no presente documento adjuntos a ou com agentes quimioterápicos e/ou radioterapia, em pacientes que não começaram ainda tal terapia ou que têm ou não exibiram ain-

da sinais de resistência ou em pacientes que começaram a exibir sinais de resistência, como um meio de sensibilizar os tumores à quimioterapia e/ou radioterapia.

COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E ADMINISTRAÇÃO DAS MESMAS

[00715] Os compostos e conjugados divulgados no presente documento podem ser utilizados para tratar um indivíduo que precisa do mesmo. Em certas modalidades, o indivíduo é um mamífero, tal como um ser humano ou um mamífero não humano. Quando administrada a um animal, tal como um ser humano, a composição ou o composto é, de preferência, administrado como uma composição farmacêutica que compreende, por exemplo, um composto divulgado e um veículo farmacêuticamente aceitável.

[00716] Veículos farmacêuticamente aceitáveis são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, soluções aquosas tais como água ou solução salina fisiologicamente tamponada ou outros solventes ou veículos tais como glicóis, glicerol, óleos tal como azeite de oliva ou ésteres orgânicos injetáveis. Nas modalidades preferenciais, quando tais composições farmacêuticas são para administração humana, particularmente para rotas invasivas de administração (isto é, rotas, tais como injeção ou implantação, que envolvem transporte ou difusão através de uma barreira epitelial), a solução aquosa é livre de pirogênio ou substancialmente livre de pirogênio. Os excipientes podem ser escolhidos, por exemplo, para efetuar liberação retardada de um agente ou para alvejar seletivamente uma ou mais células, tecidos ou órgãos. A composição farmacêutica pode estar em uma forma unitária de dosagem tal como tablete, cápsula (incluindo cápsula dispersível e cápsula de gelatina), grânulo, liófilo para reconstituição, pó, solução, xarope, supositório, injeção ou similares. A composição pode também estar presente em um sistema de liberação transdérmico, por

exemplo, um emplastro de pele. A composição pode estar também presente em uma solução adequada para administração tópica, tal como uma pomada ou creme.

[00717] Um veículo farmacologicamente aceitável pode conter agentes fisiologicamente aceitáveis que atuam, por exemplo, para estabilizar, aumentar a solubilidade ou para aumentar a absorção de um composto tal como um composto da invenção. Tais agentes fisiologicamente aceitáveis incluem, por exemplo, carboidratos, tais como glicose, sacarose ou dextranas, antioxidantes, tais como ácido ascórbico ou glutathione, agentes quelantes, proteínas de baixo peso molecular ou outros estabilizantes ou excipientes. A escolha de um veículo farmacologicamente aceitável, incluindo um agente fisiologicamente aceitável, depende, por exemplo, da rota de administração da composição. A preparação de composição farmacêutica pode ser um sistema de distribuição de fármaco autoemulsificante ou um sistema de distribuição de fármaco automicroemulsificante. A composição farmacêutica (preparação) também pode ser um lipossoma ou outra matriz polimérica, que pode ter incorporado na mesma, por exemplo, um composto da invenção. Lipossomas, por exemplo, que compreendem fosfolípidios ou outros lípidos, são veículos fisiologicamente aceitáveis e metabolizáveis não tóxicos que são relativamente simples de fabricar e administrar.

[00718] A expressão "farmacologicamente aceitável" é empregada no presente documento para referir-se àqueles compostos, materiais, composições, e/ou formas de dosagem que estão contidas no escopo do julgamento médico do parecer, adequados para o uso em contato com os tecidos de indivíduos humanos e indivíduos animais sem excesso de toxicidade, irritação, resposta alérgica, ou outro problema ou complicação, comensurável com uma razão benefício/risco razoável.

[00719] A expressão "veículo farmacologicamente aceitável" confor-

me usado no presente documento significa um material composição ou veículo farmacêuticamente aceitável, tal como um líquido ou uma carga sólida, diluente, excipiente, solvente ou material de encapsulação. Cada veículo precisa ser "aceitável" no sentido de ser compatível com os outros ingredientes da formulação e não prejudicial ao paciente. Alguns exemplos de materiais que podem servir como veículos farmacêuticamente aceitáveis incluem: (1) açúcares, como lactose, glicose e sacarose; (2) amidos, como amido de milho e amido de batata; (3) celulose, e seus derivados, como carboximetilcelulose de sódio, etilcelulose e acetato de celulose; (4) tragacanto em pó; (5) malte; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, como manteiga de coco e ceras de supositório; (9) óleos, como óleo de amendoim, óleo de semente de algodão, óleo de cártamo, óleo de sésamo, óleo de oliva, óleo de milho e óleo de soja; (10) glicóis, como propileno glicol; (11) polióis, como glicerina, sorbitol, manitol e polietileno glicol; (12) ésteres, como oleato de etila e laurato de etila; (13) ágar; (14) agentes de tamponamento, como hidróxido de magnésio e hidróxido de alumínio; (15) ácido algínico; (16) água sem pirogênios; (17) solução salina isotônica; (18) solução de Ringer; (19) álcool etílico; (20) soluções tampão de fosfato; e (21) outras substâncias compatíveis não tóxicas empregadas em formulações farmacêuticas.

[00720] A composição farmacêutica (preparação) pode ser administrada a um indivíduo por qualquer uma de inúmeras rotas de administração incluindo, por exemplo, por via oral (por exemplo, umedecidas como um soluções ou suspensões não aquosas ou aquosas, tabletes, cápsulas (incluindo cápsulas dispersíveis e cápsulas de gelatina), bolus, pós, grânulos, pastas para aplicação à língua); absorção através da mucosa oral (por exemplo, sublingual); por via anal, retal ou vaginal (por exemplo, como um pessário, creme ou espuma); por via parenteral (incluindo intramuscular, intravenosa, subcutânea ou por via intra-

tecal, como, por exemplo, uma solução ou suspensão estéril); por via nasal; por via intraperitoneal; por via subcutânea; por via transdérmica (por exemplo, como um emplastro aplicado à pele); e por via tópica (por exemplo, como um creme, pomada ou aspersão aplicada à pele ou como um colírio). O composto pode também ser formulado para inalação. Em certas modalidades, um composto pode ser simplesmente dissolvido ou suspenso em água estéril. Detalhes de rotas de administração apropriadas e composições adequadas para as mesmas podem ser encontradas, por exemplo, nas Patentes U.S. nº 6.110.973, 5.763.493, 5.731.000, 5.541.231, 5.427.798, 5.358.970 e 4.172.896, bem como em patentes citadas nas mesmas.

[00721] As formulações podem ser convenientemente apresentadas em forma de dosagem unitária e podem ser preparadas por meio de qualquer método bem conhecido na técnica da farmácia. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinado com um material veículo para produzir uma forma de dosagem única irá variar dependendo do hospedeiro sendo tratado, do modo particular de administração. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinado com um material veículo para produzir uma forma de dosagem única será geralmente aquela quantidade do composto que produz um efeito terapêutico. Geralmente, de cem por cento, esta quantidade estará na faixa de cerca de 1 por cento a cerca de noventa e nove por cento de ingrediente ativo, preferencialmente de cerca de 5 por cento a cerca de 70 por cento, com máxima preferência de cerca de 10 por cento a cerca de 30 por cento.

[00722] Métodos de preparo destas formulações ou composições incluem a etapa de colocar em associação um composto ativo, tal como um composto da invenção, com o veículo e, opcionalmente, um ou mais ingredientes acessórios. Em geral, as formulações são preparadas associando de modo uniforme e profundo um composto da pre-

sente invenção a veículos líquidos ou veículos sólidos finamente divididos ou ambos e, então, se for necessário, conformando o produto.

[00723] Formulações da invenção adequadas para administração oral podem estar sob a forma de cápsulas (incluindo cápsulas dispersíveis e cápsulas de gelatina), hóstias, pílulas, tabletes, losangos (usando uma base flavorizada, geralmente sacarose e acácia ou tragacanto), líofilo, pós, grânulos ou como uma solução ou uma suspensão em um líquido aquoso ou não aquoso ou como uma emulsão de óleo em água ou de água em óleo ou como um elixir ou xarope ou como pastilhas (usando uma base inerte, tal como gelatina e glicerina ou sacarose e acácia) e/ou como colutório bucal e similares, cada um contendo uma quantidade predeterminada de um composto da presente invenção como um ingrediente ativo. Compostos, conjugados ou composições dos mesmos podem ser também administrados como um bolus, electuário ou pasta.

[00724] Para preparar formas de dosagem sólidas para administração oral (cápsulas (incluindo cápsulas dispersíveis e cápsulas de gelatina), tabletes, pílulas, drágeas, pós, grânulos e similares), o ingrediente ativo é misturado com um ou mais veículos farmacêuticamente aceitáveis, tais como citrato de sódio ou fosfato de dicálcio e/ou qualquer um dos seguintes: (1) cargas ou extensores, tais como amidos, lactose, sacarose, glicose, manitol e/ou ácido silícico; (2) aglutinantes, tais como, por exemplo, carboximetilcelulose, alginatos, gelatina, polivinil pirrolidona, sacarose e/ou acácia; (3) umectantes, tais como glicerol; (4) agentes de desintegração, tais como ágar-ágar, carbonato de cálcio, amido de batata ou tapioca, ácido algínico, certos silicatos e carbonato de cálcio; (5) agentes retardantes de solução, tais como parafina; (6) aceleradores de absorção, tais como compostos de amônio quaternário; (7) agentes umectantes, tais como, por exemplo, álcool cetílico e monostearato de glicerol; (8) absorventes, tais como caulim e

argila de bentonita; (9) lubrificantes, tais como talco, estearato de cálcio, estearato de magnésio, polietileno glicóis sólidos, lauril sulfato de sódio e misturas dos mesmos; (10) agentes de complexação, tais como, ciclodextrinas modificadas e não modificadas; e (11) agentes de coloração. No caso de cápsulas (incluindo cápsulas dispersíveis e cápsulas de gelatina), tabletes e pílulas, as composições farmacêuticas podem também compreender agentes de tamponamento. Composições sólidas de um tipo similar podem também ser empregadas como cargas em cápsulas de gelatina com carga macia ou dura usando tais excipientes como lactose ou açúcares de leite, bem como polietileno glicóis de alto peso molecular e similares.

[00725] Um tablete pode ser feito por compressão ou moldagem, opcionalmente com um ou mais ingredientes acessórios. Tabletes comprimidos podem ser preparados usando aglutinante (por exemplo, gelatina ou hidroxipropilmetil celulose), lubrificante, diluente inerte, conservante, desintegrante (por exemplo, glicolato de amido de sódio ou carboximetil celulose de sódio reticulado), agente de ativo de superfície ou dispersante. Tabletes moldados podem ser fabricados pela moldagem, em uma máquina adequada, de uma mistura do composto em pó umedecido com um diluente líquido inerte.

[00726] Os tabletes e outras formas de dosagem sólidas das composições farmacêuticas, tais como drágeas, cápsulas (incluindo cápsulas dispersíveis e cápsulas de gelatina), pílulas e grânulos, podem opcionalmente ser classificados ou preparados com revestimentos e cascas, tais como revestimentos entéricos e outros revestimentos bem conhecidos na técnica de formulação de farmacêuticos. Os mesmos podem também ser formulados de modo a fornecer liberação lenta ou controlada do ingrediente ativo nisto usando, por exemplo, hidroxipropilmetil celulose em proporções variadas para fornecer o perfil de liberação desejado, outras matrizes poliméricas, lipossomas e/ou microes-

feras. Os mesmos podem ser esterilizados, por exemplo, por filtração através de uma carga de retenção de bactérias ou incorporando agentes esterilizantes sob a forma de composições sólidas estéreis que podem ser dissolvidas em água estéril ou algum outro meio injetável estéril imediatamente antes do uso. Estas composições podem também opcionalmente conter agentes opacificantes e podem ser de uma composição que as mesmas liberam o ingrediente ativo (ou ingredientes) sozinho ou preferencialmente, em uma certa porção do trato gastrointestinal, opcionalmente, de maneira atrasada. Exemplos de composições de incorporação que podem ser usadas incluem substâncias poliméricas e ceras. O ingrediente ativo pode também estar em forma microencapsulada, se adequado, com um ou mais dos excipientes descritos acima.

[00727] Formas de dosagem líquidas úteis para administração oral incluem emulsões farmaceuticamente aceitáveis, liófilos para reconstituição, microemulsões, soluções, suspensões, xaropes e elixires. Além do ingrediente ativo, as formas de dosagem líquidas podem conter diluentes inertes comumente usados na técnica, tais como, por exemplo, água ou outros solventes, ciclodextrinas e derivados dos mesmos, agentes solubilizantes e emulsificantes, tais como álcool etílico, álcool isopropílico, carbonato de etila, acetato de etila, álcool benzílico, benzoato de benzila, propileno glicol, 1,3-butileno glicol, óleos (em particular, óleos de semente de algodão, amendoim, milho, gérmen, oliva, rícino e gergelim), glicerol, álcool de tetra-hidrofurila, polietileno glicóis e ésteres de ácido graxo de sorbitano e misturas dos mesmos.

[00728] Além de diluentes inertes, as composições orais podem também incluir adjuvantes tais como agentes umectantes, agentes emulsificantes e de suspensão, agentes adoçantes, flavorizantes, colorantes, aromatizantes e conservantes.

[00729] Suspensões, além dos compostos ativos, podem conter

agentes de suspensão como, por exemplo, álcoois de isostearila etoxilados, polioxietileno sorbitol e ésteres de sorbitano, celulose microcristalina, meta-hidróxido de alumínio, bentonita, ágar-ágar e tragacanto e misturas dos mesmos.

[00730] Formulações das composições farmacêuticas para administração retal, vaginal ou uretral podem ser apresentadas como um supositório, que pode ser preparado misturando um ou mais compostos ativos com um ou mais excipientes ou veículos não irritantes adequados compreendendo, por exemplo, manteiga de cacau, polietileno glicol, uma cera de supositório ou um salicilato e que é sólido à temperatura ambiente, mas líquido à temperatura corporal e, portanto, irá se fundir no reto ou na cavidade vaginal e liberar o composto ativo.

[00731] Formulações das composições farmacêuticas para administração na boca podem ser apresentadas como um colutório bucal ou uma aspensão oral ou uma pomada oral.

[00732] Alternativa ou adicionalmente, composições podem ser formuladas para liberação através de um cateter, stent, fio ou outro dispositivo intraluminal. A distribuição através de tais dispositivos pode ser especialmente útil para distribuição para a bexiga, uretra, uréter, reto ou intestino.

[00733] Formulações que são adequadas para administração vaginal também incluem pessários, absorventes internos, cremes, géis, pastas, espumas ou formulações de aspensão contendo tais veículos como são conhecidos na técnica por serem apropriados.

[00734] Formas de dosagem para a administração tópica ou transdérmica incluem pós, aspensões, pomadas, pastas, cremes, loções, géis, soluções, emplastros e inalantes. O composto ativo pode ser misturado sob condições estéreis com um veículo farmaceuticamente aceitável e com quaisquer conservantes, tampões ou propelentes que podem ser exigidos.

[00735] As pomadas, pastas, cremes e géis podem conter, além de um composto ativo, excipientes, tais como gordura animal e vegetal, óleos, ceras, parafinas, amido, tragacanto, derivados de celulose, polietileno glicóis, silicones, bentonitas, ácido silícico, talco e óxido de zinco ou misturas dos mesmos.

[00736] Pós e aspersões podem conter, além de um composto ativo, excipientes tais como lactose, talco, ácido silícico, hidróxido de alumínio, silicatos de cálcio e pó de poliamida ou misturas destas substâncias. Aspersões podem adicionalmente conter propelentes habituais, tais como clorofluoro-hidrocarbonetos e hidrocarbonetos não substituídos voláteis, tais como butano e propano.

[00737] Emplastos transdérmicos têm a vantagem adicionada de fornecer distribuição controlada de um composto da presente invenção para o corpo. Tais formas de dosagem podem ser feitas dissolvendo ou dispersando o composto ativo no meio apropriado. Acentuadores de absorção podem também ser usados para aumentar o fluxo do composto na pele. A taxa de tal fluxo pode ser controlada ou fornecendo uma membrana de controle de taxa ou dispersando o composto em uma matriz polimérica ou gel.

[00738] Formulações oftálmicas, pomadas para olho, pós, soluções e similares, são também contempladas como estando dentro do escopo desta invenção. Formulações oftálmicas exemplificativas são descritas na Publicação U.S. nº 2005/0080056, 2005/0059744, 2005/0031697 e 2005/004074; e Patente U.S. nº 6.583.124, cujo conteúdo está incorporado ao presente documento a título de referência. Se for desejado, formulações oftálmicas líquidas têm propriedades similares àsquelas de fluidos lacrimais, humor aquoso ou humor vítreo ou são compatíveis com tais fluidos.

[00739] Os sintagmas "administração parenteral" e "administrado parenteralmente" conforme usado no presente documento significam

modos de administração além da administração enteral e tópica, geralmente por injeção e incluem, sem limitação, injeção e infusão intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnoide, intraspinal e intrasternal.

[00740] Composições farmacêuticas adequadas para administração parenteral compreendem um ou mais compostos ativos em combinação com uma ou mais soluções aquosas ou não aquosas isotônicas estéreis farmacêuticamente aceitáveis, dispersões, suspensões ou emulsões ou pós estéreis que podem ser reconstituídas em soluções ou dispersões injetáveis estéreis logo antes do uso, que podem conter antioxidantes, tampões, bacteriostatos, solutos que tornam a formulação isotônica com o sangue do recipiendário previsto ou agentes de suspensão ou espessantes.

[00741] Exemplos de veículos aquosos e não aquosos adequados que podem ser empregados nas composições farmacêuticas da invenção incluem água, etanol, polióis (tais como glicerol, propileno glicol, polietileno glicol e similares) e misturas adequadas dos mesmos, óleos vegetais, tais como óleo de oliva e ésteres orgânicos injetáveis, tais como oleato de etila. A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, usando materiais de revestimento, tais como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula exigido, no caso de dispersões, e pelo uso de tensoativos.

[00742] Estas composições podem também conter adjuvantes tais como conservantes, agentes umectantes, agentes de emulsificação e agentes dispersantes. A prevenção da ação de micro-organismos pode ser assegurada pela inclusão de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico e similares. Pode ser desejável incluir agentes isotônicos, tais como

açúcares, cloreto de sódio e similares nas composições. Além disto, a absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser provocada pela inclusão de agentes que atrasam a absorção tais como monoestearato de alumínio e gelatina.

[00743] Em alguns casos, a fim de prolongar o efeito de um fármaco, é desejável reduzir a absorção do fármaco de injeção intramuscular ou subcutânea. Isto pode ser realizado pelo uso de uma suspensão líquida de material cristalino ou amorfo tendo solubilidade em água ruim. A taxa de absorção do fármaco depende, então, de sua taxa de dissolução, que, por sua vez, pode depender do tamanho do cristal e da forma cristalina. Alternativamente, a absorção atrasada de uma forma de fármaco parenteralmente administrada é realizada dissolvendo ou suspendendo o fármaco em um veículo oleoso.

[00744] Formas de depósito injetáveis são feitas formando matrizes microencapsuladas dos compostos expostos em polímeros biodegradáveis tais como polilactídeo-poliglicósídeo. Dependendo da razão entre fármaco e polímero e da natureza do polímero particular empregado, a taxa de liberação de fármaco pode ser controlada. Exemplos de outros polímeros biodegradáveis incluem poli(ortoésteres) e poli(anidridos). Formulações injetáveis de depósito são também preparadas aprisionando o fármaco em lipossomas ou microemulsões que são compatíveis com o tecido corporal.

[00745] Para uso nos métodos desta invenção, compostos ativos podem ser dados por si só ou como uma composição farmacêutica contendo, por exemplo, 0,1 a cerca de 99,5% (mais preferencialmente, 0,5 a cerca de 90,0%) de ingrediente ativo em combinação com um veículo farmaceuticamente aceitável.

[00746] Em algumas modalidades da invenção, um composto da invenção é administrado conjuntamente com um ou mais compostos/agentes adicionais.

[00747] Em certas tais modalidades, a administração conjunta é simultânea. Em certas tais modalidades, o composto da invenção é co-formulado com um ou mais compostos adicionais. Em certas outras tais modalidades, o composto da invenção é administrado separadamente, mas simultaneamente com um ou mais compostos adicionais. Em certas tais modalidades, a administração conjunta é sequencial, com administração do composto da invenção precedendo ou seguindo a administração do um ou mais compostos adicionais por minutos ou horas.

[00748] Métodos de introdução de um composto da invenção podem ser também fornecidos por dispositivos recarregáveis ou biodegradáveis. Vários dispositivos poliméricos de liberação lenta foram desenvolvidos e testados in vivo nos últimos anos para a distribuição controlada de fármacos, incluindo biofarmacêuticos proteináceos. Uma variedade de polímeros biocompatíveis (incluindo hidrogéis), incluindo tanto polímeros biodegradáveis como não degradáveis, pode ser usada para formar um implante para a liberação sustentada de um composto em um local-alvo particular.

[00749] Níveis de dosagem reais dos ingredientes ativos nas composições farmacêuticas podem ser variados de modo a obter uma quantidade do ingrediente ativo que é eficaz para alcançar a resposta terapêutica desejada para um paciente particular, composição e modo de administração, sem ser tóxico para o paciente.

[00750] O nível de dosagem selecionado irá depender de uma variedade de fatores incluindo a atividade do conjugado composto particular ou combinação de compostos e/ou conjugados empregados ou do éster, sal ou amida do mesmo, da rota de administração, do tempo de administração, da taxa de excreção do composto particular (ou compostos) sendo empregado, da duração do tratamento, de outros fármacos, compostos e/ou materiais usados em combinação com o com-

posto particular (ou compostos) empregado, da idade, sexo, peso, condição, saúde geral e histórico médico anterior do paciente sendo tratado e fatores similares bem conhecidos na técnica médica.

[00751] Um médico ou veterinário tendo habilidade comum na técnica pode prontamente determinar e prescrever a quantidade terapêuticamente eficaz da composição farmacêutica necessária. Por exemplo, o médico ou veterinário pode iniciar doses da composição farmacêutica ou composto em níveis inferiores àqueles exigidos a fim de alcançar o efeito terapêutico desejado e gradualmente aumenta a dosagem até que o efeito desejado seja alcançado. "Quantidade terapêuticamente eficaz" se refere à concentração de um composto que é suficiente para produzir o efeito terapêutico desejado. É geralmente entendido que a quantidade eficaz do composto irá variar de acordo com o peso, sexo, idade e histórico médico do indivíduo. Outros fatores que influenciam na quantidade eficaz podem incluir, sem limitação, a severidade da condição do paciente, o distúrbio sendo tratado, a estabilidade do composto e, se for desejado, outro tipo de agente terapêutico sendo administrado com o composto da invenção. Uma dose total maior pode ser distribuída por múltiplas administrações do agente. Métodos para determinar a eficácia e a dosagem são conhecidos pelos versados na técnica (Isselbacher et al. (1996) Harrison's Principles of Internal Medicine 13^a edição, 1814-1882, incorporado ao presente documento a título de referência).

[00752] Em geral, uma dose diária adequada de um composto ativo usado nas composições e métodos da invenção será aquela quantidade do composto que é a menor dose eficaz para produzir um efeito terapêutico. Tal dose eficaz geralmente dependerá dos fatores descritos acima.

[00753] Se for desejado, a dose diária eficaz do composto ativo ou conjugado pode ser administrada como uma, duas, três, quatro, cinco,

seis ou mais subdoses administradas separadamente em intervalos apropriados ao longo do dia, opcionalmente, em formas de dosagem unitária. Em certas modalidades da presente invenção, o composto ativo pode ser administrado duas ou três vezes ao dia. Em modalidades preferenciais, o composto ativo será administrado uma vez ao dia.

[00754] O paciente que recebe este tratamento é qualquer animal em necessidade, incluindo primatas, em particular, seres humanos e outros mamíferos tais como equinos, gado, suínos e ovelhas; e aves e animais de estimação em geral.

[00755] Em certas modalidades, compostos ou conjugados revelados no presente documento podem ser usados sozinhos ou administrados conjuntamente com outro tipo de agente terapêutico. Conforme usado no presente documento, a expressão "administração conjunta" se refere a qualquer forma de administração de dois ou mais compostos ou conjugados terapêuticos diferentes de tal modo que o segundo composto ou conjugado seja administrado enquanto o composto ou conjugado terapêutico anteriormente administrado ainda seja eficaz no corpo (por exemplo, os dois compostos ou conjugados são simultaneamente eficazes no paciente, que pode incluir efeitos sinérgicos dos dois compostos ou conjugados). Por exemplo, os diferentes compostos ou conjugados terapêuticos podem ser administrados ou na mesma formulação ou em uma formulação separada, concomitante ou sequencialmente. Em certas modalidades, diferentes conjugados ou compostos terapêuticos podem ser administrados dentro de uma hora, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 72 horas, uma semana ou mais um do outro. Assim, um indivíduo que recebe tal tratamento pode se beneficiar de um efeito combinado de diferentes conjugados ou compostos terapêuticos.

[00756] Esta invenção inclui o uso de sais farmacologicamente aceitáveis de compostos ou conjugados revelados no presente documento.

Em certas modalidades, sais contemplados da invenção incluem, sem limitação, sais de alquila, dialquila, trialquila ou tetra-alquil amônio. Em certas modalidades, sais contemplados da invenção incluem, sem limitação, sais de L-arginina, benentamina, benzatina, betaína, hidróxido de cálcio, colina, deanol, dietanolamina, dietilamina, 2-(dietilamino) etanol, etanolamina, etilenodiamina, N-metilglucamina, hidrabamina, 1H-imidazol, lítio, L-lisina, magnésio, 4-(2-hidroxietil)morfolina, piperazina, potássio, 1-(2-hidroxietil)pirrolidina, sódio, trietanolamina, trome-tamina e zinco. Em certas modalidades, sais contemplados da invenção incluem, sem limitação, Na, Ca, K, Mg, Zn ou outros sais metálicos.

[00757] Os sais de adição ácidos farmacêuticamente aceitáveis podem também existir como vários solvatos, tais como com água, metanol, etanol, dimetilformamida e similares. Misturas de tais solvatos podem também ser preparadas. A fonte de tal solvato pode ser do solvente de cristalização, inerente no solvente de preparação ou cristalização ou accidental para tal solvente.

[00758] Agentes umectantes, emulsificantes e lubrificantes, tais como lauril sulfato de sódio e estearato de magnésio, bem como agentes corantes, agentes de liberação, agentes de revestimento, adoçantes, agentes flavorizantes e aromatizantes, conservantes e antioxidantes podem também estar presentes nas composições.

[00759] Exemplos de antioxidantes farmacêuticamente aceitáveis incluem: (1) antioxidantes solúveis em água, tais como ácido ascórbico, cloridrato de cisteína, bissulfato de sódio, metabissulfito de sódio, sulfito de sódio e similares; (2) antioxidantes solúveis em óleo, tais como palmitato de ascorbila, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propila, alfa-tocoferol e similares; e (3) agentes quelantes de metal, tais como ácido cítrico, ácido etilenodiamina tetra-acético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfóri-

co e similares.

[00760] A invenção agora sendo descrita de modo geral, a mesma será mais prontamente entendida por referência aos seguintes exemplos, que estão incluídos meramente para propósitos de ilustração de certos aspectos e modalidades da presente invenção e não se destinam a limitar a invenção.

EXEMPLIFICAÇÃO

PROTOCOLOS SINTÉTICOS

ABREVIações

AcO: acetila

AcOH: ácido acético

EA: acetato de etila

DCM: diclorometano

m-CPBA: ácido meta-cloroperoxibenzoico

TBDMSOTf: triflato de terc-butildimetilsilila

TBDMS: terc-Butildimetilsilila

DMF: Dimetilformamida

EDCI: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

HOBt: Hidrato de 1-hidroxibenzotriazol

ACN: Acetonitrila

TBDMS-Cl: cloreto de terc-butildimetilsilila

DBU: 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno

THF: Tetra-hidrofurano

DCC: N,N'-Diciclo-hexilcarbodiimida

DMAP: 4-Dimetilaminopiridina

NHS: N-hidroxissuccinimida

DIPEA: Di-isopropiletilamina

TEA: trietilamina

DEAD: azodicarboxilato de dietila

Boc: terc-butiloxicarbonila

[00765] A uma solução de composto Int-TG1-1 (260 mg, 0,575 mmol) em DCM (3 ml), foi adicionado m-CPBA (283 mg, 1,149 mmol) a 0°C sob atmosfera de N₂. Após 5 horas, a mistura foi concentrada sob pressão reduzida. Então, EA (50 ml X 2) e uma solução aquosa de bicarbonato de sódio (30 ml) foram adicionados. A camada orgânica obtida foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida para obter o composto Int-TG1-2 (270 mg, quant.). O composto Int-TG1-2 foi usado diretamente na reação seguinte sem purificação.

[00766] RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,18 (s, 1H), 7,90 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,64 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,46 (t, J = 7,6 Hz, 1H), 7,15 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 5,51 (m, 2H), 5,11 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 5,04 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 4,24 (m, 1H), 4,16 (m, 1H), 4,08 (m, 1H), 2,18 (s, 3H), 2,09 (s, 3H), 2,07 (s, 3H), 2,02 (s, 3H). EI-MS m/z: 491(M⁺+Na).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INT-TG1-3

[00767] A uma solução de composto Int-TG1-2 em CHCl₃ (3 ml), foi adicionado hidrato de hidrazina (21 µl, 0,427 mmol) a 0°C sob atmosfera de N₂. Após agitação a 0°C por 0,5 hora, EA (30 ml X 2) e solução aquosa de HCl 1 M (10 ml) foram adicionados. A camada orgânica obtida foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida para obter o composto Int-TG1-3 (161 mg, 86%).

[00768] RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,03 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 6,98-6,95 (m, 2H), 6,83 (t, J = 7,6 Hz, 1H), 6,02 (s, 1H), 5,47 (d, J = 3,2 Hz, 2H), 5,13 (dd, J = 10,8, 2,8 Hz, 1H), 4,93 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 4,26 (m, 1H), 4,19-4,09 (m, 2H), 4,06 (m, 1H), 2,21 (s, 3H), 2,13 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 2,03 (s, 3H). EI-MS m/z: 463(M⁺+Na).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INT-TG1

[00769] A uma solução de composto Int-TG1-3 (161 mg, 0,366 mmol) em DCM (3 ml), foram adicionados Et₃N (102 µl, 0,732 mmol) e TBDMS-OTf (126 µl, 0,549 mmol) a 0°C sob atmosfera de N₂. A mistu-

reação foi bruscamente arrefecida com EA (60 ml × 2) e ácido cítrico (60 ml). A camada orgânica foi extraída com solução aquosa de bicarbonato de sódio (80 ml). A camada orgânica obtida foi seca sobre Na₂SO₄, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para obter o composto Int-TG2-1 (2,56 g, 39 %).

[00772] RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 11,26 (s, 1H), 9,96 (s, 1H), 8,16 (s, 1H), 7,98-7,96 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,04-7,02 (d, J = 9,2 Hz, 1H), 6,91 (s, 1H), 3,68-3,61 (m, 14H), 3,37-3,34 (m, 2H), EI-MS m/z: 367(M⁺).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INT-TG2-2

[00773] A uma solução de composto Int-TG2-1 (1,41 g, 3,85 mmol) e composto Int-TG (1,74 g, 4,24 mmol) em ADC anidro (20 ml), foram adicionados peneira molecular (8 g) e Ag₂O (2,68 g, 11,55 mmol) à temperatura ambiente sob atmosfera de N₂. A mistura foi agitada à temperatura ambiente por 3 horas, então, filtrada por celite. A camada orgânica foi seca sobre Na₂SO₄, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para obter o composto Int-TG2-2 (1,88 g, 70 %).

[00774] RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 10,35 (s, 1H), 8,20-8,17 (m, 2H), 7,26 (s, 1H), 7,20-7,18 (d, J = 9,2 Hz, 1H), 6,96 (s, 1H), 5,63-5,58 (m, 1H), 5,50-5,49 (m, 1H), 5,23-5,21 (m, 1H), 5,18-5,14 (m, 1H), 4,24-4,14 (m, 3H), 3,69-3,64 (m, 14H), 3,37-3,35 (m, 2H), 2,21 (s, 3H), 2,08-2,07 (m, 6H), 2,03 (s, 3H). EI-MS m/z: 697(M⁺).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INT-TG2-3

[00775] A uma solução de composto Int-TG2-2 (1,69 g, 2,42 mmol) em DCM (15 ml), foi adicionado m-CPBA (2,4 g, 9,70 mmol) a 0°C sob atmosfera de N₂. Após agitação por 7 horas a 0°C, a mistura foi bruscamente arrefecida por adição de bicarbonato de sódio saturado (40 ml X 2). A mistura foi separada e as camadas orgânicas foram lavadas

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INT-TG3-1

[00779] A uma solução de salicilaldeído (Aldrich, 200 mg, 1,64 mmol) e composto Bg-Br (813 mg, 1,64 mmol) em acetonitrila (12 ml), foi adicionada peneira molecular seca (1,0 g) e Ag_2O (1,42 g, 4,92 mmol) à temperatura ambiente. A mistura foi agitada de um dia para o outro e água destilada (50 ml) e EA (50 ml X 2) foram adicionados. A camada orgânica foi seca sobre Na_2SO_4 anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para obter o composto Int-TG-3-1 (218 mg, 30 %).

[00780] RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 10,35(s, 1H), 7,86 (dd, $J = 6,0, 1,6$ Hz, 1H), 7,56 (td, $J = 7,6, 1,6$ Hz, 1H), 7,20 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,13 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 5,39-5,31 (m, 3H), 5,27-5,25 (m, 1H), 5,24-4,19 (m, 1H), 3,75 (s, 3H), 2,07-2,04 (m, 9H). EI-MS m/z : 461($\text{M}^+ + \text{Na}$).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INT-TG3-2

[00781] A uma solução de composto Int-TG3-1 (217,6 mg, 0,50 mmol) em DCM (10 ml), foi adicionado m-CPBA (367,1 mg, 1,50 mmol) a 0°C sob atmosfera. A mistura foi agitada de um dia para o outro {a temperatura ambiente, e 40 ml de DCM foram adicionados. A camada orgânica foi lavada com bicarbonato de sódio saturado (10 ml) e seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada, concentrada sob pressão reduzida.

[00782] O resíduo foi dissolvido novamente em CHCl_3 (5 ml). Então, hidrazina (36,2 μl , 0,74 mmol) foi adicionada. Após 30 minutos, DCM (20 ml X 2) e água (10 ml) foram adicionados. A camada orgânica obtida foi seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida, e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para obter o composto Int-TG1-3-2 (195 mg, 92%).

[00783] RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,09(t, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,00-6,95 (m, 2H), 6,83 (td, $J = 6,8, 1,6$ Hz, 1H), 5,38-5,24 (m, 4H), 4,19-4,13 (m, 1H), 3,75 (s, 3H), 2,06-2,02 (m, 9H). EI-MS m/z : 449($\text{M}^+ + \text{Na}$).

cluída, a mistura foi acidificada com HCl 4 M e concentrada para remover CHCl_3 . EA (30 ml X 3), H_2O (20 ml) e salmoura (20 ml) foram adicionados para realizar extração, e a camada orgânica obtida foi seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para obter o composto Int-TG10-1 (408 mg, produto: SM=4:6 por HPLC).

[00811] RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 10,90 (s, 1H), 9,87 (s, 1H), 7,41-7,38 (m, 2H), 6,94 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H), 2,96 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 2,69 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INT-TG10-2

[00812] A uma solução de composto Int-TG10-1 (408 mg, 2,1 mmol) em DMF (10 ml), foram adicionados NHS (363 mg, 3,15 mmol) e EDCI (604 mg, 3,15 mmol) e agitados de um dia para o outro à temperatura ambiente. Então, 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amina (636 mg, 2,5 mmol) dissolvida em DMF (3 ml) e DIPEA (3,66 ml, 21 mmol) foi adicionada e agitada à temperatura ambiente por 1 hora. Após a reação ter sido concluída, a mistura foi acidificada com HCl 4 M, diluída com EA (30 ml X 5) e lavada com H_2O (30 ml) e salmoura (30 ml). A camada orgânica obtida foi seca sobre Na_2SO_4 , filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para obter o composto Int-TG10-2 (288 mg, 50% de pureza por HPLC).

[00813] EI-MS m/z : 395(M^+).

Preparação de composto Int-TG10-3

[00814] A uma solução de composto Int-TG10-2 (288 mg, 0,73 mmol) e composto Int-TG (303 mg, 0,74 mmol) em ACN (10 ml) foi adicionada peneira molecular (1,5 g) sob atmosfera de N_2 . Após agitação por 10 minutos à temperatura ambiente, Ag_2O (508 mg, 2,19 mmol) foi adicionado à mesma. A mistura foi agitada à temperatura ambiente por 3 horas e diluída com H_2O (5 ml), seguida por filtração

usando celite. O filtrado foi lavado com EA (20 ml X 2), H₂O (20 ml) e salmoura (20 ml). A camada orgânica obtida foi seca sobre Na₂SO₄, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para obter o composto Int-TG10-3 (195 mg).

[00815] EI-MS m/z: 725(M⁺).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INT-TG10-4

[00816] A uma solução de composto Int-TG10-3 (195 mg, 0,27 mmol) em DCM (5 ml), foi adicionado 70% de m-CPBA (133 mg, 0,54 mmol) a 0°C sob atmosfera de N₂. A mistura foi agitada a 0°C por 3 horas. Então, 70% de m-CPBA (66 mg, 0,27 mmol) foram, ainda, adicionados à mesma, e a mistura foi agitada de um dia para o outro a 0°C. A reação foi bruscamente arrefecida com NaHCO₃ saturado (20 ml X 3) e diluída com DCM (20 ml). A camada orgânica foi lavada com salmoura (20 ml) e seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada, concentrada sob pressão reduzida. O composto Int-TG10-4 foi usado diretamente na reação seguinte sem purificação (199 mg, bruto).

[00817] EI-MS m/z: 741(M⁺).

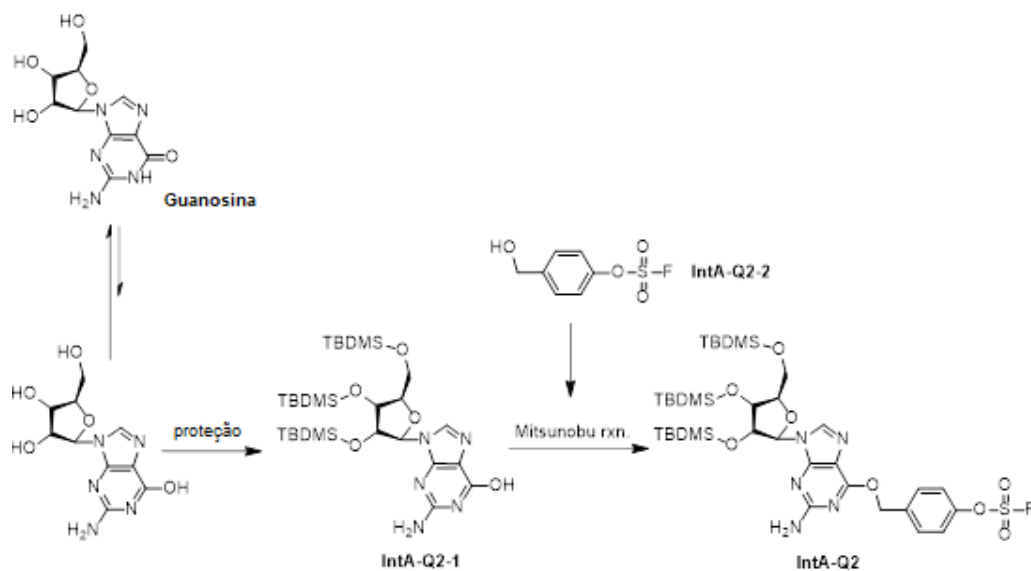
PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INT-TG10-5

[00818] A uma solução de composto Int-TG10-4 (199 mg, 0,27 mmol) em CHCl₃ (4 ml), foi adicionado NH₂NH₂·H₂O (133 mg, 0,54 mmol) a 0°C sob atmosfera de N₂. Após agitação à temperatura ambiente por 30 minutos, a mistura foi bruscamente arrefecida com EA (20 ml) e ácido cítrico saturado (20 ml). A camada orgânica obtida foi seca sobre Na₂SO₄, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para obter o composto Int-TG10-5 (146 mg).

[00819] EI-MS m/z: 713(M⁺).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INT-TG10

[00820] A uma solução de composto Int-TG10-5 (146 mg, 0,21



PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTA-Q2-1

[00824] A uma solução de Guanosina (1 g, 3,53 mmol) em DMF (30 ml), foram adicionados imidazol (1,92 g, 28,45 mmol) e TBDMS-Cl (3,193 g, 21,18 mmol) à temperatura ambiente. A mistura foi agitada de um dia para o outro à temperatura ambiente e extraída com EA (100 ml X 3), H₂O (100 ml), NH₄Cl (100 ml) e salmoura (100 ml). A camada orgânica obtida foi seca sobre Na₂SO₄, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para obter o composto IntA-Q2-1 (1,56 g, 70 %).

[00825] RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 12,05 (s, 1H), 7,89 (s, 1H), 6,40 (brs, 1H), 5,82-5,79 (m, 1H), 4,44-4,38 (m, 1H), 4,29-4,26 (m, 1H), 4,10-4,09 (m, 1H), 4,02-3,99 (m, 1H), 3,80-3,77 (m, 1H), 0,96 (s, 9H), 0,92 (s, 9H), 0,87 (s, 9H), 0,14 (s, 3H), 0,13 (s, 3H), 0,09 (s, 3H), 0,08 (s, 3H), 0,02 (s, 3H), -0,02 (s, 3H). EI-MS m/z: 627(M⁺).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTA-Q2-2

[00826] A uma solução de álcool 4-hidroxi benzílico (1,00 g, 8,06 mmol) em DCM (40 ml) e H₂O (40 ml), foi adicionado Et₃N (1,70 ml, 12,085 mmol) à temperatura ambiente sob atmosfera de N₂. Gás SO₂F₂ foi introduzida através de balão, e a mistura foi agitada à temperatura ambiente por 5 horas. Após a reação ter sido concluída, a mistu-

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTA-Q3

[00830] A uma solução de cloridrato de ácido 3-piridilacético (1,0 g, 5,76 mmol) em THF (20 ml), foi adicionado LAH (1,1 g, 28,8 mmol) a 0°C sob atmosfera de N₂. A mistura foi amornada até a temperatura ambiente e refluxada por 24 horas. A mistura foi bruscamente arrefecida por adição de metanol (10 ml) e água (20 ml). A camada orgânica foi submetida à extração com éter (50 ml X 2), e a camada orgânica obtida foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para obter o composto Int-Q3a (396,3 mg, 56%).

[00831] RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,48-8,45(m, 2H), 7,58-7,56 (m, 1H) 7,25-7,22 (m, 2H), 3,89 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 2,87 (t, J = 6,8 Hz, 2H). EI-MS m/z: 124(M⁺+1).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INT-Q3B

[00832] Uma solução do composto Int-Q3a (260 mg, 2,11 mmol) e CDI (684,6 mg, 4,22 mmol) em DCM (5 ml) foi agitada de um dia para o outro a 50°C sob atmosfera de N₂. Após a reação ter sido concluída, a mistura foi resfriada até a temperatura ambiente, seguida por extração com DCM (20 ml X 2) e água (10 ml). A camada orgânica obtida foi seca sobre Na₂SO₄, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para obter o composto Int-Q3b (296,5 mg, 65%).

[00833] RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,53 (dd, J = 3,6, 1,6 Hz, 2H), 8,08 (s, 1H), 7,59-7,57 (m, 1H), 7,37 (s, 1H), 7,29-7,26 (m, 1H), 7,06 (s, 1H), 4,63 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 3,12 (t, J = 6,8 Hz, 1H). EI-MS m/z: 218(M⁺+1).

MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTA-Q3

[00834] A uma solução de composto Int-Q3b (47,6 mg, 0,22 mmol) e composto IntA-Q2-2 (45,2 mg, 0,22 mmol) em THF (400 µl), foi adicionado NaH (2,6 mg, 0,07 mmol) a 0°C sob atmosfera de N₂. Após

em éter (10 ml), e PBr_3 1 M (446 μl , 0,45 mmol) dissolvido em DCM foi adicionado e agitado a 0°C por 2 horas. Após a reação ter sido concluída, éter (50 ml) e solução aquosa de bicarbonato de sódio (50 ml) foram adicionados para realizar a extração. A camada orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida para obter o composto IntB-Q5-1 (201 mg, 67%).

[00839] RMN de ^1H (400Hz, CDCl_3) δ 7,51 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,33 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 4,49 (s, 2H).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTA-Q5-1

[00840] Timidina (100 mg, 0,41 mmol) e 60% de NaH (25 mg, 0,62 mmol) foram dissolvidos em DMF (3 ml) sob uma atmosfera de nitrogênio, e a mistura foi resfriada a 0°C . O composto IntB-Q5-1 (167 mg, 0,62 mmol) foi adicionado a 0°C , e a mistura foi agitada à mesma temperatura por 1 hora. Após a reação ter sido concluída, EA (30 ml $\times$ 3) e solução aquosa de ácido cítrico (30 ml) foram adicionados para realizar a extração, e a camada orgânica obtida foi seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para obter o composto IntA-Q5-1 (79 mg, 45 %).

[00841] RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7,84 (s, 1H), 7,54 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 7,47 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 6,20 (t, $J = 6,8$ Hz, 1H), 5,25 (d, $J = 4$ Hz, 1H), 5,07-5,02 (m, 3H), 4,28-4,22 (m, 1H), 3,78-3,76 (m, 1H), 3,64-3,54 (m, 2H), 2,16-2,11 (m, 2H), 1,84 (s, 3H). EI-MS m/z : 431(M^+).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTA-Q5-2

[00842] O composto IntA-Q5-1 (40 mg, 0,09 mmol) e o composto Int-TG1 (62 mg, 0,11 mmol) foram dissolvidos em ACN (3 ml) sob uma atmosfera de nitrogênio, e, então, BEMP (14 μl , 0,05 mmol) foi adicionado aos mesmos. A mistura foi agitada de um dia para o outro à temperatura ambiente, DBU (7 μl , 0,05 mmol) foi, ainda, adicionado à mesma, e a mistura foi agitada à mesma temperatura por 1 hora. Após

a reação ter sido concluída, EA (20 ml X 3), solução aquosa de ácido cítrico (20 ml) e salmoura (20 ml) foram adicionadas para realizar a extração, e a camada orgânica obtida foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para obter o composto IntA-Q5-2 (26 mg, 33 %).

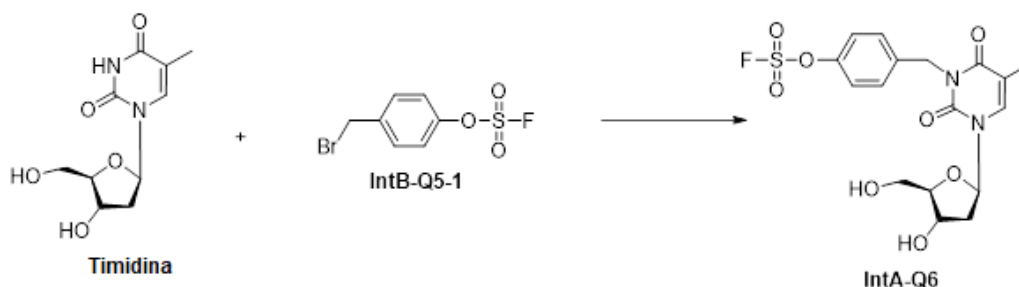
[00843] EI-MS m/z: 851(M⁺).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTA-Q5

[00844] O composto IntA-Q5-2 (16 mg, 0,02 mmol) foi dissolvido em MeOH (2 ml) sob uma atmosfera de nitrogênio e, então, resfriado a 0°C. K₂CO₃ (13 mg, 0,09 mmol) foi adicionado a 0°C, e a mistura foi agitada à mesma temperatura por 1 hora. Após a reação ter sido concluída, a solução de reação foi submetida a HPLC preparatória para obter um composto IntA-Q5 (10,3 mg, 80%).

[00845] EI-MS m/z: 705(M⁺+Na).

[EXEMPLO 17] PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTA-Q6



[00846] 60% de NaH (25 mg, 0,62 mmol) foram adicionados a uma solução agitada de timidina (100 mg, 0,41 mmol) em DMF (3 ml) sob atmosfera de N₂. A mistura foi resfriada a 0°C, e composto IntB-Q5-1 (167 mg, 0,62 mmol) foi adicionado. A mistura foi agitada por 1 hora. Após a reação ter sido concluída, a reação foi bruscamente arrefecida por adição de EA (30 ml × 3) e ácido cítrico saturado (30 ml). A camada orgânica obtida foi para obter o composto IntA-Q5-1 (79 mg, 45 %).

[EXEMPLO 18] PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTB-Q1

composto IntB-Q5-2a (2,30 g, 55%).

[00856] RMN de ^1H (400Hz, DMSO- d_6) δ 7,84 (s, 2H), 4,56 (s, 4H), 3,80 (s, 3H).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTB-Q5-2

[00857] A uma solução de composto IntB-Q5-1 (300 mg, 1,12 mmol) e composto IntB-Q5-2a (237 mg, 1,12 mmol) em DMF (10 ml), foi adicionado K_2CO_3 (308 mg, 2,23 mmol) à temperatura ambiente sob atmosfera de N_2 . Após agitação por 6 horas, a mistura foi diluída com EA (100 ml) e lavada com solução aquosa de HCl 2 N (30 ml). A camada orgânica foi seca sobre Na_2SO_4 anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para obter o composto IntB-Q5-2 (140 mg, 32 %).

[00858] RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8,07 (s, 2H), 7,58 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,39 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 5,07 (s, 2H), 4,73 (s, 4H), 3,91 (s, 3H).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTB-Q5-3

[00859] A uma solução de composto IntB-Q5-2 (68,8 mg, 1,12 mmol) em THF (2 ml), foi adicionado LiBH_4 4 M (3,8 ml, 15,20 mmol) dissolvido em THF à temperatura ambiente. A mistura foi agitada por 19 horas e adicionado EA (50 ml). A camada orgânica foi lavada com NH_4Cl saturada (50 ml), seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para obter o composto IntB-Q5-3 (23 mg, 36 %).

[00860] RMN de ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) δ 7,59 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,38 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,32 (s, 2H), 4,94 (s, 2H), 4,65 (s, 4H), 4,56 (s, 2H).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTB-Q5-4

[00861] A uma solução de composto IntB-Q5-3 (33 mg, 0,09 mmol) em THF (4 ml), foi adicionado cloroformato de 4-nitrofenila (536 mg, 2,66 mmol) e piridina (0,20 ml, 2,66 mmol) a 0°C sob atmosfera de N_2 .

2 horas. EA (20 ml X 6), H₂O (20 ml) e salmoura (200 ml) foram adicionados à mistura. A camada orgânica foi seca sobre Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para obter o composto IntCl-L-1b (10,6 g, quant.).

[00873] RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,40-7,28 (m, 5H), 6,32 (s, 1H), 5,80 (s, 1H), 5,11 (s, 2H), 5,02 (s, 1H), 4,36 (s, 1H), 3,74 (s, 3H), 3,60 (s, 4H), 3,54 (s, 4H), 3,44-3,43 (m, 2H), 3,38-3,21 (m, 2H), 2,30-2,20 (m, 3H), 2,04-2,00 (m, 1H), 1,76 (s, 1H), 1,44 (s, 9H). EI-MS m/z: 526 (M⁺).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTCL-L-1C

[00874] A uma solução de composto IntCl-L-1b (3 g, 5,71 mmol) in MeOH (25 ml), foi adicionado Pd/C (900 mg) à temperatura ambiente sob H₂. A mistura foi agitada por 3 horas e filtrada por celite e, então, concentrada sob pressão reduzida. O composto IntCl-L-1c foi usado diretamente na etapa seguinte sem purificação adicional (2,23 g, bruto).

[00875] RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 6,56 (s, 1H), 5,20 (s, 1H), 3,73 (s, 3H), 3,61 (s, 4H), 3,57-3,55 (m, 4H), 3,53-3,50 (m, 1H), 3,48-3,44 (m, 4H), 2,40-2,32 (m, 2H), 2,18-2,10 (m, 1H), 1,88-1,81 (m, 1H), 1,44 (s, 9H). EI-MS m/z: 392 (M⁺).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTCL-L-1D

[00876] A uma solução de composto IntCl-L-1c (2,23 g, 5,71 mmol) e composto FA-Int (2,12 g, 5,19 mmol) em DMF (15 ml), foram adicionados HBTU (2,36 g, 6,23 mmol) e DIPEA (1,36 ml, 7,78 mmol) a 0°C sob atmosfera de N₂. A mistura foi agitada à temperatura ambiente por 2,5 horas e EA (100 ml × 7) e H₂O (100 ml) foram adicionados. A camada orgânica foi seca sobre Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para obter o composto IntCl-L-1d (4,06 g, quant.).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO K-1

[00880] A uma solução de L-Lys(Boc)-OMe (3 g, 10,11 mmol) e ácido 4-pentinoico (992 mg, 10,11 mmol) em DMF (30 ml), foi adicionado em uma porção PyBop (7,89 g, 15,16 mmol) seguido por DIPEA (5,26 ml, 30,32 mmol) a 0°C sob atmosfera de N₂. A mistura foi agitada de um dia para o outro à temperatura ambiente. EA (80 ml X 4) e ácido cítrico saturado (60 ml) foram adicionados à mistura e a camada orgânica foi lavada com NaHCO₃ (120 ml), salmoura (100 ml), seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para obter o composto K-1 (3,29 g, 95 %).

[00881] EI-MS m/z: 341 (M⁺).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO K-2

[00882] A uma solução de composto K-1 (3,29 g, 9,66 mmol) em MeOH (15 ml), foi adicionado LiOH·H₂O (2,03 g, 48,32 mmol) dissolvido em H₂O (15 ml) a 0°C sob atmosfera de N₂.

[00883] A mistura foi agitada a 0°C por 30 minutos e amornada até a temperatura ambiente por 2 horas. A mistura foi acidificada com solução aquosa saturada de ácido cítrico, e EA (40 ml X 2) foi adicionado à mistura. A camada orgânica foi lavada com H₂O (30 ml) e salmoura (30 ml), seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O composto K-2 foi usado diretamente na etapa seguinte sem purificação adicional (3,15 g, bruto).

[00884] EI-MS m/z: 327 (M⁺).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO K

[00885] A uma solução de composto K-2 (3,69 g, 11,31 mmol) em DMF (20 ml), foram adicionados NHS (1,69 mg, 14,7 mmol) e EDCI (2,93 g, 15,26 mmol) sob atmosfera de N₂. A mistura foi agitada de um dia para o outro à temperatura ambiente e então concentrada. O resíduo, composto K, foi usado diretamente na etapa seguinte sem purifi-

cação adicional (4,79 g, bruto).

[00886] EI-MS m/z: 446 ($M^+ + Na$).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTC-L-2

[00887] A uma solução de composto IntC-L-1 (4,08 g, 5,99 mmol) e composto K (4,79 g, 11,31 mmol) em DMF (25 ml), foi adicionado DI-PEA (5,21 ml, 29,93 mmol) sob atmosfera de N_2 . A mistura foi agitada de um dia para o outro à temperatura ambiente. H_2O (70 ml) e salmoura (60 ml) foram adicionados à mistura e extraídos com EA (70 ml X 7). E a camada orgânica foi seca sobre Na_2SO_4 anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para obter o composto IntC-L-2 (1,12 g, 19%).

[00888] EI-MS m/z: 991 (M^+).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTC-L-3

[00889] A uma solução de composto IntA-L-2 (1,12 g, 1,13 mmol) em MeOH (27 ml), foi adicionado $LiOH \cdot H_2O$ (356 mg, 8,48 mmol) dissolvido em H_2O (10 ml) a $0^\circ C$ sob atmosfera de N_2 . A mistura foi agitada a $0^\circ C$ por 30 minutos e amornada até a temperatura ambiente por 3 horas. A mistura foi acidificada com HCl 2 M e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo, composto IntC-L-3, foi usado diretamente na etapa seguinte sem purificação adicional (996 mg, bruto).

[00890] EI-MS m/z: 880 (M^+).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTC-L

[00891] A uma solução de composto IntC-L-3 (996 mg, 1,13 mmol) em DCM (30 ml), foi adicionado TFA (8 ml) a $0^\circ C$ sob atmosfera de N_2 . Após a agitação $0^\circ C$ por 1 hora, a mistura foi concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi dissolvido em DMSO (5 ml) e purificado por HPLC preparatória, que produziu o composto IntC-L (409 mg, 32%).

[00892] EI-MS m/z: 780 (M^+).

[EXEMPLO 27] PREPARAÇÃO DE COMPOSTO MPS-D1

7,35 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 4,16 (t, $J = 4,8$ Hz, 2H), 3,71-3,58 (m, 22H), 2,88 (br, 1H), 2,45 (s, 3H).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO L-1B

[00901] A uma solução de composto L-1a (5,98 g, 13,7 mmol) e DMF (30 ml), foi adicionado NaN_3 (1,34 g, 20,55 mmol) sob atmosfera de N_2 . A mistura foi agitada a 110°C por 1 hora e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para obter o composto L-1b (4,1 g, 97%).

[00902] RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 3,72-3,60 (m, 22H), 3,39 (t, $J = 4,8$ Hz, 2H), 2,78 (br, 1H).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO L-1C

[00903] A uma solução de composto L-1b (2 g, 6,51 mmol) em acetona (56 ml), foi lentamente adicionada por gotejamento solução de reagente de Jones (5 ml) a -5°C sob atmosfera de N_2 . A mistura foi agitada à temperatura ambiente por 2 horas e filtrada através de celite, e o filtrado foi concentrado sob pressão reduzida. O filtrado foi diluído com DCM (20 ml $\times$ 2) e água (5 ml). A camada orgânica foi seca sobre Na_2SO_4 anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para obter o composto L-1c (1,85 g, 89 %).

[00904] RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,15(s, 2H), 3,76-3,67 (m, 18H), 3,40 (t, $J = 4,8$ Hz, 2H).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO L-1D

[00905] A uma solução de composto L-1c (500 mg, 1,56 mmol) em DCM (10 ml), foi adicionado $t\text{-BuOH}$ (305 μl , 3,11 mmol), DIC (292,5 μl , 1,87 mmol) e DMAP (19mg, 0,16 mmol) sob atmosfera de N_2 . A mistura foi agitada à temperatura ambiente por 4 horas e diluída com DCM (30 ml $\times$ 2). A camada orgânica foi lavada com água (5 ml), seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para obter o com-

posto L-1d (278,5 mg, 47 %).

[00906] RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,01 (s, 2H), 3,70-3,66 (m, 18H), 3,38 (t, $J = 4,8$ Hz, 2H), 1,47 (s, 9H).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO L-1E

[00907] A uma solução de composto L-1d (278 mg, 0,74 mmol) em EtOH (5 ml), foram adicionados Pd/C (236 mg, 0,11 mmol) e HCl 4 M (em 1,4-dioxano) sob atmosfera de N_2 . A mistura foi agitada à temperatura ambiente por 1 hora. A mistura foi filtrada através de celite para remover Pd/C e concentrada para obter o composto L-1e (255,3 mg, 89,2%).

[00908] RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8,32 (s, 1H), 3,98(s, 2H), 3,55-3,40 (m, 18H), 3,86 (t, $J = 5,6$ Hz, 2H), 2,70-2,64 (m, 2H), 1,42 (s, 9H).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO MPS-D2

[00909] A uma solução de composto L-1e (255,3 mg, 0,66 mmol) e composto MPS-D1 (240,6 mg, 0,72 mmol) em DMF (6 ml), foram adicionados HBTU (300 mg, 0,79 mmol) e DIPEA (229,3 μl , 1,32 mmol) sob uma atmosfera de nitrogênio. A mistura foi agitada à temperatura ambiente por 2 horas e diluída com EA (20 ml $\times$ 2) e água (5 ml). A camada orgânica foi seca sobre Na_2SO_4 anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para obter o composto MPS-D2 (306 mg, 71%).

[00910] RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,95 (s, 4H), 7,82 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 7,38 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 7,33-7,30 (m, 1H), 3,98 (s, 2H), 3,68-3,63 (m, 18H), 3,55-3,53 (m, 2H), 3,49-3,47 (m, 2H), 2,95 (s, 1H), 2,88 (s, 1H), 2,46 (s, 3H) 1,46 (s, 9H). EI-MS m/z : 666($\text{M}^+ + 1$).

[EXEMPLO 29] PREPARAÇÃO DE COMPOSTO MPS-D4

6,39 mmol) em MeOH (20 ml), foi adicionado por gotejamento cloreto de tionila (836 μ l, 11,5 mmol) a 0°C sob atmosfera de N₂. A mistura foi agitada de um dia para o outro à temperatura ambiente. Após a reação ter sido concluída, a mistura foi concentrada para produzir o composto IntA-Q7-1 (2,86 g, quant.).

EI-MS m/z: 448(M⁺).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTA-Q7-2

[00918] A uma solução de composto IntA-Q7-1 (1 g, 2,24 mmol) em ACN (10 ml), foram adicionados Boc₂O (730 mg, 3,36 mmol) e Et₃N (940 μ l, 6,72 mmol) a 0°C sob atmosfera de N₂. A mistura foi agitada à temperatura ambiente por 15 horas e bruscamente arrefecida com EA (30 ml $\times$ 2) e ácido cítrico (30 ml). A camada orgânica foi extraída e lavada com salmoura (50 ml), seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida para obter o composto IntA-Q7-2 (1,22 g, quant.).

[00919] RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,38 (s, 1H), 7,60 (s, 2H), 7,30 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 4,15 (m, 1H), 3,63 (s, 3H), 2,76-2,62 (m, 2H), 1,33 (s, 9H).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTA-Q7-3

[00920] A uma solução de composto IntA-Q7-2 (1,1 g, 2,01 mmol) e 4-vinilpiridina (650 μ l, 6,30 mmol) em DMF (12 ml), foram adicionados Pd(OAc)₂ (23 mg, 0,101 mmol), P(o-tol)₃ (43 mg, 0,141 mmol) e DIPEA (1,75 ml) à temperatura ambiente sob atmosfera de N₂. A mistura foi agitada a 100 °C por 3 horas. A mistura foi resfriada à temperatura ambiente, seguida por filtração por celite e, então, lavada com EA (20 ml). O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida, e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para obter o composto IntA-Q7-3 (790 mg, 78%).

[00921] EI-MS m/z: 502(M⁺).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTA-Q7

nica obtida foi seca sobre Na_2SO_4 , filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para obter o composto IntA-Q9-1 (461,3 mg, 85 %).

[00935] RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8,29 (d, J = 9,2 Hz, 2H), 7,58 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,42-7,38 (m, 4H), 5,33 (s, 2H).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTA-Q9-2

[00936] A uma solução de composto IntA-Q9-1 (461,3 mg, 1,24 mmol) em DMF (10 ml) e piridina (2 ml), foram adicionados 4-N,N-dimetiletilenodiamina (0,14 ml, 1,24 mmol), HOBT (38mg, 0,25 mmol) e DIPEA (0,22 ml, 1,24 mmol) à temperatura ambiente sob atmosfera de N_2 . Após agitação por 3 horas, EA (60 ml) e água (60 ml) foram adicionados. A camada orgânica obtida foi seca sobre Na_2SO_4 , filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para obter o composto IntA-Q9-2 (337 mg, 89 %).

[00937] RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,48 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,33 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 5,35 (br, 1H), 5,12 (s, 2H), 3,30 (q, J = 5,6, 5,2 Hz, 2H), 2,43 (t, J = 5,6 Hz, 2H), 2,24 (s, 6H). EI-MS m/z : 321(M^+).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTA-Q9-3

[00938] A uma solução de composto IntA-Q9-2 (100 mg, 0,31 mmol) em DCM anidro (3 ml), foram adicionados paraformaldeído (13,1 mg, 0,437 mmol) e TMS-Cl (0,06 ml, 0,47 mmol) à temperatura ambiente sob atmosfera de N_2 . Após agitação por 3 horas, paraformaldeído e TMS-Cl, cada um tendo uma quantidade de 10 equivalentes, foram, ainda, adicionados à mesma, e a mistura foi agitada a 50°C por 30 minutos.

[00939] O composto IntA-Q9-3 bruto foi usado diretamente na etapa seguinte sem purificação adicional.

[00940] EI-MS m/z : 365(M^+).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTA-Q9

[00941] A uma solução de composto IntA-Q9-3 (20 mg, 0,054

adicionados e acidificados com HCl 1 M. A camada orgânica foi lavada com H₂O (500 ml) e salmoura (500 ml), seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi submetido a trituração de éter/HX para obter o composto POS-D1b (20,7 g, 93%).

[00950] RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,44 (s, 1H), 7,72 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 6,94 (d, J = 8,0 Hz, 2H). EI-MS m/z: 195(M⁺).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO POS-D1C

[00951] A uma solução de composto POS-D1b (5 g, 25,75 mmol) em THF (100 ml), foram adicionados por gotejamento Et₃N (4,3 ml, 30,9 mmol) e MeI (1,76 ml, 28,33 mmol) a 0°C. Após agitação a 0°C por 10 minutos, a mistura foi amornada até a temperatura ambiente. E, então, a mistura foi agitada por 2 horas e diluída com EA (100 ml X 2). A camada orgânica foi lavada com H₂O (100 ml) e salmoura (100 ml), seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi submetido a trituração de éter para obter o composto POS-D1c (5,15 g, 96%).

[00952] RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7,80 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 6,94 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 2,74 (s, 3H). EI-MS m/z: 209(M⁺).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO POS-D1D

[00953] A uma solução de composto POS-D1c (3,2 g, 15,37 mmol) em EtOH (150 ml), foram adicionados 70% de m-CPBA (11,4 g, 46,11 mmol) a 0°C sob atmosfera de N₂. Após agitação à temperatura ambiente por 5 horas, 70% de m-CPBA (11,4 g, 46,11 mmol) foram, ainda, adicionados. Então, a mistura foi agitada de um dia para o outro à temperatura ambiente e bruscamente arrefecida com H₂O (500 ml), NaHCO₃ saturado (300 ml), diluída com EA (500 ml X 2). A camada orgânica foi lavada com salmoura (300 ml), seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi submetido a trituração de HX/EA = 1: 1 (100 ml) para obter o composto POS-D1d (3,2 mg, 89%).

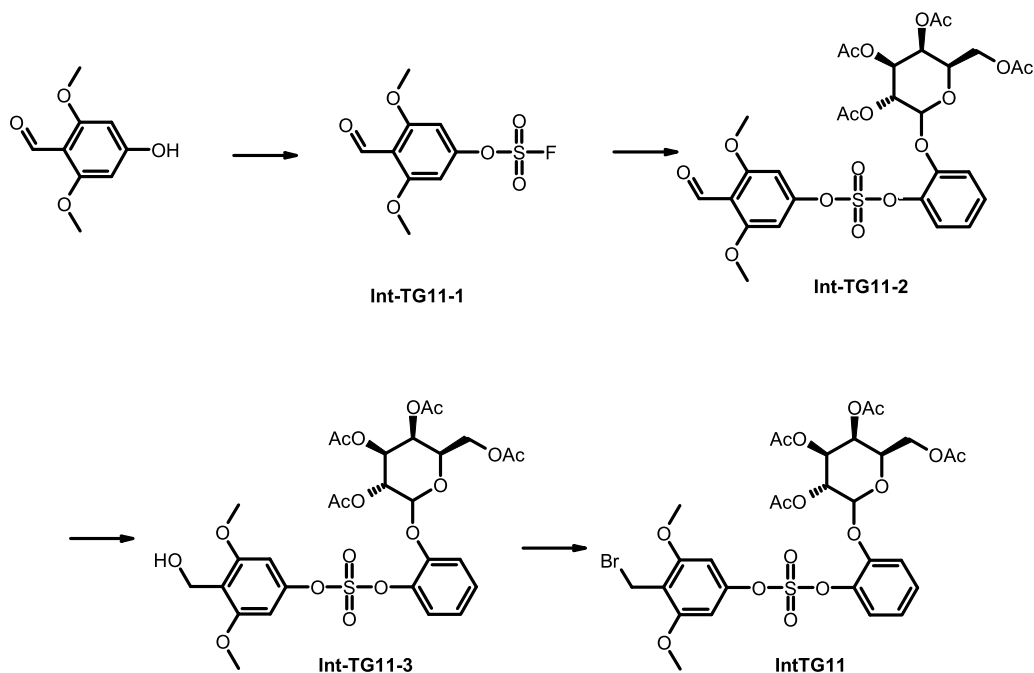
[00954] RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,95 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 7,01 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 3,69 (4s, 3H). EI-MS m/z : 241(M^+).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO POS-D1

[00955] A uma solução de tetraetileno glicol (17,3 ml, 0,10 mol) em THF (50 ml), foi adicionado por gotejamento NaH (2,6 g, 0,065 mmol) a 0°C. Após agitação a 0°C por 1 hora, brometo de propargilal (5,95 g, 0,05 mol) foi adicionado. A mistura foi agitada de um dia para o outro à temperatura ambiente e bruscamente arrefecida com gelo/água, diluída com EA (100 ml X 2). A camada orgânica foi lavada com H_2O (100 ml) e salmoura (100 ml), seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. 660 mg (2,84 mmol) de composto obtido por trituração de éter do resíduo, isto é, 3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-in-1-ol (5,87 g, 51%, RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,21 (s, 2H), 3,73-3,66 (m, 14H), 3,59-3,61 (m, 2H), 2,60 (s, 1H), 2,42 (t, $J = 2,4$ Hz, 1H)) e composto D-4-5 (310 mg, 1,29 mmol) foram dissolvidos em THF (8 ml) e DMF (0,8 ml) e PPh_3 (667 mg, 2,58 mmol) foram adicionados. A mistura foi resfriada a 0°C. DEAD 2,2 M (1,17 ml, 2,58 mmol) foi adicionado à mesma, e a mistura foi agitada a 0°C por 3 horas. Após a reação ter sido concluída, EA (15 ml $\times$ 2) e água destilada (15 ml) foram adicionados, e a camada orgânica foi extraída e lavada com salmoura (20 ml). A camada orgânica obtida foi seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida para obter o composto POS-D1 (205 mg, 30%).

[00956] EI-MS m/z : 455(M^+).

[EXEMPLO 37] PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INT-TG11



[00957] Int-TG11-3 foi sintetizado através de uma via sintética similar conforme descrito no Exemplo 6 e Exemplo 33.

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INT-TG11-1

[00958] Rendimento 99%

[00959] EI-MS m/z: 265(M⁺). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 10,41 (s, 1H), 6,54 (s, 2H), 3,91 (s, 6H).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INT-TG11-2

[00960] Rendimento 99%

[00961] EI-MS m/z: 685(M⁺). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 10,42 (s, 1H), 7,37 (d, J = 8 Hz, 1H), 7,31-7,26 (m, 2H), 7,15-7,11 (m, 1H), 6,58 (s, 2H), 5,54-5,45 (m, 2H), 5,09 (t, J = 8,4 Hz, 2H), 4,27-4,22 (m, 1H), 4,16-4,05 (m, 2H), 3,89 (s, 6H), 2,19 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 2,06 (s, 3H), 2,01 (s, 3H)

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INT-TG11-3

[00962] Rendimento 97 %. EI-MS m/z: 669 (M⁺).

[00963] RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,41 (d, J = 8 Hz, 1H), 7,27 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 7,15-7,11 (m, 1H), 6,53 (s, 2H), 5,53-5,44 (m, 2H), 5,29 (s, 1H), 5,11-5,06 (m, 1H), 4,99 (d, J = 8 Hz, 1H), 4,77 (s, 2H), 4,26-4,22 (m, 1H), 4,15-4,11 (m, 1H), 4,06-4,02 (m, 1H), 3,87 (s, 6H),

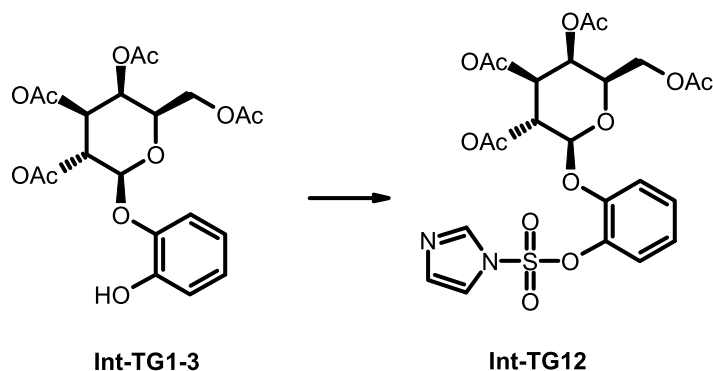
2,19 (s, 3H), 2,06-2,03 (m, 6H), 1,99 (s, 3H)

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INT-TG11

[00964] A uma solução de composto Int-TG11-3 (137 mg, 0,199 mmol) em THF seco (5 ml), foram adicionados NBS (53 mg, 0,299 mmol) e trifenilfosfina (78 mg, 0,299 mmol) à temperatura ambiente. Após agitação por 2 horas, a mistura foi concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para produzir o composto Int-TG11 (129 mg, 86%).

[00965] EI-MS m/z: 750 (M^{+1}). RMN de ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,36 (m, 1H), 7,29-7,28 (m, 2H), 6,56 (s, 1H), 6,53 (s, 1H), 5,58-5,51 (m, 1H), 5,46 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H), 5,12-5,06 (m, 2H), 4,60 (s, 2H), 4,27-4,23 (m, 1H), 4,17-4,11 (m, 1H), 4,08-4,05 (m, 1H), 3,88 (s, 3H), 3,86 (s, 3H), 2,20 (s, 3H), 2,09 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 2,01 (s, 3H)

[EXEMPLO 38] PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INT-TG12



[00966] A uma solução de composto Int-TG1-3 (530 mg, 1,2 mmol) em THF seco (25 ml), foram adicionados 1,1'-Sulfonildiimidazol (477 mg, 2,4 mmol) e Cs_2CO_3 (196mg, 0,6 mmol). Após 18 horas sob refluxo, a mistura foi bruscamente arrefecida com HCl aquoso 2 N (100 ml). A camada orgânica foi extraída com EtOAc (2 x 20 ml), seca com $MgSO_4$ anidro, filtrada e concentrada. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para produzir o composto Int-TG12 (396 mg, 58%).

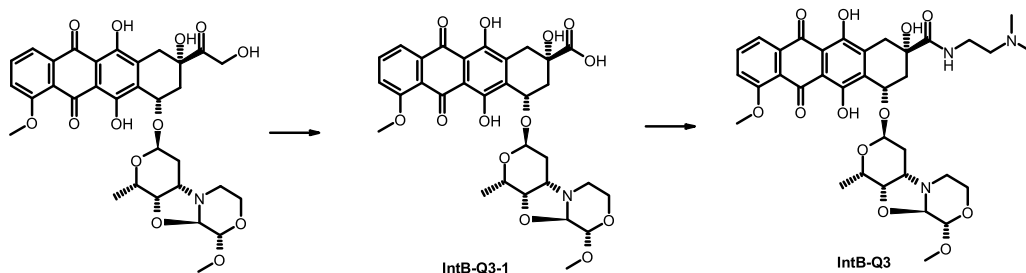
[00967] RMN de ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,84 (s, 1H), 7,35 (s, 1H), 7,34-7,31 (m, 1H), 7,20-7,16 (m, 2H), 7,05 (t, 1H), 6,86 (m, 1H), 5,51-

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INT-TG14-2

[00972] Rendimento 96 %; EI-MS m/z: 931 (M^{+1}).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INT-TG14

[00973] Rendimento 75 %; EI-MS m/z: 750 (M^{+1}).

[EXEMPLO 41] PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTB-Q3**PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTB-Q3-1**

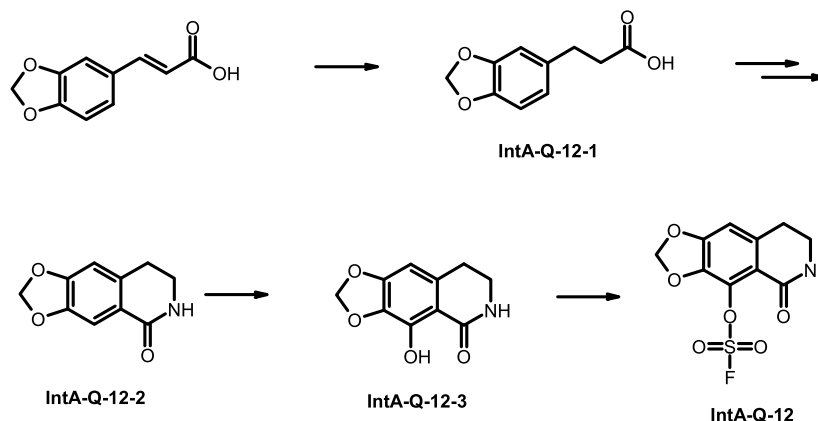
[00974] A uma solução de PNU-1529682 (52 mg, 0,081 mmol) em MeOH (5 ml) / água destilada (3 ml), foi adicionado NaIO_4 (18 mg, 0,081 mmol) à temperatura ambiente. Após agitação 2 horas, a mistura foi concentrada sob pressão reduzida, que produziu o composto IntB-Q3-1 bruto (51 mg, 99%). EI-MS m/z: 628 (M^{+1}).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTB-Q3

[00975] A uma solução de composto IntB-Q3-1 (51 mg, 0,081 mmol) em DCM seco (5 ml), foram adicionados 2-(Dimetilamino)etil amina (6,1 μl , 0,089 mmol) e TEA (34 μl , 0,243 mmol), TBTU (52 mg, 0,162 mmol) à temperatura ambiente. Após agitação 1 horas, a mistura foi diluída com DCM (2 x 8 ml). A camada orgânica foi lavada com H_2O (8 ml), seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para produzir o composto IntB-Q3 (38 mg, 67%).

[00976] EI-MS m/z: 698 (M^{+1}).

[EXEMPLO 42] PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTB-Q4



PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTA-Q-12-1

[00977] A uma solução de ácido (3,4-metilenodioxo)-cinâmico (1,5g, 7,8 mmol) em MeOH (200 ml), ácido acético (10 ml), foi adicionado 10% de Pd/C (500 mg) sob atmosfera de N₂. A mistura foi agitada à temperatura ambiente por 22 horas sob atmosfera de H₂. Então, a mistura foi filtrada através de celite e lavada com MeOH (200 ml). O filtrado foi concentrado para gerar o composto IntA-Q-12-1 como um sólido cristalino branco-sujo (1,51 g, 99%).

[00978] RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 6,74 - 6,64 (m, 3H), 5,92 (s, 2H), 2,87 (t, J = 7,8 Hz, 2H), 2,63 (t, J = 7,2 Hz, 2H).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTA-Q-12-2

[00979] A uma solução de composto IntA-Q-12-2 (750 mg, 3,86 mmol) e TEA (540 µl, 3,86 mmol) em tolueno anidro (15 ml), foi adicionada por gotejamento difenilfosforil azida (832 µl, 3,86 mmol) à temperatura ambiente sob atmosfera de N₂. A mistura foi amornada até 90°C por 90 min. Após a reação ter sido concluída, a maior parte do solvente foi removida sob pressão reduzida. O resíduo foi resfriado a 0 °C sob atmosfera de N₂. BF₃·OEt₂ (2,4 ml, 5,79 mmol) foi adicionado por gotejamento à mistura agitada e, então, agitado à temperatura ambiente por 1 hora. A mistura foi diluída com EA (50 ml) e lavada com NaHCO₃ aquoso saturado (100 ml). A camada orgânica foi seca sobre MgSO₄, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para obter o composto IntA-Q-12-

2 (650 mg, 88%).

[00980] RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,51 (s, 1H), 6,65 (s, 1H), 6,06 (brs, 1H), 6,00 (s, 2H), 3,51 (m, 2H), 2,90(t, J = 6,8 Hz, 2H). EI-MS m/z: 192 (M^{+1}).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTA-Q-12-3

[00981] A uma solução de composto IntA-Q-12-2 (200 mg, 1,04 mmol) em THF (10 ml), foi adicionado por gotejamento n-BuLi (2,5 M em Hexano, 1 ml) a -78°C sob atmosfera de N_2 . A solução púrpura clara foi agitada a -78°C por 30 minutos, e $\text{B}(\text{OMe})_3$ (200 μl , 1,77 mmol) foi adicionado. A reação foi amornada a 0°C , então, AcOH (154 μl) foi adicionado seguido por adição de 35% de H_2O_2 (230 μl). Após agitação à temperatura ambiente por 5 horas, diluída com EA (50 ml). A camada orgânica foi lavada com NaCl aquoso saturado (100 ml), seca com MgSO_4 , filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para obter o composto IntA-Q-12-3 (60 mg, 27%).

[00982] RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 12,33 (s, 1H), 6,29 (s, 1H), 6,03 (s, 2H), 5,89 (brs, 1H), 3,55 (m, 2H), 2,92 (t, J = 6,8 Hz, 2H). EI-MS m/z: 208 (M^{+1}).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTA-Q-12-4

[00983] A uma solução de composto IntA-Q-12-3 (38 mg, 0,184 mmol) em THF (3 ml), foi adicionado 1 M-tBuOK (1 M em THF, 220 μl , 0,220 mmol) à temperatura ambiente. A mistura foi agitada à temperatura ambiente por 1 hora sob SO_2F_2 , bruscamente arrefecida com 10% de solução aquosa de HCl até o pH 7 e diluída com EA (50 ml). A camada orgânica foi saturada NaCl aquoso (100 ml), seca com Na_2SO_4 , filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para obter o composto IntA-Q-12-4 (17 mg, 32%).

[00984] RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 6,71 (s, 1H), 6,15 (s, 2H),

[00992] Rendimento 63%

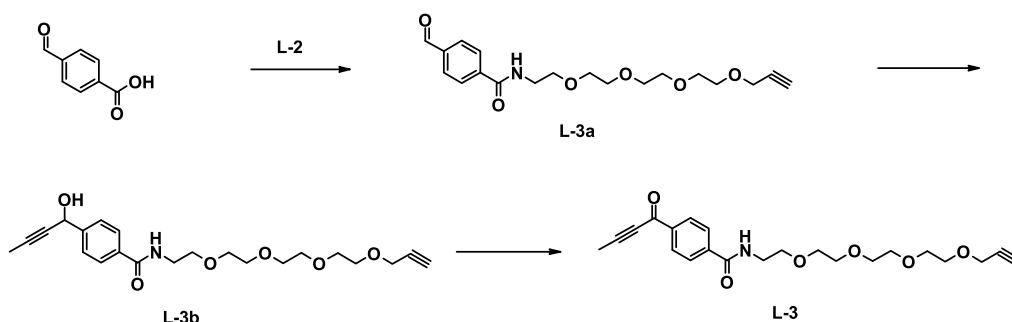
[00993] RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,21 (d, $J = 2,4$ Hz, 2H), 3,72-3,67 (m, 14H), 3,39 (t, $J = 5,2$ Hz, 2H), 2,43 (t, $J = 2,4$ Hz, 1H).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO L-2

[00994] Rendimento 76%

[00995] RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,20 (d, $J = 2,4$ Hz, 2H), 3,71-3,61 (m, 12H), 3,51 (t, $J = 4,8$ Hz, 2H), 2,87 (t, $J = 5,6$ Hz, 2H), 2,43 (t, $J = 2,4$ Hz, 1H).

[EXEMPLO 45] PREPARAÇÃO DE COMPOSTO L-3



[00996] O composto L-3 foi sintetizado por uma via sintética similar conforme descrito no documento Journal of Organic Chemistry, 2002, 67, 5.032 a 5.035, incorporado ao presente documento a título de referência.

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO L-3A

[00997] Rendimento 92 %

[00998] RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 10,08 (s, 1H), 7,97(q, $J = 8,8$ Hz, 8,8 Hz, 4H), 7,16 (brs, 1H), 4,14(d, $J = 2,4$ Hz, 2H), 3,70-3,62 (m, 16H), 2,41 (t, $J = 2,4$ Hz, 1H). EI-MS m/z : 384(M^{+1})

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO L-3B

[00999] Rendimento 69%

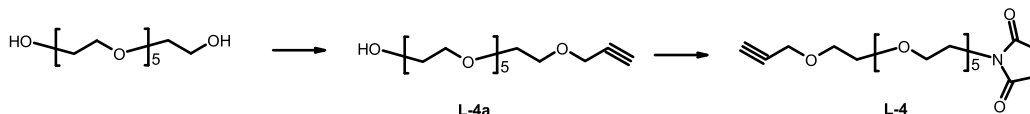
[001000] RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,82(d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 7,60(d, $J = 7,6$ Hz, 2H), 6,88 (brs, 1H), 5,47 (brs, 1H), 4,14(d, $J = 2,4$ Hz, 2H), 3,70-3,63 (m, 16H), 2,42 (brs, 1H), 2,19 (s, 3H). EI-MS m/z : 404 (M^{+1})

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO L-3

[001001] Rendimento 81%

[001002] RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8,19(d, $J = 7,2$ Hz, 2H), 7,92(d, $J = 7,6$ Hz, 2H), 7,07 (brs, 1H), 4,16(s, 2H), 3,70-3,49 (m, 16H), 2,42 (brs, 1H), 2,19 (s, 3H). EI-MS m/z : 402(M^{+1})

[EXEMPLO 46] PREPARAÇÃO DE COMPOSTO L-4



[001003] O composto L-4 foi sintetizado por uma via sintética similar conforme descrito no documento Journal of Medicinal Chemistry, 52(19), 5816-5825; 2009, incorporado ao presente documento a título de referência.

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO L-4A

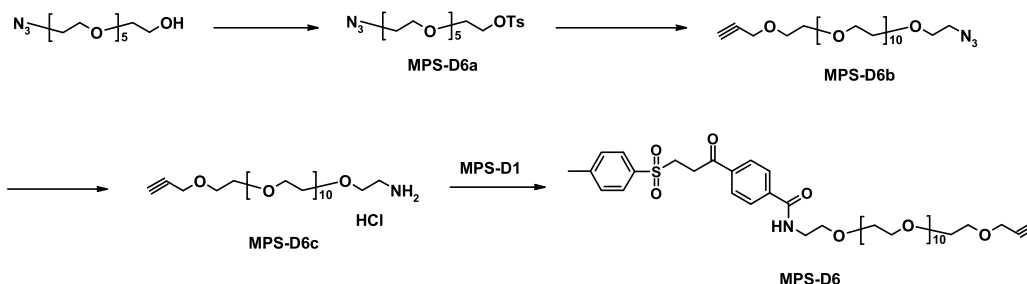
[001004] Rendimento 55%

[001005] RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,21 (d, $J = 2,0$ Hz, 2H), 3,72-3,60 (m, 24H), 2,79 (brs, 1H), 2,43 (t, $J = 2,4$ Hz, 1H).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO L-4

[001006] EI-MS m/z : 400(M^{+1})

[EXEMPLO 47] PREPARAÇÃO DE COMPOSTO MPS-D6



[001007] O composto L-5 foi sintetizado através de uma via sintética similar conforme descrito no Exemplo 44 e no Exemplo 45.

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO MPS-D6A

[001008] Rendimento 91%

[001009] RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,80 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,35 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 4,16 (t, $J = 4,8$ Hz, 2H), 3,70-3,61 (m, 20H), 3,39 (t, $J = 4,8$ Hz, 2H), 2,45 (s, 3H). EI-MS m/z : 462(M^{+1})

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO MPS-D6B

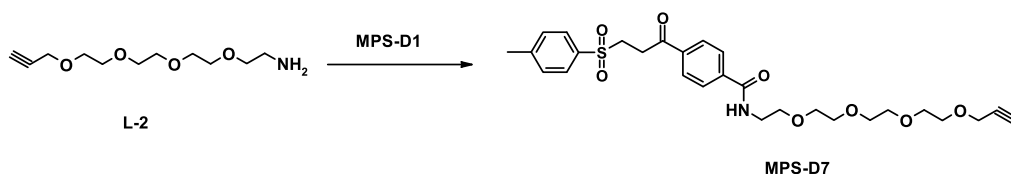
[001010] Rendimento 93%; EI-MS m/z: 610(M⁺)

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO MPS-D6C

[001011] Rendimento 54%. EI-MS m/z: 584 (M⁺)

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO MPS-D6

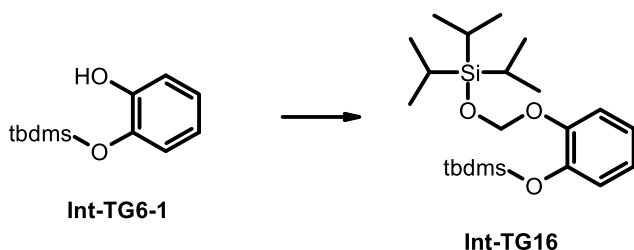
[001012] Rendimento 72%; EI-MS m/z: 899(M⁺)

[EXEMPLO 48] PREPARAÇÃO DE COMPOSTO MPS-D7

[001013] O composto MPS-D7 foi sintetizado através de uma via sintética similar conforme descrito no Exemplo 28.

[001014] Rendimento 80%; EI-MS m/z: 546(M⁺)

[001015] RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,11-7,94(m, 4H), 7,83(d, J = 7,6 Hz, 2H), 7,44 (brs, 1H), 7,38(d, J = 8,0 Hz, 2H), 4,15(s, 2H), 3,69-3,65 (m, 14H), 3,58-3,48(m, 4H), 2,80 (s, 1H), 2,46(s, 3H).

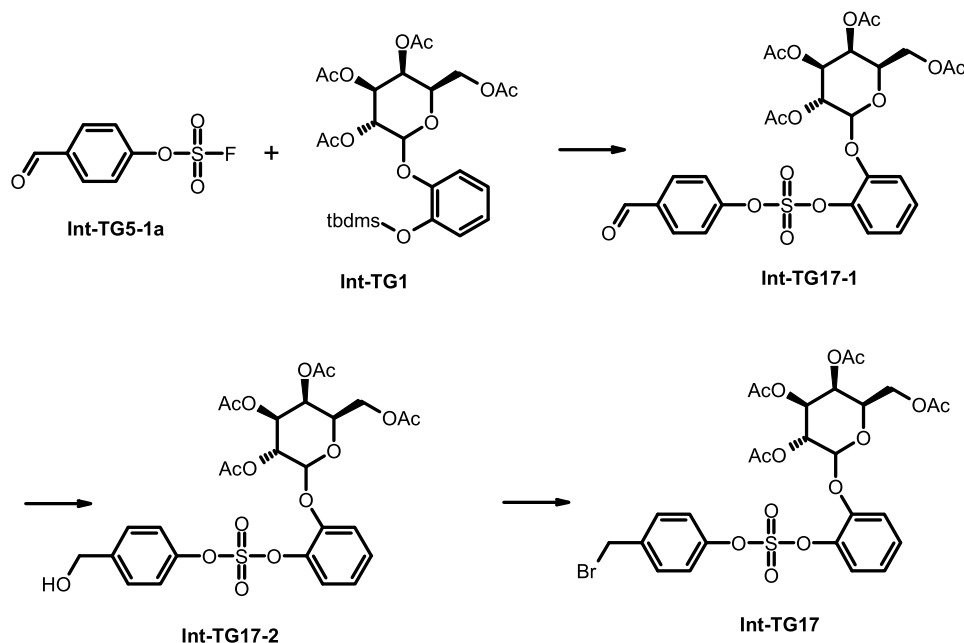
[EXEMPLO 49] PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INT-TG16

[001016] A uma solução de composto Int-TG6-1 (300 mg, 1,34 mmol) e TOM-Cl (310 µl, 1,34 mmol) em DCM (2 ml), foi adicionado DIPEA (291 µl, 1,67 mmol) sob atmosfera de N₂. Após agitação a temperatura ambiente por 2 horas, TOM-Cl (310 µl, 1,34 mmol) e DIPEA (466 µl, 2,67 mmol) foram, ainda, adicionados à mesma. A mistura foi agitada de um dia para o outro à temperatura ambiente. Após a reação ter sido concluída, a mistura foi purificada por HPLC preparatória para obter o composto Int-TG16 (165 mg, 30%).

[001017] RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,22-7,20 (m, 1H), 6,92-

6,87 (m, 3H), 5,43 (s, 2H), 1,21-1,08 (m, 21H), 1,03(s, 9H), 0,19(s, 6H).

[EXEMPLO 50] PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INT-TG17



[001018] O composto Int-TG17 foi sintetizado através de uma via sintética similar conforme descrito no Exemplo 37.

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INT-TG17-1

[001019] Rendimento 84%; EI-MS m/z: 888 (M^{+1}).

[001020] RMN de ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 10,04 (s, 1H), 7,99-7,97 (m, 1H), 7,56-7,51 (m, 2H), 7,38-7,34 (m, 2H), 7,31-7,27 (m, 2H), 7,15-7,08 (m, 1H), 5,58-5,51 (m, 1H), 5,48-5,45 (m, 1H), 5,12-5,07 (m, 2H), 4,27-4,22 (m, 1H), 4,18-4,13 (m, 1H), 4,08-4,04 (m, 1H), 2,19 (s, 3H), 2,07 (s, 3H), 2,06 (s, 3H), 2,01 (s, 3H).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INT-TG17-2

[001021] Rendimento 33% EI-MS m/z: 649 (M^{+1} Na).

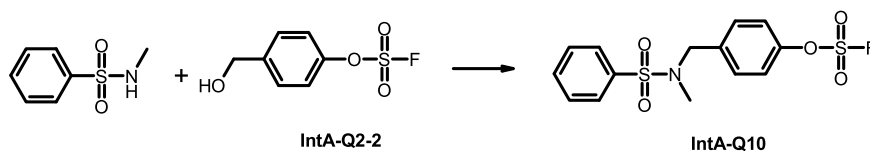
[001022] RMN de ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,45-7,41 (m, 3H), 7,35-7,33 (m, 2H), 7,30-7,25 (m, 2H), 7,15-7,10 (m, 1H), 5,51-5,44 (m, 2H), 5,08-5,02 (m, 2H), 4,72 (d, $J = 5,2$ Hz, 2H), 4,26-4,21 (m, 1H), 4,16-4,12 (m, 1H), 4,05-4,01 (m, 1H), 2,22 (s, 3H), 2,05 (s, 3H), 2,04 (s, 3H), 2,00 (s, 3H).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INT-TG17

[001023] Rendimento 71% EI-MS m/z: 713(M⁺ Na).

[001024] RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,46 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,35-7,32 (m, 3H), 7,28-7,26 (m, 2H), 7,14-7,09 (m, 1H), 5,58-5,54 (m, 1H), 5,46-5,45 (m, 1H), 5,12-5,07 (m, 2H), 4,48 (s, 2H), 4,27-4,23 (m, 1H), 4,17-4,11 (m, 1H), 4,07-4,04 (m, 1H), 2,18 (s, 3H), 2,07 (s, 3H), 2,06 (s, 3H), 2,01 (s, 3H).

[EXEMPLO 51] PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTA-Q10

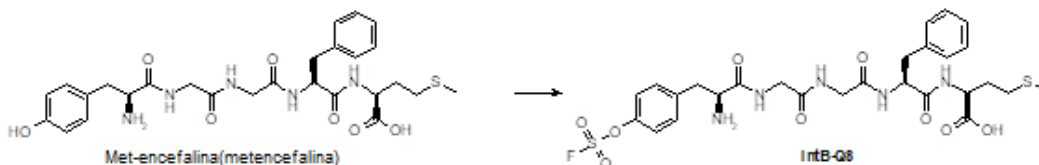


[001025] A uma solução de N-metil benzenossulfonamida (208 mg, 1,21 mmol) em THF (5 ml), foram adicionados composto IntA-Q2-2 (100 mg, 0,48 mmol) e PPh₃ (382 mg, 1,45 mmol) sob atmosfera de N₂. E, então, DEAD (221 µL, 1,21 mmol) foi adicionado por gotejamento, e a mistura foi agitada de um dia para o outro à temperatura ambiente e diluída com EA (50 ml). A camada orgânica foi lavada com H₂O (40 ml) e salmoura (40 ml), seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para obter o composto IntA-Q10 (143 mg, 82%).

[001026] RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,84 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 7,66-7,63 (m, 1H), 7,60-7,53 (m, 2H), 7,44 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,32 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 4,19 (s, 2H), 2,65 (s, 3H).

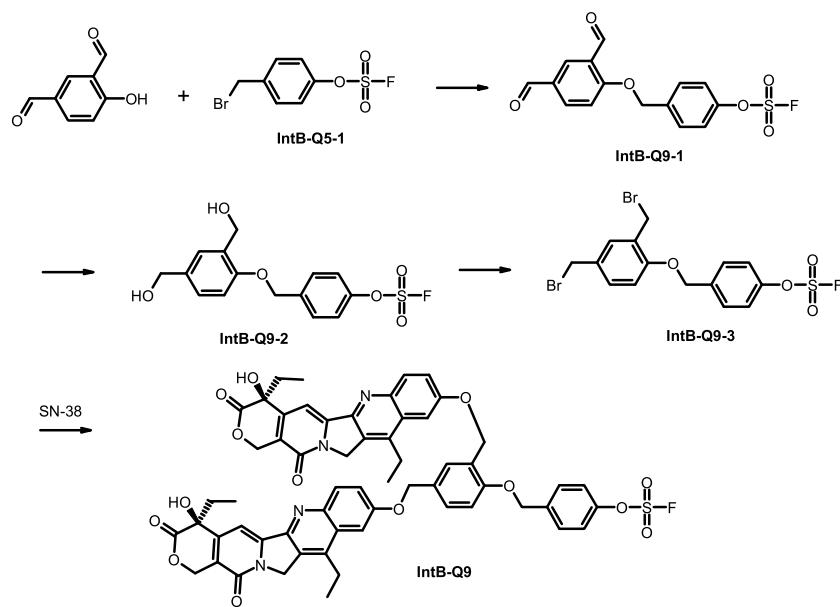
[001027] EI-MS m/z: 360(M⁺).

[EXEMPLO 52] PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTB-Q8



[001028] O composto IntB-Q8 foi sintetizado através de uma via sintética similar conforme descrito no Exemplo 12.

[001029] Rendimento 16%; EI-MS m/z: 656(M⁺).

[EXEMPLO 53] PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTB-Q9

[001030] O composto IntB-Q9 foi sintetizado através de uma via sintética similar conforme descrito no Exemplo 37 e Exemplo 2.

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTB-Q9-1

[001031] Rendimento 77 %

[001032] RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 10,54 (s, 1H), 9,97 (s, 1H), 8,38 (s, 1H), 8,14 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,59 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 7,43 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 7,19 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 5,33 (s, 2H).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTB-Q9-2

[001033] Rendimento 94 %; EI-MS m/z : 365($\text{M}^+ + \text{Na}$).

[001034] RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7,67-7,61 (m, 4H), 7,37 (s, 1H), 7,12 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 6,94 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 5,19 (s, 2H), 5,06-5,02 (m, 2H), 4,56 (d, $J = 4,8$ Hz, 2H), 4,42 (d, $J = 5,6$ Hz, 2H).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTB-Q9-3

[001035] Rendimento 82%

[001036] RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,62 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,41-7,38 (m, 3H), 7,32 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 6,86 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 5,19 (s, 2H), 4,57 (s, 2H), 4,47 (s, 2H).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTB-Q9

[001037] EI-MS m/z : 1092(M^{+1}).

Exemplo 6.

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTB-Q11-1

[001048] Rendimento 98%

[001049] RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8,37 (brs, 1H) 8,02 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,75 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,61 (t, J = 7,2, 1H), 7,51 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 4,32 (brs, 1H), 4,18 (t, J = 8,8, 1H), 4,05 (m, 1H), 3,93 (dd, J = 11,2, 2,8 Hz, 1H), 3,52 (t, J = 10,8 Hz, 1H), 1,61 (s, 9H). EI-MS m/z : 438,2($\text{M}^{+1} + \text{Na}$).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTB-Q11-2

[001050] Rendimento 79%

[001051] RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8,09 (brs, 1H) 7,77 (m, 3H), 7,57 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 7,46 (t, J = 7,6 Hz, 1H), 7,32 (m, 1H), 6,78 (m, 1H), 5,56 (m, 1H), 5,46 (d, J = 2,8 Hz, 1H), 5,22 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 5,12 (dd, J = 10,4, 3,2 Hz, 1H), 4,30 (brs, 1H), 4,25 – 4,02 (m, 5H), 3,93 (m, 1H), 3,60 (m, 15H), 3,31 (m, 2H), 2,17 (s, 3H), 2,04 (s, 3H), 1,95 (s, 6H), 1,56 (s, 9H). EI-MS m/z : 1080,6(M^{+1}).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTB-Q11

[001052] O composto IntB-11-2 (50 mg, 0,046 mmol) foi dissolvido em HCl 4 N em 1,4-dioxano (1 ml) a 0°C sob atmosfera de N_2 . Após agitação à temperatura ambiente por 4 horas, a mistura foi diluída com DCM (5 ml) e concentrada. O composto IntB-Q11 foi usado diretamente na etapa seguinte sem purificação adicional (47 mg, 99%).

[001053] EI-MS m/z : 980,5(M^{+1}).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTB-Q12-1

[001054] Rendimento 46%; EI-MS m/z : 452,2($\text{M}^{+1} + \text{Na}$).

[001055] RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8,4 (brs, 1H) 7,91 (dd, J = 6,8, 2,4 Hz, 1H), 7,38 (m, 2H), 4,34 (m, 1H), 4,23 (m, 1H), 4,05 (m, 1H), 3,62 (d, J = 10,4, 1H), 3,30 (t, J = 11,2, 1H), 2,83 (s, 1H), 1,61 (s, 9H).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTB-Q12-2

Após agitação por 30 minutos, a reação foi amornada até a temperatura ambiente e adicionalmente agitada por 1 hora. A mistura foi diluída com EA (20 ml) e lavada com H₂O (10 ml). O composto IntB-Q15-1 (50 mg, 80%) como uma espuma amarela pálida.

[001062] EI-MS m/z: 398,2(M⁺+Na).

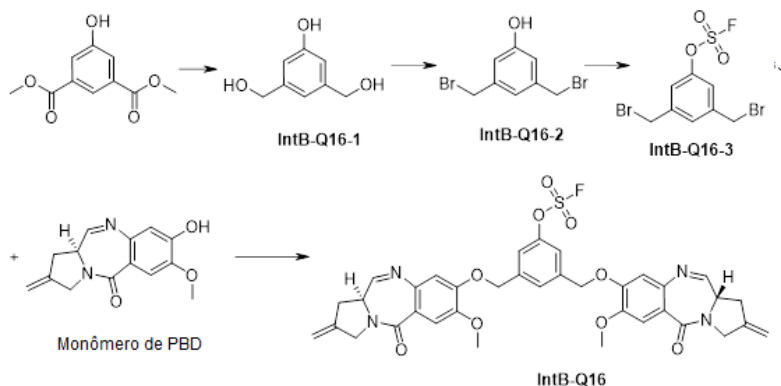
[001063] RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,02 (brs, 1H) 7,79 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,72 (t, J = 8,8 Hz, 1H), 7,51 (m, 1H), 7,38 (m, 1H), 4,16 (m, 1H), 4,04 (m, 1H), 3,92 (m, 1H), 3,71 (m, 1H), 3,36 (m, 1H), 2,27, (s, 3H), 1,54 (s, 9H).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTB-Q15

[001064] O composto IntB-Q15 foi sintetizado através de uma via sintética similar conforme descrito no Exemplo 55.

[001065] Rendimento 99%; EI-MS m/z: 276,2(M⁺).

[EXEMPLO 57] PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTB-Q16



PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTB-Q16-1

[001066] A uma solução de 5-hidroxi-isoftalato de dimetila (5,0 g, 23,79 mmol) em THF (300 ml), foi adicionado LAH (3,6 g, 95,15 mmol) a 0°C sob uma atmosfera de nitrogênio. Após agitação à temperatura ambiente por 17 horas, 15% de solução aquosa de NaOH (10 ml) e água destilada (30 ml) foram adicionados. Após a mistura ter sido extraída com EA (500 ml), a camada orgânica foi lavada com salmoura (100 ml), seca com Na₂SO₄, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para obter o

composto IntB-Q16-1 (3,02 g, 82%).

[001067] RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9,21 (s, 1H), 6,66 (s, 1H), 6,58 (s, 2H), 5,07 (t, $J = 5,6$ Hz, 2H), 4,38 (d, $J = 5,6$ Hz, 4H).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTB-Q16-2

[001068] A uma solução de composto IntB-Q16-1 (881,1 mg, 5,72 mmol) em AcOH (15 ml), foram adicionados 33% de HBr em AcOH (2,6 ml, 14,29 mmol) a 0°C sob atmosfera de N_2 . Após a mistura ter sido amornada a 65°C e agitada por 8 horas e agitada novamente à temperatura ambiente por 2 dias. DCM (50 ml) e água (30 ml) foram adicionados. A camada orgânica foi lavada com solução aquosa de NaHCO_3 , seca com Na_2SO_4 , filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatograma em coluna para obter o composto IntB-Q16-2 (1,1 g, 71%).

[001069] RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 6,99 (s, 1H), 6,81 (s, 2H), 4,85 (s, 1H), 4,41 (s, 4H).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTB-Q16-3

[001070] A uma solução de composto IntB-Q16-2 (1,0 g, 3,57 mmol) em DCM (35 ml), foi adicionado TEA (0,45 ml, 3,21 mmol) à temperatura ambiente sob atmosfera de N_2 . A mistura foi agitada por 1 hora e DCM (50 ml) e água (30 ml) foram adicionados. A camada orgânica foi lavada com solução aquosa de NaHCO_3 , seca com Na_2SO_4 , filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para obter o composto IntB-Q16-3 (941,7 mg, 73%).

[001071] RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,47 (s, 1H), 7,32 (s, 2H), 4,46 (s, 4H).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTB-Q16

[001072] A uma solução de composto IntB-Q16-3 (200 mg, 0,55 mmol) e um monômero de PBD (342,3 mg, 1,32 mmol) preparado por um método similar, conforme descrito no documento nº EP

e composto Int-TG1 (107 mg, 0,19 mmol) em ACN (2 ml) e DMF (0,2 ml), foi adicionado BEMP (23,3 μ l, 0,08 mmol) sob atmosfera de N₂. Após agitação à temperatura ambiente por 2,5 minutos, DBU (12 μ l, 0,08 mmol) foi, ainda, adicionado ao mesmo, e a mistura foi agitada à temperatura ambiente por 2 horas e diluída com EA (30 ml X 2). A camada orgânica foi lavada com H₂O (30 ml) e salmoura (20 ml), seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi separado e purificado por HPLC preparatória para obter o composto A-18a (22,5 mg, 14%).

[001141] EI-MS m/z: 900(M⁺).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO A-18B

[001142] A uma solução de composto A-18a (22,5 mg, 0,022 mmol) em ACN (1 ml), foram adicionados Boc₂O (14,5 mg, 0,066 mmol) e DMAP (2,7 mg, 0,022 mmol) sob atmosfera de N₂. Após agitação de um dia para o outro à temperatura ambiente, Boc₂O (4,8 mg, 0,022 mmol) e DMAP (1,4 mg, 0,011 mmol) foram, ainda, adicionados à mesma, e a mistura foi agitada à temperatura ambiente por 5 horas. A mistura foi separada e purificada por HPLC preparatória para obter o composto A-18 (10 mg, 37%).

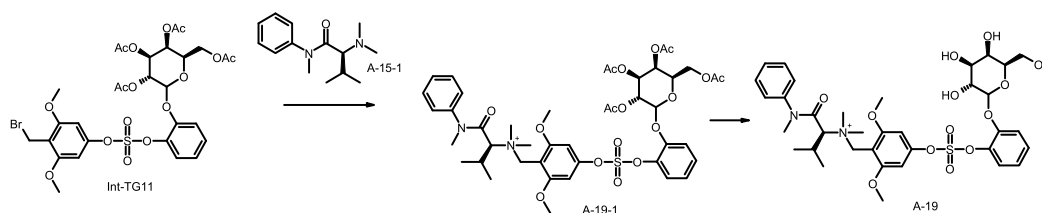
[001143] EI-MS m/z: 1101(M⁺).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO A-18

[001144] O composto A-18 foi sintetizado através de uma via sintética similar conforme descrito no Exemplo 58.

[001145] EI-MS m/z: 850(M⁺).

[EXEMPLO 75] PREPARAÇÃO DE COMPOSTO A-19



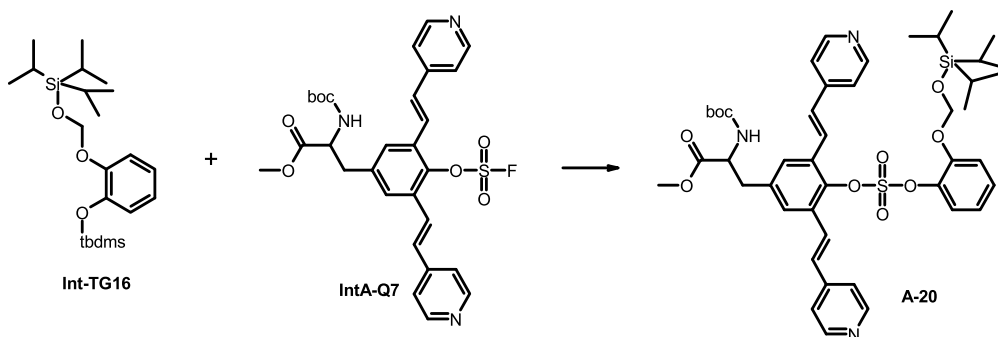
[001146] O composto A-19 foi sintetizado através de uma via sintética similar conforme descrito no Exemplo 72.

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO A-19-1

[001147] Rendimento 44 %; EI-MS m/z: 904 (M^{+1}).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO A-19

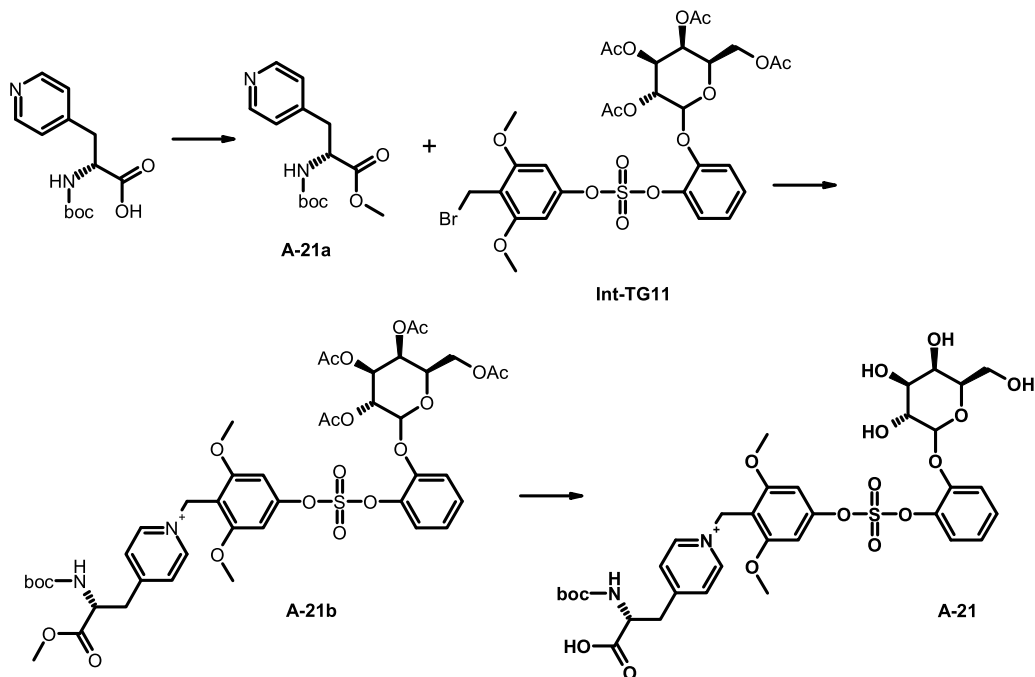
[001148] Rendimento 70 %; EI-MS m/z: 736 (M^{+1}).

[EXEMPLO 76] PREPARAÇÃO DE COMPOSTO A-20

[001149] O composto A-20 foi sintetizado através de uma via sintética similar conforme descrito no Exemplo 71.

[001150] Rendimento 68 %; EI-MS m/z: 861(M^{+1}).

[Exemplo 77] Preparação de composto A-21

**PREPARAÇÃO DE COMPOSTO A-21A**

[001151] N-Boc-3-(4-piridil)-D-alanina (300 mg, 0,06 mmol) e DMAP (275 mg, 2,25 mmol) foram dissolvidos em MeOH (5 a 0°C). DCC (465 mg, 2,25 mmol) foi adicionado a 0°C, a mistura foi agitada a 0°C por 2

horas. A reação foi amornada à temperatura ambiente e agitada de um dia para o outro. A mistura foi diluída com EA (30 ml), filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para obter o composto A-21a.

[001152] RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8,46 (d, $J = 5,6$ Hz, 2H), 7,37 (d, $J = 8$ Hz, 1H), 7,26 (d, $J = 5,6$ Hz, 2H), 4,29-4,23 (m, 1H), 3,63 (s, 3H), 3,06-3,01 (m, 1H), 2,89-2,83 (m, 1H), 1,31 (s, 9H).

[001153] EI-MS m/z : 281(M^{+1}).

[001154] O composto A-21 foi sintetizado através de uma via sintética similar conforme descrito no Exemplo 72.

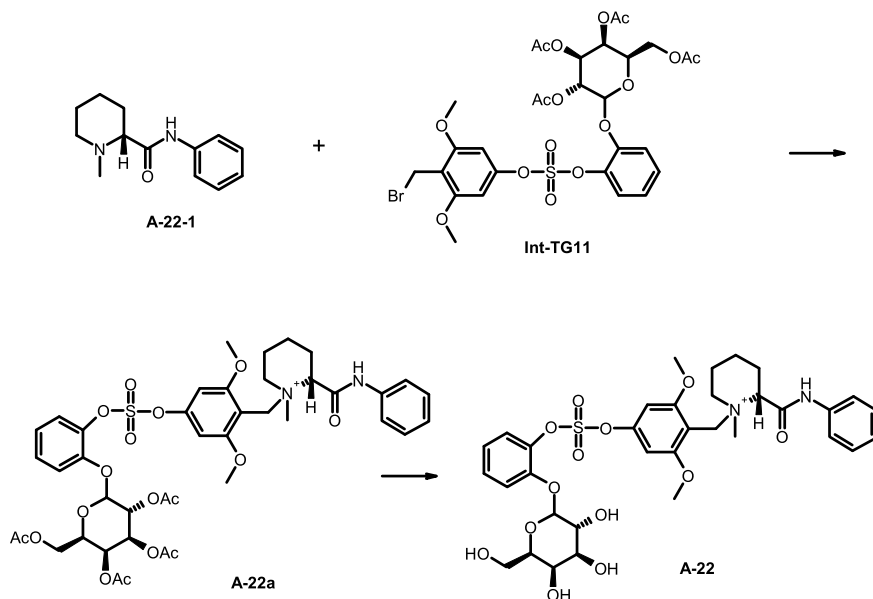
PREPARAÇÃO DE COMPOSTO A-21B

[001155] Rendimento 29%; EI-MS m/z : 950(M^{+1})

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO A-21

[001156] Rendimento 47%; EI-MS m/z : 768(M^{+1}).

[EXEMPLO 78] PREPARAÇÃO DE COMPOSTO A-22



[001157] O composto A-22 foi sintetizado através de uma via sintética similar conforme descrito no Exemplo 72.

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO A-22A

[001158] Rendimento 68% EI-MS m/z : 888(M^{+1}).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO A-22

ca similar conforme descrito no Exemplo 69.

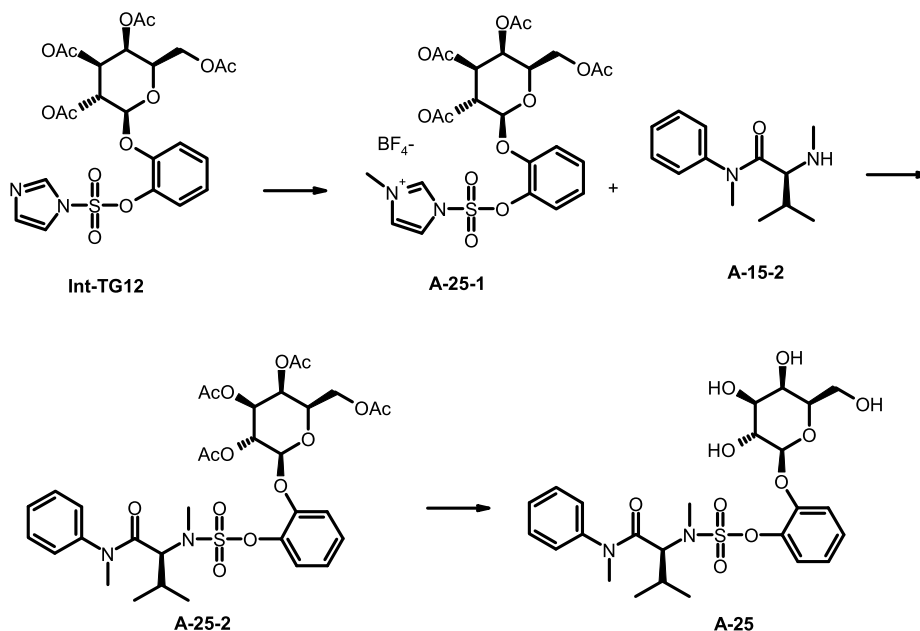
PREPARAÇÃO DE COMPOSTO A-24A

[001164] Rendimento 33 %; EI-MS m/z: 851(M^{+1}).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO INTA-Q5

[001165] Rendimento 80%; EI-MS m/z: 705($M^{+1}+Na$).

[EXEMPLO 81] PREPARAÇÃO DE COMPOSTO A-25



PREPARAÇÃO DE COMPOSTO A-25-2

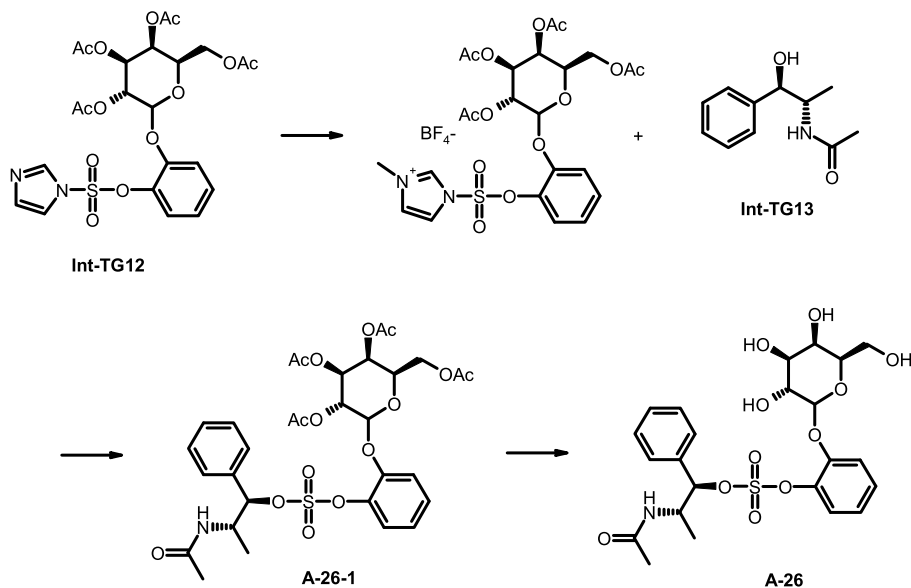
[001166] A uma solução de composto Int-TG12 (100 mg, 0,175 mmol) em DCM (6 ml), foi adicionado triflato de metila (30 μ l, 0,263 mmol) a 0°C sob atmosfera de N_2 . A mistura foi agitada à temperatura ambiente por 4 horas concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi dissolvido em ACN seco (5 ml) e adicionado o composto A-15-2 (46 mg, 0,21 mmol) à temperatura ambiente. A mistura foi aquecida a 40°C por 8 horas, bruscamente arrefecida com HCl aquoso 2 N (8 ml) e extraída com EtOAc (2 x 10 ml). A camada orgânica foi seca com $MgSO_4$ anidro, filtrada e concentrada. O resíduo foi dissolvido em DMSO (1 ml) e purificado por HPLC preparatória, que produziu o composto A-25-2 (43,5 mg, 35%).

[001167] EI-MS m/z: 723 (M^{+1}).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO A-25

[001168] O composto A-25 foi sintetizado através de uma via sintética similar conforme descrito no Exemplo 61.

[001169] Rendimento 60 %; EI-MS m/z: 555 (M^{+1}).

[EXEMPLO 82] PREPARAÇÃO DE COMPOSTO A-26

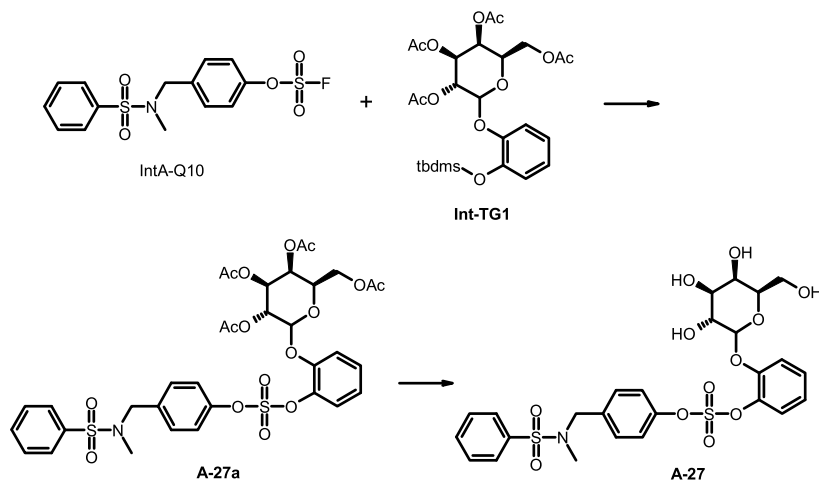
[001170] O composto A-26 foi sintetizado através de uma via sintética similar conforme descrito no Exemplo 81.

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO A-26-1

[001171] Rendimento 8 %; EI-MS m/z: 696 (M^{+1}).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO A-26

[001172] Rendimento 32 %; EI-MS m/z: 528 (M^{+1}).

[EXEMPLO 83] PREPARAÇÃO DE COMPOSTO A-27

[001192] O composto B-7 foi sintetizado através de uma via sintética similar conforme descrito no Exemplo 67 e no Exemplo 61.

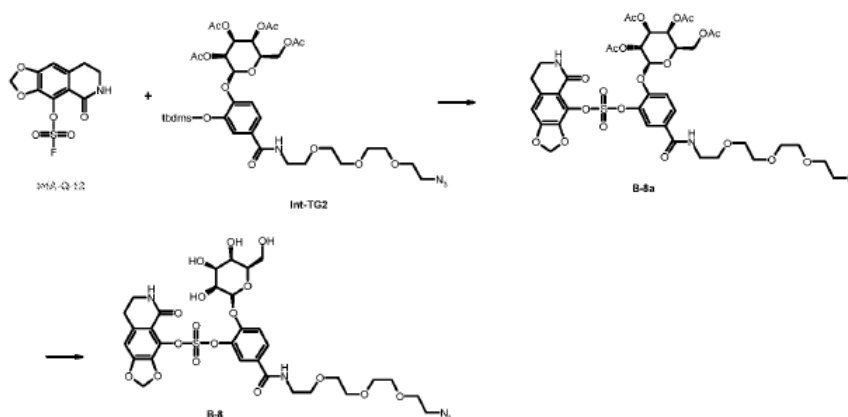
PREPARAÇÃO DE COMPOSTO B-7A

[001193] Rendimento 99%; EI-MS m/z: 1063 (M^{+1}).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO B-7

[001194] EI-MS m/z: 895 (M^{+1}).

[EXEMPLO 89] PREPARAÇÃO DE COMPOSTO B-8



PREPARAÇÃO DE COMPOSTO B-8A

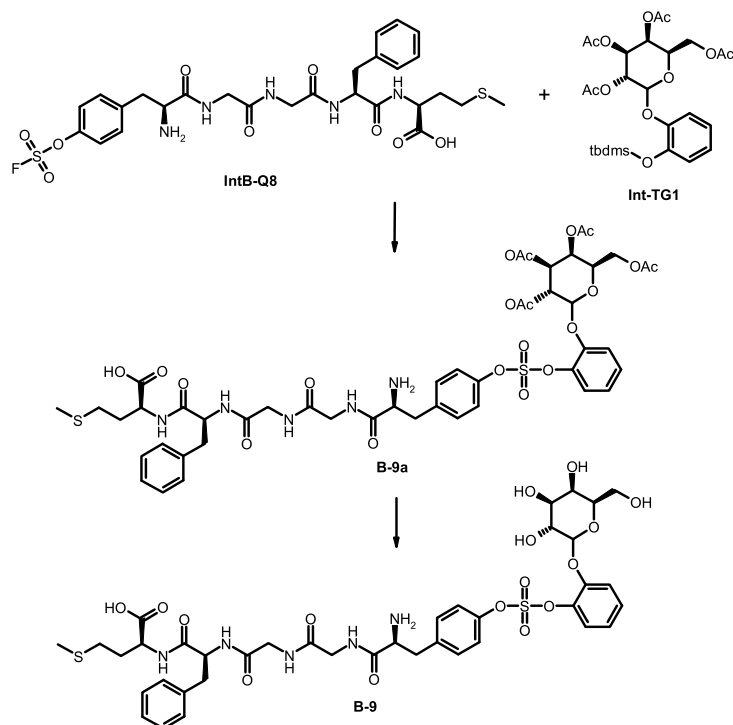
[001195] O composto B-8a foi sintetizado através de uma via sintética similar conforme descrito no Exemplo 67

[001196] Rendimento 16%; EI-MS m/z: 954(M^{+1}), 976 ($M^{+1}+Na$)

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO B-8

[001197] A uma solução de composto B-8a (3,1 mg, 0,0032 mmol) em metanol (1 ml), foram adicionados 25% de NaOMe em MeOH (3 μ l, 0,012 mmol) a 0°C. Após agitação à temperatura ambiente por 1,5 hora, a mistura foi neutralizada com solução aquosa de HCl 2 M e, então, purificada por HPLC preparatória para obter um composto B-8 como um sólido rosa (1,2 mg, 47%).

[EXEMPLO 90] PREPARAÇÃO DO COMPOSTO B-9



[001198] O composto B-9 foi sintetizado através de uma via sintética similar conforme descrito no Exemplo 67 e no Exemplo 61.

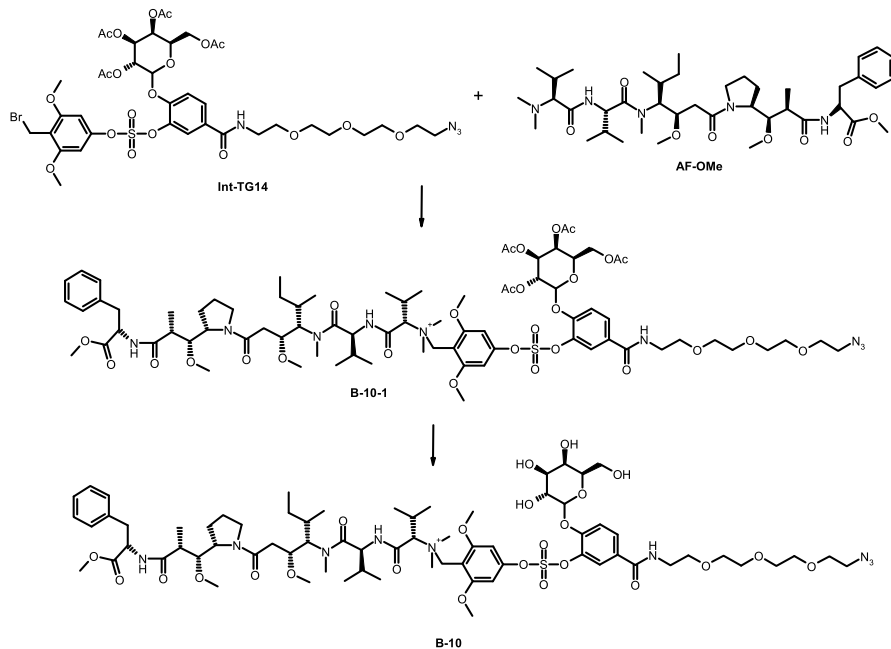
PREPARAÇÃO DE COMPOSTO B-9A

[001199] Rendimento 50%; EI-MS m/z: 1077 (M^{+1}).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO B-9

[001200] Rendimento 32%; EI-MS m/z: 908 (M^{+1}).

[EXEMPLO 91] PREPARAÇÃO DE COMPOSTO B-10



PREPARAÇÃO DE COMPOSTO AF-OME

[001201] A uma solução de composto MMAF-OMe (120 mg, 0,161 mmol) em DMF (4 ml), foram adicionados 37% de formaldeído (36 $\mu\ell$, 0,483 mmol) e AcOH (184 $\mu\ell$, 3,22 mmol) à temperatura ambiente. Após agitação 5 minutos, a mistura foi adicionada a NaCNBH₃ (21 mg, 0,322 mmol), agitada por 2 horas e bruscamente arrefecida com NaHCO₃ saturado (10 ml). EtOAc (20 ml) foi adicionado. A camada orgânica foi seca sobre Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna para produzir o composto AF-OMe (98 mg, 80%). EI-MS m/z: 761(M⁺).

[001202] O composto B-10 foi sintetizado através de uma via sintética similar conforme descrito no Exemplo 72.

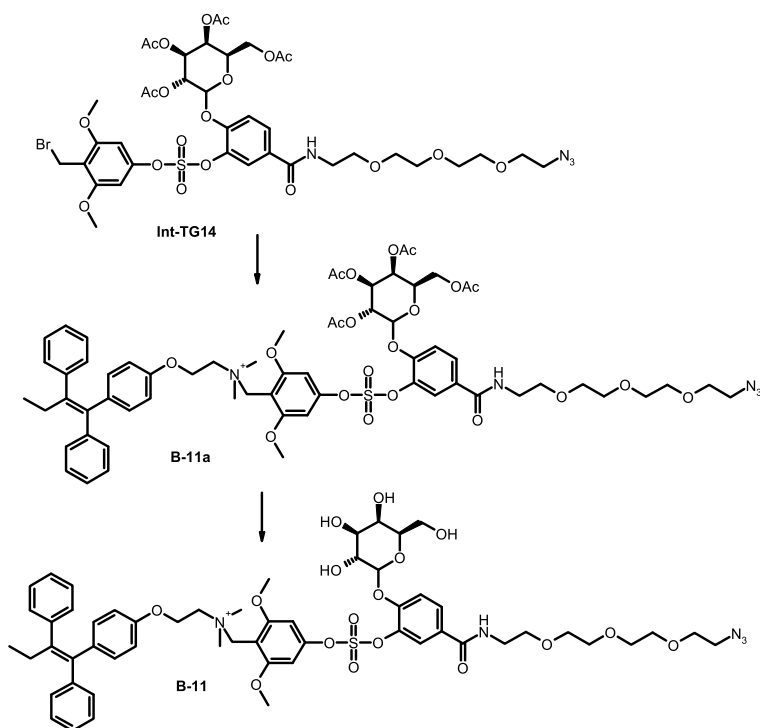
PREPARAÇÃO DE COMPOSTO B-10-1

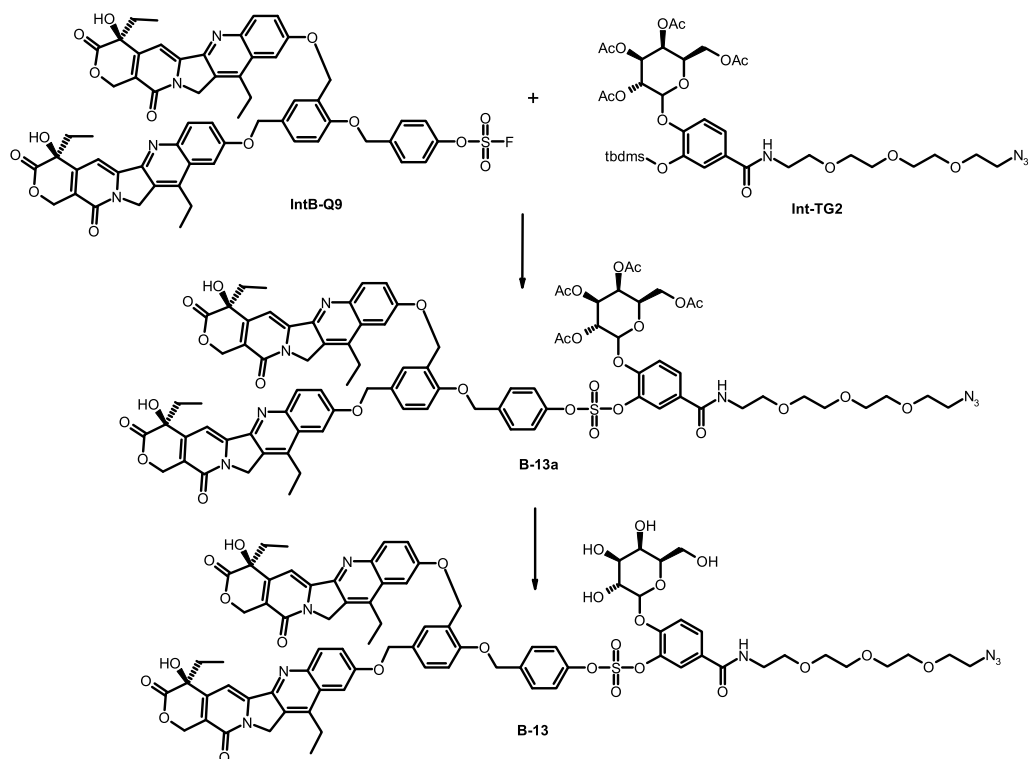
[001203] Rendimento 27 %; EI-MS m/z: 1673 (M⁺).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO B-10

[001204] Rendimento 81 %; EI-MS m/z: 1491 (M⁺).

[EXEMPLO 92] PREPARAÇÃO DO COMPOSTO B-11





[001211] O composto B-13 foi sintetizado através de uma via sintética similar conforme descrito no Exemplo 74.

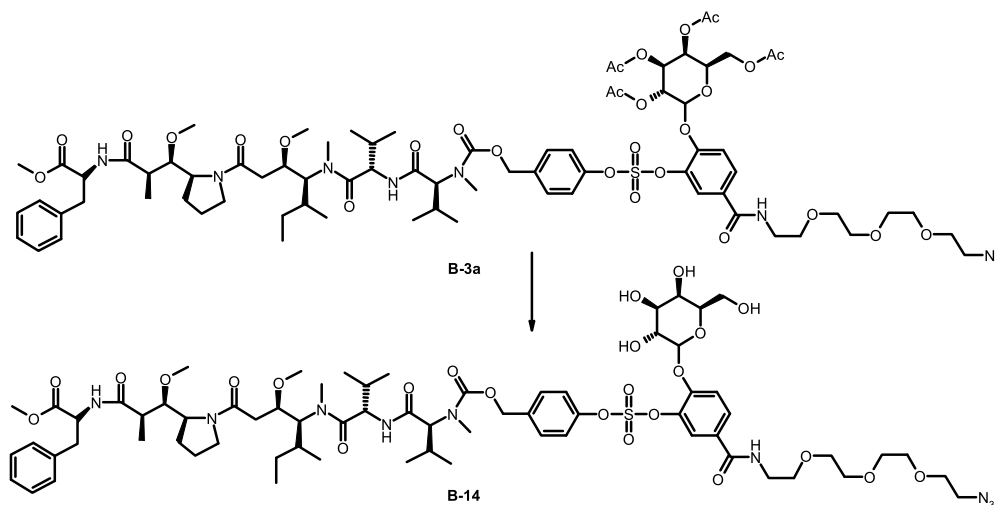
PREPARAÇÃO DE COMPOSTO B-13A

[001212] Rendimento 9%; EI-MS m/z: 878($M^{+1/2}$).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO B-13

[001213] Rendimento 33%; EI-MS m/z: 1610(M^{+1}).

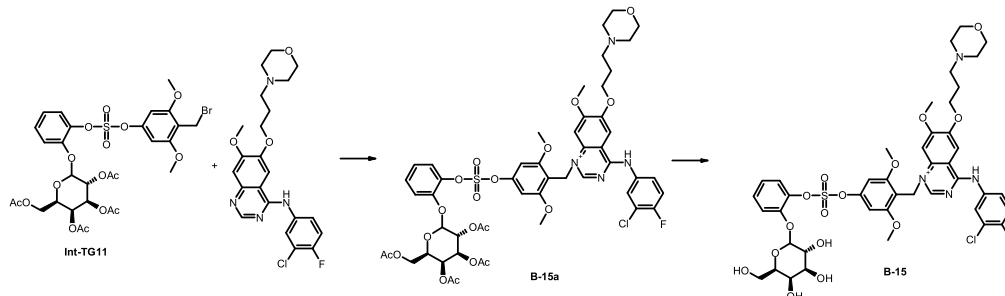
[EXEMPLO 95] PREPARAÇÃO DO COMPOSTO B-14



[001214] O composto B-14 foi sintetizado através de uma via sintética similar conforme descrito no Exemplo 61.

[001215] Rendimento 30 %; EI-MS m/z: 1474 (M^+).

[EXEMPLO 96] PREPARAÇÃO DE COMPOSTO B-15



[001216] O composto B-15 foi sintetizado através de uma via sintética similar conforme descrito no Exemplo 72.

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO B-15A

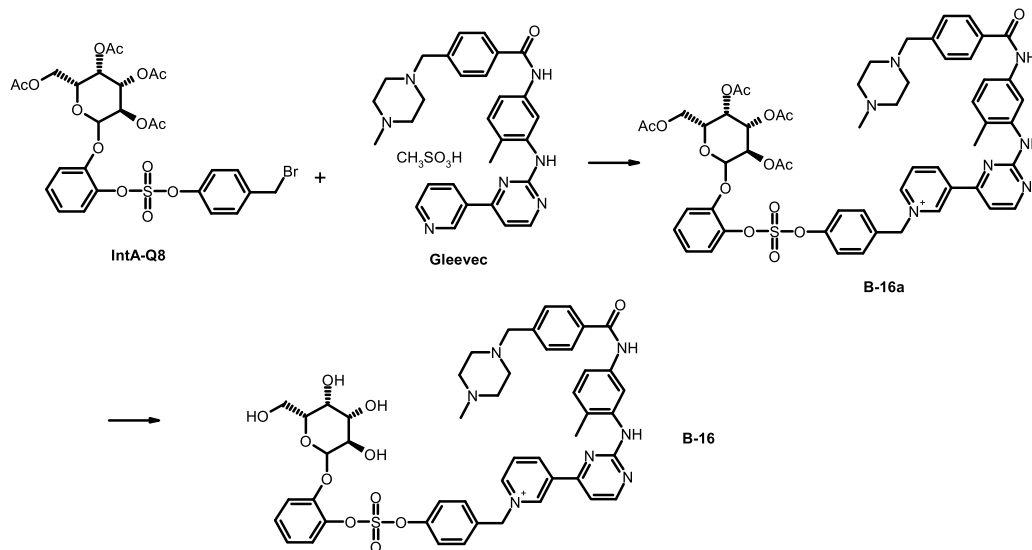
[001217] Rendimento 45 %; EI-MS m/z: 1116 (M^+).

[001218] RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,73 (s, 1H), 8,01 (m, 1H), 7,97 (s, 1H), 7,68 (m, 1H), 7,51 (t, $J = 9,2$ Hz, 1H), 7,45 (d, $J = 8$ Hz, 1H), 7,36 (m, 2H), 7,26 (s, 1H), 7,10-7,07 (m, 1H), 6,89 (s, 2H), 4,97 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 4,62 (s, 2H), 4,27 (m, 2H), 4,04-3,95 (m, 7H), 3,96 (s, 6H)

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO B-15

[001219] Rendimento 70 %; EI-MS m/z: 948 (M^{+1}).

[EXEMPLO 97] PREPARAÇÃO DE COMPOSTO B-16



[001220] O composto B-16 foi sintetizado através de uma via sintética

ca similar conforme descrito no Exemplo 72.

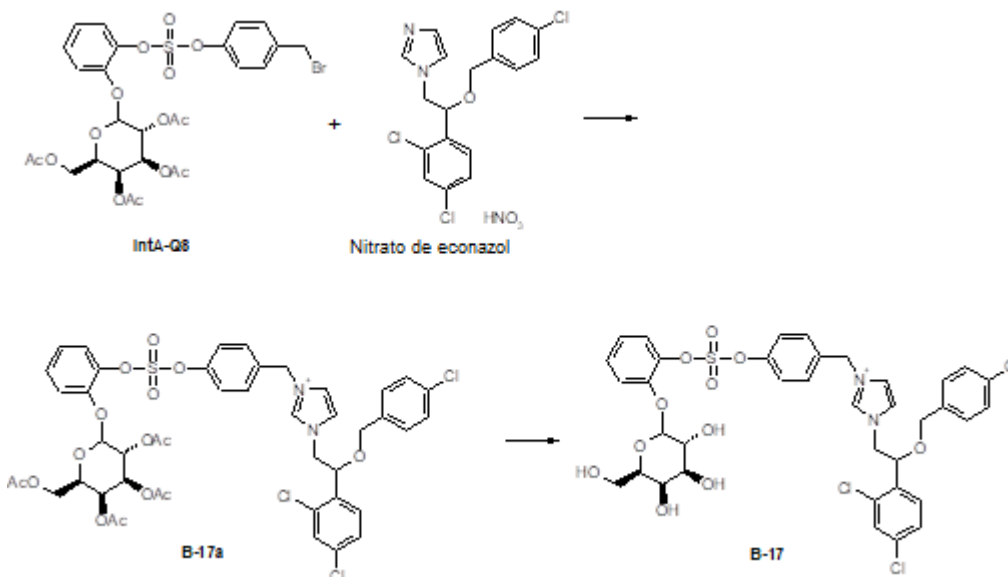
PREPARAÇÃO DE COMPOSTO B-16A

[001221] Rendimento 99 %; EI-MS m/z: 1103 (M^{+1}).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO B-16

[001222] Rendimento 85 %; EI-MS m/z: 935 (M^{+1}).

[EXEMPLO 98] PREPARAÇÃO DO COMPOSTO B-17



[001223] O composto B-17 foi sintetizado através de uma via sintética similar conforme descrito no Exemplo 72.

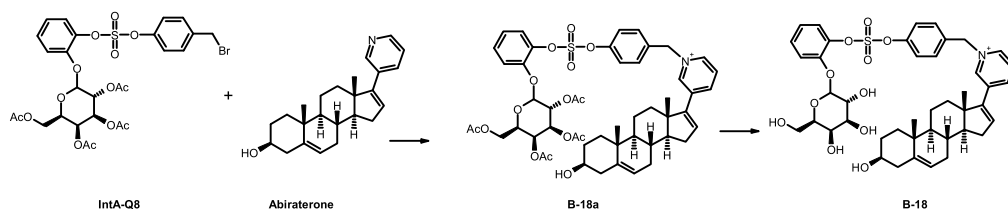
PREPARAÇÃO DE COMPOSTO B-17A

[001224] Rendimento 55 %; EI-MS m/z: 991 (M^{+1}).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO B-17

[001225] Rendimento 60 %; EI-MS m/z: 823 (M^{+1}).

[EXEMPLO 99] PREPARAÇÃO DO COMPOSTO B-18



[001226] O composto B-18 foi sintetizado através de uma via sintética similar conforme descrito no Exemplo 72.

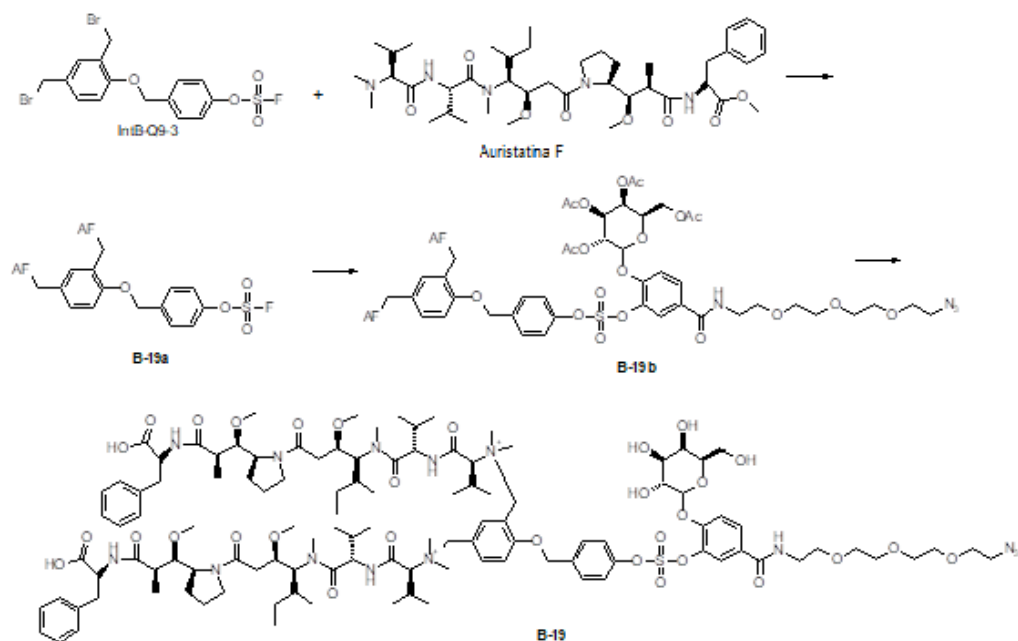
PREPARAÇÃO DE COMPOSTO B-18A

[001227] Rendimento 72 %; EI-MS m/z: 960 (M^{+1}).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO B-18

[001228] Rendimento 54 %; EI-MS m/z: 791 (M^{+1}).

[EXEMPLO 100] PREPARAÇÃO DO COMPOSTO B-19



[001229] O composto B-19 foi sintetizado através de uma via sintética similar conforme descrito no Exemplo 92 e no Exemplo 70.

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO B-19A

[001230] Rendimento 38 %; EI-MS m/z: 914($M^{+1/2}$).

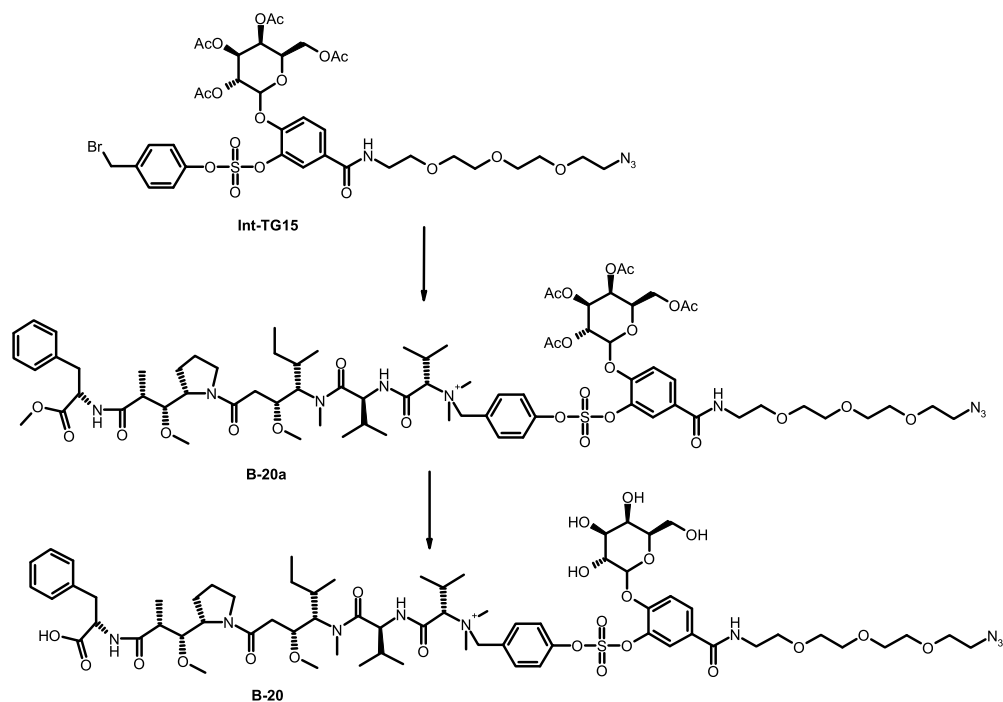
PREPARAÇÃO DE COMPOSTO B-19B

[001231] Rendimento 60 %; EI-MS m/z: 831($M^{+1/3}$).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO B-19

[001232] Rendimento 17 %; EI-MS m/z: 1148($M^{+1/2}$).

[EXEMPLO 101] PREPARAÇÃO DE COMPOSTO B-20



[001233] O composto B-20 foi sintetizado através de uma via sintética similar conforme descrito no Exemplo 72.

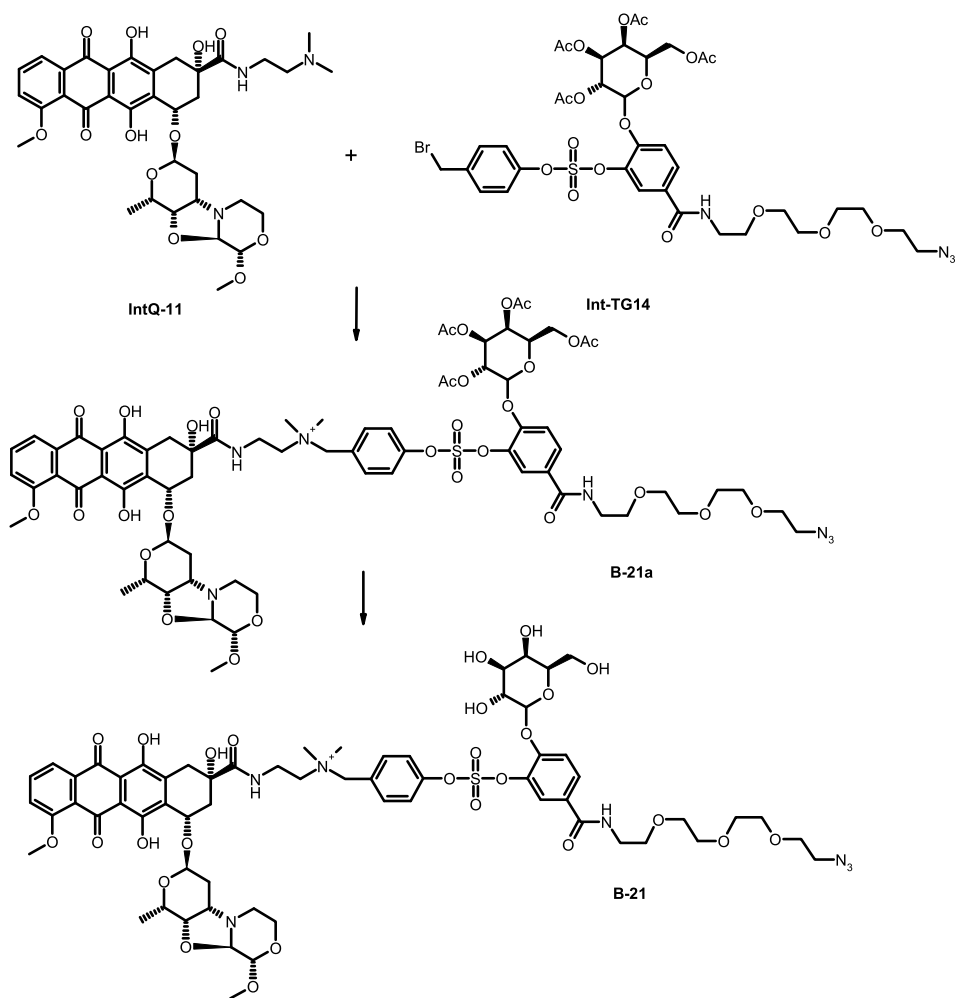
PREPARAÇÃO DE COMPOSTO B-20A

[001234] Rendimento 14 %; EI-MS m/z: 1614 (M^{+1}).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO B-20

[001235] Rendimento 37 %; EI-MS m/z: 1432 (M^{+1}).

[EXEMPLO 102] PREPARAÇÃO DO COMPOSTO B-21



[001236] Composto B-21 foi sintetizado através de uma via sintética similar conforme descrito no Exemplo 72.

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO B-21A

[001237] Rendimento 38 EI-MS m/z: 1551 (M^{+1}).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO B-21

[001238] Rendimento 54 %; EI-MS m/z: 1383 (M^{+1}).

[EXEMPLO 103] PREPARAÇÃO DO COMPOSTO B-22

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO D-14A

[001300] A uma solução de composto (A) (10 mg, 0,018 mmol) e composto Int-TG15 (16,8 mg, 0,018 mmol) em ACN (1 ml), foi adicionada uma peneira molecular (100 mg) sob atmosfera de N₂. Após agitação à temperatura ambiente por 10 minutos, Ag₂O (12,5 mg, 0,054 mmol) foi adicionado. A mistura foi agitada à temperatura ambiente por 5 horas e filtrada através de celite e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por HPLC preparatória para obter o composto D-14a (18 mg, 71%).

[001301] RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,99 (m, 2H), 7,85 (s, 1H), 7,77 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,65 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,58 (m, 1H), 7,44~7,40 (m, 2H), 7,36 (J = 8,4 Hz, 2H), 7,29 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 6,94 (m, 1H), 6,46 (s, 1H), 6,11 (s, 1H), 5,94 (m, 2H), 5,80 (s, 1H), 5,56 (m, 1H), 5,50~5,46 (m, 2H), 5,35~5,31 (m, 2H), 5,25~5,22 (m, 2H), 5,15~5,13 (m, 2H), 4,38 (m, 1H), 4,25~4,08 (m, 4H), 3,65~3,59 (m, 15H), 3,54~3,49 (m, 1H), 3,33 (m, 2H), 2,17 (s, 3H), 2,13 (s, 3H), 2,09 (s, 3H), 2,06 (s, 3H), 2,04 (s, 3H), 2,00 (s, 3H), 1,81 (s, 3H). EI-MS m/z: 705 (1/2M⁺), 1408 (M⁺), 1430(M⁺Na).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO D-14B

[001302] A uma solução do composto D-14a (16 mg, 0,011 mmol) em DCM (4 ml), foi adicionado NaOMe 1 M em metanol (20 µl) a 0°C. Após agitação a 0°C por 20 minutos, a mistura foi bruscamente arrefecida com solução aquosa de HCl 1 M (30 µl) e, então, purificada por HPLC preparatória para obter o composto D-14b (4 mg, 32%)

[001303] EI-MS m/z: 557 (1/2M⁺), 1114 (M⁺), 1136 (M⁺⁺Na).

PREPARAÇÃO DE COMPOSTO D-14

[001304] O composto D-14 foi sintetizado através de uma via sintética similar conforme descrito no Exemplo 56.

[001305] Rendimento 12 %; EI-MS m/z: 830 (M+1/2).

[EXEMPLO 130] PREPARAÇÃO DE COMPOSTO D-15

(5% de DMSO). MPS usado como materiais-padrão foi dissolvido em solução de tampão PBS para produzir uma solução 500 μ M. 406 μ l da solução de tampão PBS (pH 7,4) e 140 μ l do composto (500 μ M) da presente invenção e 140 μ l de MPS foram misturados. O mesmo foi seguido pela adição de solução de enzima (14 μ l de 1 mg/ml). Em comparação com β -galactosidase humana, 21 μ l de solução enzimática (1 mg/ml) foram adicionados para atingir a mesma concentração molar, e o composto da presente invenção e MPS que têm, cada um, uma quantidade de 140 μ l e 399 μ l da solução tampão (pH 7,4) foram misturados. A mistura de reação resultante foi incubada a 37 °C. Enzima β -galactosidase de *Escherichia coli* (Sigma G4155) foi usada na mistura de reação. A solução de reação enzimática foi dividida em alíquotas a 0 min antes de a reação e em um tempo predeterminado após a reação, respectivamente, em que cada alíquota tinha 70 μ l. Então, o composto restante da presente invenção ou MPS e um material liberado pela reação enzimática foram quantitativamente analisados por HPLC.

MÉTODO 2) β -GALACTOSIDASE HUMANA

[001320] Cada composto A-3, B-2 e B-10 da presente invenção foi dissolvido em DMSO e misturado com solução tampão PBS para preparar solução de estoque 500 μ M (5% de DMSO). MPS usado como um material padrão foi preparado como uma solução para ter uma concentração de 500 μ M em solução tampão PBS. 280 μ l da solução tampão PBS (pH 7,4) e do composto B-2 (500 μ M) da presente invenção e MPS que têm, cada um, uma quantidade de 140 μ l foram misturados entre si. Então, 140 μ l de solução enzimática a 0,1 mg/ml foram adicionados aos mesmos, preparando, assim, uma solução de reação enzimática em uma quantidade total de 700 μ l. A mistura de reação foi incubada a 37 °C. Enzima β -galactosidase humana (R&D 6464-GH-020) foi usada na mistura de reação. A mistura de reação enzimática

foi dividida em alíquotas a 0 min antes de a reação e em um tempo predeterminado após a reação, respectivamente, em que cada alíquota tinha 70 μ l. Então, o composto restante da presente invenção ou MPS e SN38 liberado pela reação enzimática foram quantitativamente analisados por HPLC.

MÉTODO 3) β -GLICURONIDASE DE ESCHERICHIA COLI

[001321] Os compostos A-1 e A-5 da presente invenção foram dissolvidos em DMSO e misturados com solução tampão PBS para preparar uma solução que tem uma concentração de 500 μ M (5% de DMSO). MPS usado como um material padrão foi preparado como uma solução para ter uma concentração de 500 μ M em solução tampão PBS. 406 μ l da solução de tampão PBS (pH 7,4) e 140 μ l do composto (500 μ M) da presente invenção e 140 μ l de MPS foram misturados. Então, 14 μ l de solução enzimática (1 mg/ml) foram adicionados aos mesmos, preparando, assim, uma solução de reação enzimática em uma quantidade total de 700 μ l. A mistura de reação foi incubada a 37 °C. Enzima β -glicuronidase de Escherichia coli (Sigma G7396) foi usada na mistura de reação. A mistura de reação enzimática foi dividida em alíquotas a 0 min antes de a reação e em um tempo predeterminado após a reação, respectivamente, em que cada alíquota tinha 70 μ l. Então, o composto restante da presente invenção ou MPS e um material liberado pela reação enzimática foram quantitativamente analisados por HPLC.

MÉTODO 4) β -GALACTOSIDASE + β -GLICURONIDASE DE ESCHERICHIA COLI

[001322] O composto A-5 da presente invenção foi dissolvido em DMSO e misturado com solução tampão PBS para preparar uma solução que tem uma concentração de 500 μ M (5% de DMSO). MPS usado como um material padrão foi preparado como uma solução para ter uma concentração de 500 μ M em solução tampão PBS. 392 μ l da so-

lução de tampão PBS (pH 7,4) e 140 µl do composto A-5 (500 µM) da presente invenção e MPS foram misturados. Então, 14 µl de 1 mg/ml de β-galactosidase (Sigma G4155) e 14 µl de 1 mg/ml de β-glicuronidase (Sigma G7396) foram adicionados ao mesmo, preparando, assim, uma mistura de reação enzimática em uma quantidade total de 700 µl. A mistura de reação foi incubada a 37 °C. A mistura de reação enzimática foi dividida em alíquotas a 0 min antes de a reação e em um tempo predeterminado após a reação, respectivamente, em que cada alíquota tinha 70 µl. Então, o composto restante da presente invenção ou MPS e um material liberado pela reação enzimática foram quantitativamente analisados por HPLC.

TABELA 1

Compostos da presente invenção	t _{1/2} de liberação de TG (min)	t _{1/2} de liberação de parte Q (min)	Método experimental
A-1	0,43 ± 0,11	36,38 ± 0,39	Método 3
A-2	3,71 ± 0,22	123,08 ± 25,96	Método 1
A-3	10,71	38,18	Método 2
A-4	< 5	15,3	Método 1
A-5	< 5	70,87	Método 3
	< 5	Sem reação	Método 1
	< 5	139,4	Método 4
A-6	4,60 ± 1,72	40,36 ± 8,03	Método 1
A-9	<5	37,39	Método 1
A-10	<5	15,24	Método 1
A-12	<5	14,34	Método 1
A-13	<5	8,01	Método 1
A-14	N/D	195,2	Método 1
A-15	N/D	<5	Método 1
A-17	<1	6,7	Método 1
A-18	<5	7,4	Método 1
A-19	rápido	< 5	Método 1
A-21	rápido	< 5	Método 1
A-22	rápido	< 5	Método 1
A-23	rápido	< 5	Método 1
B-1	5,92	40,87	Método 1

B-2	0,28	1,85	Método 1/pH7,4
	5,75	46,85	Método 1/pH5,0
	N/D	112,2	Método 2/pH7,4
	5,33	39,41	Método 2/pH5,0
B-3	<10	40,62	Método 1
B-4	20,68	312,9	Método 1
B-6	< 5	629,4	Método 1
B-7	< 5	50,23	Método 1
B-8	N.D	4,3	Método 1
B-9	< 5	6,82	Método 1
B-10	2,1	6,6	Método 1/pH7,4
	8,9	27,9	Método 2/pH5,0
B-11	< 5	6,7	Método 1
B-14	N.D	433	Método 1
B-15	N.D	2,4	Método 1
B-16	N.D	9,0	Método 1
B-19	rápido	14,4	Método 1
C-3	< 5	52,03	Método 1

(N/D = não detectado sob HPLC)

[EXEMPLO 139] TESTE DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACO POR ATIVAÇÃO QUÍMICA

MÉTODO USANDO AGENTE REDUTOR

[001323] O composto A-8 obtido pelo Exemplo 65 foi dissolvido em DMSO para produzir uma concentração de 10 mM e misturado com solução de MeOH para preparar uma solução que tem uma concentração de 300 μ M (40% de DMSO). MPS usado como um material padrão foi preparado como uma solução para ter uma concentração de 300 μ M com solução tampão PBS. NaBH₄, um agente redutor, foi dissolvido em MeOH para ter uma concentração de 10 mM, e 3,0 equivalentes do composto A-8 foram adicionados. Então, a mistura de reação foi incubada a 37 °C. A mistura de reação de redução foi dividida em alíquotas em 0 min antes da reação, em 5 min, 10 min e 30 min após a reação, respectivamente, em que cada alíquota tinha 80 μ l. Então, o composto restante A-8 da presente invenção ou MPS e BOC-Tyr-OMe libe-

rado pela reação enzimática foram quantitativamente analisados por HPLC.

MÉTODO QUE USA FOTORREAÇÃO

[001324] O composto A-11 obtido pelo Exemplo 68 foi dissolvido em DMSO e misturado com solução tampão PBS que tem pH de 7,4 e solução de DMSO para preparar uma solução que tem uma concentração de 300 μ M (50% de DMSO). MPS usado como um material padrão foi preparado como uma solução para ter uma concentração de 300 μ M em solução tampão PBS.

[001325] Então, a reação foi iniciada por agitação em um fotorreator de 300 W. A mistura de reação foi dividida em alíquotas em 0 min antes da reação, em 5 min, 10 min, 30 min, 180 min, 300 min, 420 min, 24 h e 48 h após a reação, respectivamente, em que cada alíquota tinha 80 μ l. Então, o composto restante A-11 da presente invenção ou MPS e BOC-Tyr-OH liberado pela fotorreação foram quantitativamente analisados por HPLC.

CONDIÇÃO DE HIDRÓLISE SOB TAMPÃO DE PH 9,2 (EXEMPLO DE TESTE DE ACORDO COM PH)

[001326] Os compostos A-7 e A-8 obtidos pelos Exemplos 63 e 64 foram dissolvidos em DMSO e misturados com solução tampão PBS que tem pH de 9,2 para preparar uma solução que tem uma concentração de 300 μ M (40% de DMSO). MPS usado como um material padrão foi preparado como uma solução para ter uma concentração de 300 μ M em solução tampão PBS. Então, a reação foi incubada a 37 °C. A mistura de reação com pH 9,2 do composto A-7 foi dividida em alíquotas em 0 min antes da reação, em 5 min, 10 min, 30 min, 60 min, 120 min e 180 min após a reação, respectivamente, em que cada alíquota tinha 80 μ l. Então, o composto restante A-7 da presente invenção ou MPS e BOC-Tyr-OH liberado na solução tampão com pH 9,2 foram quantitativamente analisados por HPLC. A mistura de reação

com pH 9,2 do composto A-8 foi dividida em alíquotas em 0 min antes da reação, em 5 min, 10 min, 30 min, 60 min, 120 min, 180 min, 240 min e 300 min após a reação, respectivamente, em que cada alíquota tinha 80 µl. Então, o composto restante A-8 da presente invenção ou MPS e BOC-Tyr-OMe liberado na solução tampão com pH 9,2 foram quantitativamente analisados por HPLC.

CONDIÇÃO DE HIDRÓLISE SOB TAMPÃO DE PH 5,0 (EXEMPLO DE TESTE DE ACORDO COM PH)

[001327] O composto A-8 obtido pelo Exemplo 65 foi dissolvido em DMSO e misturado com solução tampão PBS que tem pH de 5,0 e solução de DMSO para preparar uma solução que tem uma concentração de 300 µM (40% de DMSO). MPS usado como um material padrão foi preparado como uma solução para ter uma concentração de 300 µM com solução tampão PBS. Então, a mistura de reação foi incubada a 37 °C. A mistura de reação com pH 5,0 do composto A-8 foi dividida em alíquotas em 0 min antes da reação, em 20 min, 180 min, 630 min e 1 dia após a reação, respectivamente, em que cada alíquota tinha 80 µl. Então, o composto restante A-8 da presente invenção ou MPS e BOC-Tyr-OMe liberado na solução tampão com pH 5,0 foram quantitativamente analisados por HPLC.

DESPROTEÇÃO SOB CONCENTRAÇÃO DE ÍON DE FLÚOR

[001328] O composto A-20 foi dissolvido em DMSO para preparar uma solução que tem uma concentração de 100 µM (90% de DMSO). MPS usado como um material padrão foi preparado como uma solução para ter uma concentração de 100 µM em solução tampão PBS. A uma solução de TBAF em THF (100 mM), foi adicionado 1,0, 10,0 e 100 equivalentes de composto A-20. A mistura de reação foi incubada a 37 °C e dividida em alíquotas em 0 min antes da reação, em 5 h, 20 h, 44 h, 68 h e 116 h após a reação, respectivamente, em que cada alíquota tinha 80 µl. Então, o composto restante A-20 ou MPS liberado

na reação foi quantitativamente analisado por HPLC.

TABELA 2

Compostos da presente invenção	t _{1/2} de liberação de parte Q (min)	Método experimental
A-7	19,27	pH 9,2
A-8	41,68	pH 9,2
	Não liberado	pH 5,0
	4,42	Agente redutor
A-11	52,03	Fotorreação
A-20	2016	íon F ⁻ (1 eq)
	672	íon F ⁻ (10 eq)
	264	íon F ⁻ (100 eq)

[EXEMPLO 140] ANÁLISE IN VITRO DE CONJUGADO DE LIGANTE-FÁRMACO

[001329] Células cancerosas KB foram coletadas e inoculadas em placas com 24 poços a uma densidade de 30000 células por poço em 2 ml de meio e cultivadas por 24 horas. Então, as diluições em série de composto C-1 obtidas no Exemplo 108 foram tratadas de 30 nM a 0,0096 nM, as diluições em série de composto C-2 obtido no Exemplo 109 foram tratadas de 1000 nM a 0,32 nM, diluições em série do composto C-3 obtido no Exemplo 110 e do composto C-7 obtido no Exemplo 114 foram tratadas de 25 nM a 0,0016 nM, e diluições em série do fármaco MMAF-OMe foram tratadas de 10 nM a 0,0097 nM. As diluições em série de compostos C-5 e C-6 obtidos no Exemplo 112 e no Exemplo 113 foram tratadas de 100 nM a 0,0001 nM, e as diluições em série de fármaco seco-DUBA foram tratadas de 100 nM a 0,001 nM. As diluições em série dos compostos C-4 e C-9 obtidos no Exemplo 111 e no Exemplo 116 foram tratadas de 1000 nM a 0,001 nM, e as diluições em série de fármaco dímero de CBI foram tratadas por de 10 nM a 0,00001 nM. As diluições em série do composto C-8 obtido no Exemplo 115 e o fármaco CBI-indol foram tratadas de 100 nM a 0,0001 nM. Após 72 horas, 96 horas ou 144 horas de incubação, 0,2

ml de corante brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), dissolvido em solução tampão PBS (5 mg/ml), foi adicionado a cada poço das placas. As formazanas formadas por redução do corante MTT por oxidoredutases mitocondriais nas células vivas foram dissolvidas em DMSO e medidas usando a absorbância a 550 nm. Os resultados das mesmas são mostrados na Tabela 3 abaixo.

TABELA 3 CITOTOXICIDADE CELULAR DE CONJUGADO DE LI-GANTE-FÁRMACO

Compostos da presente invenção	IC ₅₀ de célula KB (nM)
C-1	2,31±0,46
C-2	>500
C-3	0,64±0,13
C-4	0,02
C-5	0,45
C-6	0,45
C-7	0,82
C-8	0,12
C-9	0,10
MMAF-OMe	0,35±0,07
Seco-DUBA	0,18
dímero de CBI	0,0007
CBI-indol	0,07

[EXEMPLO 141] TESTES DE ESTABILIDADE PLASMÁTICA DE CAMUNDONGO, RATO, CACHORRO E SER HUMANO

[001330] O composto A-1 obtido no Exemplo 58 e MPS usado como um materiais-padrão foram dissolvidos em DMSO para produzir uma concentração de 60 mM. Então, cada um dentre plasma humano (Biochemed 752R-SC-PMG), plasma de camundongo (Biochemed 029-APSC-MP), plasma de rato (Biochemed 031-APSC-MP) e plasma de cachorro da raça beagle (Biochemed 013-APSC-MP) foi misturado com o composto e MPS para produzir uma concentração final de 300 µM (final 0,5% de DMSO). As misturas plasmáticas resultantes foram

incubadas em banho de água a 37 °C. Alíquotas foram tomadas antes da reação e em 1 dia, 2 dias, 4 dias e 7 dias após a reação, em que cada alíquota tinha 300 µl. Para concluir a reação, duas vezes volumes de acetonitrila foram adicionados, seguido por vortexação breve e centrifugação para precipitação de proteína plasmática. Cada sobrenadante obtido após centrifugação foi coletado e analisado por HPLC. O composto A-1 foi detectado e quantificado no plasma de camundongo, rato, cachorro da raça beagle e ser humano por até 7 dias (> 95%). Este estudo demonstrou a excelente estabilidade de ligante de β -galactosídeo em plasma.

[EXEMPLO 142] ESTABILIDADE QUÍMICA

[001331] O composto A-1 obtido pelo Exemplo 58 foi dissolvido em DMSO e misturado com solução tampão PBS (pH 7,4) para preparar uma solução que tem uma concentração de 500 µM (5% de DMSO). MPS usado como um material padrão foi preparado como uma solução para ter uma concentração de 500 µM em solução tampão PBS. 420 µl da solução tampão e 140 µl da solução de composto A-1 e 140 µl de solução de MPS foram misturados, preparando, assim, uma mistura de reação em uma quantidade total de 700 µl. A mistura de reação foi incubada à temperatura ambiente durante bloqueio da luz. A mistura de reação foi dividida em alíquotas em 0 dia antes da reação e em 1 dia, 2 dias, 4 dias e 7 dias após a reação, em que cada quantidade de alíquota foi 70 µl. Então, o composto restante A-1, MPS e tirosina liberada foram quantificados por análise por HPLC. A análise por HPLC confirmou que o composto A-1 estava presente (> 95%) por todo o período de incubação de 7 dias, que mostrou ser muito estável.

[EXEMPLO DE TESTE 6] PREPARAÇÃO DE CONJUGADO (ALBUMINA E ANTICORPO)

[001332] O composto D-1 obtido no Exemplo 117, o composto D-2 obtido no Exemplo 118, o composto D-5 obtido no Exemplo 110 e o

composto D-6 obtido no Exemplo 111 foram usados para realizar reação de conjugação a um grupo tiol de cisteína geneticamente modificada de Trastuzumab (ou albumina sérica humana, etc.), preparando, assim, D-1-AB, D-2-AB, Albu-D-5 e Albu-D-6 como conjugados de tiomab e fármaco (TDC), respectivamente, em referência a métodos apresentados no documento [consultar Nature Biotechnology, 2008, 26, 925-932, Bioconjugate Chem., 2013, 24, 1256-1263, Bioconjugate Chem., 2016, 27, 1324-1331, Bioconjugate Chem. 2014, 25, 460-469]. A análise por LC/MS confirmou que o peso molecular do tiomab era 145450 Da, e uma pequena quantidade da forma de glicação (~146895 Da) estava também presente. A análise por LC/MS do conjugado de anticorpo e fármaco preparado D-1-AB revelou a presença de massas de cerca de 148563 Da e cerca de 150038 Da. Estes deslocamentos de massa foram consistentes com a conjugação de duas moléculas de D-1.

[EXEMPLO 143] ANÁLISE IN VITRO DE CONJUGADO DE PROTEÍNA-FÁRMACO

[001333] Células cancerosas KB, SKBR-3, BT-474, NCI-N87 foram inoculadas em placas com 96 poços a uma densidade de 2000 a 8000 células por poço em 100 µl de meio e cultivadas por 24 horas. Os quatro compostos obtidos no Exemplo de Teste 6 foram tratados por diluições em série de 1:4 de 600 nM a 0,009 nM, o fármaco MMAF-OMe foi tratado por diluições em série de 1:4 de 100 nM a 0,0015 nM, e o conjugado de anticorpo e fármaco T-DM1 foi tratado por diluições em série de 1:4 de 200 nM a 0,003 nM. Os experimentos foram realizados de uma forma similar ao Exemplo de Teste 3 para quantificar células vivas 96 horas depois, e os resultados são mostrados nas Tabelas 4 e 5 abaixo. Ademais, os resultados de análise in vitro de Composto D-1-AB foram mostrados na Figura 12.

[TABELA 4] CITOTOXICIDADE CELULAR DE CONJUGADO DE

PROTEÍNA-FÁRMACO

Compostos da presente invenção	IC ₅₀ de célula KB (nM)
Albu-D-5	1,08
Albu-D-6	0,10*
MMAF-OMe	0,44(0,16*)

TABELA 5 CITOTOXICIDADE CELULAR DE CONJUGADO DE ANTICORPO-FÁRMACO

ADCs	DAR	IC ₅₀ (nM)		
		SKBR-3	BT-474	NCI-N87
D-1-AB	2,0	0,02	0,10	0,21
D-2-AB	1,71	0,01	0,08	0,14
D-4-AB	mistura			0,38
D-7-AB	0,83	0,074		
D-8-AB	2,0			0,056
D-9-AB	0,99	>500		
D-12-AB	2,0			0,021
D-13-AB	1,95			0,138
D-14-AB	1,56			6,01
D-15-AB	1,87			~200
D-16-AB	~0,5			0,066
D-18-AB	1,91	0,013		0,015
T-DM1	3,5	0,02	0,18	0,02

(*T-DM1: número CAS Roche; 1018448-65-1)

[EXEMPLO 144] EFICÁCIA IN VIVO

[001334] A eficácia in vivo de conjugados de anticorpo-fármaco da invenção foi medida por estudos de xenoenxerto de tumor em camundongos. BALB/c nu/nu machos receberam injeção subcutânea no flanco direito com suspensões de 1×10^6 de células NCI-N87, respectivamente, em PBS. Os camundongos foram randomizados em grupos de estudo quando os tumores atingiram aproximadamente 100 mm³. Os conjugados T-DM1 (2 mg/kg), D-1-AB, D-2-AB, D-8-AB e D-18-AB (0,5 mg/kg ou 2 mg/kg) foram fornecidos i.v. (injeção única no dia de tratamento 0). Todos os grupos de tratamento consistiram em 6 a 10 ani-

mais por grupo, e o tamanho do tumor foi monitorado duas vezes por semana usando medição de calibre. A massa tumoral foi calculada como volume = (largura X largura X comprimento)/2. Os conjugados D-1-AB, D-2-AB e D-8-AB levaram à regressão tumoral dentro do período de observação, isto é, 80 dias do início do experimento. O conjugado de controle, T-DM1, foi menos ativo que os conjugados da invenção.

INCORPORAÇÃO A TÍTULO DE REFERÊNCIA

[001335] Todas as publicações e patentes mencionadas no presente documento estão incorporadas ao presente documento a título de referência em sua totalidade como se cada publicação ou patente individual estivesse específica e individualmente indicada como incorporada a título de referência. No caso de conflito, o presente pedido, incluindo quaisquer definições no presente documento, prevalecerá.

EQUIVALENTES

[001336] Embora modalidades específicas da presente invenção tenham sido discutidas, o relatório descritivo acima é ilustrativo e não restritivo. Muitas variações da invenção serão tornadas evidentes àqueles versados na técnica mediante análise deste relatório descritivo e reivindicações abaixo. O escopo completo da invenção deve ser determinado por referência às reivindicações, juntamente com seu escopo completo de equivalentes, e o relatório descritivo, juntamente com tais variações.

gera um átomo de N, O ou S capaz de reagir com o SO₂ para deslocar (Q)_q-(L')_w e formar um anel com 5 ou 6 membros, incluindo X-SO₂ e os átomos intermediários de Ar;

q é um número inteiro que tem um valor de 1 a cerca de 20, de preferência, de 1 a cerca de 10;

w, x e y são, cada um, independentemente, um número inteiro que tem um valor de 0 ou 1;

cada R^a e R^c é, independentemente, hidrogênio ou alquila inferior; e

cada R^b é, independentemente, hidrogênio ou alquila inferior; ou

dois R^b, juntamente com o átomo ao qual estão ligados, formam um anel com 3 a 5 membros, de preferência, um anel com 3 ou 4 membros;

desde que, quando w for 0, q seja 1.

2. Conjugado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que X é -O-.

3. Conjugado, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que Ar é arila.

4. Conjugado, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que Ar é fenila e naftila.

5. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que Z' é uma porção química C₁₀-C₁₀₀ alquilenos linear ou ramificada, saturada ou insaturada que compreende pelo menos dois dentre os seguintes:

(i) pelo menos um heteroátomo selecionado dentre -NH-, -C(=O), -O-, -S- e -P-;

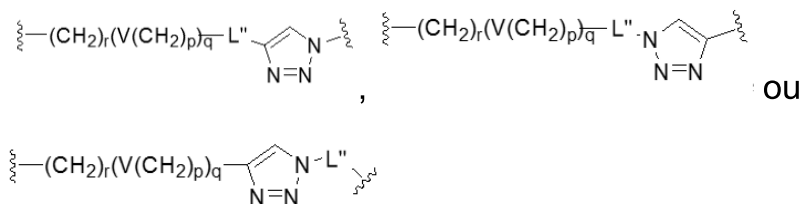
(ii) pelo menos um heteroarileno;

(iii) pelo menos uma porção química de aminoácido, ligação de açúcar, ligação de peptídeo ou ligação de amida; e

(iv) um ou mais substituintes selecionados a partir do grupo que consiste em C₁-C₂₀ alquila, C₆-C₂₀ arila C₁-C₈ alquila, -(CH₂)_sCOOH, e -(CH₂)_pNH₂, s é um número inteiro que tem um valor de 0 a 10, e p é um número inteiro que tem um valor de 1 a cerca de 10.

6. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que Z' compreende um grupo funcional que pode ser produzido através de uma reação química click, tal como um triazol.

7. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que Z' compreende:



em que:

cada V é independentemente uma ligação simples, -O-, -S-, -NR²¹-, -C(O)NR²²-, -NR²³C(O)-, -NR²⁴SO₂- ou -SO₂NR²⁵-;

R²¹, R²², R²³, R²⁴ e R²⁵ são, cada um, independentemente, hidrogênio, (C₁-C₆)alquila, (C₁-C₆)alquil(C₆-C₂₀)arila ou (C₁-C₆)alquil(C₃-C₂₀)heteroarila;

r é um número inteiro que tem um valor de 1 a cerca de 10;

p é um número inteiro que tem um valor de 0 a cerca de 10;

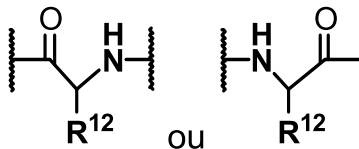
q é um número inteiro que tem um valor de 1 a cerca de 10;

e

L'' é uma ligação simples.

8. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que Z' é um grupo de ligação que conecta CB e Ar que compreende os grupos (CH₂)_b, L^c, (P¹)_a, W^{a1}, W^{a2}, W^{a3}, Y¹ e Y² conectados uns aos outros em uma cadeia linear por

10. Conjugado, de acordo com a reivindicação 8 ou 9, caracterizado pelo fato de que P¹ é



em que:

R¹² é hidrogênio, alquila, uma cadeia lateral de aminoácido, -(CH₂)_sC(O)R¹³ ou -(CH₂)_pNR¹⁴R¹⁵;

p é um número inteiro que tem um valor de 1 a cerca de 10;

s é um número inteiro que tem um valor de 0 a cerca de 10;

R¹³ é OH ou -NH(CH₂)_{s'}(X'''CH₂CH₂)_{s''}Z''-(CB)_m;

R¹⁴ e R¹⁵ são, cada um, independentemente, hidrogênio ou -C(O)(CH₂)_{s'}(X'''CH₂CH₂)_{s''}Z''-(CB)_m;

s'' é um número inteiro que tem um valor de 0 a cerca de 10;

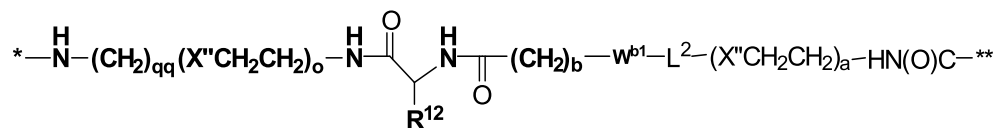
s' é um número inteiro que tem um valor de 1 a cerca de 10;

m é um número inteiro que tem um valor de 0 ou 1;

X''' é -O-, -S-, -NH- ou -CH₂-; e

Z'' é um grupo de ligação que conecta CB ao restante de R¹⁴ ou R¹⁵; ou Z'' é um grupo de ligação que compreende um grupo reativo.

11. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 10, caracterizado pelo fato de que Z' é um grupo de ligação de Fórmula (F), (G), (H), (J), (K), (L), (M) ou (N):



(F')

a clivagem da ligação entre L' e Q para liberar o agente ativo;

X é -O-, -CR^a₂- ou -NR'-, de preferência, -O-;

Ar representa um anel, tal como arila, heteroarila, cicloalquila ou heterocicloalquila, de preferência, arila ou heteroarila;

Y' é -(CR^b₂)_yN(R^a)-, -(CR^b₂)_yO- ou -(CR^b₂)_yS-, posicionado de modo que o átomo de N, O ou S seja ligado a TG, se y for 1;

X e Y' estão posicionados em átomos adjacentes de Ar;

TG é um grupo de desencadeamento que, quando ativado, gera um átomo de N, O ou S capaz de reagir com o SO₂ para deslocar (Q)_q-(L')_w e formar um anel com 5 ou 6 membros, incluindo X-SO² e os átomos intermediários de Ar;

q é um número inteiro que tem um valor de 1 a cerca de 20, de preferência, de 1 a cerca de 10;

w, x e y são, cada um, independentemente, um número inteiro que tem um valor de 0 ou 1;

cada R^a e R^c é, independentemente, hidrogênio ou alquila inferior; e

cada R^b é, independentemente, hidrogênio ou alquila inferior; ou

dois R^b, juntamente com o átomo de carbono ao qual estão ligados, formam um anel com 3 a 5 membros, de preferência, um anel com 3 ou 4 membros;

desde que, quando w for 0, q seja 1.

24. Composto, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que X é -O-.

25. Composto, de acordo com a reivindicação 23 ou 24, caracterizado pelo fato de que Ar é arila.

26. Composto, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que Ar é fenila ou naftila.

27. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindica-

quer uma das reivindicações 23 a 35, com uma porção química de alveamento.

37. Método, de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que a porção química de alveamento é uma nanopartícula, uma imunoglobulina, um ácido nucleico, uma proteína, um oligopeptídeo, um polipeptídeo, um anticorpo, um fragmento de um polipeptídeo antigênico ou um repecorpo.

38. Método, de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que a porção química de alveamento é um anticorpo selecionado dentre um anticorpo policlonal intacto, um anticorpo monoclonal intacto, um fragmento de anticorpo, um mutante de cadeia única Fv (scFv), um anticorpo multiespecífico, um anticorpo biespecífico, um anticorpo quimérico, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, uma proteína de fusão que compreende uma porção determinante antigênica de um anticorpo e outras moléculas de imunoglobulina modificadas que compreendem sítios de reconhecimento de antígeno.

39. Método, de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é selecionado dentre Muromonab-CD3, Abciximab, Rituximab, Daclizumab, Palivizumab, Infliximab, Trastuzumab (herceptina), Etanercept, Basiliximab, Gemtuzumab ozogamicina, Alemtuzumab, Ibritumomab tiuxetano, Adalimumab, Alefacept, Omalizumab, Efalizumab, Tositumomab- I^{131} , Cetuximab, Bevacizumab, Natalizumab, Ranibizumab, Panitumumab, Eculizumab, Rilonacept, Certolizumab pegol, Romiplostim, AMG-531, CNTO-148, CNTO-1275, ABT-874, LEA-29Y, Belimumab, TACI-Ig, anti-CD20 de segunda geração, ACZ-885, Tocilizumab, Atlizumab, Mepolizumab, Pertuzumab, Humax CD20, Tremelimumab (CP-675 206), Ticilimumab, MDX-010, IDEC-114, Inotuzumab ozogamicina, HuMax EGFR, Aflibercept, HuMax-CD4, Ala-Ala, ChAglyCD3, TRX4, Catumaxomab, IGN101, MT-

201, Pregovomab, CH-14.18, WX-G250, AMG-162, AAB-001, Mota-vizumab, MEDI-524, Efumgumab, Aurograb, Raxibacumab, anti-CD20 de terceira geração, LY2469298 e Veltuzumab.

40. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um conjugado, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 22, e um veículo ou excipiente farmaceuticamente aceitável.

41. Composição de imaginologia, caracterizada pelo fato de que compreende um conjugado, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 22.

42. Método para imaginologia, caracterizado pelo fato de que compreende colocar um material (por exemplo, uma célula) em contato com a composição de imaginologia, como definida na reivindicação 41.

43. Composto sensor, caracterizado pelo fato de que compreende um conjugado, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 22.

44. Método para detecção, caracterizado pelo fato de que compreende colocar um material em contato com o composto sensor, como definido na reivindicação 43.

45. Comutador molecular, máquina molecular ou nanomáquina, caracterizada pelo fato de que compreende um conjugado, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 22.

46. Método para mover porções de um dispositivo molecular, caracterizado pelo fato de que compreende misturar em uma solução

(1) o comutador molecular, máquina molecular ou nanomáquina, como definidos na reivindicação 45; e

(2) um agente de ativação que ativa o grupo de desencadeamento.

47. Método para entregar um agente ativo a uma célula, caracterizado pelo fato de que compreende colocar a célula em contato com um conjugado, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 22, em que a porção química de alveamento é selecionada para se ligar a uma molécula associada a uma célula alvo.

48. Método, de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que a célula está em um indivíduo que precisa do mesmo, tratando, assim, uma doença ou afecção.

49. Método, de acordo com a reivindicação 47 ou 48, caracterizado pelo fato de que a célula alvo é uma célula cancerosa e a porção química de alveamento é selecionada para se ligar à molécula associada à célula cancerosa (e não associada a células saudáveis ou pelo menos, de preferência, associada a células tumorais em vez de células saudáveis).

50. Método, de acordo com a reivindicação 48 ou 49, caracterizado pelo fato de que a doença ou afecção é uma doença autoimune, uma doença infecciosa ou um tumor.

51. Método para tratar uma doença proliferativa, caracterizado pelo fato de que compreende administrar um conjugado, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 22.

52. Método, de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que a doença proliferativa é selecionada dentre distúrbios autoimunes (por exemplo, lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, doença de enxerto-contrá-hospedeiro, miastenia grave ou síndrome de Sjögren), infecções inflamatórias crônicas (por exemplo, psoríase, asma ou doença de Crohn), distúrbios de hiperproliferação (por exemplo, câncer de mama, câncer de pulmão), infecções virais (por exemplo, herpes, papiloma ou HIV), osteoartrite e aterosclerose.

53. Método, de acordo com a reivindicação 52, caracterizado pelo fato de que a doença proliferativa é câncer selecionado dentre

para fornecer o conjugado de Fórmula (I').

79. Método, de acordo com a reivindicação 78, caracterizado pelo fato de que a porção química de alvejamento é uma nanopartícula, uma imunoglobulina, um ácido nucleico, uma proteína, um oligopeptídeo, um polipeptídeo, um anticorpo, um fragmento de um polipeptídeo antigênico ou um repecorpo.

80. Método, de acordo com a reivindicação 79, caracterizado pelo fato de que a porção química de alvejamento é um anticorpo selecionado dentre um anticorpo policlonal intacto, um anticorpo monoclonal intacto, um fragmento de anticorpo, um mutante de cadeia única Fv (scFv), um anticorpo multiespecífico, um anticorpo biespecífico, um anticorpo quimérico, um anticorpo humanizado, um anticorpo humano, uma proteína de fusão que compreende uma porção determinante antigênica de um anticorpo e outras moléculas de imunoglobulina modificadas que compreendem sítios de reconhecimento de antígeno.

81. Método, de acordo com a reivindicação 79, caracterizado pelo fato de que a porção química de alvejamento é um anticorpo selecionado dentre Muromonab-CD3, Abciximab, Rituximab, Daclizumab, Palivizumab, Infliximab, Trastuzumab (herceptina), Etanercept, Basiliximab, Gemtuzumab ozogamicina, Alemtuzumab, Ibritumomab tiuxetano, Adalimumab, Alefacept, Omalizumab, Efalizumab, Tositumomab-I¹³¹, Cetuximab, Bevacizumab, Natalizumab, Ranibizumab, Panitumumab, Eculizumab, Rilonacept, Certolizumab pegol, Romiplostim, AMG-531, CNTO-148, CNTO-1275, ABT-874, LEA-29Y, Belimumab, TACI-Ig, anti-CD20 de segunda geração, ACZ-885, Tocilizumab, Atlizumab, Mepolizumab, Pertuzumab, Humax CD20, Tremelimumab (CP-675 206), Ticilimumab, MDX-010, IDEC-114, Inotuzumab ozogamicina, HuMax EGFR, Aflibercept, HuMax-CD4, Ala-Ala, ChAglyCD3, TRX4, Catumaxomab, IGN101, MT-201, Pregovomab, CH-14.18, WX-

G250, AMG-162, AAB-001, Motavizumab, MEDI-524, Efumgumab, Aurgrab, Raxibacumab, anti-CD20 de terceira geração, LY2469298 e Veltuzumab.

FIG. 1

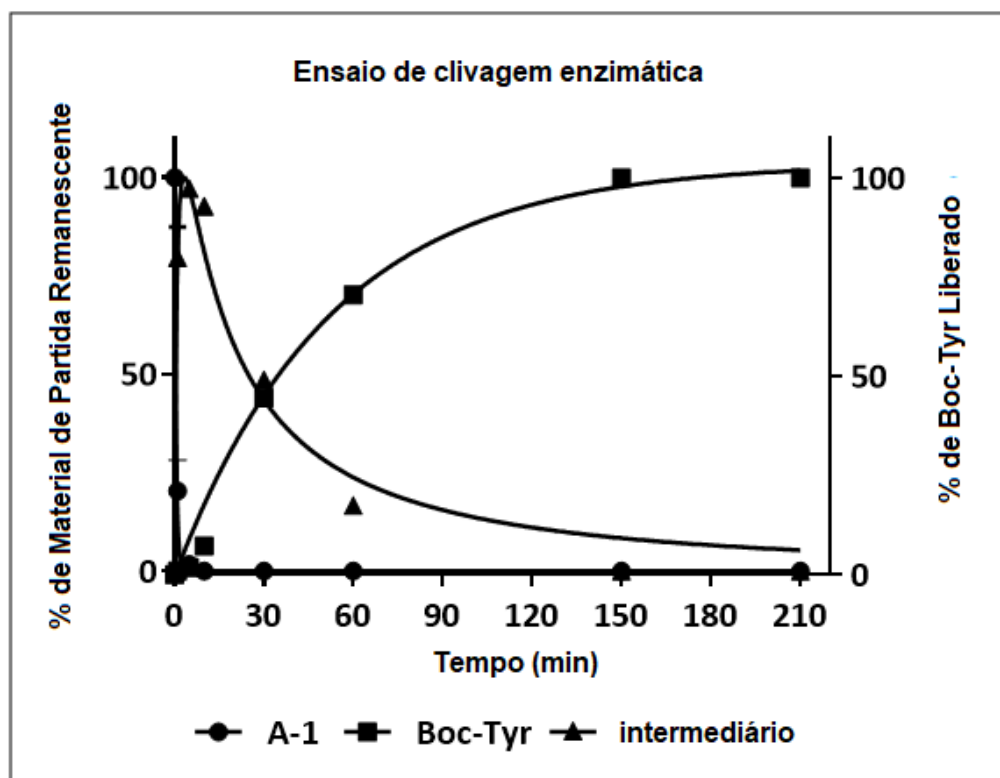


FIG. 2

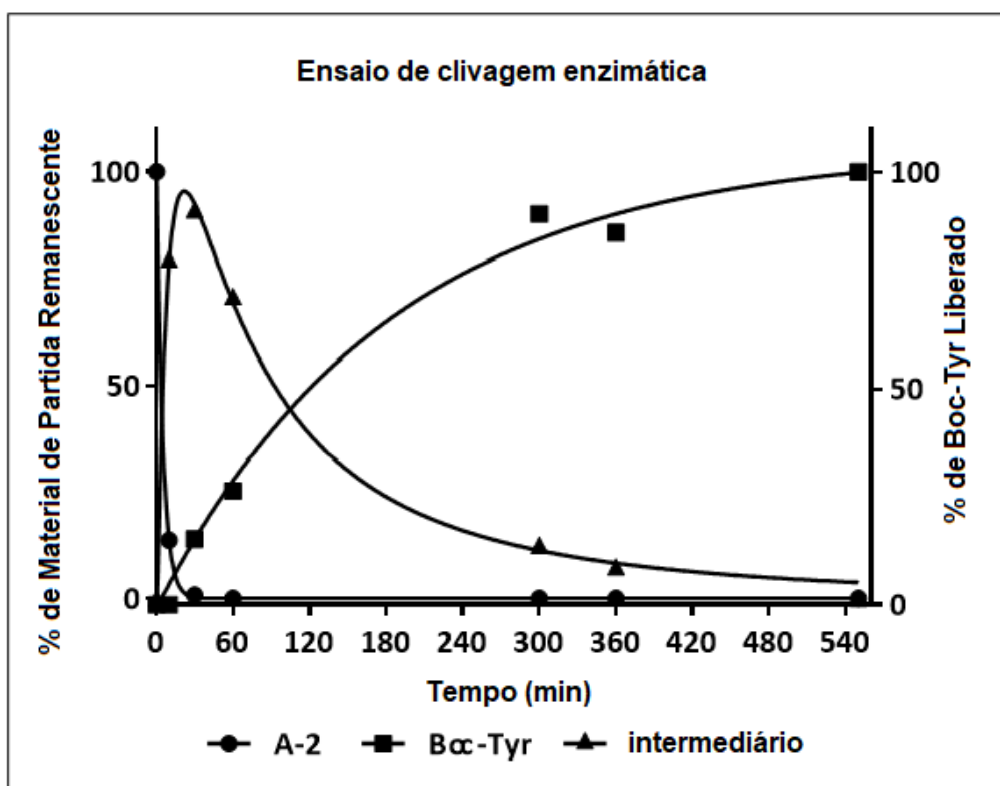


FIG. 3

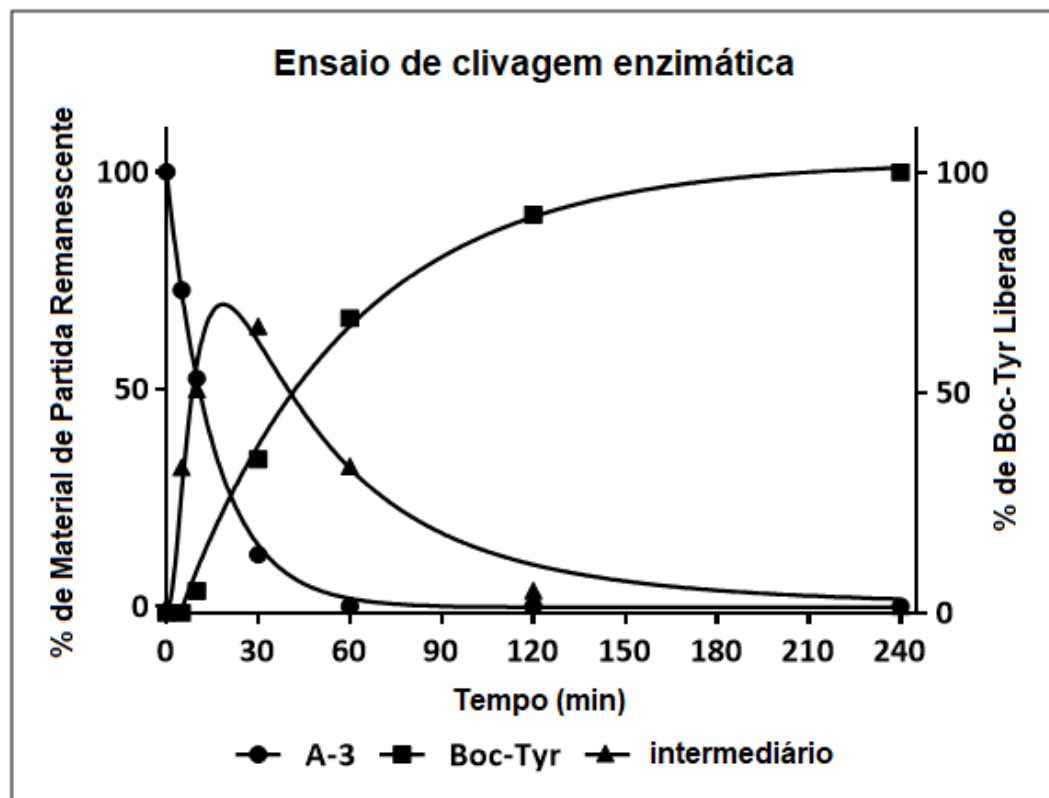


FIG. 4

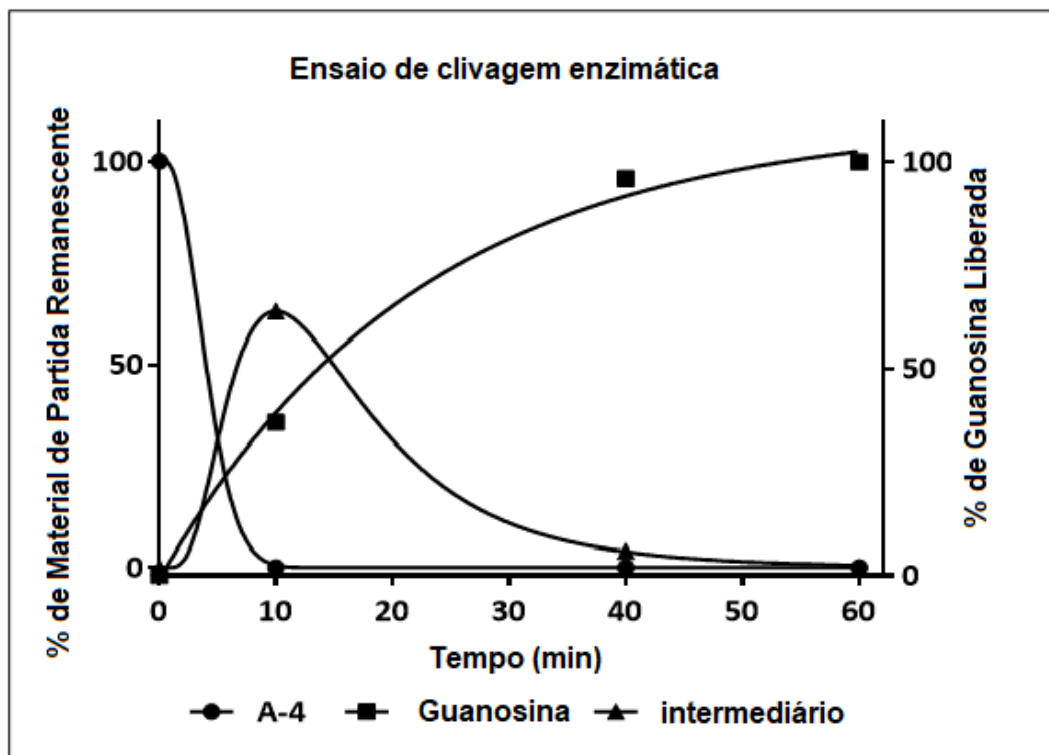


FIG. 5

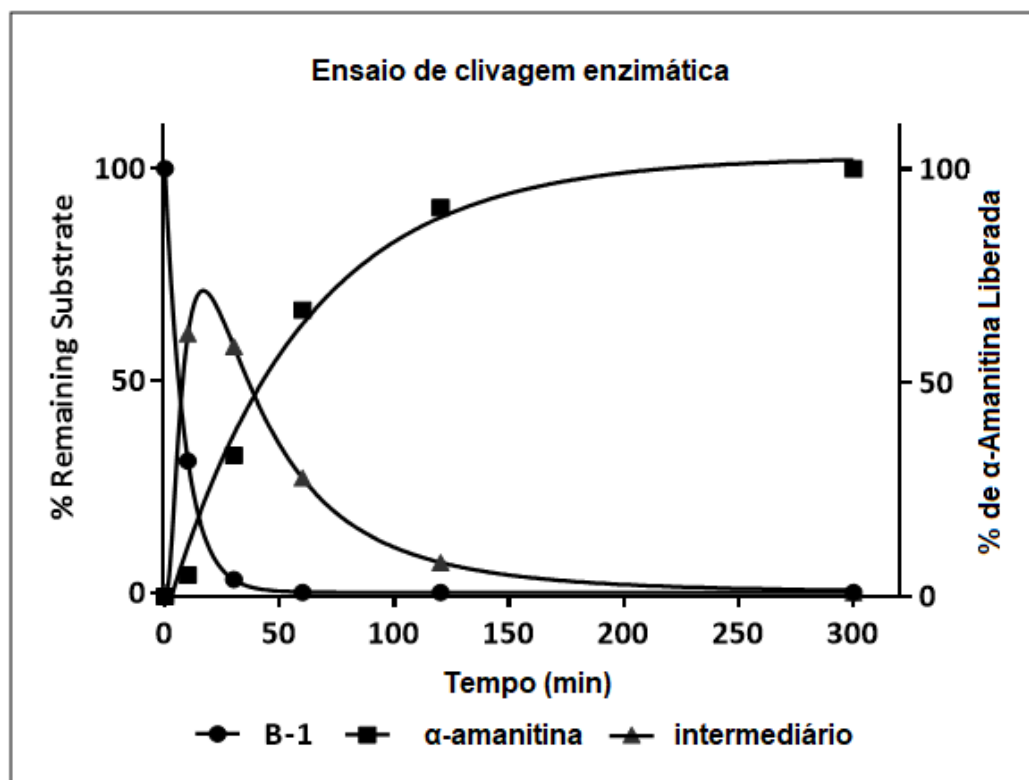


FIG. 6

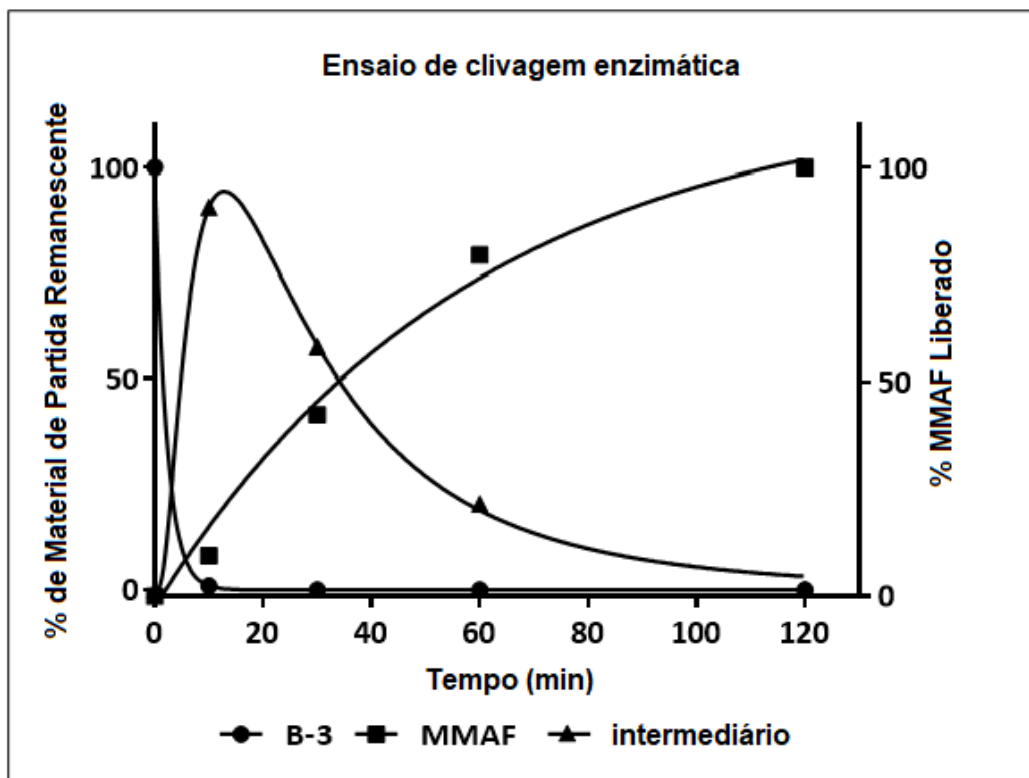


FIG. 7

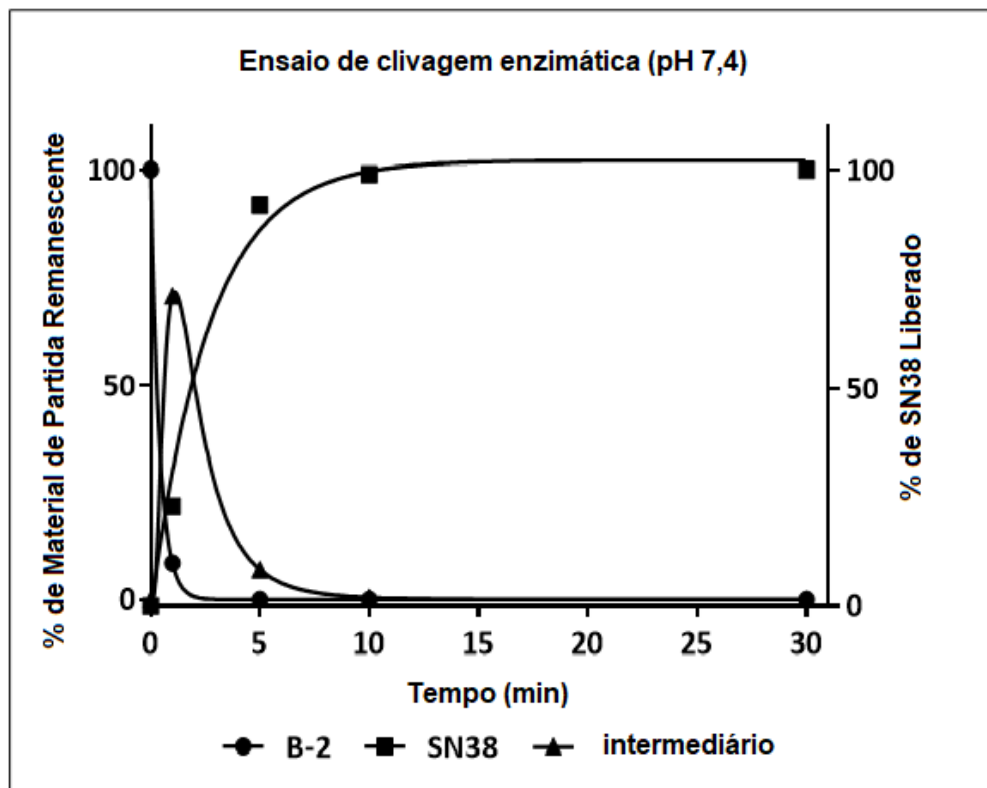


FIG. 8

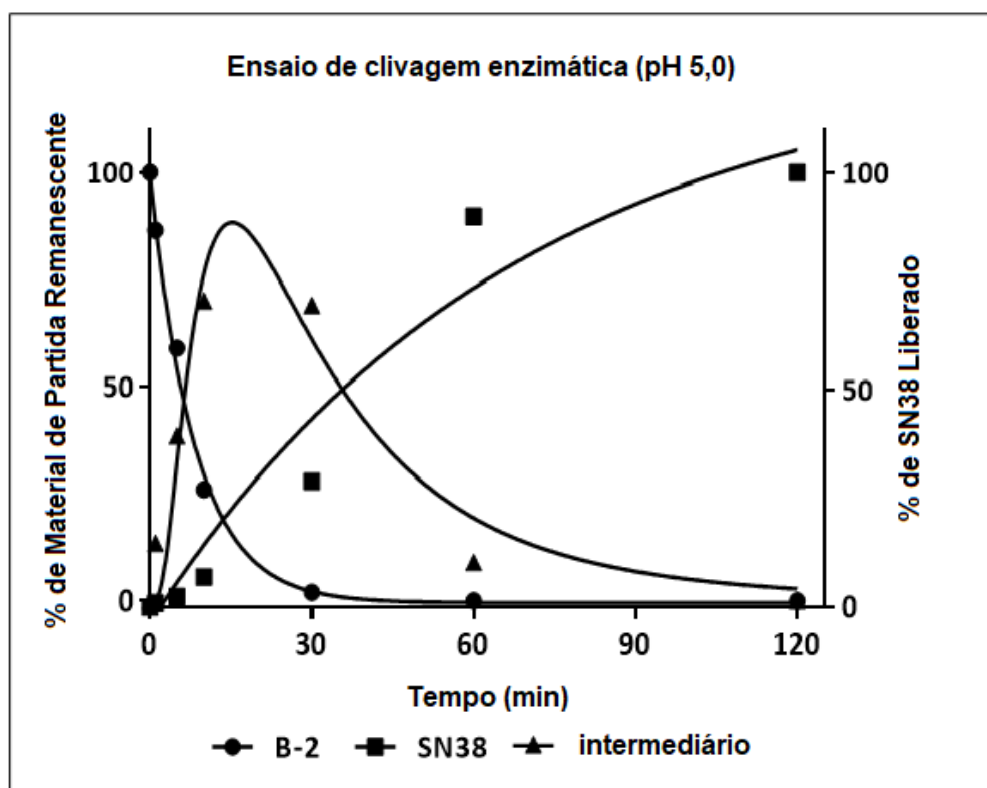


FIG. 9

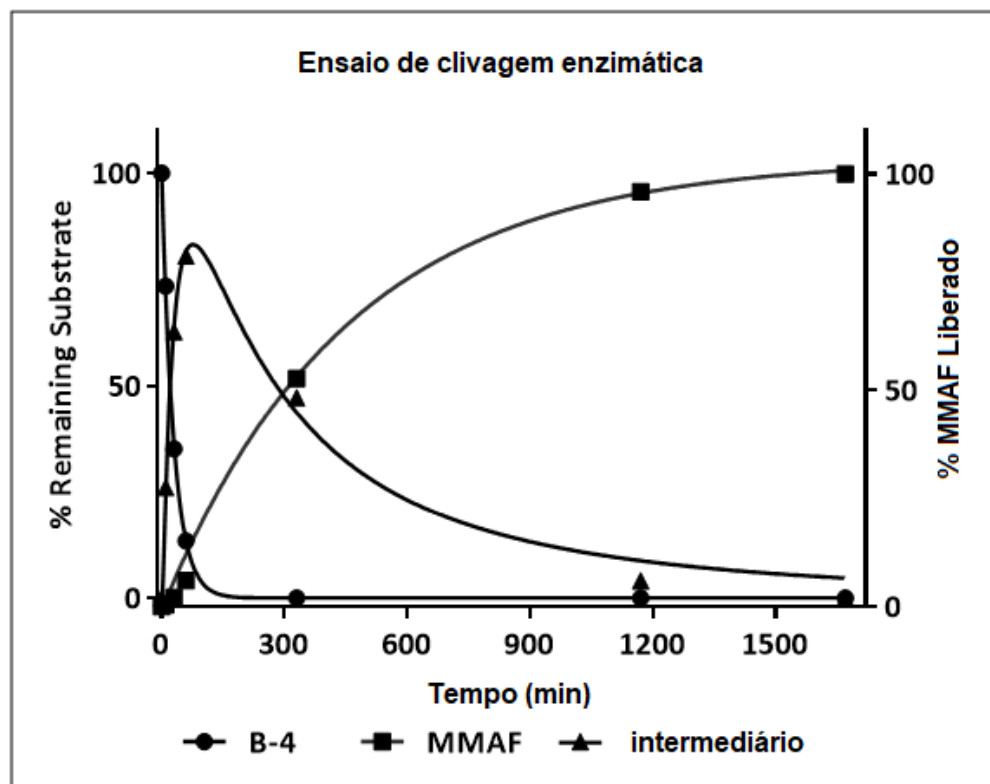


FIG. 10

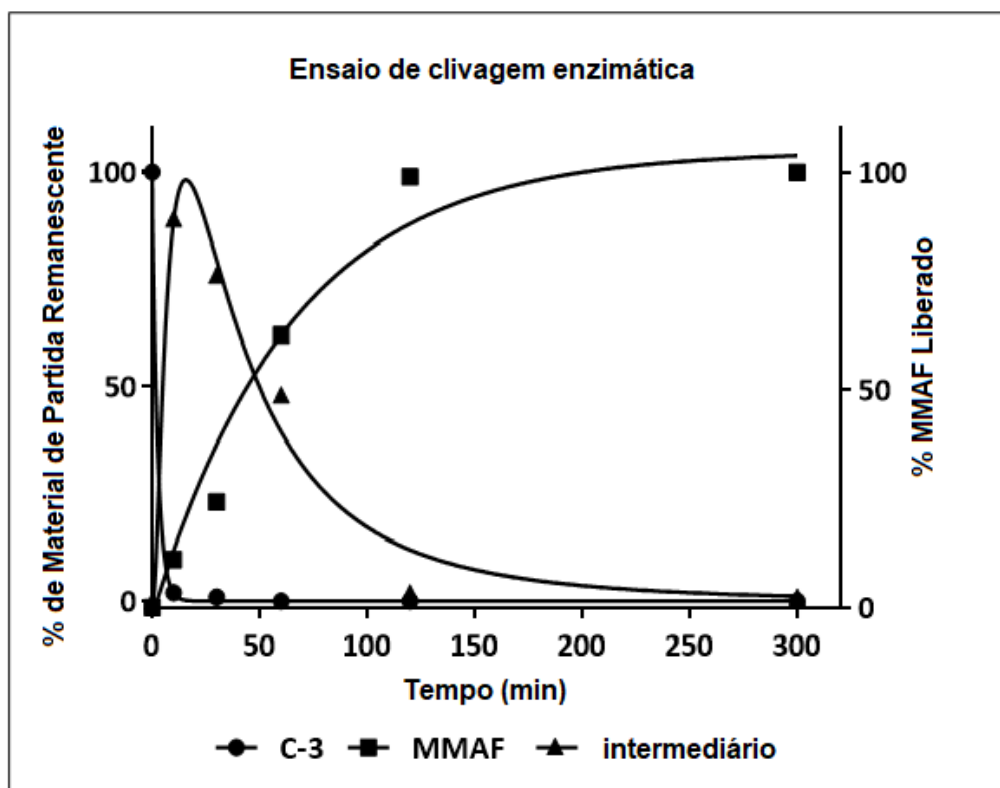


FIG. 11

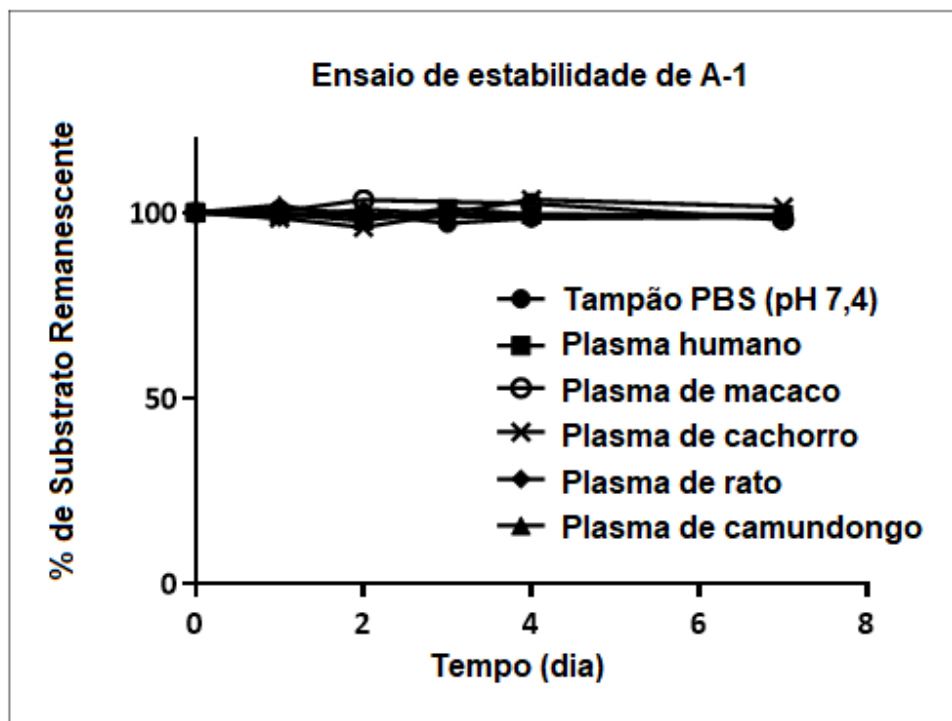


FIG. 12

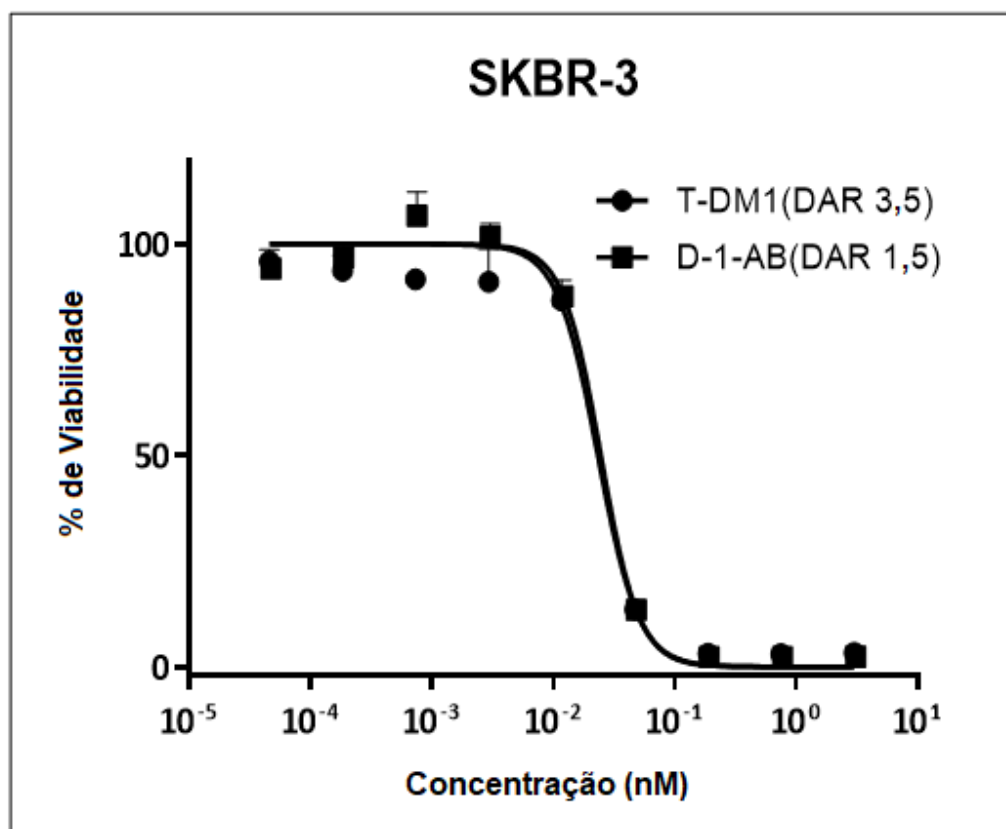
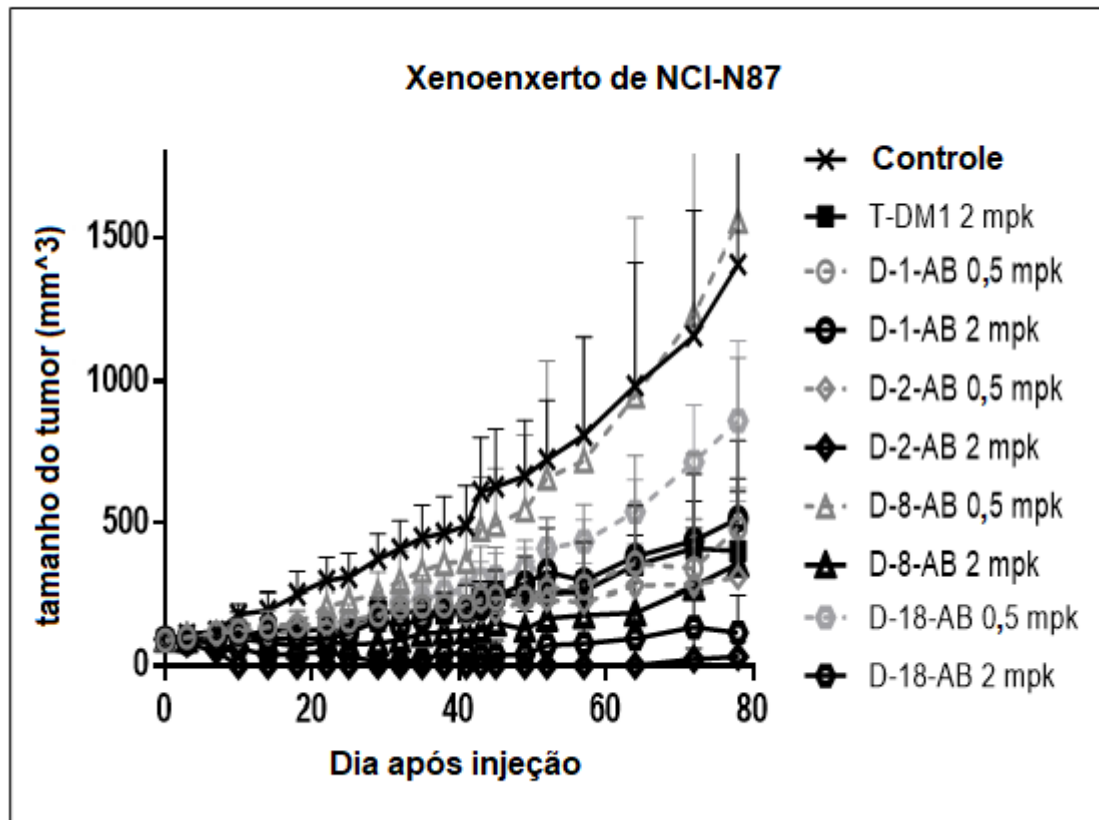


FIG. 13



RESUMO

Patente de Invenção: **"COMPOSTOS QUE COMPREENDEM LIGANTE CLIVÁVEL E USOS DOS MESMOS"**.

A presente invenção refere-se a um composto que inclui um ligante clivável, um uso do mesmo e um composto intermediário para preparar o mesmo e, mais particularmente, o composto que inclui um ligante clivável da presente invenção pode incluir um agente ativo (por exemplo, um fármaco, uma toxina, um ligante, uma sonda para detecção, etc.) que tem uma função ou atividade específica, um grupo funcional SO_2 que é capaz de liberar seletivamente o agente ativo e um grupo funcional que desencadeia uma reação química, uma reação fisicoquímica e/ou uma reação biológica por estimulação externa e pode incluir, ainda, um ligante (por exemplo, oligopeptídeo, polipeptídeo, anticorpo, etc.) que tem especificidade de ligação para um receptor alvo desejado.