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

(11) BR 112013019913-0 B1

(22) Data do Depósito: 15/02/2012

(45) Data de Concessão: 05/01/2021

(54) Título: COMPOSTO CITOTÓXICO E SEU USO, CONJUGADO E SEU USO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(51) Int.Cl.: A61K 47/00; C07D 487/04; C07D 519/00; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 06/05/2011 US 61/483,499; 15/02/2011 US 61/443,092; 15/02/2011 US 61/443,062.

(73) Titular(es): IMMUNOGEN, INC..

(72) Inventor(es): WEI LI; MICHAEL MILLER; NATHAN FISHKIN; RAVI V.J. CHARI.

(86) Pedido PCT: PCT US2012025252 de 15/02/2012

(87) Publicação PCT: WO 2012/128868 de 27/09/2012

(85) Data do Início da Fase Nacional: 05/08/2013

(57) Resumo: COMPOSTO DE BENZODIAZEPINA CITOTÓXICO E CONJUGADO, USO DOS MESMOS PARA INIBIR CRESCIMENTO DE CÉLULA ANORMAL OU TRATAR DISTÚRBIOS PROLIFERATIVO, AUTOIMUNE, DESTRUTIVO ÓSSEO E NEURODEGENERATIVO, DOENÇAS INFECCIOSA, VIRAL, FIBRÓTICA E RENAL, PANCREATITE, BEM COMO COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA. A invenção refere-se a compostos derivados de benzodiazepina com atividade antiproliferativa, bem como a conjugados dos mesmos ligados a um agente de ligação a célula. A invenção fornece ainda composições e usos dos compostos e conjugados para inibir o crescimento de célula anormal ou tratar um distúrbio proliferativo em mamífero.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"COMPOSTO CITOTÓXICO E SEU USO, CONJUGADO E SEU USO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA".**

REFERÊNCIA A PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica o benefício da data de depósito de acordo com 35 U.S.C. §119(e), do pedido provisório US 61/443.062, depositado em 15 de fevereiro de 2011, e pedido provisório US 61/483.499, depositado em 6 de maio de 2011, e pedido provisório US 61/443.092, depositado em 15 de fevereiro de 2011, os conteúdos completos dos quais, incluindo todos os desenhos, fórmulas, relatórios e reivindicações, são incorporados aqui por referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002] A presente invenção refere-se a novos compostos citotóxicos e conjugados citotóxicos compreendendo estes compostos citotóxicos e agente de ligação à célula. Mais especificamente, esta invenção refere-se a novos compostos derivados de benzodiazepina do mesmo, intermediários dos mesmos, conjugados dos mesmos, e sais farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos, que são úteis como medicamentos, em particular como agentes antiproliferativos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[003] Derivados de benzodiazepina são compostos úteis para tratar vários distúrbios, e incluem medicamentos como, antiepilépticos (imidazo [2,1-b][1,3,5]benzotiadiazepinas, patente US 4.444.688; patente US 4.062.852), antibacterianos (pirimido[1,2-c][1,3,5]benzotiadiazepinas, GB 1476684), diuréticos e hipotensivos (pirrolo(1,2-b)[1,2,5]benzotiadiazepina 5,5 dióxido, patente US 3.506;646), hipolipidêmicos (WO 03091232), antidepressivos (patente US 3.453.266); osteoporose (JP 2138272).

[004] Recentemente, foi demonstrado em modelos de tumor animal que derivados de benzodiazepina, como pirrolobenzodiazepinas

(PBDs), atuam como agentes antitumor (N-2-imidazolil alquila substituída 1,2,5-benzotiadiazepina-1,1-dióxido, patente US 6.156.746), benzo-pirido ou dipirido tiadiazepina (WO 2004/069843), pirrolo [1,2-b] [1,2,5] benzotiadiazepinas e pirrolo[1,2-b][1,2,5] derivados de benzodiazepina (WO2007/015280), derivados tomaimicina (por exemplo, pirrolo[1,4]benzodiazepinas), como aqueles descritos em WO 00/12508, WO2005/085260, WO2007/085930, e EP 2019104. Benzodiazepinas são ainda conhecidos por afetar o crescimento e diferenciação celular (Kamal A., *et al*., Bioorg Med Chem. 2008 Aug 15;16(16):7804-10 (e referências citadas neste); Kumar R, Mini Rev Med Chem. 2003 Jun;3(4):323-39 (e referências citadas neste); Bednarski J J, *et al*., 2004; Sutter A. P, *et al*., 2002; Blatt N B, *et al*., 2002), Kamal A. *et al*., Current Med. Chem., 2002; 2; 215-254, Wang J-J., J.Med. Chem., 2206; 49:1442-1449, Alley M.C. *et al*., Cancer Res. 2004; 64:6700-6706, Pepper C. J., Cancer Res 2004; 74:6750-6755, Thurston D.E. and Bose D.S., Chem Rev 1994; 94:433-465; e Tozuka, Z., *et al*., Journal of Antibiotics, (1983) 36; 1699-1708. Estrutura geral de PBDs é descrita na publicação número US 20070072846. Os PBDs diferem no número, tipo e posição de substituintes, em ambos os anéis aromáticos A e anéis pirrolo C, e no grau de saturação de anel C. Suas capacidades para formar um aduto no sulco menor e DNA de ligação cruzada permite que os mesmos interfiram com processamento de DNA, assim, seus potenciais para uso como agentes antiproliferativos.

[005] O primeiro pirrolobenzodiazepina a entrar na clínica, SJG-136 (NSC 694501) é um potente agente citotóxico que causa reticulação inter-fita de DNA (S.G Gregson *et al*., 2001, *J. Med. Chem*., 44: 737-748; M.C. Alley *et al*., 2004, *Cancer Res*., 64: 6700-6706; J.A. Hartley *et al*., 2004, *Cancer Res*., 64: 6693-6699; C. Martin *et al*., 2005, *Biochemistry*., 44: 4135-4147; S. Arnould *et al*., 2006, *Mol. Cancer Ther*., 5: 1602-1509). Os resultados de uma avaliação clínica de Fase I de

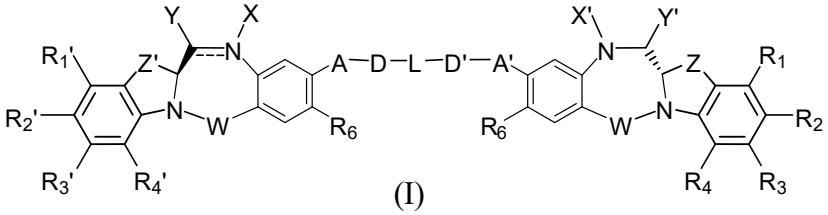
SJG-136 revelou que esta fármaco foi citotóxica em doses extremamente baixas (dose máxima tolerada de 45 μg/m^2, e vários efeitos adversos foram observados, incluindo síndrome de extravasamento vascular, edema periférico, toxicidade hepática e fadiga. Dano de DNA foi notado em todas as doses em linfócitos circulantes (D. Hochhauser *et al*., 2009, *Clin. Cancer Res*., 15: 2140-2147). Assim, há uma necessidade para derivados de benzodiazepina melhorados que são menos tóxicos e ainda terapeuticamente ativos para tratar uma variedade de estados de doenças proliferativas, como câncer.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

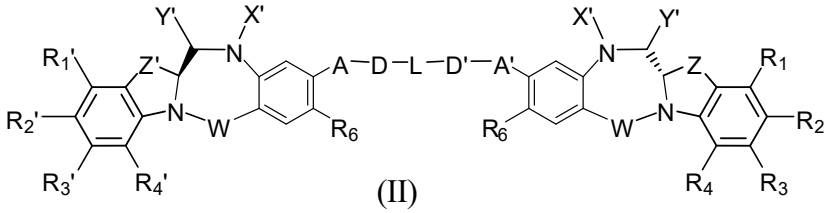
[006] Dímeros de benzodiazepina citotóxicos revelados na técnica possuem duas funcionalidades imina em suas formas livres ou forma reversivelmente protegida, como um hidrato, alcoxilato ou sulfonato. A presença destas duas funcionalidades imina resultam em ligação cruzada de DNA (S.G. Gregson *et al*., 2001, *J. Med. Chem*., 44: 737-748). A presente invenção é parcialmente baseado no achado inesperado que os conjugados de agente de ligação à célula de novos derivados benzodiazepina citotóxicos, como dímeros de indolinobenzodiazapene que são desprovidos de duas funcionalidades imina (por exemplo, uma funcionalidade imina e uma funcionalidade amina), e assim incapaz de reticulação no DNA, apresentam um índice terapêutico muito maior (relação de dose tolerada máxima para dose efetiva mínima) *in vivo* comparado aos derivados de benzodiazepina que podem gerar reticulação em DNA que são anteriormente descritas na técnica.

[007] Assim um objeto da invenção é fornecer composto citotóxico compreendendo um grupo ligante com um grupo reativo ligado a este capaz de covalentemente ligar o composto citotóxico a um agente de ligação à célula (CBA, ver abaixo), em que o composto citotóxico é

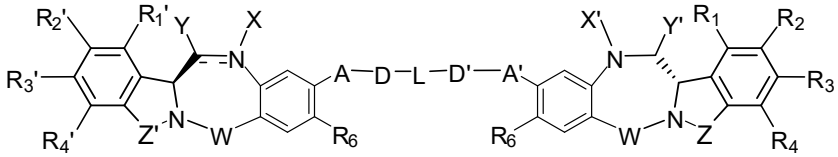
representado por qualquer uma das seguintes fórmulas:



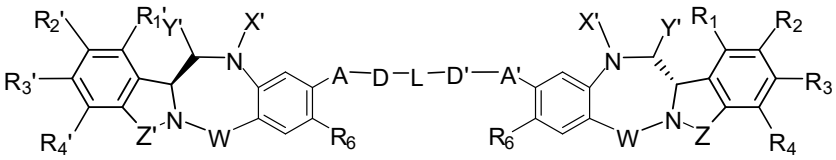
(I)



(II)



(III)



(IV)

[008] ou um sal farmaceuticamente aceitável das mesmas, em que:

[009] a linha dupla -- entre N e C representa uma ligação simples ou uma ligação dupla, desde que quando este é uma ligação dupla X é ausente e Y é -H, ou uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono, e quanto este é uma ligação simples, X é -H, o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este, ou uma porção protetora de amina;

[0010] Y é -H ou um grupo de saída selecionado de -OR, -OCOR', -OCOOR', -OCONR'R'', -NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', um heterociclo opcionalmente substituído de 5 ou 6 membros contendo nitrogênio (por exemplo, piperidina, tetra-hidropirrol, pirazol, morfolina, *etc*.), um

guanidínio representado por -NR'(C=NH)NR'R'', um aminoácido, ou um peptídeo representado por -NRCOP', em que P' é um aminoácido ou um polipeptídeo contendo entre 2 a 20 unidades de aminoácidos, -SR, -SOR', $-SO_2M$, $-SO_3M$, $-OSO_3M$, halogênio, ciano e um azido; ou,

[0011] Y é um sulfito (HSO_3, HSO_2 ou um sal de HSO_3^-, SO_3^{2-} ou HSO_2^- formado com um cátion), metabissulfito ($H_2S_2O_5$ ou um sal de $S_2O_5^{2-}$ formado com um cátion), mono-, di-, tri-, e tetra- tiofosfato (PO_3SH_3, $PO_2S_2H_2$, POS_3H_2, PS_4H_2 ou um sal de PO_3S^{3-}, $PO_2S_2^{3-}$, POS_3^{3-} ou PS_4^{3-} formado com um cátion), éster tio fosfato $(R^iO)_2PS(OR^i)$, R^iS-, R^iSO, R^iSO_2, R^iSO_3, tiossulfato (HS_2O_3 ou um sal de $S_2O_3^{2-}$ formado com um cátion), ditionito (HS_2O_4 ou um sal de $S_2O_4^{2-}$ formado com um cátion), fosforoditioato $(P(=S)(OR^{k'})(S)(OH)$ ou um sal do mesmo formado com um cátion), ácido hidroxâmico ($R^{k'}C(=O)NOH$ ou um sal formado com um cátion), formaldeído sulfoxilato ($HOCH_2SO_2^-$ ou um sal de $HOCH_2SO_2^-$ formado com um cátion, como $HOCH_2SO_2^-Na^+$) ou uma mistura dos mesmos, em que R^i é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 10 átomos de carbono e é substituído com pelo menos um substituinte selecionado de $-N(R^j)_2$, $-CO_2H$, $-SO_3H$, e $-PO_3H$; R^i pode ser ainda opcionalmente substituído com um substituinte para um alquil descrito aqui; R^j é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono; $R^{k'}$ é uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, arila, heterociclila ou heteroarila; preferencialmente, Y é um aduto de um bissulfito, um hidrossulfito, ou um metabissulfito, ou sais dos mesmos (como sal de sódio);

[0012] M é -H ou um cátion;

[0013] R, para cada ocorrência, é independentemente selecionado do grupo que consiste em -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$,

uma arila opcionalmente substituída contendo 6 a 18 átomos de carbono, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, ou um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[0014] R' e R'' são cada um independentemente selecionados de -H, -OH, -OR, -NHR, $-NR_2$, -COR, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[0015] R^c é -H ou uma alquila linear ou ramificada substituída ou não substituída contendo 1 a 4 átomos de carbono, ou o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este;

[0016] n é um inteiro de 1 a 24;

[0017] W é selecionado de C=O, C=S, CH_2, BH, SO e SO_2;

[0018] X' é selecionado de -H, um grupo de proteção amina, o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, uma arila opcionalmente substituída contendo 6 a 18 átomos de carbono, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[0019] Y' é selecionado de -H, um grupo oxo, o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este, uma alquila, alquenila ou alquinila

linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma arila opcionalmente substituída de 6 a 18 membros, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos;

[0020] R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' e R_4' são cada um independentemente selecionados do grupo que consiste em -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, halogênio, guanidínio [$-NH(C=NH)NH_2$], -OR, -NR'R'', $-NO_2$, -NCO, -NR'COR'', -SR, um sulfóxido representado por -SOR', uma sulfona representada por $-SO_2R'$, um sulfonato $-SO_3^-M^+$, um sulfato $-OSO_3^-M^+$, uma sulfonamida representada por $-SO_2NR'R''$, ciano, um azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R'' e o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este;

[0021] R_6 é -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', $-NO_2$, halogênio ou o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este;

[0022] Z e Z' são independentemente selecionados de $-(CH_2)_{n'}-$, $-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}-$, $-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}-$, $-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}-$ e $-(CH_2)_{n'}–S-(CH_2)_{na'}-$;

[0023] n' e na' são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de 0, 1, 2 e 3;

[0024] R_7 e R_8 são os mesmos ou diferentes, e são cada um independentemente selecionados de -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n-$, um aminoácido, uma unidade de peptídeo contendo 2 a 6 aminoácidos, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono;

[0025] R_9 é independentemente selecionado de -H, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol -$(OCH_2CH_2)_n$-;

[0026] A e A' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de -O-, oxo (-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -NR_5 e -CRR'N(R_5)-;

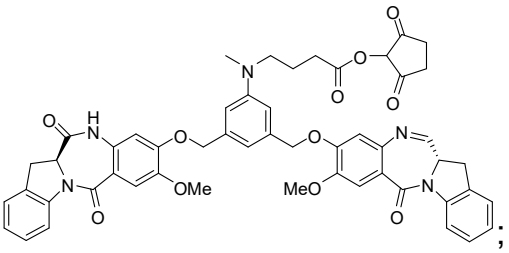
[0027] R_5 para cada ocorrência é independentemente -H ou uma alquila linear ou ramificada opcionalmente substituída contendo 1 a 10 átomos de carbono;

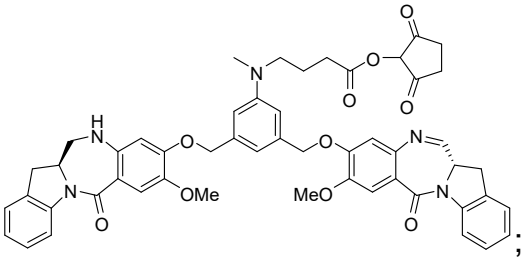
[0028] D e D' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente ausentes ou selecionados do grupo que consiste em uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo 1 a 10 átomos de carbono, um aminoácido, um peptídeo contendo 2 a 6 aminoácidos, e uma unidade de polietilenoglicol (-$OCH_2CH_2)_n$-;

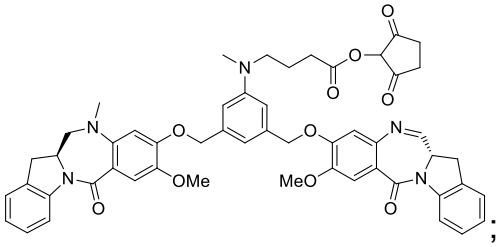
[0029] L é ausente, o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este, uma unidade de polietilenoglicol (-$OCH_2CH_2)_n$-, uma alquila ou alquenila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, um grupo fenila, um anel heterocíclico de 3 a 18 membros ou um anel heteroaril de 5 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P, em que a alquila ou alquenila é opcionalmente substituída com o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este; fenila ou anel heterocíclico ou heteroarila pode ser opcionalmente substituída, em que o substituinte pode ser o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este.

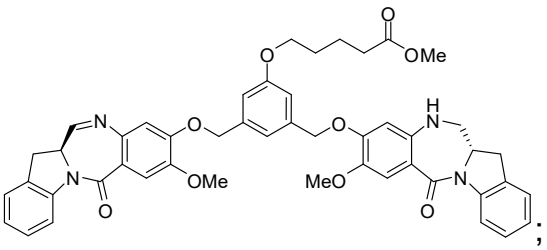
[0030] Em determinadas modalidades, X não é o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este. Em determinadas modalidades, a linha dupla ⎓ entre N e C representa uma ligação simples, Y não é -H.

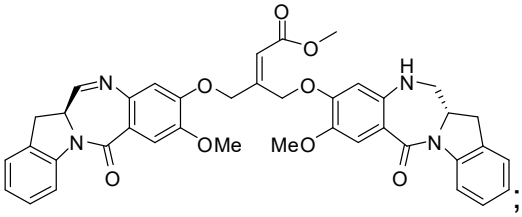
[0031] Em determinadas modalidades, o composto não é qualquer um dos seguintes compostos:

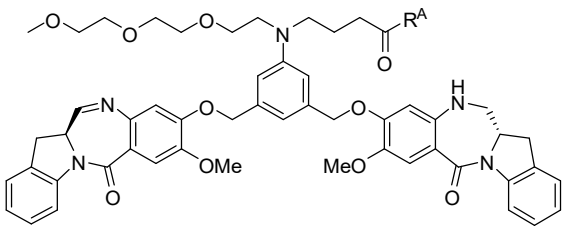
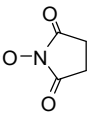

;

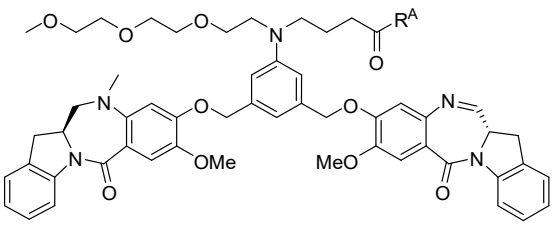
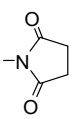

;

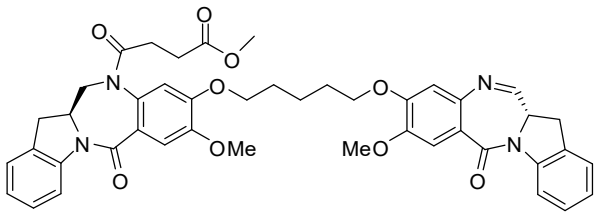

;

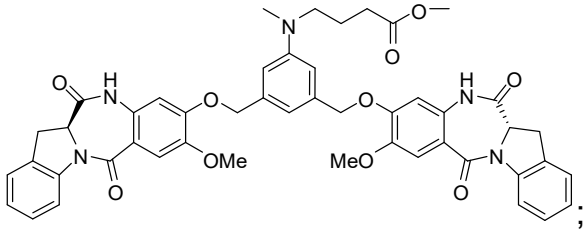

;


;

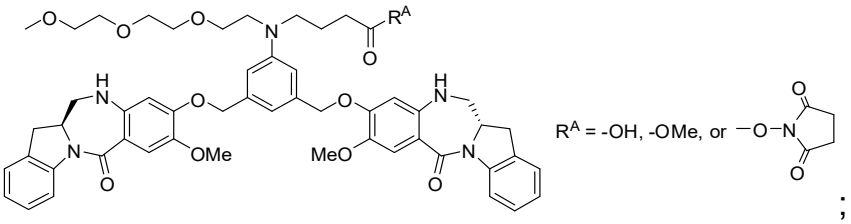

R^A = -OH, -OMe, or 
;


R^A = -OH, -OMe, or 
;

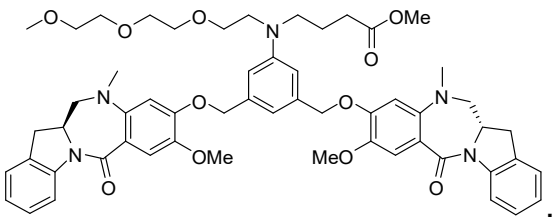




;



;

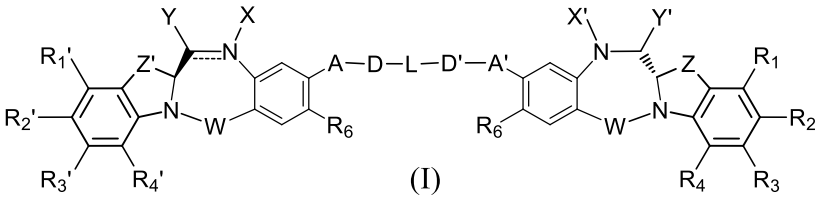


.

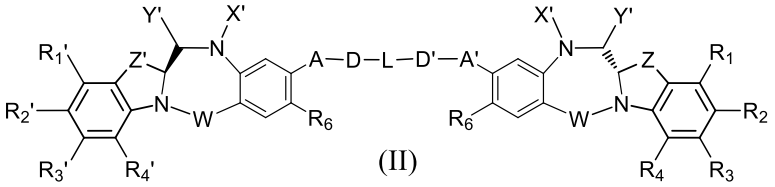
[0032] Em determinadas modalidades, Y é um grupo de saída selecionado de -OR, -OCOR', -OCOOR', -OCONR'R'', -NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', um heterociclo opcionalmente substituído de 5 ou 6 membros contendo nitrogênio (por exemplo, piperidina, tetra-hidropirrol, pirazol, morfolina, *etc*.), um guanidínio representado por -NR'(C=NH)NR'R'', um aminoácido, ou um peptídeo representado por -NRCOP', em que P' é um aminoácido ou um polipeptídeo contendo entre 2 a 20 unidades de aminoácidos, -SR, -SOR', $-SO_2M$, $-SO_3M$, $-OSO_3M$, halogênio, ciano e um azido.

[0033] Um segundo objeto da invenção é fornecer conjugados de agente de ligação à células com os novos compostos benzodiazepina ou derivados do mesmo da presente invenção. Estes conjugados são úteis como agentes terapêuticos, que são liberados especificamente para células-alvo e são citotóxicos.

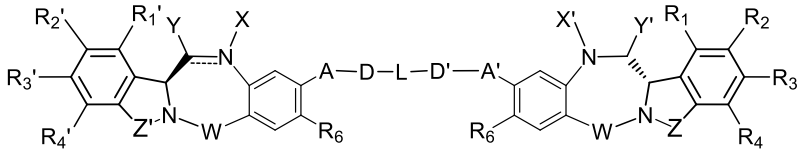
[0034] Especificamente, um conjugado da invenção pode compreender: um composto citotóxico e um agente de ligação à célula (CBA), em que o composto citotóxico compreende um grupo ligante que covalentemente se liga o composto citotóxico ao CBA, e em que o composto citotóxico é representado por qualquer uma das seguintes fórmulas:



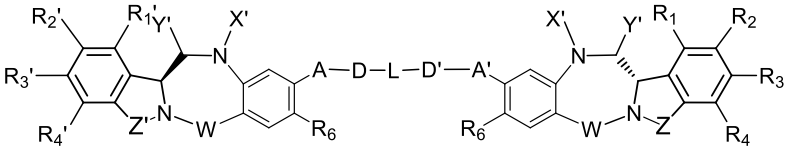
(I) ,



(II) ,



(III) ,



(IV) ,

[0035] ou um sal farmaceuticamente aceitável das mesmas, em que:

[0036] a linha dupla ═ entre N e C representa uma ligação simples ou uma ligação dupla, desde que quando este é uma ligação dupla X é ausente e Y é -H, ou uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono, e quanto este é uma ligação simples, X é -H, o grupo de ligação, ou uma porção protetora de amina;

[0037] Y é -H ou um grupo de saída selecionado de -OR, -OCOR', -OCOOR', -OCONR'R'', -NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', um heterociclo

opcionalmente substituído de 5 ou 6 membros contendo nitrogênio (por exemplo, piperidina, tetra-hidropirrol, pirazol, morfolina), um guanidínio representado por -NR'(C=NH)NR'R'', um aminoácido, ou um peptídeo representado por -NRCOP', em que P' é um aminoácido ou um polipeptídeo contendo entre 2 a 20 unidades de aminoácidos, -SR, -SOR', $-SO_2M$, $-SO_3M$, $-OSO_3M$, halogênio, ciano e um azido; ou

[0038] Y é um sulfito (HSO_3, HSO_2 ou um sal de HSO_3^-, SO_3^{2-} ou HSO_2^- formado com um cátion), metabissulfito ($H_2S_2O_5$ ou um sal de $S_2O_5^{2-}$ formado com um cátion), mono-, di-, tri-, e tetra- tiofosfato (PO_3SH_3, $PO_2S_2H_2$, POS_3H_2, PS_4H_2 ou um sal de PO_3S^{3-}, $PO_2S_2^{3-}$, POS_3^{3-} ou PS_4^{3-} formado com um cátion), éster tio fosfato $(R^iO)_2PS(OR^i)$, R^iS-, R^iSO, R^iSO_2, R^iSO_3, tiossulfato (HS_2O_3 ou um sal de $S_2O_3^{2-}$ formado com um cátion), ditionito (HS_2O_4 ou um sal de $S_2O_4^{2-}$ formado com um cátion), fosforoditioato $(P(=S)(OR^{k'})(S)(OH)$ ou um sal do mesmo formado com um cátion), ácido hidroxâmico ($R^{k'}C(=O)NOH$ ou um sal formado com um cátion), formaldeído sulfoxilato ($HOCH_2SO_2^-$ ou um sal de $HOCH_2SO_2^-$ formado com um cátion, como $HOCH_2SO_2^-Na^+$) ou uma mistura dos mesmos, em que R^i é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 10 átomos de carbono e é substituído com pelo menos um substituinte selecionado de $-N(R^j)_2$, $-CO_2H$, $-SO_3H$, e $-PO_3H$; R^i pode ser ainda opcionalmente substituído com um substituinte para um alquil descrito aqui; R^j é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono; $R^{k'}$ é uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, arila, heterociclila ou heteroarila; preferencialmente, Y é um aduto de um bissulfito, um hidrossulfito, ou um metabissulfito, ou sais dos mesmos (como sal de sódio);

[0039] M é -H ou um cátion;

[0040] R, para cada ocorrência, é independentemente selecionada do grupo que consiste em -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear,

ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, uma arila opcionalmente substituída contendo 6 a 18 átomos de carbono, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, ou um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[0041] R' e R'' são cada um independentemente selecionados de -H, -OH, -OR, -NHR, $-NR_2$, -COR, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[0042] R^c é -H ou uma alquila linear ou ramificada substituída ou não substituída contendo 1 a 4 átomos de carbono, ou o grupo de ligação;

[0043] n é um inteiro de 1 a 24;

[0044] W é selecionado de C=O, C=S, CH_2, BH, SO e SO_2;

[0045] X' é selecionado de -H, um grupo de proteção amina, o grupo de ligação, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, uma arila opcionalmente substituída contendo 6 a 18 átomos de carbono, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[0046] Y' é selecionado de -H, um grupo oxo, o grupo de ligação, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma arila opcionalmente substituída de 6 a 18 membros, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos;

[0047] R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' e R_4' são cada um independentemente selecionados do grupo que consiste em -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, halogênio, guanidínio [$-NH(C=NH)NH_2$], -OR, -NR'R'', $-NO_2$, -NCO, -NR'COR'', -SR, um sulfóxido representado por -SOR', uma sulfona representada por $-SO_2R'$, um sulfonato $-SO_3^-M^+$, um sulfato $-OSO_3^-M^+$, uma sulfonamida representada por $-SO_2NR'R''$, ciano, um azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R'' e o grupo de ligação;

[0048] R_6 é -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', $-NO_2$, halogênio ou o grupo de ligação;

[0049] Z e Z' são independentemente selecionados de $-(CH_2)_{n'}-$, $-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}-$, $-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}-$, $-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}-$ e $-(CH_2)_{n'}–S-(CH_2)_{na'}-$;

[0050] n' e na' são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de 0, 1, 2 e 3;

[0051] R_7 e R_8 são os mesmos ou diferentes, e são cada um independentemente selecionados de -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n-$, um aminoácido, uma unidade de peptídeo contendo 2 a 6 aminoácidos, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de

carbono;

[0052] R_9 é independentemente selecionado de -H, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol -$(OCH_2CH_2)_n$-;

[0053] A e A' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de -O-, oxo (-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -NR_5 e -CRR'N(R_5)-,

[0054] R_5 para cada ocorrência é independentemente -H ou uma alquila linear ou ramificada opcionalmente substituída contendo 1 a 10 átomos de carbono;

[0055] D e D' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente ausentes ou selecionados do grupo que consiste em uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo 1 a 10 átomos de carbono, um aminoácido, um peptídeo contendo 2 a 6 aminoácidos, e uma unidade de polietilenoglicol (-$OCH_2CH_2)_n$-;

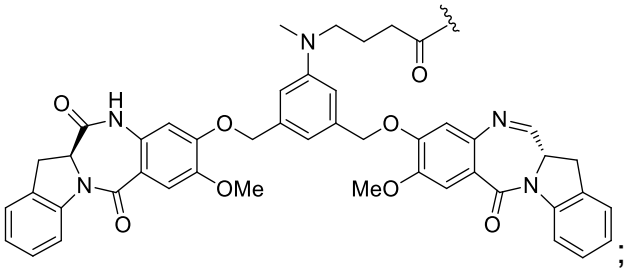
[0056] L é ausente, o grupo de ligação, uma unidade de polietilenoglicol (-$OCH_2CH_2)_n$-, uma alquila ou alquenila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, um grupo fenila, um anel heterocíclico de 3 a 18 membros ou um anel heteroaril de 5 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P, em que a alquila ou alquenila é opcionalmente substituída com o grupo de ligação; fenila ou anel heterocíclico ou heteroarila pode ser opcionalmente substituída, em que o substituinte pode ser o grupo de ligação.

[0057] Em determinadas modalidades, X não é o grupo de ligação. Em determinadas modalidades, a linha dupla = entre N e C representa uma ligação simples, Y não é -H.

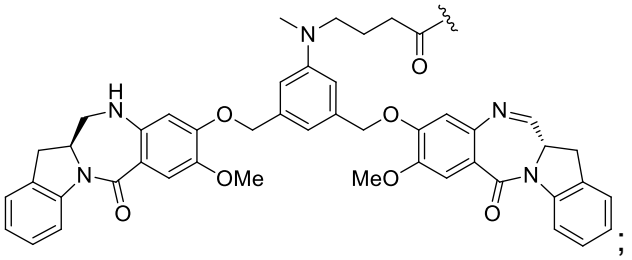
[0058] Em determinadas modalidades, Y é -H ou um grupo de saída selecionado de -OR, -OCOR', -OCOOR', -OCONR'R'', -NR'R'', -

NR'COR'', -NR'NR'R'', um heterociclo opcionalmente substituído de 5 ou 6 membros contendo nitrogênio (por exemplo, piperidina, tetra-hidropirrol, pirazol, morfolina, *etc*.), um guanidínio representado por -NR'(C=NH)NR'R'', um aminoácido, ou um peptídeo representado por -NRCOP', em que P' é um aminoácido ou um polipeptídeo contendo entre 2 a 20 unidades de aminoácidos, -SR, -SOR', $-SO_2M$, $-SO_3M$, $-OSO_3M$, halogênio, ciano e um azido. Em determinadas modalidades, Y não é -H.

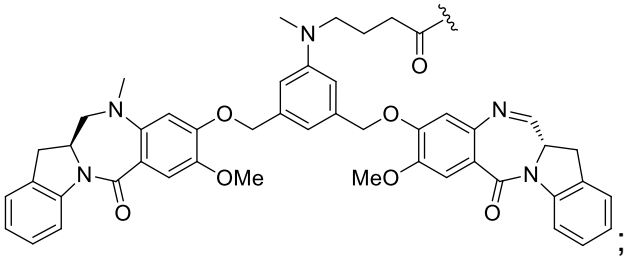
[0059] Em determinadas modalidades, o composto do conjugado não é qualquer um dos seguintes compostos (a ligação ondulada representa a ligação pela qual o composto é ligado ao CBA):



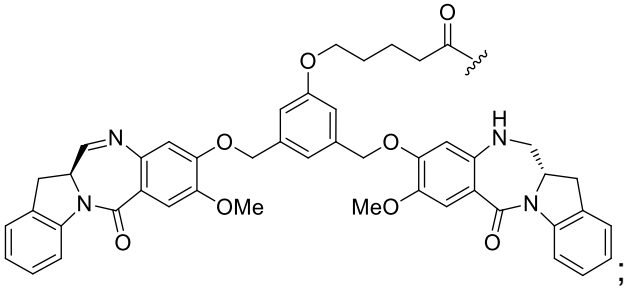
;



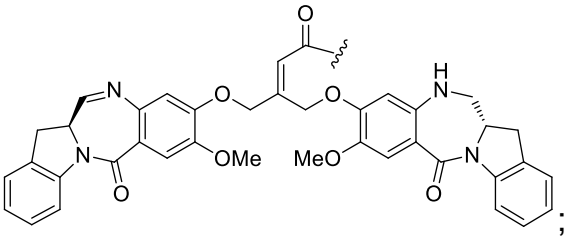
;

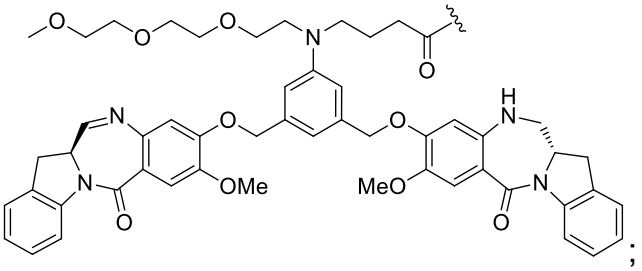


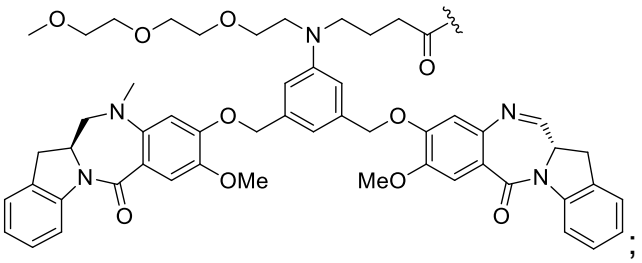
;

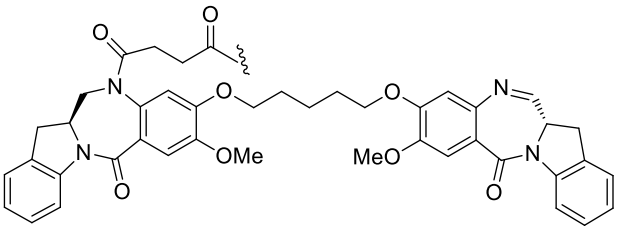


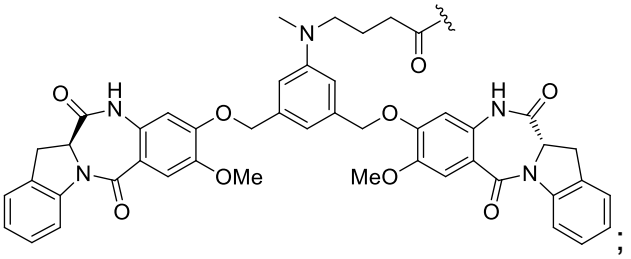
;

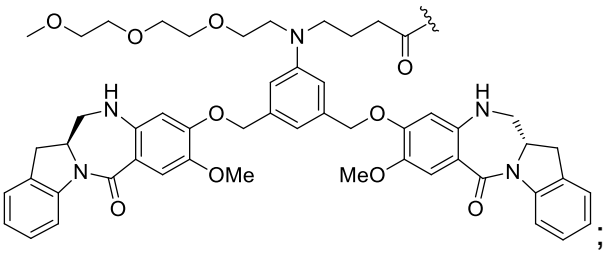

;

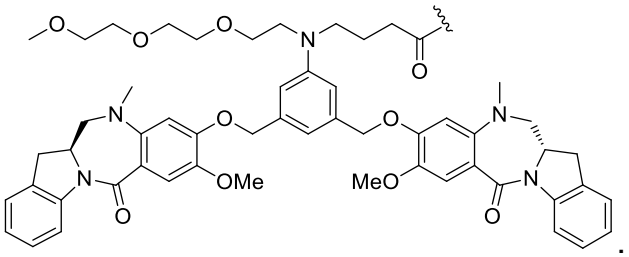

;


;




;


;



[0060] A presente invenção ainda inclui a composição (por exemplo, uma composição farmacêutica) compreendendo novos compostos benzodiazepina, derivados dos mesmos, ou conjugados dos mesmos, (e/ou solvatos, hidratos e/ou sais dos mesmos) e um carreador (um carreador farmaceuticamente aceitável). A presente invenção além disso inclui a composição (por exemplo, uma composição farmacêutica) compreendendo novos compostos benzodiazepina, derivados dos mesmos, ou conjugados dos mesmos (e/ou solvatos, hidratos e/ou sais dos mesmos), e um carreador (um carreador farmaceuticamente aceitável), ainda compreendendo um segundo agente terapêutico. As presentes composições são úteis para inibir crescimento de célula anormal ou tratar um distúrbio proliferativo em um mamífero (por exemplo, humano). As presentes composições são úteis para tratar condições como câncer, artrite reumatoide, esclerose múltipla, doença enxerto-hospedeiro (GVHD), rejeição de transplante, lúpus, miosite, infecção, deficiência imune como AIDS, e doenças inflamatórias em um mamífero (por exemplo, humano).

[0061] A presente invenção inclui um método para inibir crescimento de célula anormal ou tratar um distúrbio proliferativo em um mamífero (por exemplo, humano) compreendendo administrar a dito mamífero uma quantidade terapeuticamente eficaz de novos compostos benzodiazepina, derivados dos mesmos, ou conjugados dos mesmos, (e/ou solvatos e sais dos mesmos) ou uma composição dos mesmos, isolado ou em combinação com um segundo agente terapêutico. A presente invenção inclui um método para sintetizar e usar novos compostos benzodiazepina, derivados dos mesmos, e conjugados dos

mesmos para diagnóstico ou tratamento *in vitro*, *in situ*, e *in vivo* de células mamíferas, organismos, ou condições patológicas associadas.

[0062] Os compostos desta invenção, derivados dos mesmos, ou conjugados dos mesmos, e composições compreendendo os mesmos, são úteis para tratar ou reduzir a gravidade dos distúrbios, como, caracterizados por crescimento anormal de células (por exemplo, câncer). Outras aplicações para compostos e conjugados desta invenção incluem, entre outros, tratar condições como câncer, artrite reumatoide, esclerose múltipla, doença enxerto-hospedeiro (GVHD), rejeição de transplante, lúpus, miosite, infecção, deficiência imune como AIDS and doenças inflamatórias em um mamífero (por exemplo, humano).

[0063] Como usado aqui, quando se referindo a um grupo (por exemplo, R^c, L, X' *etc*.) "é/ser" (ou "não é") o grupo de ligação ou o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este, entende-se que o grupo "compreende" (ou "não compreende") o grupo de ligação ou o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0064] As FIGs. 1-6 mostram os esquemas para a síntese de compostos benzodiazepina e os correspondentes compostos ligáveis apropriados para conjugação da presente invenção.

[0065] A FIG. 7 mostra o esquema para a síntese de compostos representativos com ligantes PEG modificados da presente invenção.

[0066] A FIG. 8 mostra o esquema para a síntese de compostos representativos com um ligante metiltio da presente invenção.

[0067] As FIGS. 9-10 mostram os esquemas para a síntese de compostos representativos contendo uma amina terciária da presente invenção.

[0068] A FIG. 11 mostra o esquema para a síntese de compostos representativos com um ligante peptídeo da presente invenção.

[0069] As FIGS. 12-19 mostram os esquemas para a síntese de compostos representativos apropriados para métodos de conjugação de uma etapa da presente invenção.

[0070] A FIG. 20 mostra o esquema para uma síntese de dímero mono-imina de duas etapas.

[0071] A FIG. 21 mostra o esquema para uma síntese de dímero di-reduzido de duas etapas.

[0072] A FIG. 22 mostra o esquema para a síntese de uma etapa dos conjugados anticorpo-fármaco representativos.

[0073] A FIG. 23 mostra o esquema para a síntese de duas etapas dos conjugados anticorpo-fármaco representativos.

[0074] A FIG. 24 mostra a citotoxicidade in vitro do dímero metilditio **1d** contra linhagens de células Namalwa, KB e HL60/QC.

[0075] A FIG. 25 mostra a citotoxicidade in vitro e especificidade dos conjugados huMy9-6-SPDB-**1f** contra várias linhagens celulares. Notar que bissulfito de sódio foi adicionado à reação de conjugação para preparar o conjugado.

[0076] A FIG. 26 mostra a citotoxicidade in vitro e especificidade dos conjugados huFOLR1-SPDB-**1f**.

[0077] A FIG. 27 mostra conjugação de dímero não reduz a afinidade de ligação de anticorpo. Notar que bissulfito de sódio foi adicionado à reação de conjugação para preparar o conjugado.

[0078] A FIG. 28 mostra atividade antitumor *in vivo* de conjugado huMy9-6. Notar que bissulfito de sódio foi adicionado à reação de conjugação para preparar o conjugado.

[0079] A FIG. 29 mostra citotoxicidade in vitro de conjugado huMy9-6-SPDB-**1f** contra células positivas para antígeno. Notar que bissulfito de sódio foi adicionado à reação de conjugação para preparar o conjugado.

[0080] A FIG. 30 mostra esquema sintético para preparar

dissulfetos ligante contendo tioéter **27e-h**.

[0081] A FIG. 31 mostra esquema sintético para preparar dímeros **28c-f**.

[0082] A FIG. 32 mostra esquema sintético para preparar dímeros ligados a fenil **29b-c**.

[0083] A FIG. 33 mostra o esquema para uma síntese de duas etapas alternativas para dímeros mono-imina.

[0084] A FIG. 34 mostra citotoxicidade in vitro para huMy9-6-SPDB-**1f** (A), huMy9-6-sulfoSPDB-**1f** (B) e huMy9-6-BMPS-**1f** (C) contra células HL60/QC (Ag^+) com e sem bloqueio de sítios de ligação de antígeno. Notar que em todos os três experimentos (34A, 34B, e 34C), bissulfito de sódio foram adicionados à reação de conjugação para preparar o conjugado.

[0085] A FIG. 35 mostra citotoxicidade in vitro para chB38,1-SPDB-**1f** (A), e chB38,1-sulfoSPDB-**1f** (B) contra células COLO205 (Ag+). Notar que em ambos experimentos, bissulfito de sódio foi adicionado à reação de conjugação para preparar o conjugado.

[0086] A FIG. 36 mostra eficácia in vivo de huMy9-6-SPDB-**1f** em camundongos contendo HL60/QC. Notar que bissulfito de sódio foi adicionado à reação de conjugação.

[0087] A FIG. 37 mostra eficácia in vivo de huFOLR1-SPDB-**1f** em camundongos contendo tumor KB.

[0088] A FIG. 38 mostra esquema sintético do composto **1**.

[0089] A FIG. 39 mostra um esquema sintético do composto **1d** com 5-etil-2-metilpiridina borano (PEMB).

[0090] A FIG. 40 mostra um esquema sintético do composto **1d** com triacetoxicoborohidreto de sódio (STAB).

[0091] A FIG. 41 mostra um esquema sintético do composto **31a-c**.

[0092] A FIG. 42 mostra um esquema sintético do composto **32c,d**.

[0093] A FIG. 43 mostra um esquema sintético dos compostos **1i** e

12a.

[0094] A FIG. 44 mostra atividade antiproliferativa comparando (A) huMy9-6-SPDB-**1f**, (B) huMy9-6-sulfoSPDB-**1f**, e (C) huMy9-6-BMPS-**1f**, contra células OCI-AML3 (Ag+) com e sem bloqueio de sítios de ligação de antígeno. Notar que em todos os três experimentos, bissulfito de sódio foi adicionado à reação de conjugação para preparar o conjugado.

[0095] A FIG. 45 mostra um esquema alternativo para sintetizar ácido 4-(benzilóxi)-5-metóxi-2-nitrobenzoico usado na preparação de monômero IBD.

[0096] A FIG. 46 é um esquema de síntese alternativa para (5-((2-(2-(2-metoxietóxi)etóxi)etil)(2-metil-2-(metildisulfanil)propil)amino)-1,3-fenileno)dimetanol (**1b**).

[0097] A FIG. 47 é um esquema de síntese alternativa para (5-((2-(2-(2-metoxietóxi)etóxi)etil)(2-metil-2-(metildisulfanil)propil)amino)-1,3-fenileno)dimetanol (**1b**).

[0098] A FIG. 48 é um esquema de síntese alternativa para uma síntese de dímero mono-imina de duas etapas.

[0099] A FIG. 49 mostra potência de vários conjugados contra várias linhagens celulares. Os valores IC_{50} listados na tabela estão listados na unidade de nM.

[00100] A FIG. 50 mostra eficácia in vivo de huMy9-6-sulfo-SPDB**-1f** em camundongos contendo tumor MOLM-13.

[00101] A FIG. 51 mostra eficácia in vivo de huMy9-6-sulfo-SPDB**-1f** em camundongos contendo tumor NB4.

[00102] A FIG. 52 mostra eficácia in vivo de huMy9-6-BMPS**-1f** em camundongos contendo tumor HL60/QC.

[00103] A FIG. 53 mostra eficácia in vivo de huMy9-6-BMPS**-1f** in camundongos contendo tumor MOLM-13. Notar que bissulfito de sódio foi adicionado à reação de conjugação para preparar o conjugado.

[00104] A FIG. 54 mostra um esquema representativo de síntese para um conjugado Folato sulfonatado/composto citotóxico.

[00105] A FIG. 55 mostra vários conjugados representativos de fármaco sulfonatada-anticorpo com diferentes ligantes.

[00106] A FIG. 56 mostra eficácia in vivo de huMy9-6-Fármaco **2** em camundongos contendo tumor HL60/QC. Notar que bissulfito de sódio foi adicionado à reação de conjugação para preparar o conjugado.

[00107] A FIG. 57 mostra eficácia in vivo de huMy9-6-Fármaco **2** em camundongos contendo tumor MOLM-13. Notar que bissulfito de sódio foi adicionado à reação de conjugação para preparar o conjugado.

[00108] A FIG. 58 mostra citotoxicidade semelhante in vitro de HuMy9-6-Fármaco **2** (conjugados preparados sem e com bissulfito de sódio contra células HL60 que expressam antígeno CD33.

[00109] A FIG. 59 mostra citotoxicidade semelhante in vitro de conjugados anti-CD22 Ab-Fármaco 2 preparados sem e com bissulfito de sódio contra células BJAB que expressam CD22.

[00110] A FIG. 60 mostra a preparação de huMy9-6-sulfo-SPDB-**1d** usando o ligante altamente reativo 4-nitroPy-sulfo-SPDB.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[00111] A referência agora será preparada em detalhes a certas modalidades da invenção, exemplos das quais são ilustradas nas estruturas e fórmulas que acompanham. Enquanto a invenção será descrita em conjunto com as modalidades enumeradas, será entendido que não é pretendido que se limite a invenção à estas modalidades. Do contrário, a invenção pretende cobrir todas as alternativas, modificações, e equivalentes que podem ser incluídos no escopo da presente invenção, como definido pelas reivindicações. Um especialista na técnica reconhecerá muitos métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos descritos aqui, que poderiam ser usados na prática da presente invenção.

[00112] Deve ser entendido que qualquer combinação das modalidades descritas aqui, incluindo aquelas descritas em diferentes aspectos da invenção (por exemplo, compostos, moléculas de composto-ligante, conjugados, composições, métodos de preparo e uso) e diferentes partes da especificação (incluindo modalidades descritas somente nos Exemplos) podem ser combinadas com uma ou mais outras modalidades da invenção, salvo se explicitamente negada ou imprópria. Combinação de modalidades não são limitadas às combinações especificadas reivindicadas através das várias reivindicações dependentes.

DEFINIÇÕES

[00113] "**Alquila linear ou ramificada**" como usado aqui refere-se a um radical hidrocarboneto monovalente saturado de cadeia linear ou ramificada de um a vinte átomos de carbono. Exemplos de alquila incluem, entre outros, metila, etila, 1-propila, 2-propila, 1-butila, 2-metil-1-propila, $-CH_2CH(CH_3)_2$), 2-butila, 2-metil-2-propila, 1-pentila, 2-pentil 3-pentila, 2-metil-2-butila, 3-metil-2-butila, 3-metil-1-butila, 2-metil-1-butila, 1-hexila), 2-hexila, 3-hexila, 2-metil-2-pentila, 3-metil-2-pentila, 4-metil-2-pentila, 3-metil-3-pentila, 2-metil-3-pentila, 2,3-dimetil-2-butila, 3,3-dimetil-2-butila, 1-heptila, 1-octila, e semelhantes. Preferencialmente, o alquil tem um a dez átomos de carbono. Mais preferencialmente, o alquil tem um a quatro átomos de carbono.

[00114] "**Alquenila linear ou ramificada**" refere-se um radical hidrocarboneto monovalente de cadeia linear ou ramificada de dois a vinte átomos de carbono com pelo menos um local de insaturação, ou seja, uma ligação dupla de carbono-carbono, em que o radical alquenila inclui radicais contendo orientações "cis" e "trans", ou alternativamente, orientações "E" e "Z". Exemplos incluem, entre outros, etilenila ou vinil ($-CH=CH_2$), alil ($-CH_2CH=CH_2$), e semelhantes. Preferencialmente, a alquenila tem dois a dez átomos de carbono. Mais preferencialmente, a

alquila tem dois a quatro átomos de carbono.

[00115] "**Alquinila linear ou ramificada**" refere-se a um radical hidrocarboneto monovalente linear ou ramificado de dois a vinte átomos de carbono com pelo menos um local de insaturação, ou seja, uma ligação tripla carbono-carbono. Exemplos incluem, entre outros, etinila, propinila, 1-butinila, 2-butinila, 1-pentinila, 2-pentinila, 3-pentinila, hexinila, e semelhantes. Preferencialmente, a alquinila tem dois a dez átomos de carbono. Mais preferencialmente, a alquinila tem dois a quatro átomos de carbono.

[00116] O termo "**carbociclo**," "**carbociclila**" e "**anel carbocíclico**" refere-se a um anel monovalente não saturado, saturado ou parcialmente insaturado contendo 3 a 12 átomos de carbono como um anel monocíclico ou 7 a 12 átomos de carbono como um anel bicíclico. Carbociclos bicíclicos contendo 7 a 12 átomos podem ser arranjados, por exemplo, como um biciclo [4,5], [5,5], [5,6], ou [6,6] sistema, e carbociclos bicíclicos contendo 9 ou 10 átomos no anel podem ser arranjados como um biciclo [5,6] ou [6,6] sistema, ou como sistemas em ponte como biciclo[2,2.1]heptano, biciclo[2,2,2]octano e biciclo[3,2,2]nonano. Exemplos de carbociclos monocíclicos incluem, entre outros, ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila, 1-ciclopent-1-enila, 1-ciclopent-2-enila, 1-ciclopent-3-enila, ciclo-hexila, 1-ciclo-hex-1-enila, 1-ciclo-hex-2-enila, 1-ciclo-hex-3-enila, ciclo-hexadienila, cicloheptila, ciclooctila, ciclononila, ciclodecila, cicloundecila, ciclododecila, e semelhantes.

[00117] Os termos "**alquila cíclica**" e "**cicloalquila**" podem ser usados de modo intercambiável. Estes referem-se a um radical monovalente anel carbocíclico saturado. Preferencialmente, a alquila cíclica é radical de anel monocíclico de 3 a 7 membros. Mais preferencialmente, o alquila cíclica é ciclo-hexila.

[00118] O termo "**alquenila cíclica**" refere-se a um radical

carbocíclico contendo pelo menos uma ligação dupla na estrutura em anel.

[00119] O termo "**alquinila cíclica**" refere-se a um radical carbocíclico contendo pelo menos uma ligação tripla na estrutura em anel.

[00120] "**Arila**" significa um radical hidrocarboneto aromático monovalente de 6-18 átomos de carbono derivado pela remoção de um átomo de hidrogênio de um único átomo de carbono de um sistema de anel aromático parente. Alguns grupos arila são representados nas estruturas exemplares como "Ar." Arila inclui radicais bicíclicos compreendendo um anel aromático fundido a um anel saturado, parcialmente insaturado, ou carbocíclico aromático ou anel heterocíclico. Grupos aril típicos incluem, entre outros, radicais derivados de benzeno (fenila), benzenos substituídos, naftaleno, antraceno, indenila, indanila, 1,2-di-hidronaftaleno, 1,2,3,4-tetra-hidronaftila, e semelhantes. Preferencialmente, arila é grupo fenila.

[00121] Os termos "**heterociclo**," "**heterociclila,**" e "**anel heterocíclico**" são usados aqui de modo intercambiável e referem-se a um radical carbocíclicos saturado ou parcialmente insaturado (ou seja, contendo uma ou mais duplas e/ou triplas ligações dentro do anel) de 3 a 18 átomos no anel em que pelo menos um átomo no anel é um heteroátomo selecionado de nitrogênio, oxigênio, fósforo, e enxofre, os demais átomos no anel sendo C, onde um ou mais átomos no anel é opcionalmente substituído independentemente com um ou mais substituintes descritos abaixo. Um heterociclo pode ser um monociclo contendo 3 a 7 membros no anel (2 a 6 átomos de carbono e 1 a 4 heteroátomos selecionado de N, O, P, e S) ou a biciclo contendo 7 a 10 membros no anel (4 a 9 átomos de carbono e 1 a 6 heteroátomos selecionado de N, O, P, e S), por exemplo: um sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6], ou [6,6]. Heterociclos são descritos em Paquette, Leo A.;

"Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W. A. Benjamin, New York, 1968), particularmente Capítulos 1, 3, 4, 6, 7, e 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 até o presente), em particular Volumes 13, 14, 16, 19, e 28; e J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566. "**Heterociclila**" ainda inclui radicais onde os radicais heterociclos são fundidos com um anel saturado, parcialmente insaturado, ou carbocíclico aromático ou anel heterocíclico. Exemplos de anel heterocíclicos incluem, entre outros, pirrolidinila, tetra-hidrofuranoila, di-hidrofuranila, tetra-hidrotienila, tetra-hidropiranila, di-hidropiranila, tetra-hidrotiopiranila, piperidino, morfolino, tiomorfolino, tioxanila, piperazinila, homopiperazinila, azetidinila, oxetanila, tietanila, homopiperidinila, oxepanila, tiepanila, oxazepinila, diazepinila, tiazepinila, 2-pirrolinila, 3-pirrolinila, indolinila, 2H-piranila, 4H-piranila, dioxanila, 1,3-dioxolanila, pirazolinila, ditianila, ditiolanila, di-hidropiranila, di-hidrotienila, di-hidrofuranila, pirazolidinilimidazolinila, imidazolidinila, 3-azabicico[3,1,0]hexanila, 3-azabiciclo[4,1,0]heptanila, e azabiciclo[2,2,2]hexanila. Frações espiro são ainda incluídos dentro do escopo desta definição. Exemplos de um grupo heterocíclico em que átomos no anel são substituídos com frações oxo (=O) são pirimidinonila e 1,1-dioxo-tiomorfolinila.

[00122] O termo "**heteroarila**" refere-se a um radical aromático monovalente de 5 ou 6 membros no anel, e inclui sistemas de anel fundido (pelo menos um dos quais é aromático) de 5-18 átomos, contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre. Exemplos de grupos heteroaril são piridinil (incluindo, por exemplo, 2-hidroxipiridinila), imidazolila, imidazopiridinila, pirimidinil (incluindo, por exemplo, 4-hidroxipirimidinila), pirazolila, triazolila, pirazinila, tetrazolila, furila, tienila, isoxazolila, tiazolila, oxazolila, isotiazolila, pirrolila, quinolinila, isoquinolinila, indolila, benzimidazolila, benzofuranila, cinnolinila,

indazolila, indolizinila, ftalazinila, piridazinila, triazinila, isoindolila, pteridinila, purinila, oxadiazolila, triazolila, tiadiazolila, furazanila, benzofurazanila, benzotiofenila, benzotiazolila, benzoxazolila, quinazolinila, quinoxalinila, naftiridinila, e furopiridinila.

[00123] Os grupos heterociclo ou heteroarila podem ser carbono (ligado ao carbono) ou nitrogênio (ligado ao nitrogênio) ligado onde é possível. Por meio de exemplo e não limitação, heterociclos ou heteroaril ligados ao carbono são ligados na posição 2, 3, 4, 5, ou 6 de uma piridina, posição 3, 4, 5, ou 6 de uma piridazina, posição 2, 4, 5, ou 6 de uma pirimidina, posição 2, 3, 5, ou 6 de uma pirazina, posição 2, 3, 4, ou 5 de um furano, tetra-hidrofurano, tiofurano, tiofeno, pirrol ou tetra-hidropirrol, posição 2, 4, ou 5 de um oxazol, imidazol ou tiazol, posição 3, 4, ou 5 de um isoxazol, pirazol, ou isotiazol, posição 2 ou 3 de uma aziridina, posição 2, 3, ou 4 de uma azetidina, posição 2, 3, 4, 5, 6, 7, ou 8 de uma quinolina ou posição 1, 3, 4, 5, 6, 7, ou 8 de uma isoquinolina.

[00124] Por meio de exemplo e não limitação, heterociclos ou heteroaril ligados ao nitrogênio são ligados na posição 1 de uma aziridina, azetidina, pirrol, pirrolidina, 2-pirrolina, 3-pirrolina, imidazol, imidazolidina, 2-imidazolina, 3-imidazolina, pirazol, pirazolina, 2-pirazolina, 3-pirazolina, piperidina, piperazina, indol, indolina, 1H-indazol, posição 2 de um isoindol, ou isoindolina, posição 4 de uma morfolina, e posição 9 de um carbazol, ou O-carbolina.

[00125] Os heteroátomos presentes em heteroarila ou heterociclila incluem as formas oxidadas como NO, SO, e SO_2.

[00126] O termo "**halo**" ou "**halogênio**" refere-se a F, Cl, Br ou I.

[00127] O alquila, alquenila, alquinila, alquila cíclica, alquenila cíclica, alquinila cíclica, carbociclila, arila, heterociclila e heteroaril descritos acima podem ser opcionalmente substituídos com um ou mais (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6 ou mais) substituintes.

[00128] Se um substituinte é descrito como sendo "**substituído**," um substituinte não hidrogênio está no lugar de um substituinte hidrogênio em um carbono, oxigênio, enxofre ou nitrogênio do substituinte. Assim, por exemplo, um substituinte alquila substituída é um substituinte alquila em que pelo menos um substituinte não hidrogênio está no lugar de um substituinte hidrogênio no substituinte alquila. Para ilustrar, monofluoralquila é alquila substituída com um substituinte fluor, e difluoralquila é alquila substituída com dois substituintes fluor. Deve ser reconhecido que se há mais do que uma substituição em um substituinte, cada substituinte não hidrogênio pode ser idêntico ou diferente (salvo se declarado de outra forma).

[00129] Se um substituinte é descrito como sendo "**opcionalmente substituído**," o substituinte pode ser (1) não substituído, ou (2) substituído. Se um carbono de um substituinte é descrito como sendo opcionalmente substituído com uma ou mais de uma lista de substituintes, um ou mais dos hidrogênios no carbono (na medida em que há algum) pode separadamente e/ou junto ser substituído com um substituinte opcional independentemente selecionado. Se um nitrogênio de um substituinte é descrito como sendo opcionalmente substituído com uma ou mais de uma lista de substituintes, uma ou mais dos hidrogênios no nitrogênio (na medida em que há algum) pode cada um ser substituído com um substituinte opcional independentemente selecionado. Um substituinte exemplar pode ser descrito como -NR'R", em que R' e R" junto com o átomo de nitrogênio ao qual são ligados, podem formar um anel heterocíclico. O anel heterocíclico formado de R' e R" junto com o átomo de nitrogênio ao qual são ligados podem ser parcialmente ou totalmente saturados. Em uma modalidade, o anel heterocíclico consiste de 3 a 7 átomos. Em outra modalidade, o anel heterocíclico é selecionado do grupo que consiste em pirrolila, imidazolila, pirazolila, triazolila, tetrazolila, isoxazolila, piridila e tiazolila.

[00130] Este relatório descritivo usa os termos "**substituinte**," "**radical**," e "**grupo**" de modo intercambiável.

[00131] Se um grupo de substituintes é coletivamente descrito como sendo opcionalmente substituído por uma ou mais de uma lista de substituintes, o grupo pode incluir: (1) substituintes não substituíveis, (2) substituintes substituíveis que não são substituídos pelos substituintes opcionais, e/ou (3) substituintes substituíveis que são substituídos por um ou mais dos substituintes opcionais.

[00132] Se um substituinte é descrito como sendo opcionalmente substituído com até um número particular de substituintes não hidrogênios, aquele substituinte pode ser (1) não substituído; ou (2) substituído por até aquele número particular de substituintes não hidrogênios ou por até o número máximo de posições substituíveis no substituinte, o que for menor. Assim, por exemplo, se um substituinte é descrito como um heteroarila opcionalmente substituída com até 3 substituintes não hidrogênios, então qualquer heteroaril com menos do que 3 posições substituíveis poderia ser opcionalmente substituído por até quantos substituintes não hidrogênios quanto o heteroaril tiver posições substituíveis. Ditos substituintes, em exemplos não limitantes, podem ser selecionados de uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada, cíclica contendo de 1 a 10 átomos de carbono, arila, heteroarila, heterociciclila, halogênio, guanidínio [$-NH(C=NH)NH_2$], $-OR^{100}$, $NR^{101}R^{102}$, $-NO_2$, $-NR^{101}COR^{102}$, $-SR^{100}$, um sulfóxido representado por $-SOR^{101}$, uma sulfona representada por $-SO_2R^{101}$, um sulfonato $-SO_3M$, um sulfato $-OSO_3M$, uma sulfonamida representada por $-SO_2NR^{101}R^{102}$, ciano, um azido, $-COR^{101}$, $-OCOR^{101}$, $-OCONR^{101}R^{102}$ and uma unidade de polietilenoglicol $(-OCH_2CH_2)_nR^{101}$ em que M é H ou um cátion (como Na^+ ou K^+); R^{101}, R^{102} e R^{103} são cada um independentemente selecionados de H, alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo de 1 a 10 átomos de

carbono, uma unidade de polietilenoglicol $(-OCH_2CH_2)_n-R^{104,}$ em que n é um inteiro de 1 a 24, um aril contendo de 6 a 10 átomos de carbono, um anel heterocíclico contendo de 3 a 10 átomos de carbono e um heteroaril contendo 5 a 10 átomos de carbono; e R^{104} é H ou uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono, em que o alquila, alquenila, alquinila, arila, heteroarila e heterociclil nos grupos representado por R^{100}, R^{101}, R^{102}, R^{103} e R^{104} são opcionalmente substituídos com uma ou mais (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6 ou mais) substituintes independentemente selecionado de halogênio, -OH, -CN, $-NO_2$ e alquila linear ou ramificada não substituído contendo 1 a 4 átomos de carbono. Preferencialmente, os substituintes para alquila, alquenila, alquinila, alquila cíclica, alquenila cíclica, alquinila cíclica, carbociclila, arila, heterociclila e heteroarila opcionalmente substituídas descritos acima incluem halogênio, -CN, $-NR^{102}R^{103}$, $-CF_3$, $-OR^{101}$, arila, heteroarila, heterociclila, $-SR^{101}$, $-SOR^{101}$, $-SO_2R^{101}$ e $-SO_3M$.

[00133] O termo "**composto**" ou "**composto citotóxico**," "**dímero citotóxico**" e "**composto dímero citotóxico**" são usados de modo intercambiável. Pretende-se que incluam os compostos para os quais uma estrutura ou fórmula ou qualquer derivado do mesmo foi revelado na presente invenção ou uma estrutura ou fórmula ou qualquer derivado do mesmo que foi incorporado por referência. O termo ainda inclui, estereoisômeros, isômeros geométricos, tautômeros, solvatos, metabólitos, sais (por exemplo, sais farmaceuticamente aceitáveis) e profármacos, e profármaco sais de um composto de todas as fórmulas reveladas na presente invenção. O termo ainda inclui quaisquer solvatos, hidratos, e polimorfos de qualquer um dos anteriores. A menção específica de "estereoisômeros," "isômeros geométricos," "tautômeros," "solvatos," "metabólitos," "sal" "profármaco," "sal profármaco," "conjugados," "sais conjugados," "solvato," "hidrato," ou "polimorfo" em certos aspectos da invenção descrita neste pedido não

deve ser interpretado como uma omissão pretendida destas formas em outros aspectos da invenção onde o termo "composto" é usado sem menção destas outras formas.

[00134] O termo "**conjugado**" como usado aqui refere-se a um composto descrito aqui ou um derivado do mesmo que é ligado a um agente de ligação à célula.

[00135] O termo "**ligável a um agente de ligação à célula**" como usado aqui refere-se aos compostos descritos aqui ou derivados dos mesmos compreendendo pelo menos um grupo ligante ou um precursor do mesmo apropriado para ligar estes compostos ou derivados do mesmo a um agente de ligação à célula.

[00136] O termo "**precursor**" de um determinado grupo refere-se a qualquer grupo que pode levar àquele grupo por qualquer reação de desproteção, uma modificação química ou um acoplamento.

[00137] O termo "**ligado a um agente de ligação à célula**" refere-se a uma molécula de conjugado compreendendo pelo menos um de os compostos descrito aqui (por exemplo, compostos de fórmula (I)-(IV) e (VIII)-(XI) e compostos fármaco-ligante descritos aqui), ou derivado do mesmo ligado a um agente de ligação à célula através de um grupo ligante apropriado ou um precursor do mesmo.

[00138] O termo "**quiral**" refere-se às moléculas que têm a propriedade de não sobreposição do parceiro de imagem especular, enquanto o termo "aquiral" refere-se às moléculas que são sobrepostas nas imagens especulares de parceiras.

[00139] O termo "**estereoisômero**" refere-se a compostos que têm constituição química idêntica e conectividade, mas diferentes orientações de seus átomos no espaço que não podem ser interconvertidas por rotação ao redor de ligações simples.

[00140] "**Diastereoisômero**" refere-se a um estereoisômero com dois ou mais centros de quiralidade e cujas moléculas não são imagens

especulares de outro. Diastereoisômeros têm diferentes propriedades físicas, por exemplo, pontos de fusão, pontos de ebulição, propriedades espectrais, e reatividades. Misturas de diastereoisômeros podem se separar em procedimentos analíticos de alta resolução como cristalização, eletroforese e cromatografia.

[00141] "**Enantiômeros**" referem-se a dois estereoisômeros de um composto que não são imagens especulares sobrepostas de um outro.

[00142] Definições e convenções estereoquímicas usadas aqui geralmente seguem S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; e Eliel, E. and Wilen, S., "Stereochemistry of Organic Compounds," John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994. Os compostos da invenção podem conter centros quirais ou assimétricos, e, portanto, existem em diferentes formas estereoisoméricas. Pretende-se que todas as formas estereoisoméricas dos compostos da invenção, incluindo, entre outros, diastereoisômeros, enantiômeros e atropisômeros, bem como misturas dos mesmos como misturas racêmicas, forma parte da presente invenção. Muitos compostos orgânicos existem em formas opticamente ativas, ou seja, têm a capacidade de girar o plano de luz polarizada. Ao descrever um composto opticamente ativo, os prefixos D e L, ou R e S, são usados para denotar a configuração absoluta da molécula ao redor de seu centro quiral. Os prefixos d e l ou (+) e (-) são empregados para designar o sinal de rotação do plano de luz polarizada pelo composto, com (-) ou l significando que o composto é levorrotatório. Um composto prefixado com (+) ou d é dextrorotatório. Para determinada estrutura química, estes estereoisômeros são idênticos exceto que são imagens especulares de outro. Um estereoisômero específico pode ainda ser refenciado como um enantiômero, e uma mistura de ditos isômeros é geralmente chamada de mistura enantiomérica. Uma mistura 50:50 de enantiômeros é referenciada como uma mistura racêmica ou racemato,

que pode ocorrer onde não há estereoseleção ou estereoespecificidade em uma reação ou processo químico. Os termos "mistura racêmica" e "racemato" referem-se a uma mistura equimolar de duas espécies enantioméricas, destituído de atividade óptica.

[00143] O termo "**tautômero**" ou "**forma tautomérica**" refere-se isômeros estruturais de diferentes energias que são interconversíveis através de uma barreira de energia baixa. Por exemplo, tautômeros próton (também conhecidos como tautômero prototrópicos) incluem interconversões via migração de um próton, como isomerizações ceto-enol e imina-enamina. Tautômero de valência incluem interconversões por reorganização de alguns dos elétrons da ligação.

[00144] O termo "**profármaco**" como usado neste pedido refere-se a um precursor ou forma derivada de um composto da invenção que é capaz de ser enzimaticamente ou hidroliticamente ativada ou convertida na forma parente mais ativa. Ver, por exemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) e Stella *et al*., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt *et al*., (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). As profármacos desta invenção incluem, entre outras, profármacos contendo éster, profármacos contendo fosfato, profármacos contendo tiofosfato, profármacos contendo sulfato, profármacos contendo peptídeo, profármacos contendo D-aminoácido, profármacos glicosiladas, profármacos contendo β-lactama, profármacos contendo opcionalmente substituído fenoxiacetamida, profármacos contendo opcionalmente substituído fenilacetamida, profármacos contendo 5-fluorcitosina e outros 5-fluoruridina que podem ser convertidas na fármaco livre citotóxica mais ativa. Exemplos de fármacos citotóxicas que podem então ser derivatizados em uma forma de profármaco para uso nesta invenção incluem, entre outros, compostos da invenção e agentes

quimioterápicos como descrito acima.

[00145] O termo "**profármaco**" ainda pretende incluir um derivado de um composto que pode hidrolisar, oxidar, ou de outra forma reagir em condições biológicas (*in vitro* ou *in vivo*) para fornecer um composto desta invenção. Profármacos podem somente se tornar ativas em dita reação em condições biológicas, ou podem ter atividade em suas formas não reagidas. Exemplos de profármacos contempladas nesta invenção incluem, entre outros, análogos ou derivados dos compostos de qualquer uma das fórmulas reveladas aqui que compreendem frações biohidrolizáveis como amidas biohidrolizáveis, ésteres biohidrolizáveis, carbamatos biohidrolizáveis, carbonatos biohidrolizáveis, ureídas biohidrolizáveis, e análogos de fosfato biohidrolizáveis. Outros exemplos de profármacos incluem derivados de compostos de qualquer uma das fórmulas reveladas aqui que compreendem frações -NO, $-NO_2$, -ONO, ou $-ONO_2$. Profármacos podem tipicamente ser preparadas usando métodos bem conhecidos, como aqueles descritos por Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery (1995) 172-178, 949-982 (Manfred E. Wolff ed., 5th ed); ver ainda Goodman e Gilman's, The Pharmacological basis of Therapeutics, 8th ed., McGraw-Hill, Int. Ed. 1992, "Biotransformation of Drugs."

[00146] Uma forma preferencial da profármaco da invenção inclui compostos (com ou sem qualquer grupo ligante) e conjugados da invenção compreendendo um aduto formado entre uma ligação imina dos compostos/conjugados e um reagente reativo imina. Outra forma preferencial de profármaco da invenção inclui compostos como aqueles de fórmula (I) - (IV), em que quando a linha dupla = entre N e C representa uma ligação simples, X é H ou um grupo de proteção de amina, e o composto se torna uma profármaco. A profármaco da invenção pode conter uma ou ambas as formas de profármacos descritas aqui (por exemplo, contendo um aduto formado entre uma

ligação imina dos compostos/conjugados e um reagente reativo imina, e/ou contendo um grupo de saída Y quando X é -H).

[00147] O termo "**reagente reativo imina**" refere-se a um reagente que é capaz de reagir com um grupo imina. Exemplos de reagente reativo imina incluem, entre outros, sulfitos (H_2SO_3, H_2SO_2 ou um sal de HSO_3^-, SO_3^{2-} ou HSO_2^- formado com um cátion), metabissulfito ($H_2S_2O_5$ ou um sal de $S_2O_5^{2-}$ formado com um cátion), mono, di, tri, e tetra-tiofosfatos (PO_3SH_3, $PO_2S_2H_3$, POS_3H_3, PS_4H_3 ou um sal de PO_3S^{3-}, $PO_2S_2^{3-}$, POS_3^{3-} ou PS_4^{3-} formado com um cátion), ésteres de tio fosfato ($(R^iO)_2PS(OR^i)$), R^iSH, R^iSOH, R^iSO_2H, R^iSO_3H), várias aminas (hidroxil amina (por exemplo, NH_2OH), hidrazina (por exemplo, NH_2NH_2), NH_2O-R^i, $R^{i'}NH$-R^i, NH_2-R^i), NH_2-CO-NH_2, NH_2-C(=S)-NH_2, tiossulfato ($H_2S_2O_3$ ou um sal de $S_2O_3^{2-}$ formado com um cátion), ditionito ($H_2S_2O_4$ ou um sal de $S_2O_4^{2-}$ formado com um cátion), fosforoditioato ($P(=S)(OR^k)(SH)(OH)$ ou um sal do mesmo formado com um cátion), ácido hidroxâmico ($R^kC(=O)NHOH$ ou um sal formado com um cátion), hidrazida ($R^kCONHNH_2$), formaldeído sulfoxilato ($HOCH_2SO_2H$ ou um sal de $HOCH_2SO_2^-$ formado com um cátion, como $HOCH_2SO_2^-Na^+$), nucleotídeo glicado (como GDP-mannose), fludarabina ou uma mistura dos mesmos, em que R^i and $R^{i'}$ são cada um independentemente uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 10 átomos de carbono e são substituídos com pelo menos um substituinte selecionado de -$N(R^j)_2$, -CO_2H, -SO_3H, e -PO_3H; R^i e $R^{i'}$ pode ser ainda opcionalmente substituído com um substituinte para um alquil descrito aqui; R^j é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono; e R^k é uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, arila, heterociclila ou heteroaril (preferencialmente, R^k é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono; mais preferencialmente, R^k é metila, etila ou propil). Preferencialmente, o cátion é um cátion monovalente, como Na+

ou K^+. Preferencialmente, o reagente reativo imina é selecionado de sulfitos, hidroxil amina, ureia e hidrazina. Mais preferencialmente, o reagente reativo imina é $NaHSO_3$ ou $KHSO_3$.

[00148] Como usado aqui salvo se indicado de outra forma, os termos "**amida biohidrolizável**," "**éster biohidrolizável,**" "**carbamato biohidrolizável**," "**carbonato biohidrolizável**," "**ureída biohidrolizável**" e "**análogo de fosfato biohidrolizável**" significa uma amida, éster, carbamato, carbonato, ureida, ou análogo fosfato, respectivamente, que: 1) não destrói a atividade biológica do composto e confere àquele composto propriedades vantajosas in vivo, como absorção, duração da ação, ou início da ação; ou 2) é por si só biologicamente inativo mas é convertido in vivo a um composto biologicamente ativo. Exemplos de amidas biohidrolizáveis incluem, entre outros, alquil amidas inferiores, α-aminoácido amidas, alcoxiacil amidas, e alquilaminoalquilcarbonil amidas. Exemplos de ésteres biohidrolizáveis incluem, entre outros, ésteres de alquil inferior, ésteres de alcoxiacilóxi, ésteres de alquil acilamino, e ésteres de colina. Exemplos de carbamatos biohidrolizáveis incluem, entre outros, alquilaminas inferiores, etilenodiaminas substituídas, aminoácidos, hidroxialquilaminas, aminas heterocíclicas e heteroaromáticas, e aminas poliéter. Profármacos e sais de profármaco particularmente favorecidos são aqueles que aumentam a biodisponibilidade dos compostos desta invenção quando ditos compostos são administrados a um mamífero.

[00149] A frase "**sal farmaceuticamente aceitável**" como usado aqui, refere-se um sal orgânico ou inorgânico farmaceuticamente aceitável de um composto da invenção. Sais exemplares incluem, entre outros, sais de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloreto, brometo, iodeto, nitrato, bissulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato,

succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formato, benzoato, glutamato, metanossulfonato "mesilato," etanossulfonato, benzenossulfonato, p-toluenossulfonato, pamoato (ou seja, 1,1'-metileno-bis-(2-hidróxi-3-naftoato)) sais, sais de metais alcalinos por exemplo, sódio e potássio), sais de metais alcalinos terrosos (por exemplo, magnésio), e sais de amônio. Um sal farmaceuticamente aceitável pode envolver a inclusão de outra molécula como um íon acetato, um íon succinato ou outro contraíon. O contraíon pode ser uma porção orgânica ou inorgânica que estabiliza a carga no composto parente. Além disso, um sal farmaceuticamente aceitável pode ter mais do que um átomo carregado em sua estrutura. Casos onde vários átomos carregados são parte do sal farmaceuticamente aceitável podem ter vários contraíons. Assim, um sal farmaceuticamente aceitável pode ter um ou mais átomos carregados e/ou um ou mais contraíon.

[00150] Se o composto da invenção é uma base, o sal farmaceuticamente aceitável desejado pode ser preparado por qualquer método disponível apropriado na técnica, por exemplo, tratamento da base livre com um ácido inorgânico, como ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido metanossulfônico, ácido fosfórico e semelhantes, ou com um ácido orgânico, como ácido acético, ácido maleico, ácido succínico, ácido mandélico, ácido fumárico, ácido malônico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido glicólico, ácido salicílico, a ácido piranosidila, como ácido glicurônico ou ácido galacturônico, um ácido alfahidróxi, como ácido cítrico ou ácido tartárico, um aminoácido, como ácido aspártico ou ácido glutâmico, um ácido aromático, como ácido benzoico ou ácido cinâmico, um ácido sulfônico, como ácido p-toluenossulfônico ou ácido etanossulfônico, ou semelhantes.

[00151] Se o composto da invenção é um ácido, o sal farmaceuticamente aceitável desejado pode ser preparado por qualquer

método apropriado, por exemplo, tratamento do ácido livre com uma base orgânica ou inorgânica, como uma amina (primária, secundária ou terciária), um hidróxido de metal alcalino ou um hidróxido de metal alcalino terroso, ou semelhantes. Exemplos ilustrativos de sais apropriados incluem, entre outros, sais orgânicos derivados de aminoácidos, como glicina e arginina, amônia, aminas primária, secundária, e terciária, e aminas cíclicas, como piperidina, morfolina e piperazina, e sais inorgânicos derivados de sódio, cálcio, potássio, magnésio, manganês, ferro, cobre, zinco, alumínio e lítio.

[00152] Como usado aqui, o termo "**solvato**" significa um composto que ainda inclui uma quantidade estequiométrica ou não estequiométrica de solvente como água, isopropanol, acetona, etanol, metanol, DMSO, acetato de etila, ácido acético, e etanolamina diclorometano, 2-propanol, ou semelhantes, ligado por forças intermoleculares não covalentes. Solvatos ou hidratos dos compostos são prontamente preparados pela adição de pelo menos um equivalente molar de um solvente hidroxílico como metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol ou água ao composto para resultar em solvatação ou hidratação da porção imina.

[00153] Os termos "**crescimento celular anormal**" e "**distúrbio proliferativo**" são usados de modo intercambiável neste pedido. "**Crescimento celular anormal**," como usado aqui, salvo se indicado de outra forma, refere-se um crescimento celular que é independente de mecanismos regulatórios normais (por exemplo, perda de inibição de contato). Isto inclui, por exemplo, o crescimento anormal de: (1) células de tumor (tumores) que se proliferam por expressão de uma tirosina quinase mutada ou super expressão de um receptor de tirosina quinase; (2) células benignas e malignas de outros distúrbios proliferativos em que a ativação de tirosina quinase anormal ocorre; (3) qualquer tumor que se prolifera por ativação anormal de receptor de tirosina quinases;

(4) qualquer tumor que se prolifera por ativação anormal de serina/treonina quinase; e (5) células benignas e malignas de outras doenças proliferativas em que ativação anormal de serina/treonina quinase ocorre.

[00154] Os termos "**câncer**" e "**cancerígeno**" referem-se a ou descrevem a condição fisiológica em mamíferos que é tipicamente caracterizada por crescimento celular desregulado. Um "**tumor**" compreende uma ou mais células cancerígenas, e/ou células benignas ou pré-cancerígenas. Exemplos de câncer incluem, entre outros, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, e leucemia ou malignidades linfoides. Exemplos mais particulares de ditos cânceres incluem câncer de célula escamosa (por exemplo, câncer de célula escamosa epitelial), câncer pulmonar incluindo câncer pulmonar de célula pequena, câncer pulmonar de célula não pequena ("NSCLC"), adenocarcinoma pulmonar e carcinoma escamoso do pulmão, câncer do peritônio, câncer hepatocelular, câncer gástrico ou de estômago incluindo câncer gastrointestinal, câncer pancreático, glioblastoma, câncer cervical, câncer ovariano, câncer hepático, câncer de bexiga, hepatoma, câncer de mama, câncer de colo, câncer retal, câncer colorretal, carcinoma endometrial ou uterino, carcinoma de glândula salivar, câncer dos rins ou renal, câncer de próstata, câncer de vulva, câncer de tireoide, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pênis, leucemia aguda, câncer de cabeça/cérebro e pescoço, cânceres de órgãos linfáticos e malignidade hematológica incluindo leucemia (Leucemia linfoblástica aguda (ALL), Leucemia mieloide aguda (AML), Leucemia linfocítica crônica (CLL), Leucemia mieloide crônica (CML), Leucemia monocítica aguda (AMOL), Leucemia de célula pilosa (HCL), Leucemia prolinfocítica de célula T (T-PLL), Leucemia linfocítica granular grande, Leucemia de célula T adulta), Linfoma (linfoma linfocítico pequeno (SLL), Linfoma de Hodgkin (Esclerose nodular, Celularidade misturada,

Rica em linfócito, Linfócito depletado ou não depletado, e linfoma de Hodgkin predominante em linfócito nodular), Linfoma não Hodgkin (todos os subtipos), Leucemia linfocítica crônica /Linfoma linfocítico pequeno, Leucemia linfocítica de célula B, Linfoma linfoplasmacítico (como Macroglobulinemia de Waldenström), Linfoma de zona marginal esplênica, Neoplasmas de célula plasmática (Mieloma de célula plasmática, Plasmacitoma, Doenças de deposição de imunoglobulina monoclonal, Doenças da cadeia pesada), Linfoma de célula B de zona marginal extranodal (Linfoma MALT), Linfoma de célula B de zona marginal nodal (NMZL), Linfoma folicular, Linfoma de célula do manto, Linfoma de célula B grande difusa, Linfoma de célula B grande mediastinal (tímica), Linfoma de célula B grande intravascular, Linfoma de efusão primário, Linfoma/leucemia de Burkitt, Leucemia prolinfocítica de célula T, Leucemia linfocítica de célula T granular grande, Leucemia de célula NK agressiva, Leucemia/linfoma de célula T adulta, Linfoma de célula NK/T extranodal (tipo nasal), Linfoma de célula T tipo enteropatia, Linfoma de célula T hepatoesplênica, Linfoma de célula NK blástica, Micose fungoide/Síndrome de Sezary, Distúrbios linfoproliferativos de célula T positiva para CD30 cutâneo primário, Linfoma de célula grande anaplástica cutânea primária, Linfomatoide papulose, Linfoma de célula T angioimunoblástico, Linfoma de célula T periférica (não especificada), Linfoma de célula grande anaplástica), mieloma múltiplo (mieloma de célula plasmática ou Doença de Kahler).

[00155] Um "**agente terapêutico**" inclui ambos um agente biológico como um anticorpo, um peptídeo, uma proteína, uma enzima ou um agente quimioterápico.

[00156] Um "**agente quimioterápico**" é um composto químico útil no tratamento de câncer. Exemplos de agentes quimioterápicos incluem Erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), Bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), Fulvestrant (FASLODEX®,

AstraZeneca), Sutent (SU11248, Pfizer), Letrozole (FEMARA®, Novartis), Imatinib mesilato (GLEEVEC®, Novartis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), Oxaliplatina (Eloxatin®, Sanofi), 5-FU (5-fluoruracila), Leucovorina, Rapamicin (Sirolimus, RAPAMUNE®, Wyeth), Lapatinib (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), Lonafarnib (SCH 66336), Sorafenib (BAY43-9006, Bayer Labs), e Gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), agentes alquilantes como tiotepa e CYTOXAN® ciclosfosfamida; alquil sulfonatos como busulfan, improsulfan e piposulfan; aziridinas como benzodopa, carboquona, meturedopa, e uredopa; etileniminas e metilamelaminas incluindo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida e trimetilomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina e bulatacinona); uma camptotecina (incluindo o análogo sintético topotecano); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluindo seus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina e bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 e criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluindo os análogos sintéticos, KW-2189 e CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; uma sarcodictiina; espongistatina; mostardas de nitrogênio como clorambucila, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, óxido de mecloretamina cloridrato, melfalan, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracila; nitrosureias como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, e ranimnustina; antibióticos como os antibióticos enediina (por exemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gammall e caliqueamicina omegall (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186); dinemicina, incluindo dinemicina A; bisfosfonatos, como clodronato; uma esperamicina; bem como neocarzinostatina cromóforo e antibiótico enedina cromoproteína relacionada), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina,

carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinias, dactinomicina, daunorubicina, detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMYCIN® (doxorrubicina), morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina e deoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcellomicina, mitomicinas como mitomicina C, ácido micofenolico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabólitos como metotrexato e 5-fluoruracil (5-FU); análogos de ácido fólico como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamniprina, tioguanina; análogos de pirimidina como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; erogênos como calusterona, dromostanolone propionato, epitiostanol, mepitiostane, testolactona; anti-adrenais como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; repositor de ácido fólico como ácido frolinico; aceglatona; aldofosfamida glicosida; ácido aminolevulínico; eniluracila; amsacrine; bestrabucila; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elformitina; eliptinium acetato; uma epotilona; etoglucida; nitrato de gárlio; hidroxiureia; lentinan; lonidainina; maitansinoides como maitansine e ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazina; complexo polissacarídeo PSK® (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxano; rizoxina; sizofurano; espirogermânio; ácido tenuazônico; triaziquona; 2,2',2''-triclorotrietilamina; trichothecenes (especialmente T-2 toxina, verracurina A, roridina A e anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosideo ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por exemplo, TAXOL® (paclitaxel;

Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE® (Cremophor-free), formulações de paclitaxel em nanopartícula engenheirada em albumina (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Ill.), e TAXOTERE® (doxetaxel; Rhona-Poulenc Rorer, Antony, França); cloranmbucila; GEMZAR® (gemcitabina); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platina como cisplatina e carboplatina; vinblastina; etoposideo (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; NAVELBINE® (vinorelbina); novantrona; teniposideo; edatrexato; daunomicina; aminopterina; capecitabina (XELODA®); ibandronato; CPT-11; inibidores de topoisomerase RFS 2000; difluormetilornithine (DMFO); retinoides como ácido retinoico; e sais farmaceuticamente aceitáveis, ácidos e derivados de qualquer um dos acima.

[00157] Também incluídos na definição de "**agente quimioterápico**" estão: (i) agentes anti-hormonais atuam para regular ou inibir ação hormonal em tumores como anti-estrogênios e moduladores de receptor de estrogênio seletivo (SERMs), incluindo, por exemplo, tamoxifeno (incluindo NOLVADEX®; citrato de tamoxifeno), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, e FARESTON® (citrato de toremifina); (ii) inibidores de aromatase que inibem a enzima aromatase, que regulam a produção de estrogênio nas glândulas adrenais, como, por exemplo, 4(5)-imidazois, aminoglutetimida, MEGASE® (megestrol acetato), AROMASIN® (exemestano; Pfizer), formestania, fadrozol, RIVISOR® (vorozol), FEMARA® (letrozol; Novartis), e ARIMIDEX® (anastrozol; AstraZeneca); (iii) anti-androgênios como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, e goserelina; bem como troxacitabina (um análogo de citosina nucleosídeo 1,3-dioxolano); (iv) inibidores de proteína quinase; (v) inibidores de lipídeo quinase; (vi) oligonucleotídeos antissenso, particularmente aqueles que inibem a expressão de genes

nas vias de sinalização envolvidas em proliferação de célula anormal, como, por exemplo, PKC-alfa, Ralf e H-Ras; (vii) ribozimas como inibidores da expressão de VEGF (por exemplo, ANGIOZYME®) e inibidores de expressão de HER2; (viii) vacinas como vacinas de terapia gênica, por exemplo, ALLOVECTIN®, LEUVECTIN®, e VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; um inibidor de topoisomerase 1 como LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; (ix) agentes anti-angiogênicos como bevacizumabe (AVASTIN®, Genentech); e (x) sais farmaceuticamente aceitáveis, ácidos e derivados de qualquer um dos acima. Outros agentes anti-angiogênicos incluem inibidores de MMP-2 (metaloproteinase de matriz 2), inibidores de MMP-9 (metaloproteinase de matriz 9), inibidores de COX-II (ciclooxigenase II), e inibidores de receptor VEGF tirosina quinase. Exemplos de ditos inibidores de metaloproteinase de matriz úteis que podem ser usados na n combinação com os presentes compostos/composições são descritos em WO 96/33172, WO 96/27583, EP 818442, EP 1004578, WO 98/07697, WO 98/03516, WO 98/34918, WO 98/34915, WO 98/33768, WO 98/30566, EP 606,046, EP 931,788, WO 90/05719, WO 99/52910, WO 99/52889, WO 99/29667, WO 99/07675, EP 945864, patente US 5.863.949, patente US 5.861.510, e EP 780.386, todos dos quais são incorporados aqui em suas totalidades por referência. Exemplos de inibifores de VEGF receptor tirosina quinase incluem 4-(4-bromo-2-fluoranilino)-6-metóxi-7-(1-metilpiperidin-4-ilmetóxi)quinazolina (ZD6474; Exemplo 2 em WO 01/32651), 4-(4-fluor-2-metilindol-5-ilóxi)-6-metóxi-7-(3-pirrolidin-1-ilpropóxi)-quinazolina (AZD2171; Exemplo 240 em WO 00/47212), vatalanibe (PTK787; WO 98/35985) e SU11248 (sunitinib; WO 01/60814), e compostos como aqueles revelados nas publicações PCT WO 97/22596, WO 97/30035, WO 97/32856, e WO 98/13354).

[00158] Outros exemplos de agentes quimioterápicos que podem ser

usados em combinação com os presentes compostos incluem inibidores de PI3K (fosfoinositida-3 quinase), como aqueles reportados em Yaguchi *et al* (2006) Jour. of the Nat. Cancer Inst. 98(8):545-556; patente US 7.173.029; Patente US 7.037.915; Patente US 6.608.056; Patente US 6.608.053; Patente US 6.838.457; Patente US 6.770.641; Patente US 6.653.320; Patente US 6.403.588; WO 2006/046031; WO 2006/046035; WO 2006/046040; WO 2007/042806; WO 2007/042810; WO 2004/017950; US 2004/092561; WO 2004/007491; WO 2004/006916; WO 2003/037886; US 2003/149074; WO 2003/035618; WO 2003/034997; US 2003/158212; EP 1417976; US 2004/053946; JP 2001247477; JP 08175990; JP 08176070; Patente US 6.703.414; e WO 97/15658, todos dos quais são incorporados aqui em suas totalidades por referência. Exemplos específicos de ditos inibidores PI3K incluem SF-1126 (inibidor de PI3K, Semafore Pharmaceuticals), BEZ-235 (inibidor de PI3K, Novartis), XL-147 (inibidor de PI3K, Exelixis, Inc.).

[00159] Agentes quimioterápicos podem ainda incluir qualquer um dos fármacos genéricos ou biossimilares dos fármacos de marca referenciada aqui, ou melhoramentos das mesmas, incluindo formulações melhoradas, profármacos, meios de liberação (liberação sustentada, revestimento bioadesivo, liberação direcionada *etc.*), e formas de dosagem.

[00160] Um "**metabólito**" é um produto produzido pelo metabolismo no corpo de um composto específico, um derivado do mesmo, ou um conjugado do mesmo, ou sal do mesmo. Metabólitos de um composto, um derivado do mesmo, ou um conjugado do mesmo, podem ser identificados usando técnicas de rotina conhecidas na técnica e suas atividades determinadas usando testes como aqueles descritos aqui. Ditos produtos podem resultar, por exemplo, da oxidação, hidroxilação, redução, hidrólise, amidação, desamidação, esterificação, desesterificação, clivagem enzimática, e semelhantes, do composto

administrado. Assim, a invenção inclui metabólitos de compostos, um derivado do mesmo, ou um conjugado do mesmo, da invenção, incluindo compostos, um derivado do mesmo, ou um conjugado do mesmo, produzido por um processo compreendendo contatar um composto, um derivado do mesmo, ou um conjugado do mesmo, desta invenção com um mamífero por um período de tempo suficiente para gerar um produto metabólico do mesmo.

[00161] A frase "**farmaceuticamente aceitável**" indica que a substância ou composição devem ser compatíveis quimicamente e/ou toxicologicamente, com os outros ingredientes compreendendo uma formulação, e/ou o mamífero sendo tratado com este.

[00162] O termo "**grupo protetor**" ou "**porção protetora**" refere-se a um substituinte que é comumente empregado para bloquear ou proteger uma funcionalidade particular enquanto reagindo com outros grupos funcionais no composto, um derivado do mesmo, ou um conjugado do mesmo. Por exemplo, um "**grupo protetor de amina**" ou uma "**porção protetora de amino**" é um substituinte ligado a um grupo amino que bloqueia ou protege a funcionalidade amino no composto. Ditos grupos são bem conhecidos na técnica (ver, por exemplo, P. Wuts and T. Greene, 2007, Protective Groups in Organic Synthesis, capítulo 7, J. Wiley & Sons, NJ) e exemplificado por carbamatos como metila e etil carbamato, FMOC, carbamatos de etila substituída, carbamatos clivados por 1,6-β-eliminação (também chamado de "**auto imolativo**"), ureias, amidas, peptídeos, alquila e arila derivados. Grupos protetores amino apropriados incluem acetila, trifluoracetila, t-butoxicarbonila (BOC), benziloxicarbonila (CBZ) e 9-fluorenilmetilenoxicarbonila (Fmoc). Para uma descrição geral de grupos protetores e seus usos, ver P. G.M. Wuts & T. W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, New York, 2007.

[00163] O termo "**grupo de saída**" refere-se a um grupo de porção

carregada ou não carregada que se afastar durante uma substituição ou deslocamento. Ditos grupos de saída são bem conhecidos na técnica e incluem, entre outros, halogênios, ésteres, alcóxi, hidroxila, tosilatos, triflatos, mesilatos, nitrilas, azida, carbamato, dissulfetos, tioésteres, tioéteres e compostos diazônio.

[00164] O termo "**agente de reticulação bifuncional**," "**ligante bifuncional**" ou "**agentes de reticulação**" refere-se aos agentes de modificação que possuem dois grupos reativos; um dos quais é capaz de reagir com um agente de ligação à célula enquanto o outro reage com o composto citotóxico para ligar as duas frações. Ditos reticulantes bifuncionais são bem conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Isalm and Dent em *Bioconjugation* capítulo 5, p218-363, Groves Dictionaries Inc. New York, 1999). Por exemplo, agentes de reticulação bifuncionais que permitem ligação através de uma ligação tioéter incluem *N*-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclo-hexano-1-carboxilato (SMCC) para introduzir grupos maleimido, ou com *N*-succinimidil-4-(iodoacetil)-aminobenzoato (SIAB) para introduzir grupos iodoacetila. Outros agentes de reticulação bifuncionais que introduzem grupos maleimido ou grupos haloacetila em um agente de ligação à célula são bem conhecidos na técnica (ver pedido de patente US 2008/0050310, 20050169933, disponível de Pierce Biotechnology Inc., P.O. Box 117, Rockland, IL 61105, USA) e incluem, entre outros, bis-maleimidopolietilenoglicol (BMPEO), $BM(PEO)_2$, $BM(PEO)_3$, éster N-(β-maleimidopropilóxi)succinimida (BMPS), éster N-succinimidil de ácido γ-maleimidobutírico (GMBS), éster N-hidroxissuccinimida de ácido ε-maleimidocaproico (EMCS), ácido 5-maleimidovalerico NHS, HBVS, N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclo-hexano-1-carbóxi-(6-amidocaproato), que é um análogo de "cadeia longa" de SMCC (LC-SMCC), éster m-maleimidobenzoil-N-hidroxissuccinimida (MBS), ácido 4-(4-N-maleimidofenil)-butírico hidrazida ou sal HCl (MPBH), N-

succinimidil 3-(bromoacetamido)propionato (SBAP), N-succinimidil iodoacetato (SIA), éster N-succinimidil de ácido κ-maleimidoundecanoico (KMUA), N-succinimidil 4-(p-maleimidofenil)-butirato (SMPB), succinimidil-6-(β-maleimidopropionamido)hexanoato (SMPH), succinimidil-(4-vinilsulfonil)benzoato (SVSB), ditiobis-maleimidoetano (DTME), 1,4-bis-maleimidobutano (BMB), 1,4 bismaleimidil-2,3-di-hidroxibutano (BMDB), bis-maleimidohexano (BMH), bis-maleimidoetano (BMOE), sulfossuccinimidil 4-(N-maleimido-metil)ciclo-hexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC), sulfossuccinimidil(4-iodo-acetil)aminobenzoato (sulfo-SIAB), éster m-maleimidobenzoil-N-hidroxissusulfossuccinimida (sulfo-MBS), éster N-(γ-maleimidobutirilóxi)sulfossuccinimida (sulfo-GMBS), éster N-(ε-maleimidocaproilóxi)sulfossuccimido (sulfo-EMCS), éster N-(κ-maleimidoundecanoilóxi)sulfossuccinimida (sulfo-KMUS), e sulfossuccinimidil 4-(p-maleimidofenil)butirato (sulfo-SMPB).

[00165] Agentes de reticulação heterobifuncionais são agentes de reticulação bifuncionais contendo dois grupos reativos diferentes. Agentes de reticulação heterobifuncionais contendo ambos um grupo amina-reativo *N*-hidroxissuccinimida (grupo NHS) e um grupo carbonil-reactive hidrazina podem ainda ser usados para ligar os compostos citotóxicos descritos aqui com um agente de ligação à célula (por exemplo, anticorpo). Exemplos de ditos agentes de reticulação heterobifuncionais comercialmente disponíveis incluem succinimidil 6-hidrazinonicotinamida acetona hidrazona (SANH), succinimidil 4-hidrazidotereftalato cloridrato (SHTH) e succinimidil hidrazinium nicotinato cloridrato (SHNH). Conjugados contendo uma ligação lábil a ácido podem ainda ser preparados usando um derivado de benzodiazepina contendo hidrazina da presente invenção. Exemplos de agentes de reticulação bifuncionais que podem ser usados incluem succinimidil-p-formil benzoato (SFB) e succinimidil-p-

formilfenoxiacetato (SFPA).

[00166] Agentes de reticulação bifuncionais que permitem a ligação de agente de ligação à célula com compostos citotóxicos através de ligações dissulfeto são conhecidos na técnica e incluem *N*-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP), *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB), *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)2-sulfobutanoato (sulfo-SPDB) para introduzir grupos ditiopiridila. Outros agentes de reticulação bifuncionais que podem ser usados para introduzir grupos dissulfeto são conhecidos na técnica e são revelados nas patentes U.S. 6.913.748, 6.716.821 e publicações de Patente US 20090274713 e 20100129314, todos dos quais são incorporados aqui por referência. Alternativamente, agentes de reticulação como 2-iminotiolano, homocisteina tiolactona ou S-acetilsuccínico anidreto que introduzem grupos tiol podem ainda ser usados.

[00167] Um "**ligante**," "**porção ligante**," ou "**grupo ligante**" como definido aqui se refere a uma porção que conecta dois grupos, como um agente de ligação à célula e um composto citotóxico, juntos. Tipicamente, o ligante é substancialmente inerte em condições para as quais os dois grupos este está se conectando são ligados. Um agente de ligação cruzada bifuncional pode compreender dois grupos reativos, um em cada extremidade de uma porção ligante, de modo que um grupo reativo pode ser primeiro reagido com o composto citotóxico para fornecer um composto contendo a porção ligante e um segundo grupo reativo, que pode então reagir com um agente de ligação à célula. Alternativamente, uma extremidade do agente de ligação cruzada bifuncional pode ser primeiro reagida com o agente de ligação à célula para fornecer um agente de ligação à célula contendo uma porção ligante e um segundo grupo reativo, que pode então reagir com um composto citotóxico. A porção ligante pode conter uma ligação química

que permite a liberação da porção citotóxica em um local particular. Ditas ligações químicas são bem conhecidos na técnica e incluem ligações dissulfeto, ligações tioéter, ligações lábeis a ácido, ligações fotolábeis, ligações lábeis a peptidase e ligações lábeis a esterase (ver, por exemplo, Patentes US 5.208.020; 5.475.092; 6.441.163; 6.716.821; 6.913.748; 7.276.497; 7.276.499; 7.368.565; 7.388.026 e 7.414.073). São preferenciais as ligações dissulfeto, ligações lábeis a tioéter e peptidase. Outros ligantes que podem ser usados na presente invenção incluem ligantes não cliváveis, como aqueles descritos em detalhes na publicação número U.S. 20050169933, ou ligantes carregados ou ligantes hidrofílicos são descritos em US 2009/0274713, US 2010/01293140 e WO 2009/134976, cada um dos quais é expressamente incorporado aqui por referência, cada um dos quais é expressamente incorporado aqui por referência.

[00168] Em uma modalidade, o grupo de ligação com um grupo reativo ligado em uma extremidade, como um éster reativo, é selecionado de um dos seguintes:

- $O(CR_{20}R_{21})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-O(CR_{20}R_{21})_m(CR_{26}=CR_{27})_{m'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-O(CR_{20}R_{21})_m(alquinil)_{n'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-O(CR_{20}R_{21})_m(piperazino)_{t'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-O(CR_{20}R_{21})_m(pirrolo)_{t'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-O(CR_{20}R_{21})_mA''_{m''}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-S(CR_{20}R_{21})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-S(CR_{20}R_{21})_m(CR_{26}=CR_{27})_{m'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-S(CR_{20}R_{21})_m(alquinil)_{n'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})$

$_{q}(CO)_{t}X''$,

$-S(CR_{20}R_{21})_{m}(piperazino)_{t'}(CR_{22}R_{23})_{n}(OCH_{2}CH_{2})_{p}(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_{q}(CO)_{t}X''$,

$-S(CR_{20}R_{21})_{m}(pirrolo)_{t'}(CR_{22}R_{23})_{n}(OCH_{2}CH_{2})_{p}(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_{q}(CO)_{t}X''$,

$-S(CR_{20}R_{21})_{m}A''_{m''}(CR_{22}R_{23})_{n}(OCH_{2}CH_{2})_{p}(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_{q}(CO)_{t}X''$,

$-NR_{33}(C=O)_{p''}(CR_{20}R_{21})_{m}(CR_{22}R_{23})_{n}(OCH_{2}CH_{2})_{p}(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_{q}(CO)_{t}X''$,

$-NR_{33}(C=O)_{p''}(CR_{20}R_{21})_{m}(CR_{26}=CR_{27})_{m'}(CR_{22}R_{23})_{n}(OCH_{2}CH_{2})_{p}(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''$

$(CR_{24}R_{25})_{q}$

$(CO)_{t}X''$,

$-NR_{33}(C=O)_{p''}(CR_{20}R_{21})_{m}(alquinil)_{n'}(CR_{22}R_{23})_{n}(OCH_{2}CH_{2})_{p}(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_{q}-(CO)_{t}X''$,

$-NR_{33}(C=O)_{p''}(CR_{20}R_{21})_{m}(piperazino)_{t'}(CR_{22}R_{23})_{n}(OCH_{2}CH_{2})_{p}(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_{q}$

$(CO)_{t}X''$,

$-NR_{33}(C=O)_{p''}(CR_{20}R_{21})_{m}(pirrolo)_{t'}(CR_{22}R_{23})_{n}(OCH_{2}CH_{2})_{p}(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_{q}-(CO)_{t}X''$,

$-NR_{33}(C=O)_{p''}(CR_{20}R_{21})_{m}A''_{m''}(CR_{22}R_{23})_{n}(OCH_{2}CH_{2})_{p}(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_{q}$

$(CO)_{t}X''$,

$-(CR_{20}R_{21})_{m}(CR_{22}R_{23})_{n}(OCH_{2}CH_{2})_{p}(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_{q}(CO)_{t}X''$,

$-(CR_{20}R_{21})_{m}(CR_{26}=CR_{27})_{m'}(CR_{22}R_{23})_{n}(OCH_{2}CH_{2})_{p}(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_{q}(CO)_{t}X''$,

-

$(CR_{20}R_{21})_{m}(alquinil)_{n'}(CR_{22}R_{23})_{n}(OCH_{2}CH_{2})_{p}(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_{q}(CO)_{t}X''$,

$-(CR_{20}R_{21})_{m}(piperazino)_{t'}(CR_{22}R_{23})_{n}(OCH_{2}CH_{2})_{p}(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_{q}(CO)_{t}X''$,

$-(CR_{20}R_{21})_{m}A''_{m''}(CR_{22}R_{23})_{n}(OCH_{2}CH_{2})_{p}(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_{q}(CO)_{t}X''$,

$-(CR_{20}R_{21})_{m}(CR_{29}=N-NR_{30})_{n''}(CR_{22}R_{23})_{n}(OCH_{2}CH_{2})_{p}(CR_{40}R_{41})_{p''}$

$Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-(CR_{20}R_{21})_m(CR_{29}=N-NR_{30})_{n''}(CR_{26}=CR_{27})_{m'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''$

$(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-(CR_{20}R_{21})_m(CR_{29}=N-NR_{30})_{n''}(\text{alquinil})_{n'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''$

$(CR_{24}R_{25})_q$-$(CO)_tX''$,

$-(CR_{20}R_{21})_m(CR_{29}=N-NR_{30})_{n''}A''_{m''}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q$

$(CO)_tX''$,

[00169] em que:

[00170] m, n, p, q, m', n', t' são inteiros de 1 a 10, ou são opcionalmente 0;

[00171] t, m", n", e p" são 0 ou 1;

[00172] X" é selecionado de $OR_{36,}$ $SR_{37,}$ $NR_{38}R_{39,}$ em que $R_{36,}$ $R_{37,}$ $R_{38,}$ R_{39} são H, ou alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo de 1 a 20 átomos de carbono e, ou, uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n$, R_{37}, opcionalmente, é um grupo protetor tiol quando t = 1, COX" forma um éster reativo selecionado de ésteres N-hidroxissuccinimida, ésteres N-hidroxiftalimida, ésteres N-hidróxi sulfo-succinimida, ésteres para-nitrofenila, ésteres dinitrofenila, ésteres pentafluorfenila e seus derivados, em que ditos derivados facilitate formação de ligação amida;

[00173] Y" é ausente ou é selecionado de O, S, S-S ou $NR_{32,}$ em que R_{32} tem a mesma definição conferida acima para R; ou

[00174] quando Y" não é S-S e t = 0, X" é selecionado de um grupo maleimido, um grupo haloacetila ou $SR_{37,}$ em que R_{37} tem a mesma definição como acima;

[00175] A" é um aminoácido selecionado de glicina, alanina, leucina, valina, lisina, citrulina e glutamato ou um polipeptídeo contendo entre 2 a 20 unidades de aminoácidos;

[00176] R_{20}, R_{21}, R_{22}, R_{23}, R_{24}, R_{25}, R_{26}, e R_{27} são os mesmos ou diferentes, e são -H ou uma alquila linear ou ramificada contendo de 1 a 5 átomos de carbono;

[00177] R_{29} e R_{30} são os mesmos ou diferentes, e são -H ou alquil de 1 a 5 átomos de carbono;

[00178] R_{33} é -H ou alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo de 1 a 12 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol R-$(OCH_2CH_2)_n$-, ou R_{33} é -COR_{34}, -CSR_{34}, -SOR_{34}, ou -SO_2R_{34}, em que R_{34} é H ou alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo de 1 a 20 átomos de carbono ou, uma unidade de polietilenoglicol -$(OCH_2CH_2)_n$; e

[00179] um de R_{40} e R_{41} é opcionalmente um grupo funcional carregado negativamente ou positivamente e o outro é H ou alquila, alquenila, alquinila contendo 1 a 4 átomos de carbono.

[00180] Qualquer um dos grupos ligantes acima pode estar presente em qualquer um dos compostos, compostos fármaco-ligante, ou conjugados da invenção, incluindo substituindo o grupo de ligações de qualquer uma das fórmulas descritas aqui.

[00181] O termo "**aminoácido**" refere-se aminoácidos de ocorrência natural ou aminoácido de ocorrência não natural representado por NH_2-$C(R^{aa'}R^{aa})$-C(=O)OH, em que R^{aa} e $R^{aa'}$ são cada um independentemente H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo 1 a 10 átomos de carbono, arila, heteroarila ou heterociclila. O termo "aminoácido" ainda refere-se ao resíduo correspondente quando um átomo de hidrogênio é removido de extremidade de amina e/ou carbóxi do aminoácido, como -NH-$C(R^{aa'}R^{aa})$-C(=O)O-.

[00182] O termo "**cátion**" refere-se um íon com carga positiva. O cátion pode ser monovalente (por exemplo, Na^+, K^+, etc.), bi-valente (por exemplo, Ca^{2+}, Mg^{2+}, etc.) ou multi-valente (por exemplo, Al^{3+} etc.).

Preferencialmente, o cátion é monovalente.

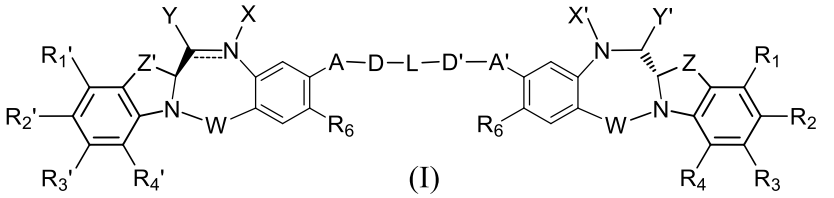
[00183] O termo "**quantidade terapeuticamente eficaz**" significa a quantidade de composto ativo ou conjugado que induz a resposta biológica em um sujeito. Dita resposta inclui alício de sintomas da doença ou distúrbio sendo tratado, prevenção, inibição ou um atraso na recorrência de sintoma da doença ou da própria doença, um aumento na longevidade do sujeito comparado com a ausência do tratamento, ou prevenção, inibição ou atraso na progressão do sintoma da doença ou da própria doença. Determinação da quantidade efetiza está dentro da capacidade daquelas especialistas na técnica, especialmente à luz da revelação detalhada fornecida aqui. A toxicidade e eficácia terapêutica do composto I podem ser determinadas por procedimentos farmacêuticos padrões em culturas de células e em animais experimentais A quantidade efetiva de composto ou conjugado da presente invenção ou outro agente terapêutico a ser administrados a um sujeito irá depender do estágio, categoria e estado do mieloma múltiplo e características do sujeito, como saúde geral, idade, sexo, peso corporal e tolerância à fármaco. A quantidade efetiva de composto da presente invenção ou outro agente terapêutico a serem administrados irão ainda depender da via de administração e forma de dosagem. A quantidade de dosagem e intervalo pode ser ajustada individualmente para fornecer níveis plasmáticos do composto ativo que são suficientes para manter os efeitos terapêuticos desejados.

COMPOSTOS CITOTÓXICOS

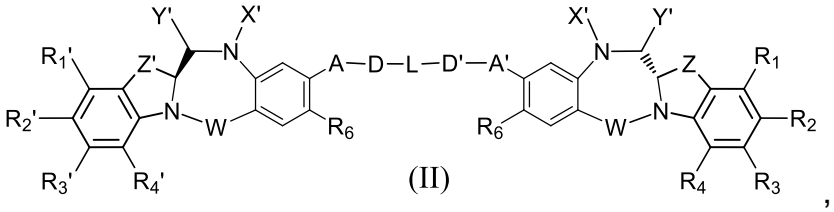
[00184] A presente invenção é direcionada para compostos citotóxicos descritos aqui (por exemplo, compostos de fórmulas (I), (II), (III), e (IV)). Em uma modalidade, os compostos citotóxicos da presente invenção não incluem quaisquer compostos descritos em US 2010/0203007 (o ensinamento completo do qual é incorporado aqui por referência), como aqueles especificamente revelados na provisão

abaixo.

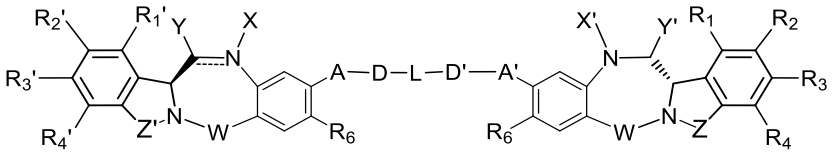
[00185] Em uma primeira modalidade específica, a invenção fornece um composto citotóxico compreendendo um grupo ligante com um grupo reativo ligado a este capaz de covalentemente ligar o composto citotóxico a um agente de ligação à célula (CBA), em que dito composto citotóxico é representado por qualquer uma das seguintes fórmulas (I), (II), (III) ou (IV):



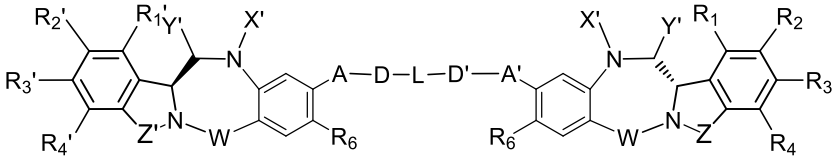
(I) ,



(II) ,



(III) ,



(IV) ,

[00186] ou um sal farmaceuticamente aceitável das mesmas, em que:

[00187] a linha dupla ═ entre N e C representa uma ligação simples ou uma ligação dupla, desde que quando este é uma ligação dupla, X é ausente e Y é -H, ou uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono, e quanto este é uma ligação simples, X é -H, o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este, ou uma porção protetora de amina; preferencialmente, a linha dupla ═ entre N e C

representa uma ligação dupla;

[00188] Y é -H ou um grupo de saída selecionado de -OR, -OCOR', -OCOOR', -OCONR'R'', -NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', um heterociclo opcionalmente substituído de 5 ou 6 membros contendo nitrogênio (por exemplo, piperidina, tetra-hidropirrol, pirazol, morfolina, *etc*.), um guanidínio representado por -NR'(C=NH)NR'R'', um aminoácido, ou um peptídeo representado por -NRCOP', em que P' é um aminoácido ou um polipeptídeo contendo entre 2 a 20 unidades de aminoácidos, -SR, -SOR', $-SO_2M$, $-SO_3M$, $-OSO_3M$, halogênio, ciano e um azido, em que M é -H ou um cátion; como Na^+ ou K^+. Preferencialmente, M é -H ou Na^+. Preferencialmente, Y é selecionado de $-SO_3M$, -OH, -OMe, -OEt ou -NHOH. Mais preferencialmente, Y é $-SO_3M$ ou -OH; ou,

[00189] Y é um sulfito (HSO_3, HSO_2 ou um sal de HSO_3^-, SO_3^{2-} ou HSO_2^- formado com um cátion), metabissulfito ($H_2S_2O_5$ ou um sal de $S_2O_5^{2-}$ formado com um cátion), mono-, di-, tri-, e tetra- tiofosfato (PO_3SH_3, $PO_2S_2H_2$, POS_3H_2, PS_4H_2 ou um sal de PO_3S^{3-}, $PO_2S_2^{3-}$, POS_3^{3-} ou PS_4^{3-} formado com um cátion), éster tio fosfato $(R^iO)_2PS(OR^i)$, R^iS-, R^iSO, R^iSO_2, R^iSO_3, tiossulfato (HS_2O_3 ou um sal de $S_2O_3^{2-}$ formado com um cátion), ditionito (HS_2O_4 ou um sal de $S_2O_4^{2-}$ formado com um cátion), fosforoditioato ($P(=S)(OR^{k'})(S)(OH)$ ou um sal do mesmo formado com um cátion), ácido hidroxâmico ($R^{k'}C(=O)NOH$ ou um sal formado com um cátion), formaldeído sulfoxilato ($HOCH_2SO_2^-$ ou um sal de $HOCH_2SO_2^-$ formado com um cátion, como $HOCH_2SO_2^-$ Na^+) ou uma mistura dos mesmos, em que R^i é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 10 átomos de carbono e é substituído com pelo menos um substituinte selecionado de $-N(R^j)_2$, $-CO_2H$, $-SO_3H$, e $-PO_3H$; R^i pode ser ainda opcionalmente substituído com um substituinte para um alquil descrito aqui; R^j é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono; $R^{k'}$ é uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, arila,

heterociclila ou heteroarila; preferencialmente, Y é um aduto de um bissulfito, um hidrossulfito, ou um metabissulfito, ou sais dos mesmos (como sal sódio);

[00190] R, para cada ocorrência, é independentemente selecionada do grupo que consiste em -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, uma arila opcionalmente substituída contendo 6 a 18 átomos de carbono, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, ou um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[00191] R' e R" são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de -H, -OH, -OR, -NHR, $-NR_2$, -COR, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[00192] R^c é -H ou uma alquila linear ou ramificada substituída ou não substituída contendo 1 a 4 átomos de carbono, ou o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este;

[00193] n é um inteiro de 1 a 24;

[00194] W é selecionado de C=O, C=S, CH_2, BH, SO, e SO_2;

[00195] X' é selecionado do grupo que consiste em -H, -OH, um grupo de proteção amina, o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, uma arila opcionalmente

substituída contendo 6 a 18 átomos de carbono (por exemplo, fenila), um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P. Preferencialmente, X' é -H, -OH, -Me ou o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este. Mais preferencialmente, X' é -H;

[00196] Y' é selecionado do grupo que consiste em -H, um grupo oxo, o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma arila opcionalmente substituída de 6 a 18 membros, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos. Preferencialmente, Y' é selecionado de -H ou oxo. Mais preferencialmente, Y' é -H;

[00197] R_1, R_2, R_3, R_4, R_1'. R_2'. R_3' e R_4' são cada um independentemente selecionados do grupo que consiste em -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, halogênio, guanidínio [$-NH(C=NH)NH_2$], -OR, -NR'R'', $-NO_2$, -NCO, -NR'COR'', -SR, um sulfóxido representado por -SOR', uma sulfona representada por $-SO_2R'$, um sulfonato $-SO_3^-M^+$, um sulfato $-OSO_3^-M^+$, uma sulfonamida representada por $-SO_2NR'R''$, ciano, um azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R'' e o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este. Preferencialmente, um de R_2, R_3, R_2' e R_3' é o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este e os demais são -H;

[00198] R_6 é -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO_2, halogênio, o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este, -OR^c ou -SR^c, em que R^c é -H, uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono. Preferencialmente, R_6 é -OMe ou -SMe. Ainda mais preferencialmente, R_6 é -OMe;

[00199] Z e Z' são independentemente selecionados de -$(CH_2)_{n'}$-, -$(CH_2)_{n'}$-CR_7R_8-$(CH_2)_{na'}$-, -$(CH_2)_{n'}$-NR_9-$(CH_2)_{na'}$-, -$(CH_2)_{n'}$-O-$(CH_2)_{na'}$- e -$(CH_2)_{n'}$–S-$(CH_2)_{na'}$-;

[00200] n' e na' são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de 0, 1, 2 e 3;

[00201] R_7 e R_8 são os mesmos ou diferentes, e são cada um independentemente selecionados de -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', uma unidade de polietilenoglicol -$(OCH_2CH_2)_n$-, um aminoácido, uma unidade de peptídeo contendo 2 a 6 aminoácidos, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono;

[00202] R_9 é independentemente selecionado de -H, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol -$(OCH_2CH_2)_n$-;

[00203] A e A' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de -O-, oxo (-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -N(R_5)- e -CRR'N(R_5)-. Preferencialmente, A e A' são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de -O- e -S-. Mais preferencialmente, A e A' são -O-;

[00204] R_5 para cada ocorrência é independentemente -H ou uma alquila linear ou ramificada opcionalmente substituída contendo 1 a 10 átomos de carbono;

[00205] D e D' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente ausentes ou selecionados do grupo que consiste em um aminoácido, um peptídeo contendo 2 a 6 aminoácidos, e uma

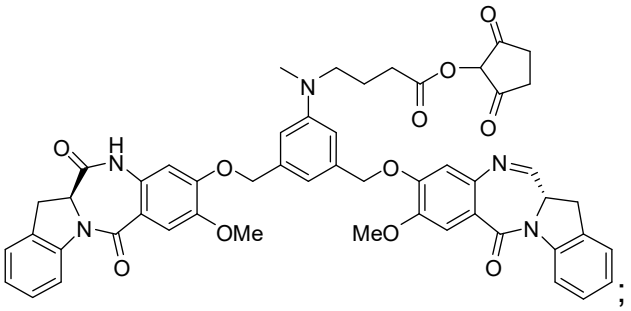
unidade de polietilenoglicol (-$OCH_2CH_2)_n$-, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo 1 a 10 átomos de carbono, em que o alquila, alquenila e alquinil são opcionalmente substituídos com uma ou mais (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6 ou mais) substituintes independentemente selecionados do grupo que consiste em halogênio, -OR, -NR'COR'', -SR e -COR';

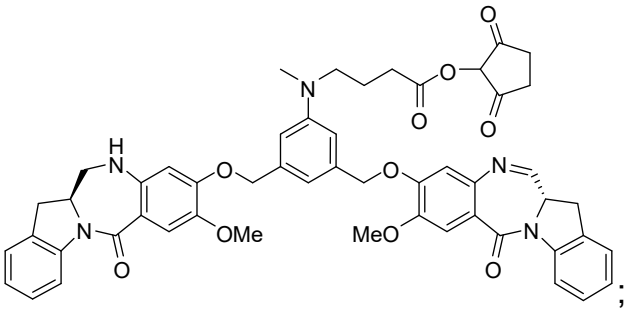
[00206] Preferencialmente, D e D' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo de 1 a 10 átomos de carbono. Mais preferencialmente, D e D' são alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono. Ainda mais preferencialmente, D e D' são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de uma alquila linear contendo 1 a 4 átomos de carbono;

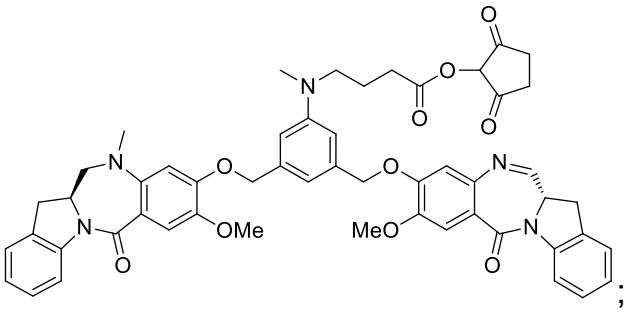
[00207] L é ausente, o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este, uma unidade de polietilenoglicol (-$OCH_2CH_2)_n$-, uma alquila ou alquenila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono (por exemplo, 1-6 átomos de carbono), um grupo fenila, um anel heterocíclico de 3 a 18 membros ou um anel heteroaril de 5 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P, em que a alquila ou alquenila é opcionalmente substituída com o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este; fenila ou anel heterocíclico ou heteroarila pode ser opcionalmente substituída, em que o substituinte pode ser o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este.

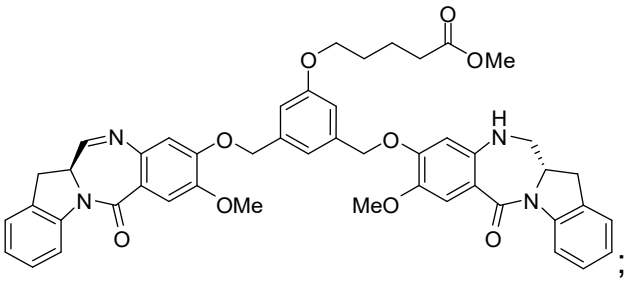
[00208] Em determinadas modalidades, X não é o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este. Em determinadas modalidades, a linha dupla ⎓ entre N e C representa uma ligação simples, Y não é -H.

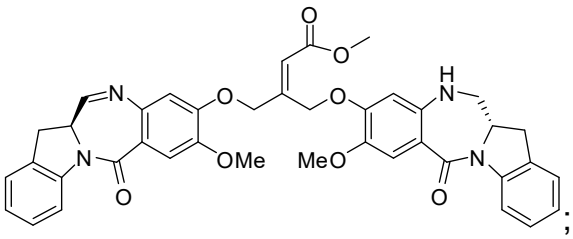
[00209] Em determinadas modalidades, os compostos citotóxicos da presente invenção não são qualquer um dos seguintes compostos:

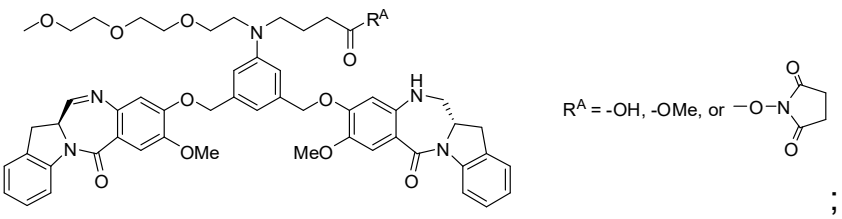

;

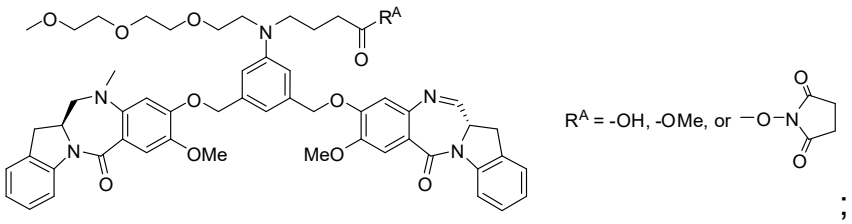

;


;

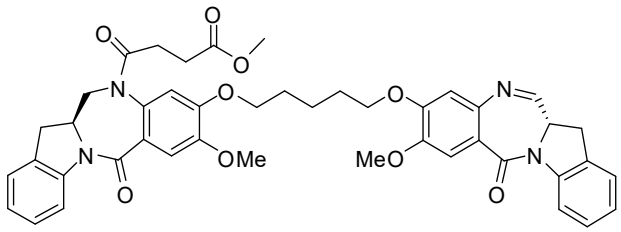

;

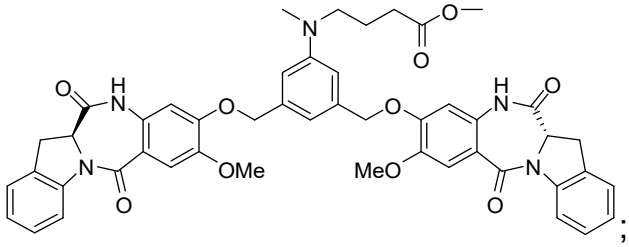

;


R^A = -OH, -OMe, or
;

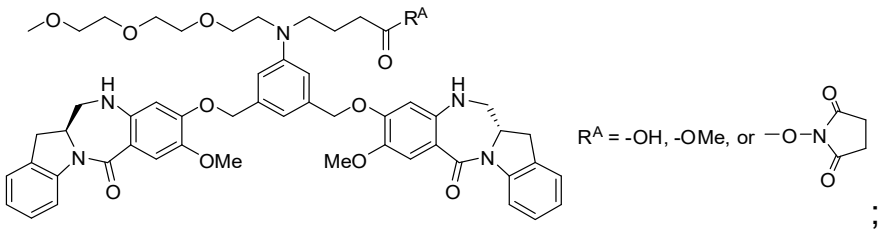


;

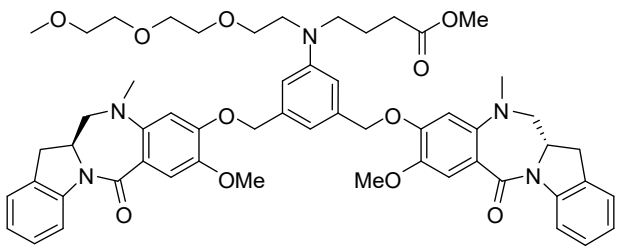




;



;



.

[00210] Em determinadas modalidades, Y é -H ou um grupo de saída selecionado de -OR, -OCOR', -OCOOR', -OCONR'R'', -NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', um heterociclo opcionalmente substituído de 5 ou 6 membros contendo nitrogênio (por exemplo, piperidina, tetra-hidropirrol, pirazol, morfolina, *etc*.), um guanidínio representado por -NR'(C=NH)NR'R'', um aminoácido, ou um peptídeo representado por -NRCOP', em que P' é um aminoácido ou um polipeptídeo contendo entre 2 a 20 unidades de aminoácidos, -SR, -SOR', $-SO_2M$, $-SO_3M$, $-OSO_3M$, halogênio, ciano e um azido. Preferencialmente, Y é aduto de

bissulfito de sódio, aduto de Hidrossulfito de Sódio, ou aduto de Metabissulfito de Sódio. Em determinadas modalidades, Y não é -H.

[00211] Em determinadas modalidades, L é ausente, ou é selecionado de um grupo fenila opcionalmente substituída e um grupo piridila opcionalmente substituída, em que o grupo fenila e o piridil contêm o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este, ou L é um grupo amina contendo o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este (ou seja, -N(grupo ligante)-), ou L é uma alquila ou alquenila linear, ramificada ou cíclica contendo de 1 a 6 átomos de carbono e contendo o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este.

[00212] Em uma segunda modalidade específica, para dímeros citotóxicos (I), (II), (III) e (IV), as variáveis são como descrito abaixo:

[00213] a linha dupla ⎓ entre N e C representa uma ligação dupla;

[00214] Y é -H;

[00215] W é C=O;

[00216] R_1, R_2, R_1', R_2', R_4 e R_4' são -H;

[00217] um de R_3, ou R_3' é opcionalmente um grupo ligante e o outro é -H;

[00218] R_6 é -OMe;

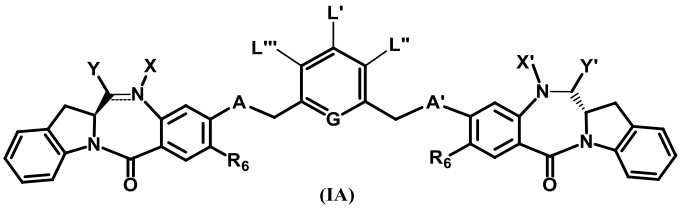
[00219] Z e Z' são -CH_2-;

[00220] X' é -H;

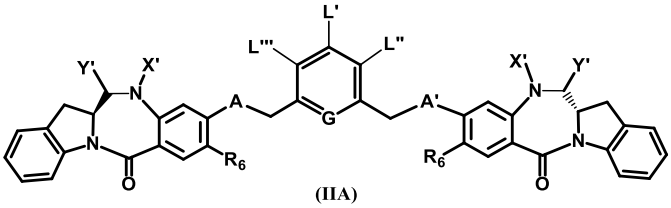
[00221] Y' é -H;

[00222] A e A' são -O-; e as demais das variáveis são como descrito na primeira modalidade específica.

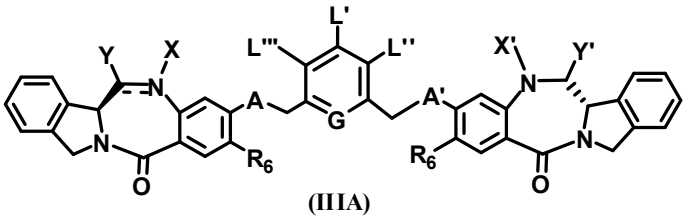
[00223] Em uma terceira modalidade específica, os dímeros citotóxicos de fórmula (I), (II), (III) e (IV) são representado pela seguinte fórmulas:



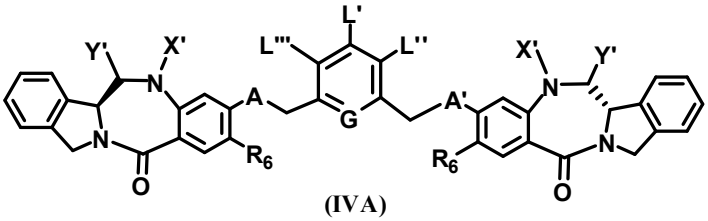
(IA) ;



(IIA) ;



(IIIA)



(IVA) ,

[00224] em que:

[00225] a linha dupla ⎓ entre N e C representa uma ligação simples ou uma ligação dupla, desde que quando este é uma ligação dupla X é ausente e Y é -H, e quanto este é uma ligação simples, X é selecionado de -H, o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este, ou um grupo protetor de amina (preferencialmente X é -H);

[00226] Y é selecionado de -H, -OR, -OCOR', -SR, -NR'R", $-SO_3M$, $-SO_2M$, ou $-OSO_3M$, em que M é -H ou um cátion como Na^+. K^+. Preferencialmente, Y é selecionado de -OH, -OMe, -OEt, -NHOH ou $-SO_3M$. Ainda mais preferencialmente, Y é -OH ou $-SO_3M$, preferencialmente M é -H ou Na^+;

[00227] R é -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono ou um grupo PEG $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, em que n é um inteiro de 1

a 24 e R^c é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono;

[00228] R' e R" são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de -H, -OH, -OR, -NRR$^{g'}$, -COR, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma arila opcionalmente substituída contendo de 6 a 18 átomos de carbono**,** um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos selecionado de O, S, N e P, um grupo PEG -$(CH_2CH_2O)_n$-R^c, em que n é um inteiro de 1 a 24, preferencialmente n é 2, 4 ou 8; e $R^{g'}$ é -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono ou um grupo PEG -$(CH_2CH_2O)_n$-R^c;

[00229] X' é selecionado do grupo que consiste em -H, -OH, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica substituída ou não substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, fenila, e um grupo de proteção amina. Preferencialmente, X' é -H, -OH ou -Me. Mais preferencialmente, X' é -H;

[00230] Y' é selecionado do grupo que consiste em -H, um grupo oxo, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica substituída ou não substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono. Preferencialmente, Y' é selecionado de -H ou -Me. Mais preferencialmente Y' é -H;

[00231] R_6 é -OR^c ou -SR^c, em que R^c é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono. Preferencialmente, R_6 é -OMe ou -SMe. Ainda mais preferencialmente, R_6 é -OMe;

[00232] A e A' são selecionados de -O- e -S-. Preferencialmente, A e A' são -O-;

[00233] L', L", e L"' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de -H, uma alquila, alquenila ou

alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, halogênio, guanidínio [$-NH(C=NH)NH_2$], -OR, -NR'R'', $-NO_2$, -NR'COR'', -SR, um sulfóxido representado por -SOR', uma sulfona representada por $-SO_2R'$, um sulfonato $-SO_3^-M^+$, um sulfato $-OSO_3^+M^-$, uma sulfonamida representada por $SO_2NR'R''$, ciano, um azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R'' e o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este, contanto que somente um de L', L'', e L''' é o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este. Preferencialmente, L' é o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este. Alternativamente, um de L', L'' ou L''' é o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este, enquanto os outros são -H. Mais preferencialmente, L' é o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este, e L'' e L''' são -H;

[00234] G é selecionado de -CH- ou -N-; e as demais das variáveis são como descrito na primeira modalidade específica.

[00235] Em determinadas modalidades, X não é o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este. Em determinadas modalidades, a linha dupla ═ entre N e C representa uma ligação simples, Y não é -H.

[00236] Em determinadas modalidades, A e A' são ambos -O-, R_6 é -OMe, e G é -CH-.

[00237] Em uma quarta modalidade específica, para os dímeros citotóxicos de fórmula (IA), (IIA), (IIIA) ou (IVA), L' é representado para a fórmula:

$$-W'-R^x-V-R^y-J,$$

[00238] em que:

[00239] W' e V são os mesmos ou diferentes, e são cada um independentemente ausente ou selecionado de $–CR^eR^{e'}-$, -O-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -S-, -SO-, $-SO_2-$, $-CH_2-S-$, $-CH_2O-$, $-CH_2NR^e-$, -O-(C=O)O-, -O-(C=O)N(R^e)-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)-, -C(=O)-N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)O-, -N(C(=O)R^e)C(=O)-, -N(C(=O)R^e)-, $-(O-CH_2-CH_2)_n-$, -

SS-, ou -C(=O)-, ou um aminoácido, ou um peptídeo contendo 2 a 8 aminoácidos;

[00240] R^x e R^y são os mesmos ou diferentes, e são cada um independentemente ausente ou uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo 1 a 10 átomos de carbono, um aril contendo 6 a 10 átomos de carbono ou um anel heterocíclico de 3 a 8 membros contendo 1 a 3 heteroátomos selecionado de O, N ou S;

[00241] R^e e $R^{e'}$ são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada, cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono ou $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$, em que R^k é um -H, uma alquila linear, ramificada cíclica contendo 1 a 6 átomos de carbono, opcionalmente contendo um grupo amino secundário (por exemplo, $-NHR^{101}$) ou amino terciário ($-NR^{101}R^{102}$) ou um heterociclo contendo nitrogênio de 5 ou 6 membros, como piperidina ou morfolina, em que R^{101} e R^{102} são cada um independentemente uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono. Preferencialmente, R^{101} e R^{102} são cada um independentemente uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono;

[00242] n é um inteiro de 1 a 24; e

[00243] J compreende o grupo reativo ligado a este, e é selecionado de um maleimido, um haloacetamido, -SH, $-SSR^d$, $-CH_2SH$, $-CH(Me)SH$, $-C(Me)_2SH$, $-NHR^{c1}$, $-CH_2NHR^{c1}$, $-NR^{c1}NH_2$, -COOH, e -COE, em que -COE representa um éster reativo selecionado de, entre outros, éster N-hidroxissuccinimida, éster N-hidróxi sulfossuccinimida, nitrofenil (por exemplo, 2 ou 4-nitrofenil) éster, dinitrofenil (por exemplo, 2,4-dinitrofenil) éster, sulfo-tetraflurofenil (por exemplo, 4-sulfo-2,3,5,6-tetrafluorfenil) éster, e pentafluorfenil éster, e em que R^{c1} é -H ou uma alquila linear ou ramificada substituída ou não substituída contendo 1 a

4 átomos de carbono, e

[00244] R^d é selecionado de fenila, nitrofenila (por exemplo, 2 ou 4-nitrofenila), dinitrofenila (por exemplo, 2 ou 4-nitrofenila), carboxinitrofenil (por exemplo, 3-carbóxi-4-nitrofenila), piridila ou nitropiridil (por exemplo, 4-nitropiridila).

[00245] Em determinadas modalidades, J é -SH, $-SSR^d$, um maleimido, ou um éster N-hidroxissuccinimida.

[00246] Em determinadas modalidades, $R^{e'}$ é -H ou -Me; R^e é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono ou $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$; n é um inteiro de 2 a 8; preferencialmente R^k é -H, -Me ou $-CH_2CH_2-NMe_2$, e as demais das variáveis são como descrito acima na quarta modalidade específica.

[00247] Em determinadas modalidades, V é um aminoácido ou um peptídeo contendo 2 a 8 aminoácidos. Em determinadas modalidades, V é valina-citrulina, gly-gly-gly, ou ala-leu-ala-leu.

[00248] Em determinadas modalidades,

[00249] W' é -O-, $-N(R^e)-$ ou $-N(R^e)-C(=O)-$;

[00250] R^e é H, uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono, ou $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$;

[00251] R^x é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono;

[00252] V é ausente, -(O-CH2-CH2)n-, -C(=O)-NH-, -S-, -NH-C(=O)-;

[00253] R^y é ausente ou uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono; e

[00254] J é -SH, $-SSR^d$ ou -COE (preferencialmente, éster N-hidroxissuccinimida). As demais das variáveis são como descrito na quarta modalidade específica.

[00255] Em determinadas modalidades,

[00256] W' é -O-, $-N(R^e)-$ ou $-N(R^e)-C(=O)-$;

[00257] R^e é H, Me, ou -$(CH_2$-CH_2-$O)_n$-Me;

[00258] n é um inteiro de 2 a 6;

[00259] R^x é alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono;

[00260] V e R^y são ausentes; e

[00261] J é -COE, preferencialmente éster N-hidroxissuccinimida. As demais das variáveis são como descrito na quarta modalidade específica.

[00262] Em uma quinta modalidade específica, L' é representado pela seguinte fórmula:

$$-W'-[CR_{1''}R_{2''}]_a-V-[Cy]_{0-1}-[CR_{3''}R_{4''}]_b-COE,$$

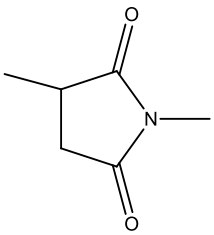
[00263] em que:

[00264] $R_{1''}$, $R_{2''}$, e $R_{3''}$ são cada um independentemente -H ou uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono, preferencialmente -Me;

[00265] $R_{4''}$ é -H, uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono (preferencialmente -Me), -SO_3H, ou -$SO_3^-M^+$, em que M^+ é um cátion farmaceuticamente aceitável;

[00266] a é um inteiro de 0-5 (por exemplo, de 0 a 2, 3, 4, ou 5), e b é um inteiro de 0-6 (por exemplo, de 0 a 3, 4, 5, ou 6); e,

[00267] Cy é um anel heterocíclico de 5 membros opcionalmente substituído contendo um N heteroátomo, preferencialmente Cy é



.

[00268] Em determinadas modalidades, W' é -$N(R^e)$-.

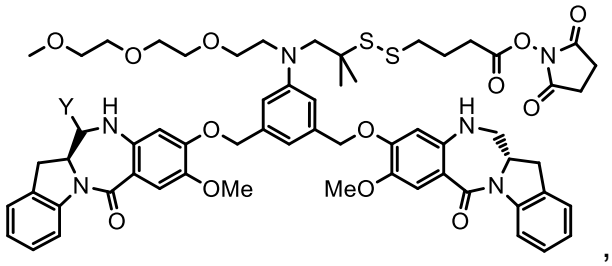
[00269] Em determinadas modalidades, como na quarta e/ou quinta modalidade específica, R^e é -$(CH_2$-CH_2-$O)_{2-6}$- R^k, em que R^k é um -H, uma alquila linear, ramificada cíclica contendo 1 a 6 átomos de carbono.

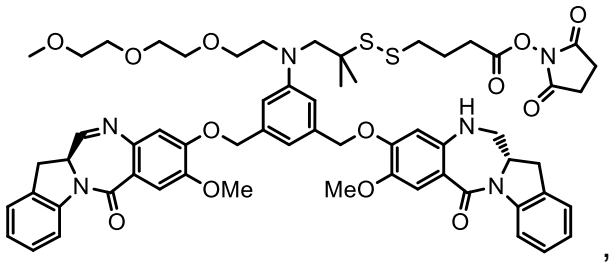
[00270] Em determinadas modalidades, como na quarta e/ou quinta modalidade específica, V é -S- ou -SS-.

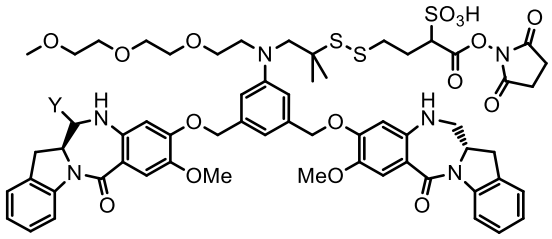
[00271] Na sexta modalidade específica, como na quarta e/ou quinta modalidade específica, L' é representado pela seguinte fórmula:

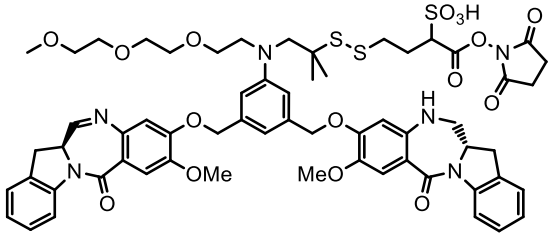
$$-NR^{e}-[CR_{1''}R_{2''}]_{a}-S-[CR_{3''}R_{4''}]_{b}-COE.$$

[00272] Em determinadas modalidades, o composto é qualquer um dos seguintes:


,


,


, ou

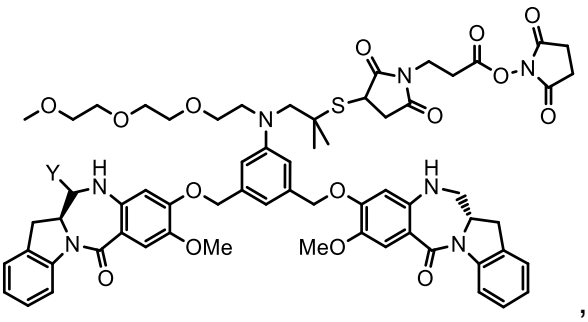

,

[00273] em que Y é -H ou $-SO_3M$, e M é -H ou um cátion farmaceuticamente aceitável. Em determinadas modalidades, Y é $-SO_3M$.

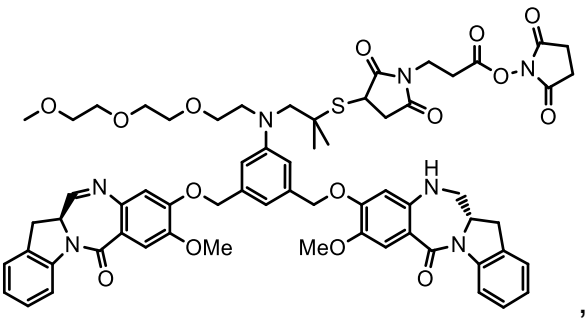
[00274] Em uma sétima modalidade específica, como na quarta e/ou quinta modalidade específica, L' é representado pela seguinte fórmula:

$-NR^{e}-[CR_{1''}R_{2''}]_{a}-S-Cy-[CR_{3''}R_{4''}]_{b}-COE.$

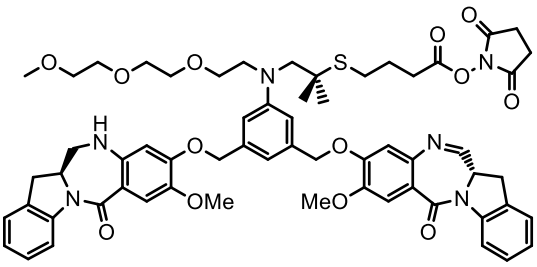
[00275] Em determinadas modalidades, o composto é qualquer um dos seguintes:



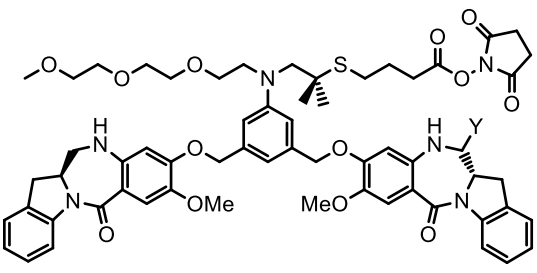
,



,



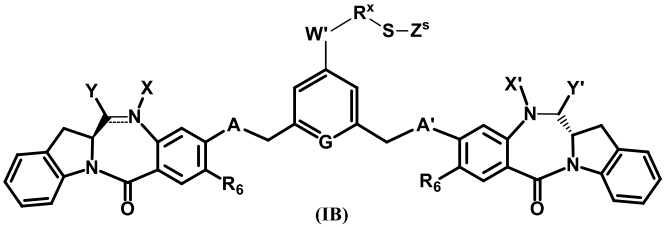
, ou



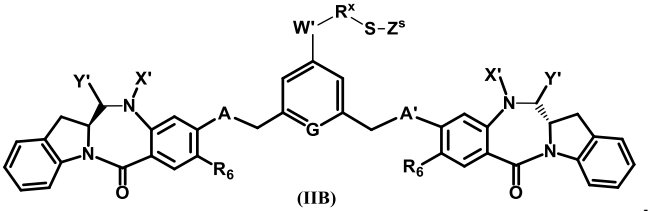
,

[00276] em que Y é -H ou $-SO_3M$, e M é -H ou um cátion farmaceuticamente aceitável. Em determinadas modalidades, Y é $-SO_3M$.

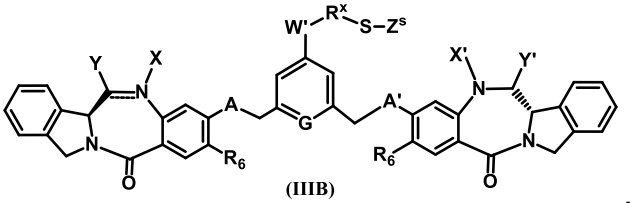
[00277] Em uma oitava modalidade específica, os dímeros citotóxicos de fórmula (I), (II), (III) e (IV) são representados pelas seguintes fórmulas:



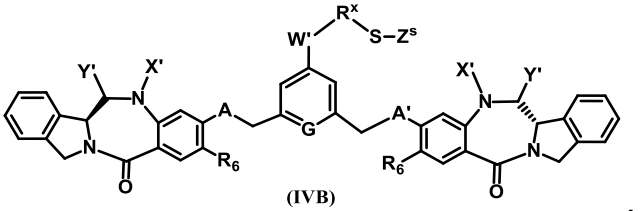
(IB) ,



(IIB) ,



(IIIB) ,



(IVB) ,

[00278] em que:

[00279] W' é ausente ou selecionado de -O-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)-, -N(C(=O)R^e)-, -S- ou -CH_2-S-, -CH_2NR^e-;

[00280] R^x é ausente ou selecionado de uma alquila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono;

[00281] R^e é -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada, cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono ou -(CH_2-CH_2-O)$_n$-R^k, em que R^k é um -H, uma alquila linear, ramificada cíclica contendo 1 a 6 átomos de carbono, opcionalmente contendo um grupo amino secundário (por exemplo, -NHR^{101}) ou amino terciário (-N$R^{101}R^{102}$) ou um heterociclo de 5 ou 6 membros contendo nitrogênio, como piperidina ou morfolina, em que R^{101} e R^{102} são cada um independentemente uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono. Preferencialmente, R^{101} e R^{102} são cada um

independentemente uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono;

[00282] Z^s é -H, -SR^m;

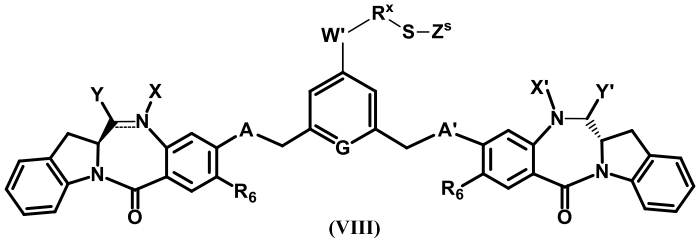
[00283] R^m é R^d ou uma alquila linear ou ramificada substituída ou não substituída contendo 1 a 4 átomos de carbono contendo um éster reativo, selecionado de ésteres N-hidroxissuccinimida, ésteres N-hidroxiftalimida, ésteres N-hidróxi sulfo-succinimida, ésteres para-nitrofenila, ésteres dinitrofenila, ésteres pentafluorfenila;

[00284] R^d é selecionado de fenila, nitrofenila, dinitrofenila, carboxinitrofenila, piridila ou nitropiridila; e,

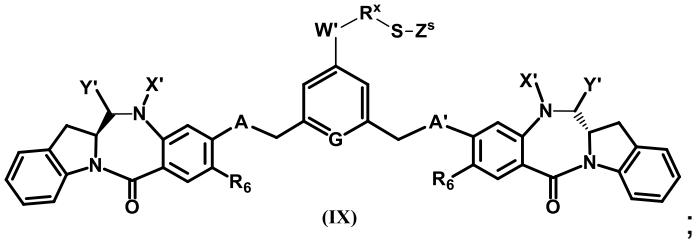
[00285] n é um inteiro de 1 a 24; e as demais das variáveis são como descrito acima na terceira modalidade específica.

[00286] Preferencialmente, R^k é -H ou -Me, e n é um inteiro de 2 a 8. Preferencialmente, R^x é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono; e as demais das variáveis são como descrito acima na terceira, quarta, e/ou quinta modalidade específica.

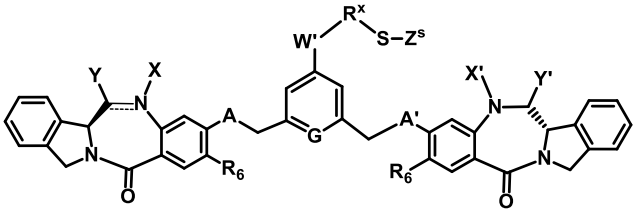
[00287] Em uma nona modalidade específica, os dímeros citotóxicos de fórmula (I), (II), (III) e (IV) são representados pelas seguintes fórmulas:



(VIII) ;

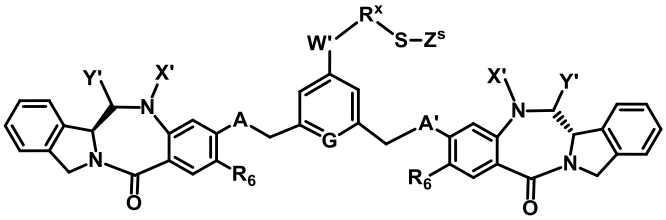


(IX) ;



(X)

; e



(XI)

,

[00288] em que:

[00289] a linha dupla ⎓ entre N e C representa uma ligação simples ou uma ligação dupla, desde que quando este é uma ligação dupla, X é ausente e Y é -H, e quanto este é uma ligação simples, X é selecionado de -H, o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este, ou um grupo protetor de amina (preferencialmente X é -H ou um grupo de proteção de amina; mais preferencialmente, X é -H);

[00290] Y é selecionado de -H, -OR, -OCOR', -SR, -NR'R," $-SO_3M$, $-SO_2M$ ou $-OSO_3M$ (por exemplo, Y é -OR, -OCOR', -SR, -NR'R," $-SO_3M$, $-SO_2M$ ou $-OSO_3M$), em que M é -H ou um cátion como Na^+ ou K^+;

[00291] R é -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono ou um grupo PEG $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, em que n é um inteiro de 1 a 24, e R^c é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono;

[00292] R' e R" são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de -H, -OH, -OR, $-NRR^{g'}$, -COR, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma arila opcionalmente substituída contendo de 6 a 18 átomos de carbono**,** um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos

selecionado de O, S, N e P, um grupo PEG $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, em que n é um inteiro de 1 a 24, preferencialmente n é 2, 4 ou 8; e $R^{g'}$ é -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono ou um grupo PEG $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$;

[00293] X' é selecionado do grupo que consiste em -H, -OH, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica substituída ou não substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, fenila, e um grupo de proteção amina;

[00294] Y' é selecionado do grupo que consiste em -H, um grupo oxo, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica substituída ou não substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono;

[00295] A e A' são selecionados de -O- e -S-;

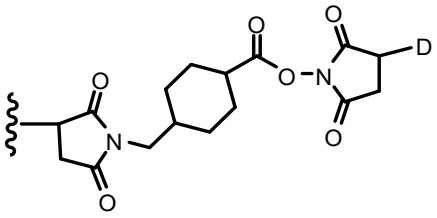
[00296] W' é ausente ou selecionado de -O-, $-N(R^e)-$, $-N(R^e)-C(=O)-$, $-N(C(=O)R^e)-$, -S- ou $-CH_2-S-$, $-CH_2NR^e-$;

[00297] R^x é ausente ou selecionado de uma alquila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono;

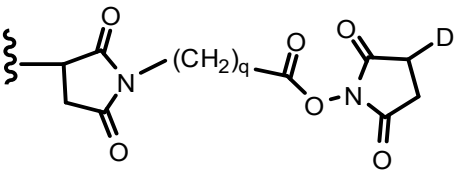
[00298] R^e é -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada, cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono ou $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$, em que R^k é um -H, uma alquila linear, ramificada cíclica contendo 1 a 6 átomos de carbono, opcionalmente contendo um grupo amino secundário (por exemplo, $-NHR^{101}$) ou amino terciário ($-NR^{101}R^{102}$) ou um heterociclo contendo nitrogênio de 5 ou 6 membros, como piperidina ou morfolina, em que R^{101} e R^{102} são cada um independentemente uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono;

[00299] G é selecionado de -CH- ou -N-;

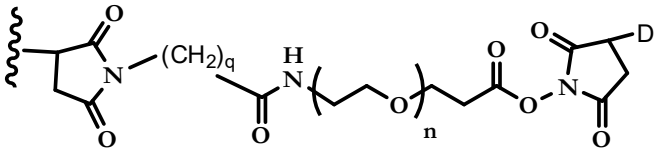
[00300] Z^s é -H, ou é selecionado de qualquer uma das seguintes fórmulas:



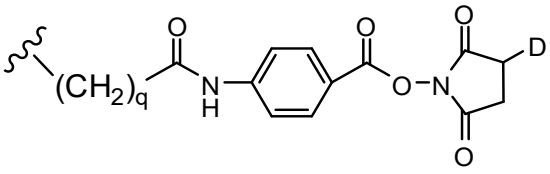
(a1);



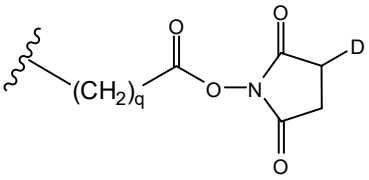
(a2);



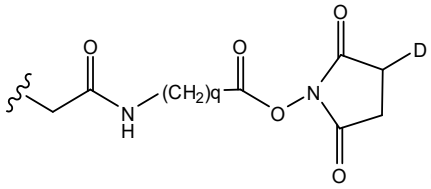
(a3);



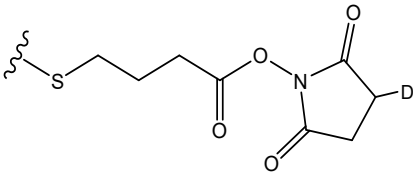
(a4);



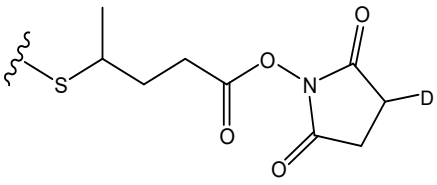
(a5);



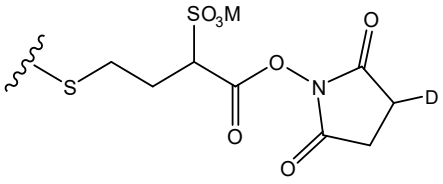
(a6);



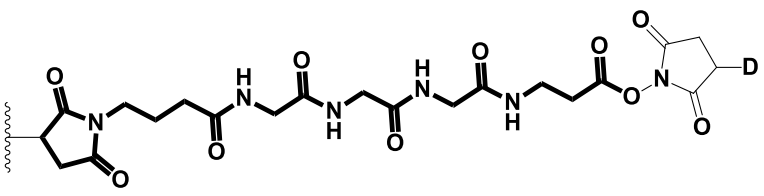
(a7);



(a8);



(a9), e,



(a10),

[00301] em que:

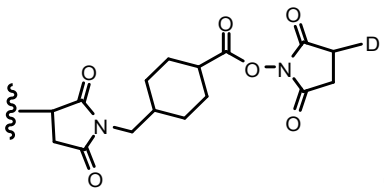
[00302] q é um inteiro de 1 a 5;

[00303] n é um inteiro de 2 a 6;

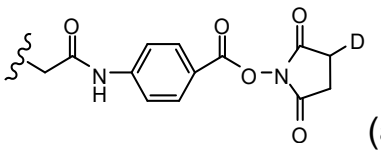
[00304] D é -H ou -SO_3M;

[00305] M é -H ou um cátion, como Na^+ ou K^+.

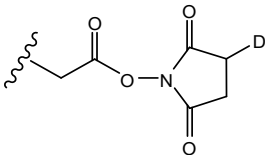
[00306] Em determinadas modalidades, Z^s é representado por qualquer uma das seguintes fórmulas:



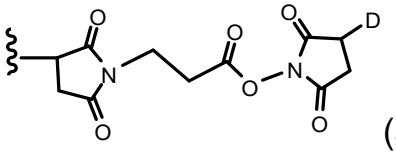
(a1);



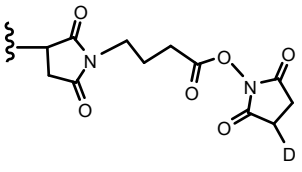
(a4');



(a5');



(a12);



(a13).

[00307] Em determinadas modalidades, W' é -$N(R^e)$-.

[00308] Em determinadas modalidades, R^e é -$(CH_2$-CH_2-$O)_n$-R^k, em que R^k é um -H, uma alquila linear, ramificada cíclica contendo 1 a 6 átomos de carbono.

[00309] Em determinadas modalidades, R^k é -H ou -Me, n é 4, e q é 2.

[00310] Em determinadas modalidades, R^x é uma alquila linear ou

ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono.

[00311] Em determinadas modalidades, R^x pode ser $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$, em que R^f e R^g são cada um independentemente selecionados de H ou uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono; e p é 0, 1, 2 ou 3.

[00312] Em determinadas modalidades, R^f e R^g são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de -H e -Me; e p é 1.

[00313] Em uma décima modalidade específica, os compostos de fórmula (VIII), (IX), (X) e (XI) descritos na nona modalidade específica, as variáveis são como descrito abaixo:

[00314] a linha dupla ⎓ entre N e C representa uma ligação simples ou uma ligação dupla, desde que quando este é uma ligação dupla X é ausente e Y é -H, e quanto este é uma ligação simples, X é -H; Y é -H, -OH ou $-SO_3M$;

[00315] M é -H ou um cátion farmaceuticamente aceitável (por exemplo, Na^+);

[00316] X' e Y' são ambos -H;

[00317] A e A' são ambos -O-;

[00318] R_6 é -OMe; e

[00319] R^x é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono.

[00320] Em uma modalidade relacionada, Y é -OH ou $-SO_3M$.

[00321] Em outra modalidade, os compostos de fórmula (VIII), (IX), (X) e (XI) descritos na nona modalidade específica, as variáveis são como descrito abaixo:

[00322] W' é -O-, $-N(R^e)-$, $-N(R^e)-C(=O)-$, $-N(COR^e)-$, -S- ou $-CH_2-S-$;

[00323] R^x é ausente ou selecionado de uma alquila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 6 átomos de carbono;

[00324] R^e é -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada, cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono ou $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$, em

que R^k é um -H, uma alquila linear, ramificada cíclica contendo 1 a 6 átomos de carbono, opcionalmente contendo um grupo de amina primária, secundária ou terciária ou um heterociclo de 5 ou 6 membros contendo nitrogênio, como piperidina ou morfolina;

[00325] n é um inteiro de 1 a 24; e as demais das variáveis são como descrito acima na nona modalidade específica.

[00326] Preferencialmente, R^k é -H ou -Me, e n é um inteiro de 2 a 8. Preferencialmente, R^x é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono.

[00327] Preferencialmente, R^x é $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$, em que R^f e R^g são cada um independentemente selecionados de H ou uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono; p é 0, 1, 2 ou 3. Mais preferencialmente, R^f e R^g são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de -H e -Me; e p é 1.

[00328] Em outra modalidade preferencial, o ligante é representado por qualquer uma das fórmulas selecionadas de fórmulas (a1), (a4), (a5), (a10) e (a11) mostradas acima; e as demais das variáveis são como descrito acima na décima modalidade específica.

[00329] Em uma décima primeira modalidade específica, para os compostos de fórmula (IB), (IIB), (IIIB) e (IVB) descritos na oitava modalidade específica, as variáveis são como descrito abaixo:

[00330] a linha dupla ⎓ entre N e C representa uma ligação simples ou uma ligação dupla, desde que quando este é uma ligação dupla X é ausente e Y é -H, e quanto este é uma ligação simples, X é -H; Y é -H, -OH ou $-SO_3M$ (por exemplo, Y é -OH ou $-SO_3M$);

[00331] M é -H ou Na^+;

[00332] X' e Y' são ambos -H;

[00333] A e A' são ambos -O-;

[00334] R_6 é -OMe;

[00335] R^x é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos

de carbono; e as demais das variáveis é como descrito acima na terceira, quarta, ou quinta modalidade específica.

[00336] Preferencialmente, R^x é $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$, em que R^f e R^g são cada um independentemente selecionados de H ou uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono; p é 0, 1, 2 ou 3. Mais preferencialmente, R^f e R^g são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de -H e -Me; e p é 1.

[00337] Em qualquer uma das modalidades específicas acima (por exemplo, a primeira até a 11ª modalidades específicas), a linha dupla ⎓ entre N e C pode representar uma ligação dupla.

[00338] Em qualquer uma das modalidades específicas acima (por exemplo, a primeira até a 11ª modalidades específicas), a linha dupla ⎓ entre N e C pode representar uma ligação simples, X é -H, o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este, ou um grupo protetor de amina (por exemplo, X é -H ou um grupo de proteção de amina); e Y é selecionado de -H, -OR, -OCOR', -SR, -NR'R," um heterociclo opcionalmente substituído de 5 ou 6 membros contendo nitrogênio, $-SO_3M$, $-SO_2M$ e um sulfato $-OSO_3M$ (por exemplo, Y é -OR, -OCOR', -SR, -NR'R," um heterociclo opcionalmente substituído de 5 ou 6 membros contendo nitrogênio, $-SO_3M$, $-SO_2M$ e um sulfato $-OSO_3M$).

[00339] Em determinadas modalidades, Y é selecionado de -H, $-SO_3M$, -OH, -OMe, -OEt ou -NHOH (por exemplo, Y é $-SO_3M$, -OH, -OMe, -OEt ou -NHOH).

[00340] Em determinadas modalidades, Y é -H, $-SO_3M$ ou -OH (por exemplo, Y é $-SO_3M$ ou -OH).

[00341] Em determinadas modalidades, M é -H, Na^+ ou K^+.

[00342] Em qualquer uma das modalidades específicas acima (por exemplo, a primeira até a 11ª modalidades específicas), W, quando presente, é C=O.

[00343] Em qualquer uma das modalidades específicas acima (por

exemplo, a primeira até a 11ª modalidades específicas), Z e Z', quando presente, são -CH_2.

[00344] Em qualquer uma das modalidades específicas acima (por exemplo, a primeira até a 11ª modalidades específicas), X' é selecionado do grupo que consiste em -H, -OH, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, fenila, o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este, e um grupo de proteção amina.

[00345] Em determinadas modalidades, X' é -H, -OH, -Me ou o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este.

[00346] Em determinadas modalidades, X' é -H.

[00347] Em qualquer uma das modalidades específicas acima (por exemplo, a primeira até a 11ª modalidades específicas), Y' é selecionado do grupo que consiste em -H, um grupo oxo, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica substituída ou não substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono.

[00348] Em determinadas modalidades, Y' é -H ou oxo.

[00349] Em determinadas modalidades, Y' é -H.

[00350] Em qualquer uma das modalidades específicas acima (por exemplo, a primeira até a 11ª modalidades específicas), A e A' são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de O, S, NR_5 e oxo (C=O). A e A' podem ser o mesmo ou diferentes e selecionado de -O- e -S-. Preferencialmente, ambos A e A' são -O-.

[00351] Em qualquer uma das modalidades específicas acima (por exemplo, a primeira até a 11ª modalidades específicas), D e D', quando presentes, são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de uma unidade de polietilenoglicol $(-OCH_2CH_2)_n$, em que n é um inteiro de 1 a 24, um aminoácido, um peptídeo contendo 2 a 6 aminoácidos, ou uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada, cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, em que o alquila, alquenila

e alquinil são opcionalmente substituídos com um ou mais substituintes independentemente selecionados do grupo que consiste em halogênio, -OR, -NR'COR'', -SR e -COR'. Preferencialmente, D e D' são alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono.

[00352] Em uma décima segunda modalidade, o composto citotóxico da presente invenção como descrito na primeira, terceira, e nona modalidade é representado pelos seguintes:

[00353] a linha dupla ⎓ entre N e C representa uma ligação dupla;

[00354] Y é -H;

[00355] W é C=O;

[00356] R_1, R_2, R_1', R_2', R_4 e R_4' são -H;

[00357] um de R_3, ou R_3' é opcionalmente o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este e o outro é -H;

[00358] R_6 é -OMe;

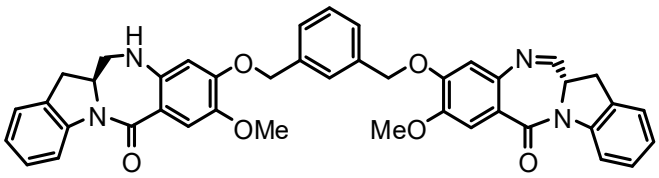
[00359] Z e Z' são -CH_2;

[00360] X' é -H;

[00361] Y' é -H; e

[00362] A e A' são -O-.

[00363] Em uma décima terceira modalidade, o composto citotóxico da presente invenção é:



(composto **29b**),

[00364] ou um sal farmaceuticamente aceitável das mesmas.

[00365] Em uma modalidade, composto **29b** pode ser usado nos métodos da presente invenção descritos aqui. Em uma modalidade preferencial, composto **29b** pode ser usado para tratar um distúrbio proliferativo, como câncer.

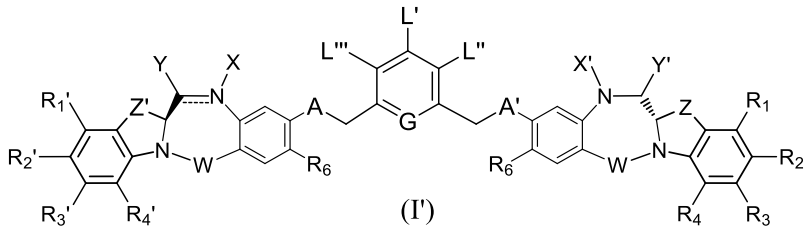
[00366] Em outra modalidade, composto **29b** pode ser usado para triar linhagens de células que são sensíveis aos compostos

benzodiazepina, como derivados de benzodiazepina descritos aqui.

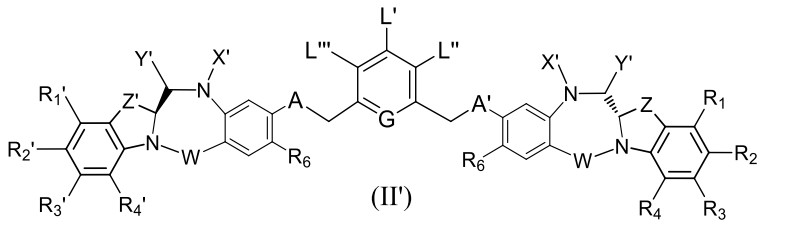
COMPOSTOS DE FÁRMACO & COMPOSTOS DE FÁRMACO-LIGANTE

[00367] Os compostos citotóxicos descritos acima compreendem um grupo ligante com um grupo reativo ligado a este, cujos compostos podem resultar da reação de um reagente de reticulação bifuncional com compostos "menos ligante" para formar os chamados compostos fármaco-ligante. Alternativamente, compostos da fármaco que são de outra forma idênticos aos compostos fármaco-ligante, mas sem a porção ligante são ainda incluídos pela presente invenção.

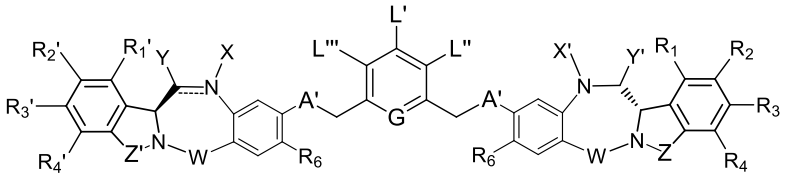
[00368] Assim em determinadas modalidades, a invenção fornece um composto citotóxico sem grupo ligante, mas pode ser capaz de reagir com um agente de ligação cruzada bifuncional para formar um composto da invenção, como qualquer uma da 1ª até a 12ª modalidades específicas descritas acima; ou para formar um conjugado de agente de ligação à célula da invenção (como aqueles descritos abaixo). Um composto citotóxico sem ligante exemplar da invenção inclui composto **29b** da 13ª modalidade específica acima. Os compostos citotóxicos sem ligante da invenção são representados por qualquer uma das seguintes fórmulas (I'), (II'), (III') ou (IV'):



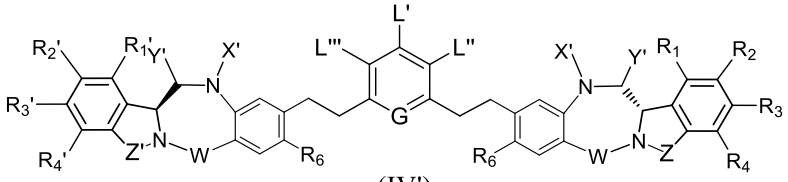
(I')



(II')



(III')



(IV')

[00369] ou um sal farmaceuticamente aceitável das mesmas, em que:

[00370] a linha dupla ⎓ entre N e C representa uma ligação simples ou uma ligação dupla, desde que quando este é uma ligação dupla, X é ausente e Y é -H, ou uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono, e quanto este é uma ligação simples, X é -H, ou uma porção protetora de amina; preferencialmente, a linha dupla ⎓ entre N e C representa uma ligação dupla;

[00371] Y é -H ou um grupo de saída selecionado de -OR, -OCOR', -OCOOR', -OCONR'R'', -NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', um heterociclo opcionalmente substituído de 5 ou 6 membros contendo nitrogênio (por exemplo, piperidina, tetra-hidropirrol, pirazol, morfolina, *etc*.), um guanidínio representado por -NR'(C=NH)NR'R'', um aminoácido, ou um peptídeo representado por -NRCOP', em que P' é um aminoácido ou um polipeptídeo contendo entre 2 a 20 unidades de aminoácidos, -SR, -SOR', $-SO_2M$, $-SO_3M$, $-OSO_3M$, halogênio, ciano e um azido, em que M é -H ou um cátion; como Na^+ ou K^+. Preferencialmente, M é -H ou Na^+. Preferencialmente, Y é selecionado de $-SO_3M$, -OH, -OMe, -OEt ou -NHOH. Mais preferencialmente, Y é $-SO_3M$ ou -OH; ou

[00372] Y é um sulfito (HSO_3, HSO_2 ou um sal de HSO_3^-, SO_3^{2-} ou HSO_2^- formado com um cátion), metabissulfito ($H_2S_2O_5$ ou um sal de $S_2O_5^{2-}$ formado com um cátion), mono-, di-, tri-, e tetra- tiofosfato

(PO_3SH_3, $PO_2S_2H_2$, POS_3H_2, PS_4H_2 ou um sal de PO_3S^{3-}, $PO_2S_2^{3-}$, POS_3^{3-} ou PS_4^{3-} formado com um cátion), éster tio fosfato $(R^iO)_2PS(OR^i)$, R^iS-, R^iSO, R^iSO_2, R^iSO_3, tiossulfato (HS_2O_3 ou um sal de $S_2O_3^{2-}$ formado com um cátion), ditionito (HS_2O_4 ou um sal de $S_2O_4^{2-}$ formado com um cátion), fosforoditioato ($P(=S)(OR^{k'})(S)(OH)$ ou um sal do mesmo formado com um cátion), ácido hidroxâmico ($R^{k'}C(=O)NOH$ ou um sal formado com um cátion), formaldeído sulfoxilato ($HOCH_2SO_2^-$ ou um sal de $HOCH_2SO_2^-$ formado com um cátion, como $HOCH_2SO_2^-Na^+$) ou uma mistura dos mesmos, em que R^i é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 10 átomos de carbono e é substituído com pelo menos um substituinte selecionado de $-N(R^j)_2$, $-CO_2H$, $-SO_3H$, e $-PO_3H$; R^i pode ser ainda opcionalmente substituído com um substituinte para uma alquila descrita aqui; R^j é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono; $R^{k'}$ é uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, arila, heterociclila ou heteroarila; preferencialmente, Y é um aduto de um bissulfito, um hidrossulfito, ou um metabissulfito, ou sais dos mesmos (como sal de sódio);

[00373] R, para cada ocorrência, é independentemente selecionada do grupo que consiste em -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, uma arila opcionalmente substituída contendo 6 a 18 átomos de carbono, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, ou um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[00374] R' e R" são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de -H, -OH, -OR, -NHR, $-NR_2$, -COR,

uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[00375] R^c é -H ou uma alquila linear ou ramificada substituída ou não substituída contendo 1 a 4 átomos de carbono;

[00376] n é um inteiro de 1 a 24;

[00377] W é selecionado de C=O, C=S, CH_2, BH, SO, e SO_2;

[00378] X' é selecionado do grupo que consiste em -H, -OH, um grupo de proteção amina, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, uma arila opcionalmente substituída contendo 6 a 18 átomos de carbono (por exemplo, fenila), um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P. Preferencialmente, X' é -H, -OH, ou -Me. Mais preferencialmente, X' é -H;

[00379] Y' é selecionado do grupo que consiste em -H, um grupo oxo, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma arila opcionalmente substituída de 6 a 18 membros, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos. Preferencialmente, Y' é selecionado de -H ou oxo. Mais preferencialmente, Y' é -H;

[00380] R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' e R_4' são cada um independentemente selecionados do grupo que consiste em -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, halogênio, guanidínio [$-NH(C=NH)NH_2$], -OR, -NR'R'', $-NO_2$, -NCO, -NR'COR'', -SR, um sulfóxido representado por -SOR', uma sulfona representada por $-SO_2R'$, um sulfonato $-SO_3^-M^+$, um sulfato $-OSO_3^-M^+$, uma sulfonamida representada por $-SO_2NR'R''$, ciano, um azido, -COR', -OCOR', e -OCONR'R''. Preferencialmente, 1, 2, 3, ou todos de R_2, R_3, R_2' e R_3' é -H;

[00381] R_6 é -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', $-NO_2$, halogênio, $-OR^c$ ou $-SR^c$, em que R^c é -H, uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono. Preferencialmente, R_6 é -OMe ou -SMe. Ainda mais preferencialmente, R_6 é -OMe;

[00382] Z e Z' são independentemente selecionados de $-(CH_2)_{n'}-$, $-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}-$, $-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}-$, $-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}-$ e $-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}-$;

[00383] n' e na' são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de 0, 1, 2 e 3;

[00384] R_7 e R_8 são os mesmos ou diferentes, e são cada um independentemente selecionados de -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n-$, um aminoácido, uma unidade de peptídeo contendo 2 a 6 aminoácidos, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono;

[00385] R_9 é independentemente selecionado de -H, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n-$;

[00386] A e A' são os mesmos ou diferentes, e são

independentemente selecionados de -O-, oxo (-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -N(R_5)- e -CRR'N(R_5)-. Preferencialmente, A e A' são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de -O- e -S-. Mais preferencialmente, A e A' são -O-;

[00387] R_5 para cada ocorrência é independentemente -H ou uma alquila linear ou ramificada opcionalmente substituída contendo 1 a 10 átomos de carbono;

[00388] L', L'', e L''' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de -H, halogênio, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída, haloalquila, alcóxi, haloalcóxi, -NO_2, ou -CN;

[00389] G é selecionado de -CH- ou -N-.

[00390] Em determinadas modalidades, a linha dupla = entre N e C representa uma ligação simples, Y não é -H.

[00391] Em determinadas modalidades, a linha dupla = entre N e C representa uma ligação simples ou uma ligação dupla, desde que quando este é uma ligação dupla X é ausente e Y é -H, e quanto este é uma ligação simples, X é selecionado de -H, ou um grupo protetor de amina (preferencialmente X é -H); W é C=O; R_1, R_2, R_3, R_4, $R_{1'}$, $R_{2'}$, $R_{3'}$, e $R_{4'}$ são -H; Z e Z' são -CH_2-; A e A' são ambos -O-; W é -(C=O)-; G é -CH-; R_6 é -H, ou opcionalmente substituído C1-C10 linear, C1-C10 ramificado, ou C3-C7 alquila cíclica, -O-alquila, ou -O-halo-alquila, como -OMe; X' é selecionado do grupo que consiste em -H, -OH, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica substituída ou não substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, fenila, e um grupo de proteção amina; e Y' é selecionado do grupo que consiste em -H, um grupo oxo, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica substituída ou não substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono.

[00392] Preferencialmente, quando Y não é -H, Y é selecionado de -

OR, -OCOR', -SR, -NR'R", $-SO_3M$, $-SO_2M$, ou $-OSO_3M$, em que M é -H ou um cátion como Na^+. K^+. Preferencialmente, Y é selecionado de -H, -OH, -OMe, -OEt, -NHOH ou $-SO_3M$ (por exemplo, Y é -OH, -OMe, -OEt, -NHOH ou $-SO_3M$). Ainda mais preferencialmente, Y é -H, -OH ou $-SO_3M$ (por exemplo, Y é -OH ou $-SO_3M$), preferencialmente M é -H ou Na^+.

[00393] Em determinadas modalidades, a linha dupla ⁼ entre N e C representa uma ligação simples ou uma ligação dupla, desde que quando este é uma ligação dupla X é ausente e Y é -H, e quanto este é uma ligação simples, X é selecionado de -H, ou um grupo protetor de amina (preferencialmente X é -H); W é C=O; R_1, R_2, R_3, R_4, $R_{1'}$, $R_{2'}$, $R_{3'}$, $R_{4'}$, X' e Y' são -H; Z e Z' são $-CH_2-$; A e A' são ambos -O-; W é -(C=O)-; G é -CH-; R_6 é -H, ou opcionalmente substituído C1-C10 linear, C1-C10 ramificado, ou C3-C7 alquila cíclica, -O-alquila, ou -O-halo-alquila, como -OMe.

[00394] Os agentes de reticulação bifuncionais podem ser qualquer ligante bifuncional conhecido na técnica. Por exemplo, os ligantes bifuncionais podem ser usados para preparar os compostos fármaco-ligante são aqueles que formam ligações dissulfeto, ligações tioéter, ligações lábeis a ácido, ligações fotolábeis, ligações lábeis a peptidase e ligações lábeis a esterase com os compostos citotóxicos (ver por exemplo, Patente US 5.208.020; 5.475.092; 6.441.163; 6.716.821; 6.913.748; 7.276.497; 7.276.499; 7.368.565; 7.388.026 e 7.414.073, todos dos quais são incorporados aqui por referência). Preferencialmente, os agentes de reticulação bifuncionais são aqueles que formam ligações dissulfeto, ligações lábeis a tioéter e peptidase com os compostos citotóxicos. Outros agentes de reticulação bifuncionais que podem ser usados na presente invenção incluem ligantes não cliváveis, como aqueles descritos na publicação U.S número US 2005/0169933, ou ligantes carregados ou ligantes

hidrofílicos e são descritos em US 2009/0274713, US 2010/01293140 e WO 2009/134976, cada um dos quais é expressamente incorporado aqui por referência. Os agentes de reticulação bifuncionais que podem ser usadas para preparar os compostos (fármaco-ligante) da presente invenção ainda incluem aqueles descritos em *Thermo Scientific Pierce Crosslinking Technical Handbook*, o ensinamento completo do qual é incorporado aqui por referência.

SÍNTESE DE COMPOSTOS CITOTÓXICOS

[00395] Processos representativos para preparar os compostos dímeros citotóxicos da presente invenção são mostrados nas FIGS. 1-11. Os dímeros foram preparados reagindo um monômero com compostos ligantes que possuem dois grupos de saída como halogênio, triflato, mesilato, ou tosilato como aqueles descritos para a síntese de **1c** na FIG. 1. Síntese de dímeros representativos que contêm uma porção tiol ou dissulfeto permite a ligação ao agente de ligação às células através de ligações reduzíveis ou não reduzíveis são mostrados nas FIGS. 1-5, 7, 8, e 10. Na FIG. 1 um ligante contendo uma porção pequena de polietileno glicol e um alquil dissulfeto foi preparado pela aminação redutora de **1a**. A conversão de **1b** ao seu correspondente mesilato e acoplamento com a unidade de monômero IBD (indolinobenzodiazepina) gerou dímero **1c** que foi reduzido a mono-imina, convertido a tiol livre, e acoplado com **2** para gerar composto **1g** da presente invenção. Na FIG. 3, uma forma modificada de monômero IBD foi preparada e acoplada para gerar um dímero da presente invenção em que a imina reduzida foi convertida a um ligante. A FIG. 4 descreve um dímero processando uma pequena porção de polietileno glicol e uma amida dissulfeto que foi reduzida ao tiol **4c** e convertida a um éster reativo. A FIG. 5 descreve a síntese de piridil dissulfeto contendo ligante **5e** que foi convertido ao mono-imina tiol **5i** da presente invenção antes de ser convertido a um éster reativo. A síntese de

dímeros representativos que possuem ligantes que podem reagir com agente de ligação às células são preparados por conversão de ésteres de metil aos correspondentes ésteres reativos de um grupo de saída como, entre outros, ésteres N-hidroxissuccinimida, ésteres N-hidroxiftalimida, ésteres N-hidróxi sulfo-succinimida, ésteres para-nitrofenila, ésteres pentafluorfenil são mostrados nas FIGS. 6, 9, e 11.

[00396] Processos representativos para preparar os compostos dímeros citotóxicos da presente invenção apropriados para conjugação de uma etapa com um agente de ligação à célula são mostrados nas FIGS. 1 e 12-19. Em todos estes exemplos um dímero contendo uma porção tiol é reagido com um reagente de reticulação bifuncional que possui um grupo reativo como, entre outros, um tiopiridila, um maleimido, iodeto, brometo, ou tosilato em um lado e um substituinte reativo apropriado para reação com um agente de ligação à célula como, entre outros, ésteres N-hidroxissuccinimida, ésteres N-hidroxiftalimida, ésteres N-hidróxi sulfo-succinimida, ésteres paranitrofenila, ésteres pentafluorfenila.

[00397] Processos sintéticos alternativos para preparar compostos dímeros citotóxicos representativos da presente invenção são mostrados nas FIGS. 20-21. Na FIG. 20, a síntese do dímero mono reduzido (ou seja, contendo um grupo imina) é obtida por um método de acoplamento de duas etapas, em que uma forma reduzida de monômero é inicialmente acoplada ao ligante seguido por acoplamento com o monômero IBD ou o dímero é preparado usando uma mistura de ambos monômero reduzido e monômero IBD no acoplamento com o ligante reativo. Enquanto o dímero di-reduzido é potencialmente um subproduto da segunda via sintética anteriormente descrita, uma via mais direta é mostrada na FIG. 21 em que o monômero reduzido é acoplado a ambos com o ligante diretamente.

AGENTES DE LIGAÇÃO À CÉLULA

[00398] A efetividade dos conjugados da invenção como agentes terapêuticos depende da seleção cuidadosa de um agente apropriado de ligação à célula. Agentes de ligação à célula podem ser de qualquer tipo atualmente conhecido, ou que se torne conhecido e inclui peptídeos e não peptídeos. Geralmente, estes podem ser anticorpos (especialmente anticorpos monoclonais), linfocinas, hormônios, fatores de crescimento, vitaminas (como folato *etc.*, que podem se ligar a um receptor de superfície celular do mesmo, por exemplo, um receptor de folato), moléculas transportadoras de nutrientes (como transferrina), ou qualquer outra molécula ou substância de ligação à célula.

[00399] Em determinadas modalidades, os agentes de ligação à célula são proteínas ou polipeptídeos, ou compostos compreendendo proteínas ou polipeptídeos. Preferencialmente, as proteínas ou polipeptídeos compreendem um ou mais resíduos Lys com grupos de cadeia lateral -NH_2. Alternativamente ou além disso, as proteínas ou polipeptídeos compreendem um ou mais resíduos Cys. Os grupos de cadeia lateral –SH dos resíduos Cys podem ser intactos, ou podem ser em uma ligação dissulfeto que pode ser reduzida. Preferencialmente, redução das ligações dissulfeto não significativamente impactam negativamente a função de ligação à célula das proteínas ou polipeptídeos (por exemplo, no caso de anticorpo ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, redução das ligações dissulfeto não substancialmente aumenta a dissociação de cadeias leves/cadeias pesadas).

[00400] Os grupos Lys de cadeia lateral -NH_2 e/ou os grupos de Cys cadeia lateral -SH podem ser covalentemente ligados aos ligantes, que são, por sua vez, ligados aos dímeros compostos da invenção, assim conjugação de agentes de ligação à célula aos dímeros compostos da invenção. Cada agente baseado em proteína de ligação à célula pode conter vários grupos -NH_2 de cadeia lateral Lys e/ou os grupos -SH de

cadeia lateral Cys disponíveis para ligação dos compostos da invenção através de reticulantes bifuncionais.

[00401] Exemplos de agentes de ligação à célula mais específicos que podem ser usados incluem:

[00402] anticorpos policlonais;

[00403] anticorpos monoclonais;

[00404] fragmentos de anticorpos como Fab, Fab', e $F(ab')_2$, Fv, minibodies, diabodies, tribodies, tetrabodies (Parham, *J. Immunol*. 131:2895-2902 (1983); Spring *et al*. *J. Immunol.* 113:470-478 (1974); Nisonoff *et al*. *Arch. Biochem. Biophys.* 89:230-244 (1960), Kim *et al*., Mol, Cancer Ther., 7: 2486-2497 (2008), Carter, Nature Revs., 6 : 343-357 (2006));

[00405] interferons (por exemplo, α, β, γ);

[00406] linfocinas como IL-2, IL-3, IL-4, IL-6;

[00407] hormônios como insulina, TRH (hormônio de liberação de tirotropina), MSH (hormônio estimulante de melanócito), hormônios esteroides, como androgênios e estrogênios;

[00408] fatores de crescimento e fatores estimulantes de colônias como EGF, TGF-alfa, FGF, VEGF, G-CSF, M-CSF e GM-CSF (Burgess, *Immunology Today* 5:155-158 (1984));

[00409] transferrina (O'Keefe *et al*. *J. Biol. Chem.* 260:932-937 (1985));

[00410] vitaminas, como folato;

[00411] Estruturas de proteína baseadas em uma sequência consenso de repetições de fibronectina tipo III (FN3) (também conhecido como Centyrins; ver publicação de patente U.S. Publicação de patente 2010/0255056, incorporada aqui por referência);

[00412] Designer Ankyrin Repeat Proteins (DARPins; publicações de patente US 20040132028; 20090082274; 20110118146; 20110224100, incorporadas aqui por referência), C. Zahnd *et al*. 2010, Cancer Res.,

70; 1595-1605, incorporada aqui por referência); e,

[00413] Proteínas de estrutura de domínio de fibronectina (Adnectinas: Publicações de Patente US 20070082365; 20080139791, incorporadas aqui por referência).

[00414] Técnicas de anticorpos monoclonais permitem a produção de agentes extremamente específicos de ligação à célula na forma de anticorpos monoclonais específicos. Particularmente bem conhecidos na técnica são técnicas para a criação de anticorpos monoclonais produzidos por camundongos, ratos, hamsters ou qualquer outro mamífero imunizante com o antígeno de interesse como a célula-alvo intacta, antígenos isolados da célula-alvo, cujos vírus, vírus inteiros atenuados, e proteínas virais como proteínas de cobertura viral. Células humanas sensibilizadas podem ainda ser usadas. Qualquer método para criar anticorpos monoclonais é o uso de bibliotecas de fago de scFv (região variável de cadeia única), especificamente scFv humana (ver por exemplo, Griffiths *et al*., Patentes US 5.885.793 e 5.969.108; McCafferty et al., WO 92/01047; Liming et al., WO 99/06587). Além disso, anticorpos de regeneração revelados na patente US 5.639.641 pode ainda ser usada, como podem os anticorpos quiméricos e anticorpos humanizados. A seleção do agente de ligação à célula apropriado é uma questão de escolha que depende da população de célula particular que deve ser objetivada, mas nos anticorpos monoclonais humanos gerais são preferenciais conforme um apropriado está disponível.

[00415] Por exemplo, o anticorpo monoclonal MY9 é um anticorpo IgG1 murino que se liga especificamente ao antígeno CD33 {J.D. Griffin *et al* 8 Leukemia Res., 521 (1984)} e pode ser usado se as células-alvo expressam CD33 como na doença de leucemia mieloide aguda (AML). O agente de ligação à célula pode ser qualquer composto que se liga a uma célula, em um modo específico ou não específico. Geralmente,

estes podem ser anticorpos (especialmente anticorpos monoclonais e fragmentos de anticorpo), interferons, linfocinas, hormônios, fatores de crescimento, vitaminas, moléculas transportadoras de nutrientes (como transferrina), ou qualquer outra molécula ou substância de ligação à célula.

[00416] Onde o agente de ligação à célula é um anticorpo, este se liga a um antígeno que é um polipeptídeo e pode ser uma molécula transmembrana (por exemplo, receptor) ou um ligante como um fator de crescimento. Antígenos exemplares incluem moléculas como renina; um hormônio de crescimento, incluindo hormônio de crescimento humano e hormônio de crescimento bovino; fator de liberação de hormônio de crescimento; hormônio paratireoide; hormônio estimulante de tireoide; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadeia A de insulina; cadeia B de insulina; proinsulina; hormônio estimulante de folículo; calcitonina; hormônio luteinizante; glucagon; fatores de coagulação como fator vmc, fator IX, fator tecidual (TF), e fator de von Willebrands; fatores anti-coagulantes como proteína C; fator natriurético atrial; surfactante pulmonar; um ativador de plasminogênio, como uroquinase ou urina humana ou ativador de plasminogenio tipo tecidual (t-PA); bombesina; trombina; fator crescimento hematopoiético; fator de necrose tumoral alfa e beta; encefalinase; RANTES (ativação regulada em célula T normalmente expressa e secretada); proteína inflamatória de macrófago humano (MIP-1-alfa); uma albumina sérica, como albumina sérica humana; substância que inibe Muellerian; cadeia A de relaxina; cadeia B de relaxina; prorelaxina; peptídeo associado a gonadotropina de camundongo; uma proteinamicrobiana, como beta-lactamase; DNase; IgE; um antígeno associado a Linfócito T citotóxico (CTLA), como CTLA-4; inibina; activina; fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormônios ou fatores de crescimento; proteína A ou D; fatores reumatoides; um fator neurotrófico como fator

neurotrófico derivado de osso (BDNF), neurotrofina -3, -4, -5, ou- 6 (NT-3, NT4, NT-5, ou NT-6), ou um fator de crescimento de nervo como NGF-β; fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF); fator de crescimento de fibroblasto como aFGF e bFGF; receptor de fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGFR2), fator de crescimento epidérmico (EGF); fator de crescimento de transformação (TGF) como TGF-alfa e TGF-beta, incluindo TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4, ou TGF-□β5; fator de crescimento de insulina tipo I e II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de ligação ao fator de crescimento tipo insulina, melanotransferrina, EpCAM, GD3, FLT3, PSMA, PSCA, MUC1, MUC16, STEAP, CEA, TENB2, receptores EphA, receptores EphB, receptor de folato, FOLR1, mesotelina, cripto, $alfa_v beta_6$, integrinas, VEGF, VEGFR, EGFR, receptor de tarnsferrina, IRTA1, IRTA2, IRTA3, IRTA4, IRTA5; proteínas CD como CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD11, CD14, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD26, CD28, CD30, CD33, CD36, CD37, CD38, CD40, CD44, CD52, CD55, CD56, CD59, CD70, CD79, CD80, CD81, CD103, CD105, CD134, CD137, CD138, CD152 ou um anticorpo que se liga a um ou mais antígenos associados ao tumor ou receptores de superfície celular revelados na publicação US 20080171040 ou publicação US 20080305044 e são incorporados em suas totalidades por referência; eritropoietina; fatores osteoindutores; imunotoxinas; uma proteína morfogenética de osso (BMP); um interferon, como interferons alfa, beta, e gama; fatores estimuladores de colônia (CSFs), por exemplo, M-CSF, GM-CSF, e G-CSF; interleucinas (ILs), por exemplo, IL-1 a IL-10; óxido dismutase; receptores de célula T; proteínas de membrana de superfície; fator de aceleração de decaimento; antígeno viral como, por exemplo, uma porção do envelope HIV; proteinas de transporte; receptores homing; adressinas; proteínas regulatórias; integrinas, como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, um ICAM, VLA-4 e VCAM; um antígeno

associado ao tumor como receptor HER2, HER3 ou HER4; endoglina, c-Met, c-kit, 1GF1R, PSGR, NGEP, PSMA, PSCA, LGR5, B7H4, e fragmentos de qualquer um dos polipeptídeos acima listados.

[00417] Além disso, GM-CSF, que se liga às células mieloides pode ser usado como um agente de ligação à célula para células doentes de leucemia mieloide aguda. IL-2 que se liga às células T ativadas pode ser usado para a prevenção de rejeição de enxerto de transplante, para terapia e prevenção de doença de enxerto-hospedeiro, e para tratamento de leucemia de célula T aguda. MSH, que se liga aos melanócitos, pode ser usado para o tratamento de melanoma, como os anticorpos podem ser direcionados na direção de melanomas. Ácido fólico pode ser usado para direcionar o receptor de folato expresso em tumores ovarianos e outros. Fator de crescimento epidérmico pode ser usado para direcionar aos cânceres escamosos como pulmonar e cabeça e pescoço. Somatostatina pode ser usada para direcionar neuroblastomas e outros tipos de tumor.

[00418] Cânceres de mama e testículos podem ser bem sucedidamente direcionados com estrogênio (ou análogos de estrogênio) ou androgênio (ou análogos de androgênio) respectivamente como agente de ligação à células.

[00419] Em uma modalidade, o agente de ligação à célula é anticorpos monoclonais humanizados. Em outra modalidade, o agente de ligação à célula é huMy9-6, ou outros anticorpos relacionados, que são descritos na patentes US 7.342.110 e 7.557.189 (incorporadas aqui por referência). Em outra modalidade, o agente de ligação à célula é um anticorpo de receptor anti-folato descrito no pedido provisório US 61/307.797, 61/346.595, 61/413.172 e pedido US 13/033.723 (publicado como US 2012-0009181 A1). Os ensinamentos de todos estes pedidos são incorporados aqui por referência em sua totalidade.

[00420] Em determinadas modalidades, o agente de ligação à célula

pode ser um anticorpo monoclonal ou porções de ligação ao antígeno do mesmo compartilhando sequências críticas para ligação ao antígeno com um anticorpo revelado aqui, como huMy9-6 ou seus anticorpos relacionados descritos na patentes US 7.342.110 e 7.557.189 (incorporadas aqui por referência). Estes anticorpos derivados podem ter substancialmente a mesma ou idêntica (1) regiões de cadeia leve e/ou cadeia pesada CDR3; (2) regiões cadeia leve e/ou cadeia pesada CDR1, CDR2, e CDR3; ou (3) regiões de cadeia leve e/ou cadeia pesada, comparados a um anticorpo descrito aqui. As sequências dentro destas regiões podem conter substituições de aminoácido conservadas, incluindo substituintes dentro das regiões CDR. Preferencialmente, não há mais do que 1, 2, 3, 4, ou 5 substituições conservadas. Em determinadas modalidades, os anticorpos derivados têm uma região de cadeia leve e/ou uma região de cadeia pesada que é pelo menos cerca de 90%, 95%, 99% ou 100% idêntica a um anticorpo descrito aqui. Estes anticorpos derivados podem ter substancialmente a mesma especificidade de ligação e/ou afinidade ao antígeno-alvo comparado a um anticorpo descrito aqui. Preferencialmente, os valores de K_d e/ou k_{off} dos anticorpos derivados estão dentro de 10 vezes (maior ou menor), 5 vezes (maior ou menor), 3 vezes (maior ou menor), ou 2 vezes (maior ou menor) de um anticorpo descrito aqui. Estes anticorpos derivados podem ser anticorpos totalmente humanos, ou anticorpos humanizados, ou anticorpos quiméricos. Os anticorpos derivados podem ser produzidos de acordo com os métodos reconhecidos na técnica.

[00421] Em uma modalidade, o anticorpo receptor anti-folato é um anticorpo humanizado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que especificamente se liga um receptor 1 de folato humano, em que o anticorpo compreende: (a) a cadeia pesada CDR1 compreendendo GYFMN (SEQ ID NO: 1); a cadeia pesada CDR2 compreendendo

RIHPYDGDTFYNQXaa1FXaa2Xaa$_3$ (SEQ ID NO: 2); e a cadeia pesada CDR3 compreendendo YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 3); e (b) a cadeia leve CDR1 compreendendo KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 4); a cadeia leve CDR2 compreendendo RASNLEA (SEQ ID NO: 5); e a cadeia leve CDR3 compreendendo QQSREYPYT (SEQ ID NO: 6); em que Xaa$_1$ é selecionado de K, Q, H, e R; Xaa$_2$ é selecionado de Q, H, N, e R; e Xaa$_3$ é selecionado de G, E, T, S, A, e V. Preferencialmente, a sequência de cadeia pesada CDR2 compreende RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO: 7).

[00422] Em outra modalidade, o anticorpo receptor anti-folato é um anticorpo humanizado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que especificamente se liga ao receptor 1 de folato humano compreendendo a cadeia pesada contendo a sequência de aminoácido de

QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHP
YDGDTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAM
DYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 8).

[00423] Em outra modalidade, o anticorpo anti-folato é um anticorpo humanizado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo codificado pelo plasmídeo de DNA depositado com o ATCC em 7 de abril de 2010 e contendo N.ºs de depósito ATCC PTA-10772 e PTA-10773 ou 10774.

[00424] Em outra modalidade, o anticorpo receptor anti-folato é um anticorpo humanizado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que especificamente se liga ao receptor 1 de folato humano compreendendo a cadeia leve contendo a sequência de aminoácido de

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLIYRA
SNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEI
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO: 9); ou
DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLIYRA
SNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEI
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO: 10).

[00425] Em outra modalidade anticorpo receptor anti-folato é um anticorpo humanizado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que especificamente se liga ao receptor 1 de folato humano compreendendo a cadeia pesada contendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 8, e a cadeia leve contendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10. Preferencialmente, o anticorpo compreende a cadeia pesada contendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 8 e a cadeia leve contendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 10 (hu FOLR1).

[00426] Em outra modalidade, o anticorpo receptor anti-folato é um anticorpo humanizado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo codificado pelo plasmídeo de DNA depositado com o ATCC em 7 de abril de 2010 e contendo N.ºs de depósito ATCC PTA-10772 e PTA-10773 ou 10774.

[00427] Em outra modalidade, o anticorpo receptor anti-folato é um anticorpo humanizado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreendendo um domínio variável de cadeia pesada pelo menos cerca de 90%, 95%, 99% ou 100% idêntico a

[00428] QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVK QSPGQSLEWIGRIHPYDGDTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLS LTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 11),

[00429] e um domínio variável de cadeia leve pelo menos cerca de

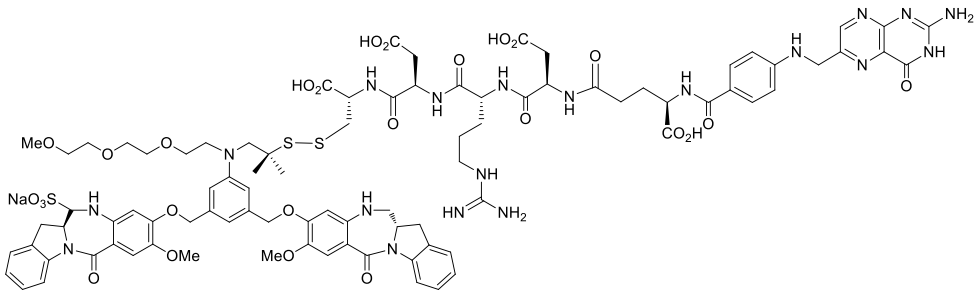
90%, 95%, 99% ou 100% idêntico a

[00430] DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 12); ouDIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 13).

CONJUGADOS DE AGENTE DE LIGAÇÃO À CÉLULA-FÁRMACO

[00431] A presente invenção ainda fornece conjugados de agente de ligação à célula-fármaco compreendendo um agente de ligação à célula ligado a um ou mais compostos citotóxicos da presente invenção através de uma variedade de ligantes, incluindo, entre outros, ligantes dissulfeto, ligantes tioéter, ligantes de ligação a amida, ligantes lábeis a peptidase, ligantes lábeis a ácido, ligantes lábeis a esterase.

[00432] Conjugados representativos da invenção são anticorpo/composto citotóxico, fragmento de anticorpo/composto citotóxico, fator de crescimento epidérmico (EGF)/composto citotóxico, hormônio estimulante de melanócito (MSH)/composto citotóxico, hormônio estimulante de tireoide (TSH)/composto citotóxico, somatostatina/composto citotóxico, folato/composto citotóxico, estrogênio/composto citotóxico, análogo de estrogênio/composto citotóxico, androgênio/composto citotóxico, e análogo de androgênio/composto citotóxico. Um conjugado representativo de folato/composto citotóxico é representado abaixo, com o aduto opcional $-SO_3^-Na^+$ na ligação imina de um dos monômeros de fármaco. Um esquema de síntese representativo para este conjugado é mostrado na Figura 54.



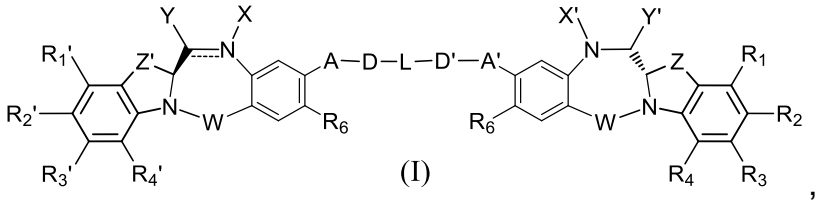
conjugado folato/composto citotóxico

[00433] Em uma modalidade preferencial, a presente invenção fornece conjugados compreendendo um composto dímero indolinobenzodiazepina (por exemplo, compostos de fórmulas (I)-(IV), (IA)-(IVA) e (IB)-(IVB)) e o agente de ligação à célula ligados por uma ligação covalente. O ligante pode ser clivado no local das células de proliferação de tumor/não desejadas para liberar o agente citotóxico ao seu-alvo em um número de vias. O ligante pode ser clivado, por exemplo, por pH baixo (hidrazona), ambiente redutor (dissulfeto), proteólise (ligação de amida/peptídeo), ou por uma reação enzimática (esterase/glicosidase).

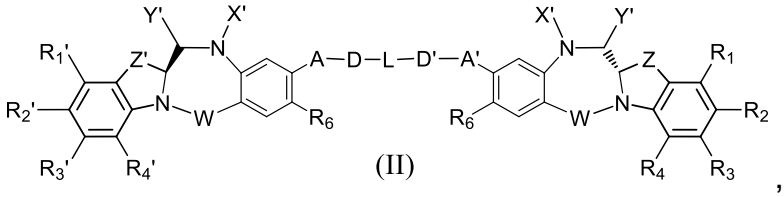
[00434] Em um aspecto preferencial, conjugados citotóxicos representativos da invenção são composto dímero anticorpo/indolinobenzodiazepina, composto dímero de fragmento de anticorpo/indolinobenzodiazepina, composto dímero fator de crescimento epidérmico (EGF)/indolinobenzodiazepina, composto dímero hormônio estimulante de melanócito (MSH)/indolinobenzodiazepina, composto dímero hormônio estimulante de tireoide (TSH)/indolinobenzodiazepina, composto dímero somatostatina/ indolinobenzodiazepina, composto dímero folato/ indolinobenzodiazepina, composto dímero estrogênio/indolinobenzodiazepina, composto dímero análogo de estrogênio/indolinobenzodiazepina, composto dímero inibidor de antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) /indolinobenzodiazepina, composto dímero matriptase

inibidor/indolinobenzodiazepina, composto dímero proteínas de repetição de anquirina desenhadas (DARPins)/indolinobenzodiazepina, composto dímero androgênio/indolinobenzodiazepina, e composto dímero análogo de androgênio/ indolinobenzodiazepina.

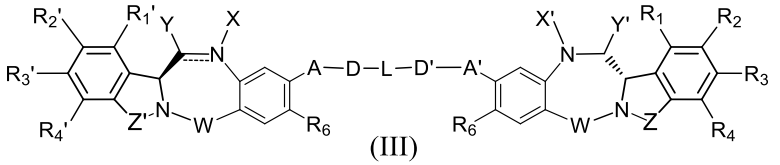
[00435] Assim na décima quarta modalidade específica, a invenção fornece um conjugado compreendendo: um composto citotóxico e um agente de ligação à célula (CBA), em que o composto citotóxico compreende um grupo ligante que covalentemente se liga o composto citotóxico ao CBA, e em que o composto citotóxico é representado por qualquer uma das seguintes fórmulas:



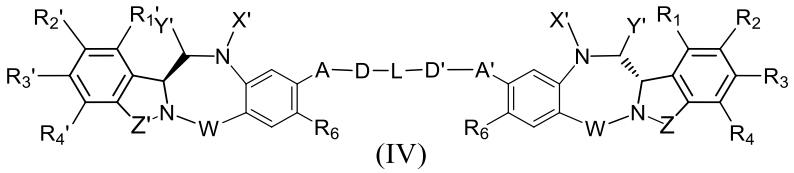
(I) ,



(II) ,



(III) ,



(IV)

[00436] ou um sal farmaceuticamente aceitável das mesmas, em que:

[00437] a linha dupla ⎓ entre N e C representa uma ligação simples ou uma ligação dupla, desde que quando este é uma ligação dupla X é ausente e Y é -H, ou uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono, e quanto este é uma ligação simples, X é -H, o

grupo de ligação, ou uma porção protetora de amina;

[00438] Y é -H ou um grupo de saída selecionado de -OR, -OCOR', -OCOOR', -OCONR'R'', -NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', um heterociclo opcionalmente substituído de 5 ou 6 membros contendo nitrogênio (por exemplo, piperidina, tetra-hidropirrol, pirazol, morfolina), um guanidínio representado por -NR'(C=NH)NR'R'', um aminoácido, ou um peptídeo representado por -NRCOP', em que P' é um aminoácido ou um polipeptídeo contendo entre 2 a 20 unidades de aminoácidos, -SR, -SOR', $-SO_2M$, $-SO_3M$, $-OSO_3M$, halogênio, ciano e um azido; ou,

[00439] Y é um sulfito (HSO_3, HSO_2 ou um sal de HSO_3^-, SO_3^{2-} ou HSO_2^- formado com um cátion), metabissulfito ($H_2S_2O_5$ ou um sal de $S_2O_5^{2-}$ formado com um cátion), mono-, di-, tri-, e tetra- tiofosfato (PO_3SH_3, $PO_2S_2H_2$, POS_3H_2, PS_4H_2 ou um sal de PO_3S^{3-}, $PO_2S_2^{3-}$, POS_3^{3-} ou PS_4^{3-} formado com um cátion), éster tio fosfato $(R^iO)_2PS(OR^i)$, R^iS-, R^iSO, R^iSO_2, R^iSO_3, tiossulfato (HS_2O_3 ou um sal de $S_2O_3^{2-}$ formado com um cátion), ditionito (HS_2O_4 ou um sal de $S_2O_4^{2-}$ formado com um cátion), fosforoditioato $(P(=S)(OR^{k'})(S)(OH)$ ou um sal do mesmo formado com um cátion), ácido hidroxâmico ($R^{k'}C(=O)NOH$ ou um sal formado com um cátion), formaldeído sulfoxilato ($HOCH_2SO_2^-$ ou um sal de $HOCH_2SO_2^-$ formado com um cátion, como $HOCH_2SO_2^-Na^+$) ou uma mistura dos mesmos, em que R^i é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 10 átomos de carbono e é substituído com pelo menos um substituinte selecionado de $-N(R^j)_2$, $-CO_2H$, $-SO_3H$, e $-PO_3H$; R^i pode ser ainda opcionalmente substituído com um substituinte para um alquil descrito aqui; R^j é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono; $R^{k'}$ é uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, arila, heterociclila ou heteroarila; preferencialmente, Y é um aduto de um bissulfito, um hidrossulfito, ou um metabissulfito, ou sais dos mesmos (como sal de sódio);

[00440] M é -H ou um cátion;

[00441] R, para cada ocorrência, é independentemente selecionada do grupo que consiste em -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, uma arila opcionalmente substituída contendo 6 a 18 átomos de carbono, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, ou um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[00442] R' e R'' são cada um independentemente selecionados de -H, -OH, -OR, -NHR, $-NR_2$, -COR, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[00443] R^c é -H ou uma alquila linear ou ramificada substituída ou não substituída contendo 1 a 4 átomos de carbono, ou o grupo de ligação;

[00444] n é um inteiro de 1 a 24;

[00445] W é selecionado de C=O, C=S, CH_2, BH, SO e SO_2;

[00446] X' é selecionado de -H, um grupo de proteção amina, o grupo de ligação, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, uma arila opcionalmente substituída contendo 6 a 18 átomos de carbono, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio,

oxigênio e enxofre, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[00447] Y' é selecionado de -H, um grupo oxo, o grupo de ligação, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma arila opcionalmente substituída de 6 a 18 membros, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos;

[00448] R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' e R_4' são cada um independentemente selecionados do grupo que consiste em -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, halogênio, guanidínio [$-NH(C=NH)NH_2$], -OR, -NR'R'', $-NO_2$, -NCO, -NR'COR'', -SR, um sulfóxido representado por -SOR', uma sulfona representada por $-SO_2R'$, um sulfonato $-SO_3^-M^+$, um sulfato $-OSO_3^-M^+$, uma sulfonamida representada por $-SO_2NR'R''$, ciano, um azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R'' e o grupo de ligação;

[00449] R_6 é -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', $-NO_2$, halogênio ou o grupo de ligação;

[00450] Z e Z' são independentemente selecionados de $-(CH_2)_{n'}-$, $-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}-$, $-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}-$, $-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}-$ e $-(CH_2)_{n'}–S-(CH_2)_{na'}-$;

[00451] n' e na' são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de 0, 1, 2 e 3;

[00452] R_7 e R_8 são os mesmos ou diferentes, e são cada um independentemente selecionados de -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', uma

unidade de polietilenoglicol -$(OCH_2CH_2)_n$-, um aminoácido, uma unidade de peptídeo contendo 2 a 6 aminoácidos, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono;

[00453] R_9 é independentemente selecionado de -H, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol -$(OCH_2CH_2)_n$-;

[00454] A e A' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de -O-, oxo (-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -NR_5 e -CRR'N(R_5)-;

[00455] R_5 para cada ocorrência é independentemente -H ou uma alquila linear ou ramificada opcionalmente substituída contendo 1 a 10 átomos de carbono;

[00456] D e D' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente ausentes ou selecionados do grupo que consiste em uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo 1 a 10 átomos de carbono, um aminoácido, um peptídeo contendo 2 a 6 aminoácidos, e uma unidade de polietilenoglicol (-$OCH_2CH_2)_n$-;

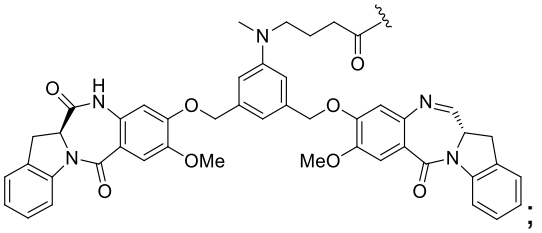
[00457] L é ausente, o grupo de ligação, uma unidade de polietilenoglicol (-$OCH_2CH_2)_n$-, uma alquila ou alquenila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, um grupo fenila, um anel heterocíclico de 3 a 18 membros ou um anel heteroaril de 5 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P, em que a alquila ou alquenila é opcionalmente substituída com o grupo de ligação; fenila ou anel heterocíclico ou heteroarila pode ser opcionalmente substituída, em que o substituinte pode ser o grupo de ligação.

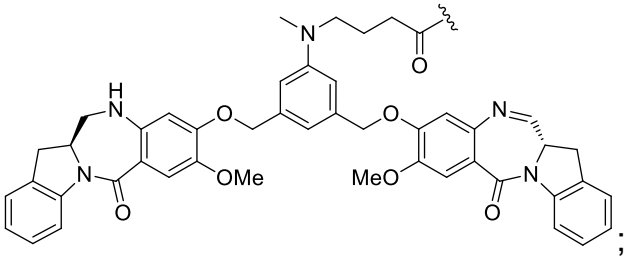
[00458] Em determinadas modalidades, X não é o grupo de ligação. Em determinadas modalidades, a linha dupla ⎓ entre N e C representa

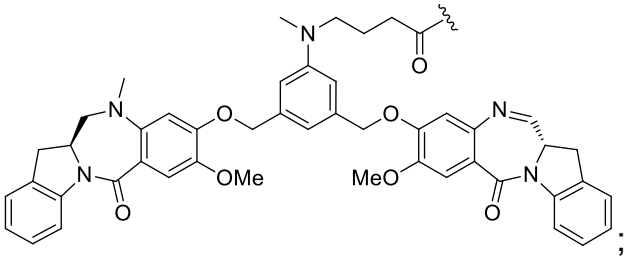
uma ligação simples, Y não é -H.

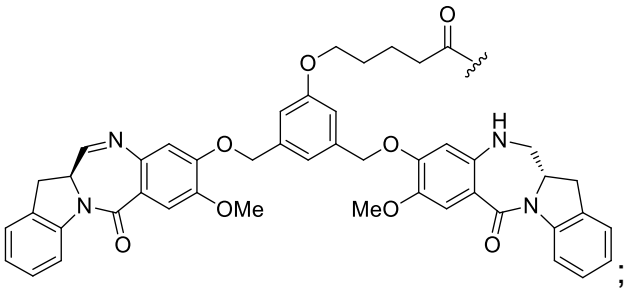
[00459] Em determinadas modalidades, Y é um grupo de saída selecionado de -OR, -OCOR', -OCOOR', -OCONR'R'', -NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', um heterociclo opcionalmente substituído de 5 ou 6 membros contendo nitrogênio (por exemplo, piperidina, tetra-hidropirrol, pirazol, morfolina, *etc*.), um guanidínio representado por -NR'(C=NH)NR'R'', um aminoácido, ou um peptídeo representado por -NRCOP', em que P' é um aminoácido ou um polipeptídeo contendo entre 2 a 20 unidades de aminoácidos, -SR, -SOR', $-SO_2M$, $-SO_3M$, $-OSO_3M$, halogênio, ciano e um azido.

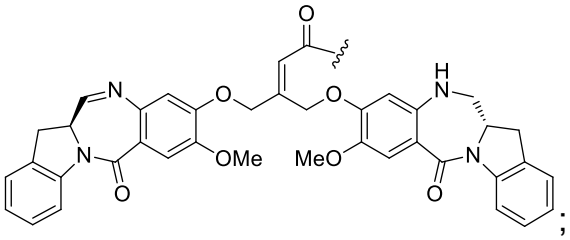
[00460] Em determinadas modalidades, o composto não é qualquer um dos seguintes compostos:

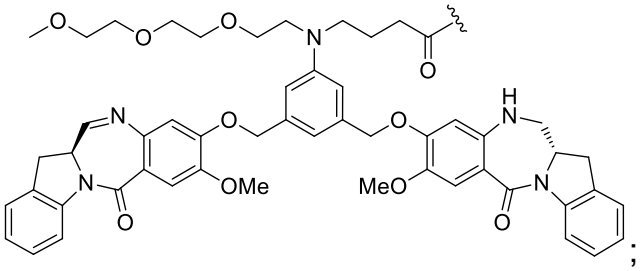


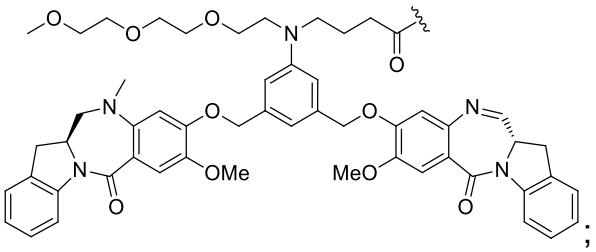


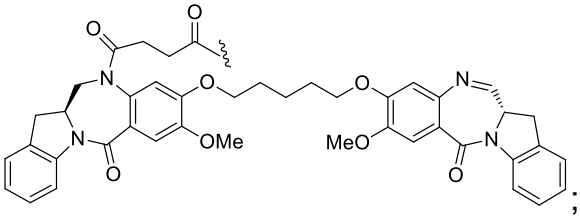


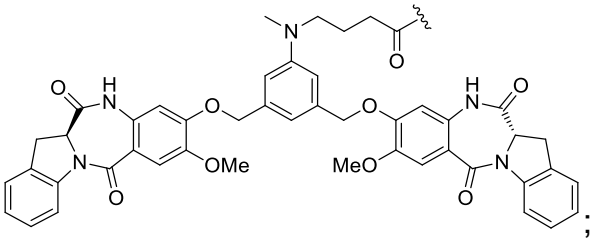


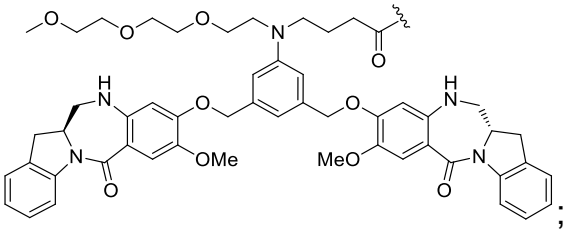

;

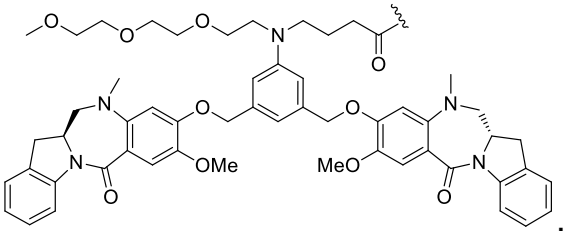

;


;

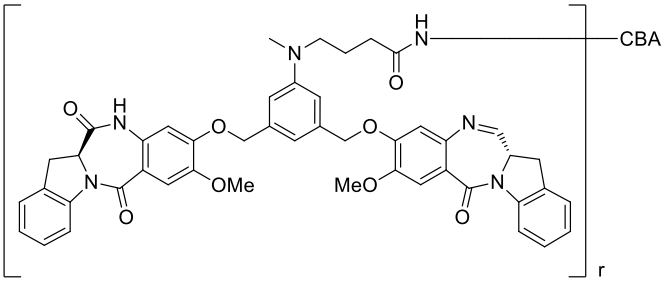

;


;

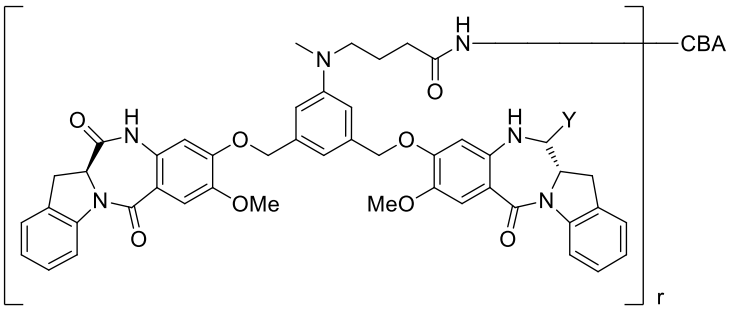

;


.

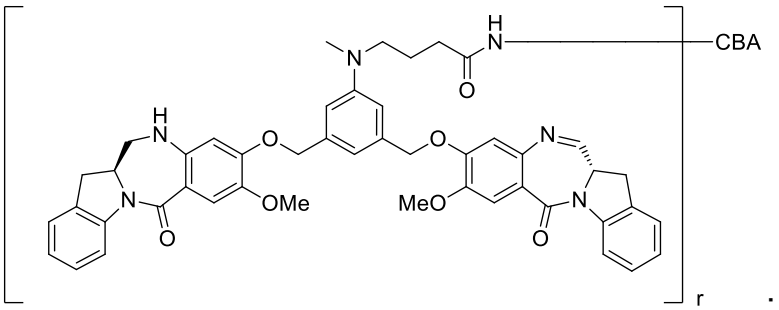
[00461] Em determinadas modalidades, os conjugados da invenção incluem os seguintes:



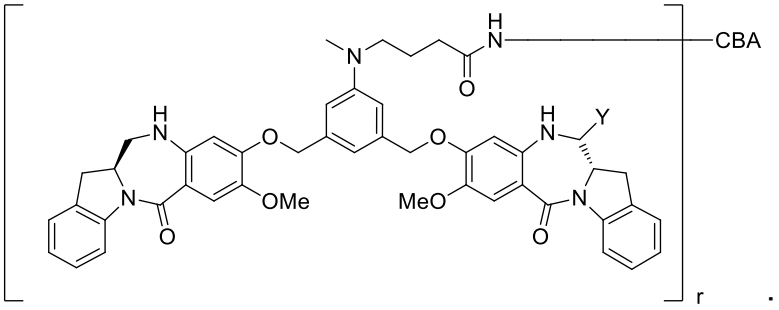
;



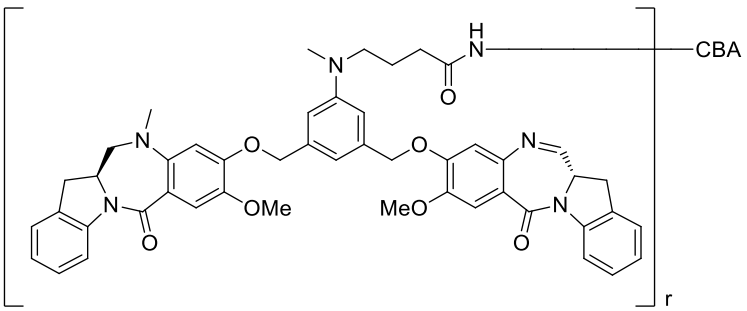
;



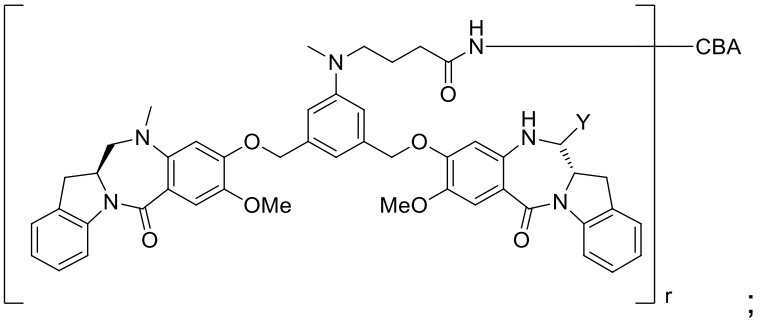
;



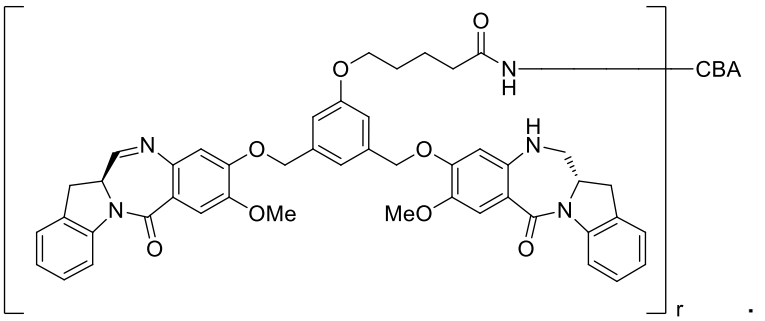
;



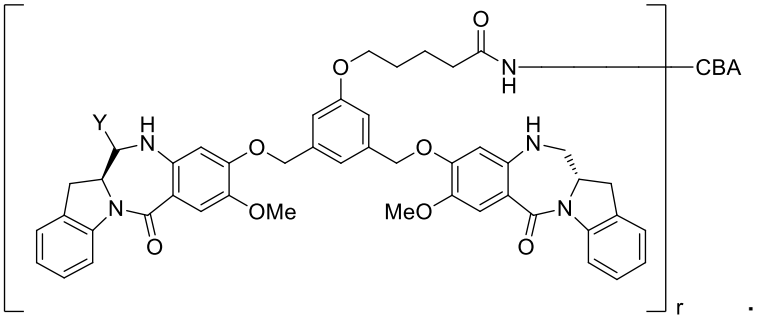
;


CBA
r

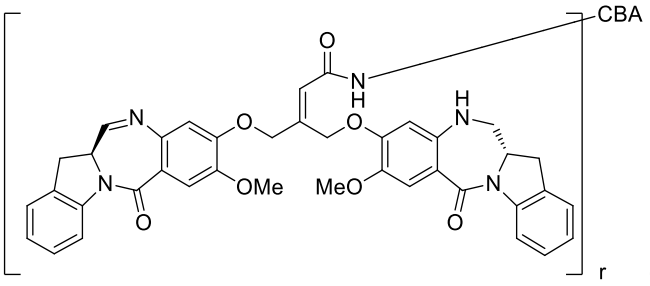
;


CBA
r

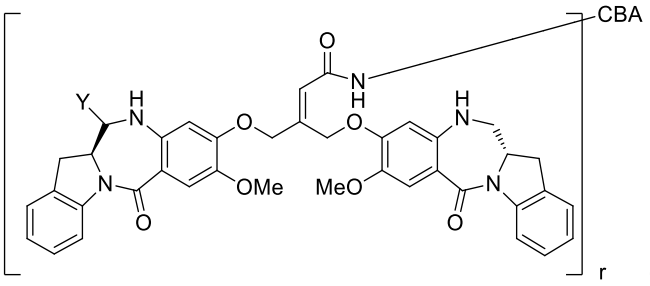
;


CBA
r

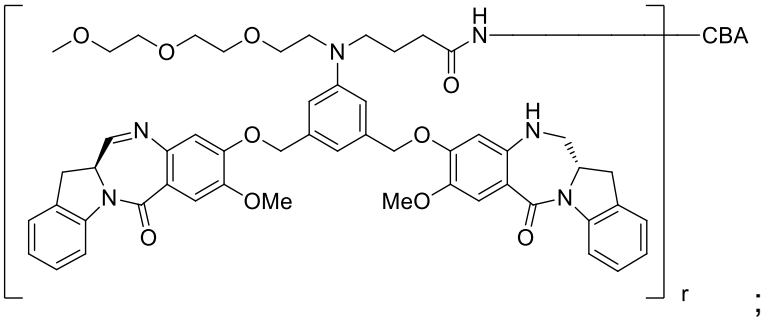
;


CBA
r

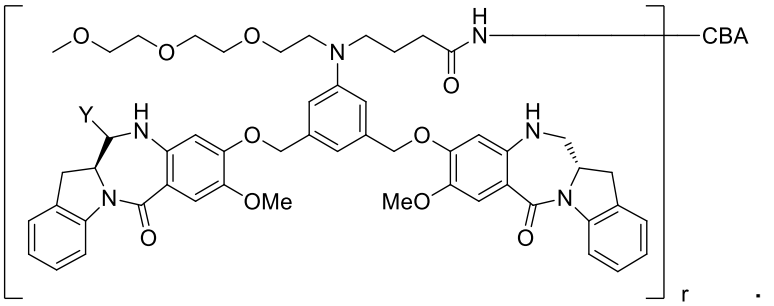
;


CBA
r

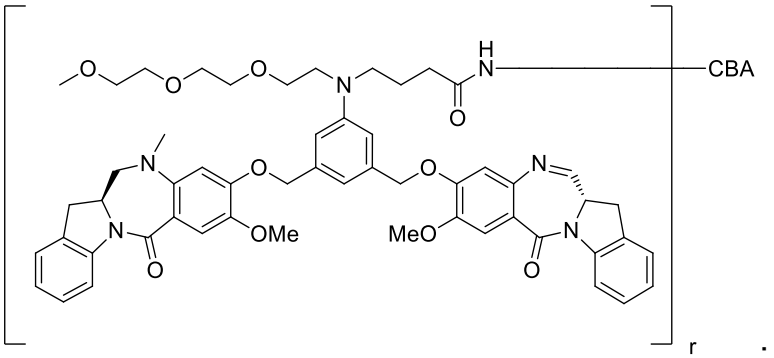
;


CBA
OMe
MeO
r

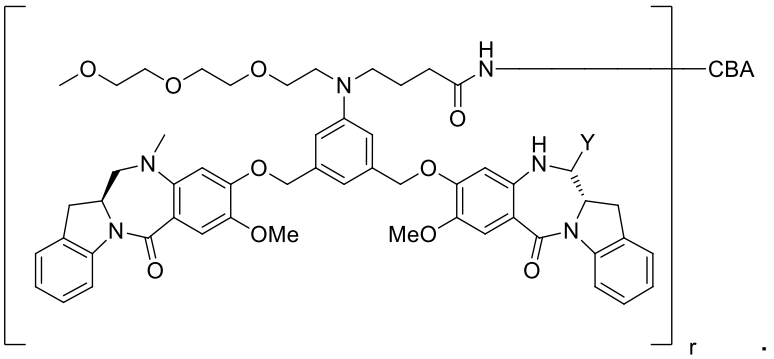
;


CBA
Y
OMe
MeO
r

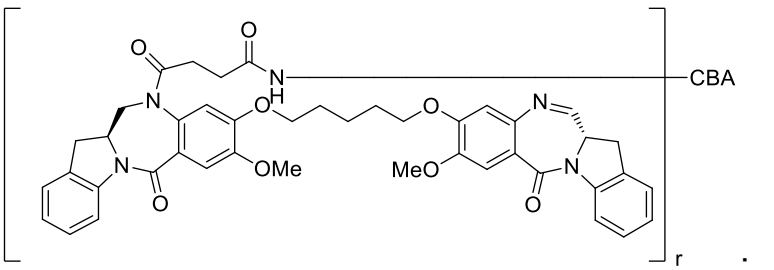
;


CBA
OMe
MeO
r

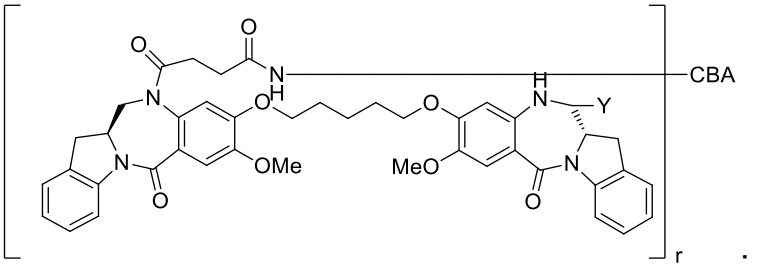
;


CBA
Y
OMe
MeO
r

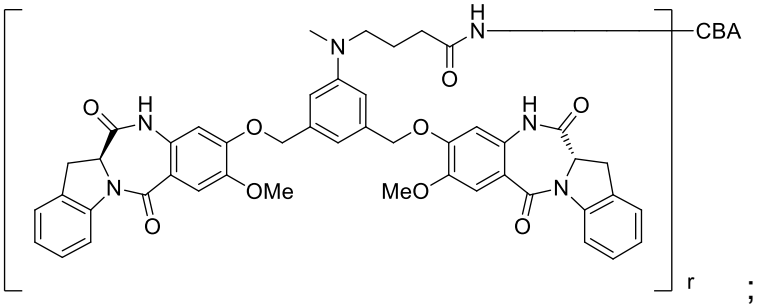
;


CBA
OMe
MeO
r

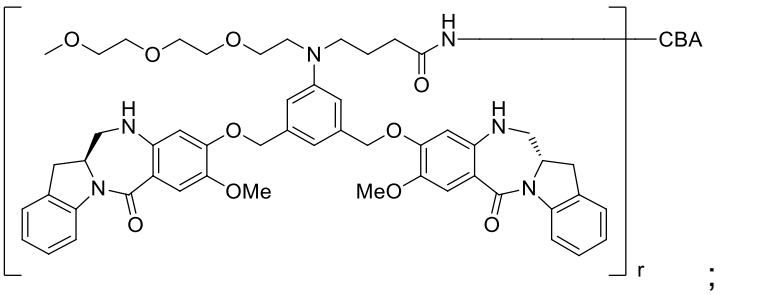
;



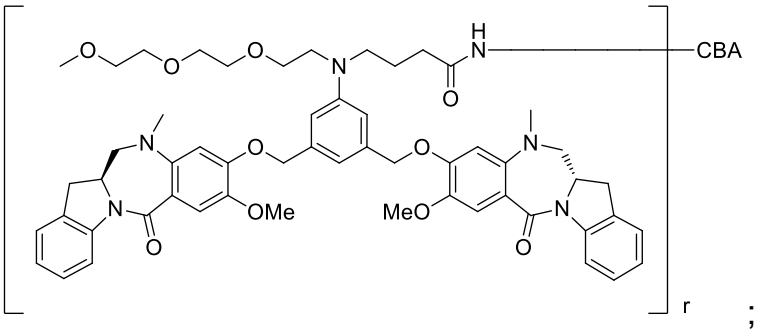
;



;



;



;

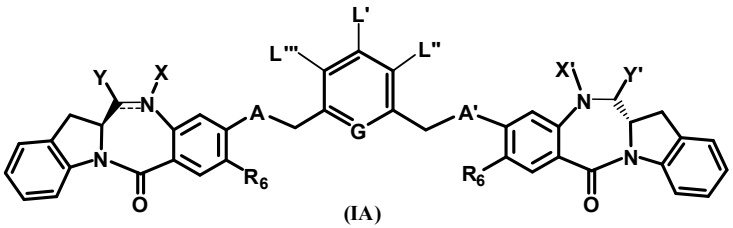
[00462] em que:

[00463] CBA é o agente de ligação à célula, r é um inteiro de 1 a 10, Y é -H, an aduto de um bissulfito, um hidrossulfito, ou um metabissulfito, ou sais dos mesmos, ou $-SO_3M$, e M é -H ou um cátion farmaceuticamente aceitável.

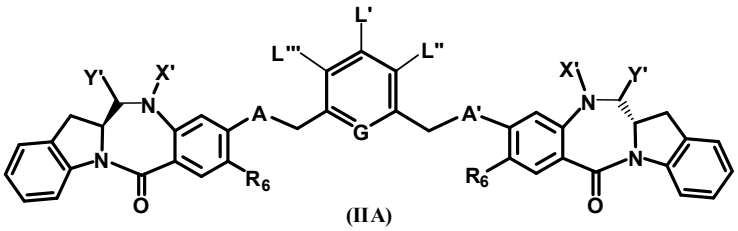
[00464] Em determinadas modalidades, L é ausente, ou é selecionado de um grupo fenila opcionalmente substituída e um grupo piridila opcionalmente substituída, em que o grupo fenila e o piridil contêm o grupo de ligação, ou L é um grupo amina contendo o grupo de

ligação (ou seja, -N(grupo ligante)-), ou L é uma alquila ou alquenila linear, ramificada ou cíclica contendo de 1 a 6 átomos de carbono e contendo o grupo de ligação.

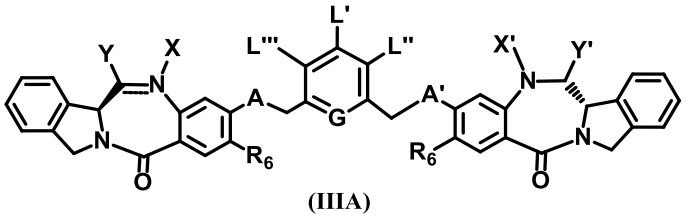
[00465] Na décima quinta modalidade específica, o composto é representado por qualquer uma das seguintes fórmulas:



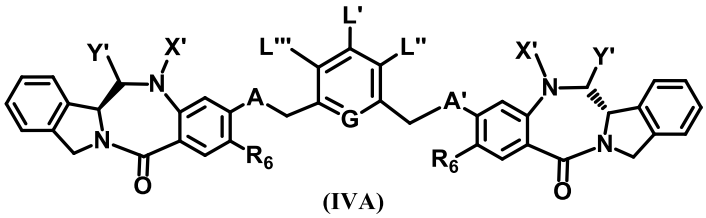
(IA) ;



(IIA) ;



(IIIA) ,



(IVA) ,

[00466] em que:

[00467] L', L'', e L''' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, halogênio, guanidínio [$-NH(C=NH)NH_2$], -OR, -NR'R'', $-NO_2$, -NR'COR'', -SR, um sulfóxido representado por -SOR', uma sulfona representada por $-SO_2R'$, um sulfonato $-SO_3M$, um sulfato -

OSO_3M, uma sulfonamida representada por $-SO_2NR'R''$, ciano, um azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R'' e o grupo de ligação, contanto que somente um de L', L'', e L''' é o grupo de ligação; e

[00468] G é selecionado de -CH- ou -N-. Os demais grupos são como descrito na décima quarta modalidade específica acima.

[00469] Em determinadas modalidades, um de L', L'', ou L''' é o grupo de ligação, enquanto os outros são -H. Preferencialmente, L' é o grupo de ligação, e L'' e L''' são -H.

[00470] Em determinadas modalidades, A e A' são ambos -O-, R_6 é -OMe, e G é -CH-.

[00471] Na décima sexta modalidade específica, L' é representado pela seguinte fórmula:

$$-W'-R^x-V-R^y-J,$$

[00472] em que:

[00473] W' e V são os mesmos ou diferentes, e são cada um independentemente ausente ou selecionado de $-CR^eR^{e'}-$, -O-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -S-, -SO-, $-SO_2-$, $-CH_2-S-$, $-CH_2O-$, $-CH_2NR^e-$, -O-(C=O)O-, -O-(C=O)N(R^e)-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)-, -C(=O)-N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)O-, -N(C(=O)R^e)C(=O)-, -N(C(=O)R^e)-, $-(O-CH_2-CH_2)_n-$, -SS-, ou -C(=O)-, ou um aminoácido, ou um peptídeo contendo 2 a 8 aminoácidos;

[00474] R^x e R^y são os mesmos ou diferentes, e são cada um independentemente ausente ou uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo 1 a 10 átomos de carbono, um aril contendo 6 a 10 átomos de carbono ou um anel heterocíclico de 3 a 8 membros contendo 1 a 3 heteroátomos selecionados de O, N ou S;

[00475] R^e e $R^{e'}$ são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono ou $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$, em que R^k é

um -H, uma alquila linear, ramificada cíclica contendo 1 a 6 átomos de carbono, opcionalmente contendo um grupo amino secundário (por exemplo, -NHR^{101}) ou amino terciário (-$NR^{101}R^{102}$) ou um heterociclo de 5 ou 6 membros contendo nitrogênio, como piperidina ou morfolina, em que R^{101} e R^{102} são cada um independentemente uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono; preferencialmente, R^{101} e R^{102} são cada um independentemente uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono;

[00476] n é um inteiro de 1 a 24; e

[00477] J é covalentemente ligado ao CBA, e é selecionado de uma succinimida, um acetamido, -S-, -SS-, -CH_2S-, -CH(Me)S-, -$C(Me)_2$S-, -NR^{c1}-, -CH_2NR^{c1}-, -NR^{c1}N-, e -C(=O)-, em que R^{c1} é -H ou uma alquila linear ou ramificada substituída ou não substituída contendo 1 a 4 átomos de carbono.

[00478] Em determinadas modalidades, J é -S-, -SS-, uma succinimida, ou -C(=O)-.

[00479] Em determinadas modalidades, $R^{e'}$ é -H ou -Me; R^{e} é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono ou -$(CH_2$-CH_2-$O)_n$-R^k; n é um inteiro de 2 a 8; e R^k é -H, -Me ou -CH_2CH_2-NMe_2, e as demais das variáveis são como descrito acima na décima quinta modalidade específica.

[00480] Em determinadas modalidades, V é um aminoácido ou um peptídeo contendo 2 a 8 aminoácidos.

[00481] Em determinadas modalidades, V é valina-citrulina, gly-gly-gly, ou ala-leu-ala-leu.

[00482] Em determinadas modalidades,

[00483] W' é -O-, -N(Re)- ou -N(Re)-C(=O)-;

[00484] R^{e} é H, uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono, ou -$(CH_2$-CH_2-$O)_n$-R^k;

[00485] R^x é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono;

[00486] V é ausente, -(O-CH2-CH2)$_n$-, -C(=O)-NH-, -S-, -NH-C(=O)-;

[00487] R^y é ausente ou uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono; e

[00488] J é -S-, -SS-, ou -C(=O)-, e os demais grupos são como definido na décima sexta modalidade específica.

[00489] Em determinadas modalidades,

[00490] W' é -O-, -N(Re)- ou -N(Re)-C(=O)-;

[00491] R^e é -H, -Me, ou -(CH_2-CH_2-O)$_n$-Me;

[00492] n é um inteiro de 2 a 6;

[00493] R^x é alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono;

[00494] V e R^y são ausentes; e

[00495] J é -C(=O)-. Os demais grupos são como definido na décima sexta modalidade específica.

[00496] Na décima sétima modalidade específica, L' na décima sexta modalidade específica é representado pela seguinte fórmula:

$$-W'-[CR_{1''}R_{2''}]_a-V-[Cy]_{0-1}-[CR_{3''}R_{4''}]_b-C(=O)-,$$

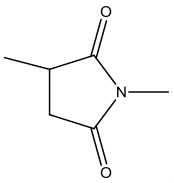
[00497] em que:

[00498] $R_{1''}$, $R_{2''}$, e $R_{3''}$ são cada um independentemente -H ou uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono, preferencialmente -Me;

[00499] $R_{4''}$ é -H, uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono (preferencialmente -Me), -SO_3H, ou -$SO_3^-M^+$, em que M^+ é um cátion farmaceuticamente aceitável;

[00500] a é um inteiro de 0-5 (por exemplo, de 0 a 2, 3, 4, ou 5), e b é um inteiro de 0-6 (por exemplo, de 0 a 3, 4, 5, ou 6); e,

[00501] Cy é um anel heterocíclico de 5 membros opcionalmente substituído contendo um N heteroátomo, preferencialmente Cy é



.

[00502] Em determinadas modalidades, como na décima sexta ou a décima sétima modalidade específica, W' é -N(R^e)-.

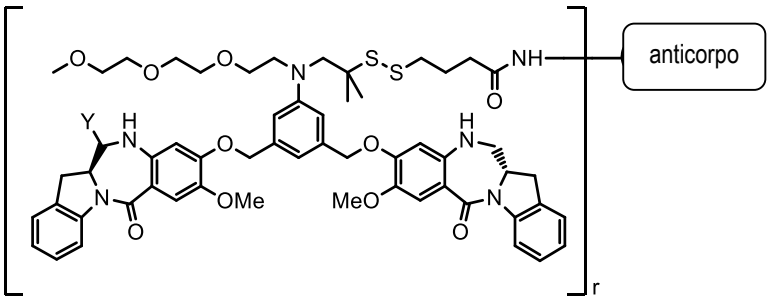
[00503] Em determinadas modalidades, como na décima sexta ou a décima sétima modalidade específica, R^e é -$(CH_2$-CH_2-$O)_{2-6}$-R^k, em que R^k é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono.

[00504] Em determinadas modalidades, como na décima sexta ou a décima sétima modalidade específica, V é -S- ou -SS-.

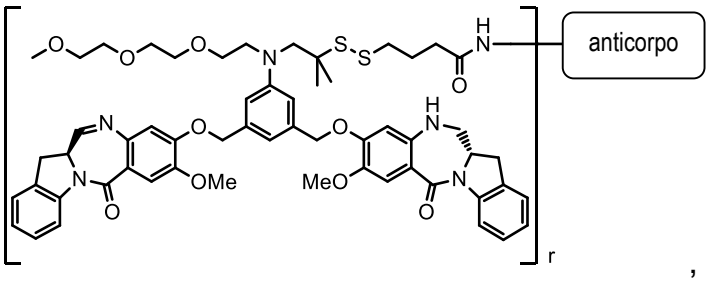
[00505] Na décima oitava modalidade específica, L' na décima sexta ou a décima sétima modalidade específica é representado pela seguinte fórmula:

$$NR^e\text{-}[CR_{1''}R_{2''}]_a\text{-}S\text{-}[CR_{3''}R_{4''}]_b\text{-}C(=O)\text{-}.$$

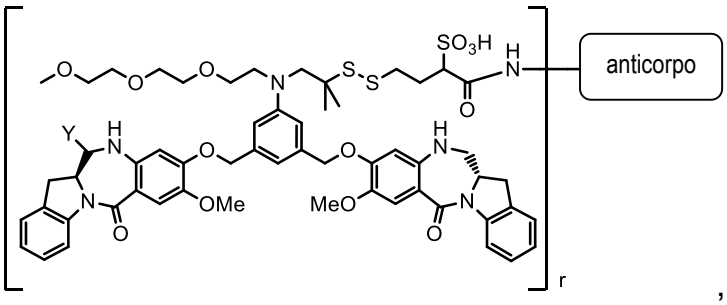
[00506] Em determinadas modalidades, como na décima sexta até a décima oitava modalidades específicas, o conjugado é:



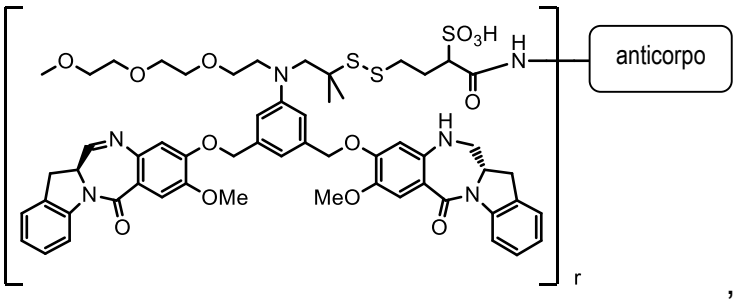
,



,



, ou



,

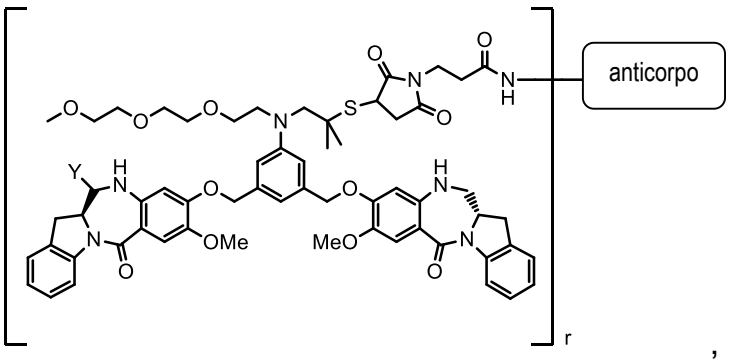
[00507] em que r é um inteiro de 1 a 10, Y é -H ou $-SO_3M$ (por exemplo, Y é $-SO_3M$), e M é -H ou um cátion farmaceuticamente aceitável.

[00508] Em determinadas modalidades, como na décima sexta até a décima oitava modalidades específicas, o anticorpo é huMy9-6.

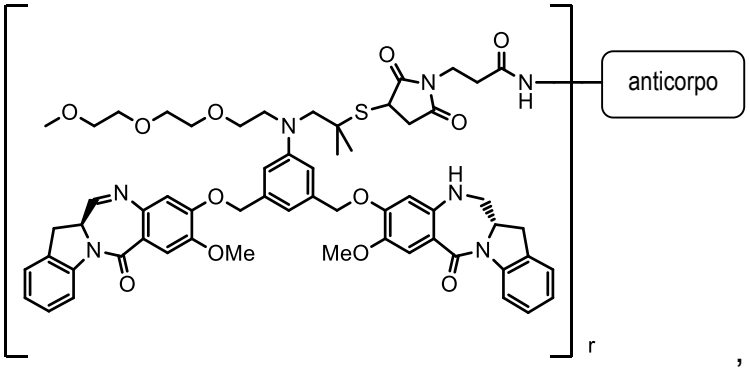
[00509] Na décima nona modalidade específica, L' na décima sexta ou a décima sétima modalidade específica é representado pela seguinte fórmula:

$$NR^e\text{-}[CR_{1''}R_{2''}]_a\text{-}S\text{-}Cy\text{-}[CR_{3''}R_{4''}]_b\text{-}C(=O)\text{-}.$$

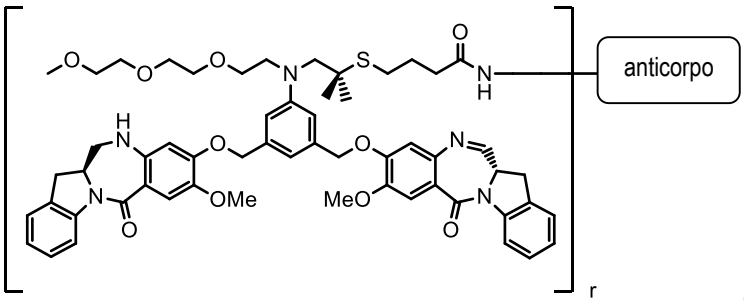
[00510] Em determinadas modalidades, como na décima sexta, décima sétima, e a décima nona modalidades específicas, o conjugado é:



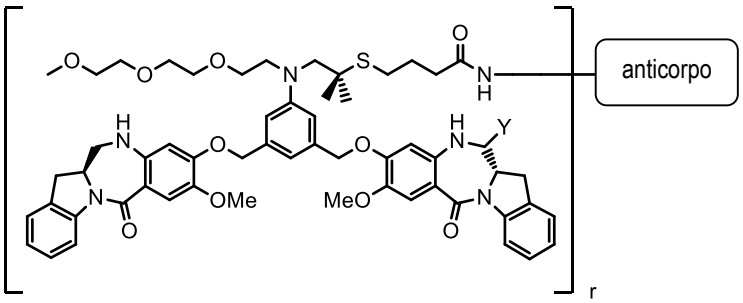
,



,



, ou,

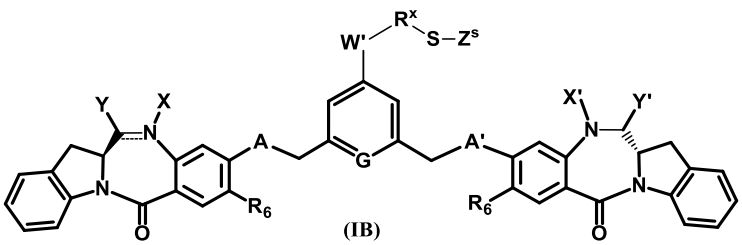


,

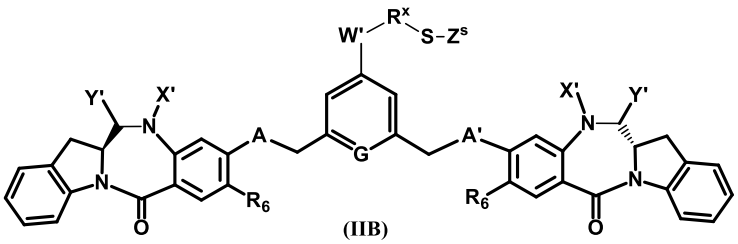
[00511] em que r é um inteiro de 1 a 10, Y é -H ou $-SO_3M$ (por exemplo, Y é $-SO_3M$), e M é -H ou um cátion farmaceuticamente aceitável.

[00512] Em determinadas modalidades, como na décima sexta, décima sétima, e a décima nona modalidades específicas, o anticorpo é huMy9-6.

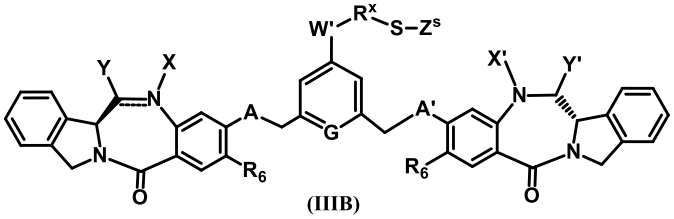
[00513] Na vigésima modalidade específica, o composto é representado pela seguinte fórmula:



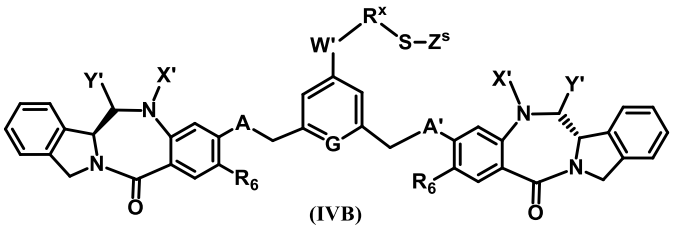
,



,



,



,

[00514] em que:

[00515] W' é ausente ou selecionado de -O-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)-, -N(C(=O)R^e)-, -S-, -CH_2-S-, ou -CH_2NR^e-;

[00516] R^x é ausente ou selecionado de uma alquila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono;

[00517] R^e é -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada, cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono ou -(CH_2-CH_2-O)$_n$-R^k, em que R^k é um -H, uma alquila linear, ramificada cíclica contendo 1 a 6 átomos de carbono, opcionalmente contendo um grupo amino secundário (por exemplo, -NHR^{101}) ou amino terciário (-N$R^{101}R^{102}$) ou um heterociclo contendo nitrogênio de 5 ou 6 membros, como piperidina ou morfolina, em que R^{101} e R^{102} são cada um independentemente uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono;

[00518] Z^s é ligado ao CBA, e é ou uma ligação, ou -SR^m-;

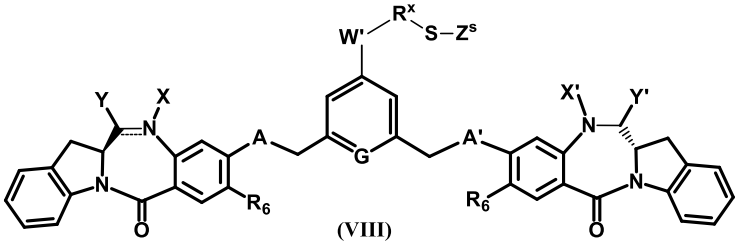
[00519] R^m é R^d ou um alquila substituída linear ou ramificado contendo 1 a 4 átomos de carbono contendo éster reativo, selecionado

de ésteres N-hidroxissuccinimida, ésteres N-hidroxiftalimida, ésteres N-hidróxi sulfo-succinimida, ésteres para-nitrofenila, ésteres dinitrofenila, e ésteres pentafluorfenila;

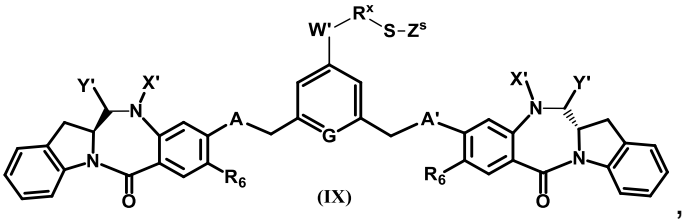
[00520] R^d é selecionado de fenila, nitrofenila, dinitrofenila, carboxinitrofenila, piridila ou nitropiridila; e

[00521] n é um inteiro de 1 a 24; e as demais das variáveis são como descrito acima na oitava ou a décima quinta modalidade específica.

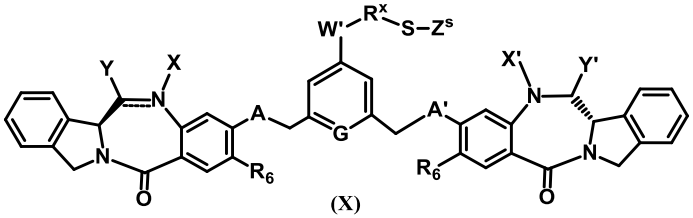
[00522] Em uma vigésima primeira modalidade específica, o composto é representado pela seguinte fórmula:



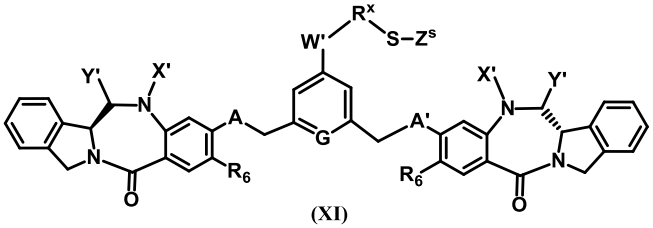
(VIII),



(IX),



(X),



(XI),

[00523] em que:

[00524] W' é ausente ou selecionado de -O-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)-, -N(C(=O)R^e)-, -S-, -CH_2-S-, ou -CH_2NR^e-;

[00525] R^x é ausente ou selecionado de uma alquila linear,

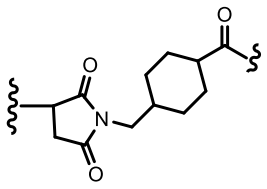
ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono;

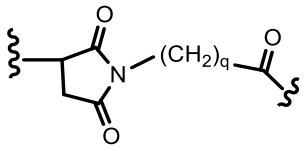
[00526] R^e é -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada, cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono ou $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$, em que R^k é um -H, uma alquila linear, ramificada cíclica contendo 1 a 6 átomos de carbono, opcionalmente contendo um grupo amino secundário (por exemplo, $-NHR^{101}$) ou amino terciário ($-NR^{101}R^{102}$) ou um heterociclo contendo nitrogênio de 5 ou 6 membros, como piperidina ou morfolina, em que R^{101} e R^{102} são cada um independentemente uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono;

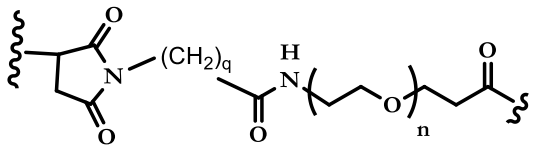
[00527] n é um inteiro de 2 a 6;

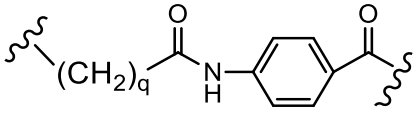
[00528] Z^s é ligado ao CBA, e é selecionado de:

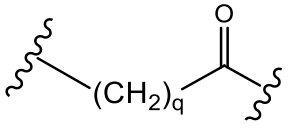
[00529] uma ligação;

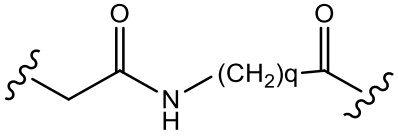

(b1);

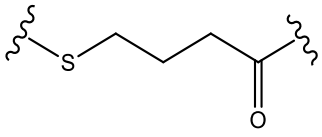

(b2);


(b3);

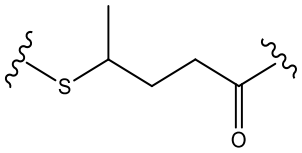

(b4);


(b5);

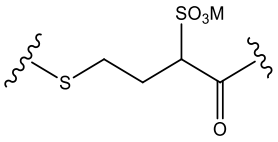

(b6);



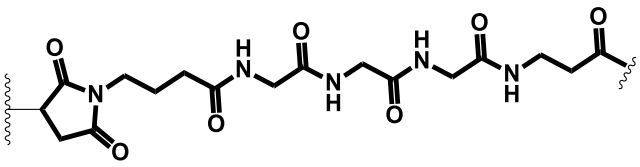
(b7);



(b8);



(b9), e,



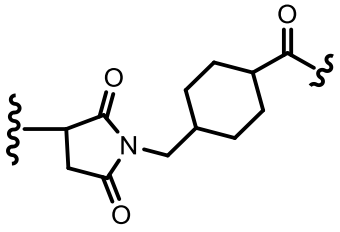
(b10),

[00530] em que:

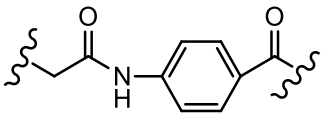
[00531] q é um inteiro de 1 a 5; e,

[00532] M é -H ou um cátion, como Na^+ ou K^+.

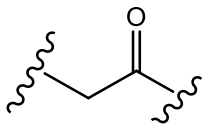
[00533] Em determinadas modalidades, Z^s é representado por qualquer uma das seguintes fórmulas:



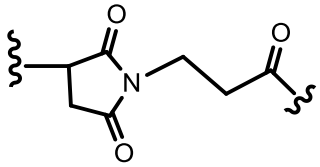
(b1);



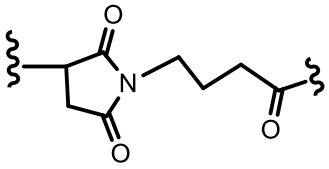
(b4');



(b5');



(b12);



(b13).

[00534] Em determinadas modalidades, W' é $-N(R^e)-$.

[00535] Em determinadas modalidades, R^e é $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$, em

que R^k é um -H, uma alquila linear, ramificada cíclica contendo 1 a 6 átomos de carbono.

[00536] Em determinadas modalidades, R^k é -H ou -Me, n é 4, e q é 2.

[00537] Em determinadas modalidades, R^x é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono.

[00538] Em determinadas modalidades, R^x é $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$, em que R^f e R^g são cada um independentemente selecionados de H ou uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono; e p é 0, 1, 2 ou 3.

[00539] Em determinadas modalidades, R^f e R^g são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de -H e -Me; e p é 1.

[00540] Em uma vigésima segunda modalidade específica, o conjugado de fórmula (VIII), (IX), (X) e (XI) descrito na vigésima primeira modalidade específica, as variáveis são como descrito abaixo:

[00541] a linha dupla ⎓ entre N e C representa uma ligação simples ou uma ligação dupla, desde que quando este é uma ligação dupla X é ausente e Y é -H, e quanto este é uma ligação simples, X é -H; Y é -H, -OH ou $-SO_3M$ (por exemplo, Y é -OH ou $-SO_3M$);

[00542] M é -H ou um cátion farmaceuticamente aceitável (por exemplo, Na^+);

[00543] X' e Y' são ambos -H;

[00544] A e A' são ambos -O-;

[00545] R_6 é -OMe; e

[00546] R^x é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono.

[00547] Na vigésima terceira modalidade específica, para os compostos de fórmula (IB), (IIB), (IIIB) e (IVB) descritos na vigésima modalidade específica, as variáveis são como descrito abaixo:

[00548] a linha dupla ⎓ entre N e C representa uma ligação simples

ou uma ligação dupla, desde que quando este é uma ligação dupla X é ausente e Y é -H, e quanto este é uma ligação simples, X é -H; Y é -H, -OH ou -SO_3M (por exemplo, Y é -OH ou -SO_3M);

[00549] M é -H ou Na^+;

[00550] X' e Y' são ambos -H;

[00551] A e A' são ambos -O-;

[00552] R_6 é -OMe;

[00553] R^x é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono.

[00554] Preferencialmente, R^x é -$(CH_2)_p$-(CR^fR^g)-, em que R^f e R^g são cada um independentemente selecionados de -H ou uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono; p é 0, 1, 2 ou 3. Mais preferencialmente, R^f e R^g são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de -H e -Me; e p é 1.

[00555] Em qualquer uma das modalidades específicas para o conjugado da invenção acima, como a décima quarta até a vigésima terceira modalidades específicas, a linha dupla ⁼⁼ entre N e C pode representar uma ligação dupla.

[00556] Em qualquer uma das modalidades específicas para o conjugado da invenção acima, como a décima quarta até a vigésima terceira modalidades específicas, a linha dupla ⁼⁼ entre N e C pode representar uma ligação simples, X é -H, o grupo de ligação, ou um grupo protetor de amina (por exemplo, X é -H); e Y é -H ou selecionado de -OR, -OCOR', -SR, -NR'R", um heterociclo opcionalmente substituído de 5 ou 6 membros contendo nitrogênio, -SO_3M, -SO_2M e um sulfato -OSO_3M. Em determinadas modalidades, Y não é -H.

[00557] Em determinadas modalidades, Y é selecionado de -H, -SO_3M, -OH, -OMe, -OEt ou -NHOH (por exemplo, Y é -SO_3M, -OH, -OMe, -OEt ou -NHOH).

[00558] Em determinadas modalidades, Y é -H, -SO_3M ou -OH (por

exemplo, Y é -SO_3M ou -OH).

[00559] Em determinadas modalidades, M é -H, Na^+ ou K^+.

[00560] Em qualquer uma das modalidades específicas para o conjugado da invenção acima, como a décima quarta até a vigésima terceira modalidades específicas, W, quando presente, é C=O.

[00561] Em qualquer uma das modalidades específicas para o conjugado da invenção acima, como a décima quarta até a vigésima terceira modalidades específicas, Z e Z', quando presente, são -CH_2-.

[00562] Em qualquer uma das modalidades específicas para o conjugado da invenção acima, como a décima quarta até a vigésima terceira modalidades específicas, X' é selecionado do grupo que consiste em -H, -OH, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, fenila, o grupo de ligação, e um grupo de proteção amina.

[00563] Em determinadas modalidades, X' é -H, -OH, -Me ou o grupo de ligação.

[00564] Em determinadas modalidades, X' é -H.

[00565] Em qualquer uma das modalidades específicas para o conjugado da invenção acima, como a décima quarta até a vigésima terceira modalidades específicas, Y' é selecionado do grupo que consiste em -H, um grupo oxo, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica substituída ou não substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono.

[00566] Em determinadas modalidades, Y' é -H ou oxo.

[00567] Em determinadas modalidades, Y' é -H.

[00568] Em qualquer uma das modalidades específicas para o conjugado da invenção acima, como a décima quarta até a vigésima terceira modalidades específicas, A e A' são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de -O-, -S-, -N(R_5)-, e oxo (C=O).

[00569] Em determinadas modalidades, A e A' são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de -O- e -S-.

[00570] Em determinadas modalidades, A e A' são -O-.

[00571] Em qualquer uma das modalidades específicas para o conjugado da invenção acima, como a décima quarta até a vigésima terceira modalidades específicas, D e D', quando presentes, são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de uma unidade de polietilenoglicol $(-OCH_2CH_2)_n$, em que n é um inteiro de 1 a 24, um aminoácido, um peptídeo contendo 2 a 6 aminoácidos, ou uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada, cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, em que o alquila, alquenila e alquinil são opcionalmente substituídos com um ou mais substituintes independentemente selecionados do grupo que consiste em halogênio, -OR, -NR'COR'', -SR e -COR'.

[00572] Em determinadas modalidades, D e D' são alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono.

[00573] Na vigésima quarta modalidade específica, o conjugado da presente invenção como descrito na décima quarta, décima quinta, ou vigésima primeira modalidade específica é representado pelo seguinte:

[00574] a linha dupla ⎓ entre N e C representa uma ligação dupla;

[00575] Y é -H;

[00576] W é C=O;

[00577] R_1, R_2, R_1', R_2', R_4 e R_4' são -H;

[00578] um de R_3, ou R_3' é opcionalmente o grupo de ligação e o outro é -H;

[00579] R_6 é -OMe;

[00580] Z e Z' são $-CH_2$;

[00581] X' é -H;

[00582] Y' é -H; e

[00583] A e A' são -O-.

[00584] Em determinadas modalidades, o conjugado de qualquer uma das modalidades descritas, como a décima quarta até a vigésima quarta modalidades específicas, pode compreender 1-10 compostos citotóxicos, 2-9 compostos citotóxicos, 3-8 compostos citotóxicos, 4-7 compostos citotóxicos, ou 5-6 compostos citotóxicos, cada composto citotóxico compreendendo o grupo de ligação ligando o composto citotóxico ao CBA, e cada composto citotóxico no conjugado é o mesmo.

[00585] Em qualquer uma das modalidades de conjugados, como a décima quarta até a vigésima quarta modalidades específicas, o agente de ligação à célula pode ligar às células-alvo selecionadas de células de tumor, células infectadas por vírus, células infectadas por micro-organismos, células infectadas por parasitas, células autoimunes, células ativadas, células mieloides, células T ativadas, Células B, ou melanócitos; células que expressam os antígenos CD4, CD6, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD56, EpCAM, CanAg, CALLA, ou Her-2; antígenos Her-3; ou células que expressam receptor de fator de crescimento de insulina, receptor de fator de crescimento epidérmico, e receptor de folato.

[00586] Em qualquer uma das modalidades de conjugados, como a décima quarta até a vigésima quarta modalidades específicas, o agente de ligação à célula pode ser um anticorpo, um anticorpo de cadeia simples, um fragmento de anticorpo que especificamente se liga à célula-alvo, um anticorpo monoclonal, um anticorpo monoclonal de cadeia simples, ou um fragmento de anticorpo monoclonal que especificamente se liga a uma célula-alvo, um anticorpo quimérico, um fragmento de anticorpo quimérico que especificamente se liga à célula-alvo, um domínio de anticorpo, um fragmento de domínio de anticorpo que especificamente se liga à célula-alvo, uma linfocina, um hormônio, uma vitamina, um fator de crescimento, um fator estimulante de colônia, ou uma molécula de transporte de nutriente.

[00587] O anticorpo pode ser um anticorpo de regeneração, um anticorpo de cadeia simples de regeneração, ou um fragmento de anticorpo de regeneração.

[00588] O anticorpo pode ser um anticorpo monoclonal, um anticorpo monoclonal de cadeia simples, ou um fragmento de anticorpo monoclonal do mesmo.

[00589] O anticorpo pode ser um anticorpo humanizado, um anticorpo humanizado de cadeia simples, ou um fragmento de anticorpo humanizado.

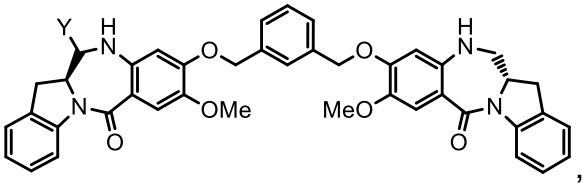
[00590] A invenção ainda fornece composição farmacêutica compreendendo qualquer um dos conjugados descritos aqui, e um carreador farmaceuticamente aceitável.

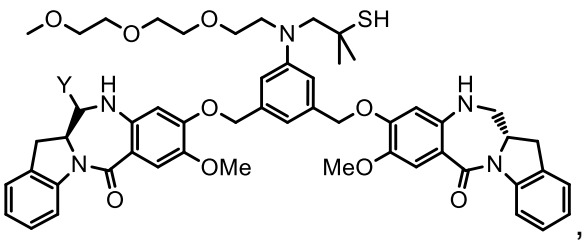
[00591] A invenção ainda fornece um composto fármaco-ligante compreendendo qualquer um dos compostos objeto covalentemente ligados a um ligante bifuncional.

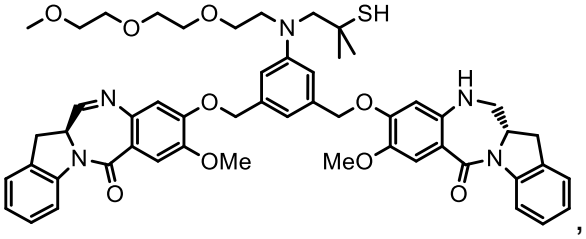
[00592] A invenção fornece mais conjugado compreendendo qualquer um dos compostos objetos, ou os compostos objetos fármaco-ligante, ligados a um agente de ligação à célula.

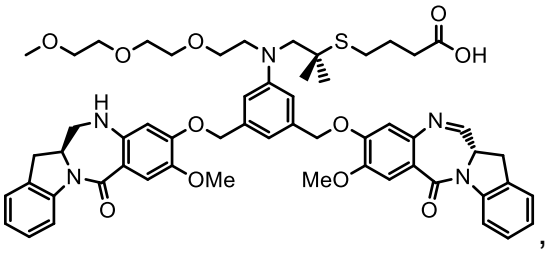
[00593] A invenção ainda fornece um método para inibir crescimento de célula anormal ou tratar um distúrbio proliferativo, um distúrbio autoimune, distúrbio destrutivo ósseo, doença infecciosa, doença viral, doença fibrótica, distúrbio neurodegenerativo, pancreatite ou doença renal em um mamífero compreendendo administrar ao mamífero uma quantidade terapeuticamente eficaz de qualquer um dos compostos (com ou sem qualquer grupo ligante) ou conjugados da invenção, e, opcionalmente, um segundo agente quimioterápico.

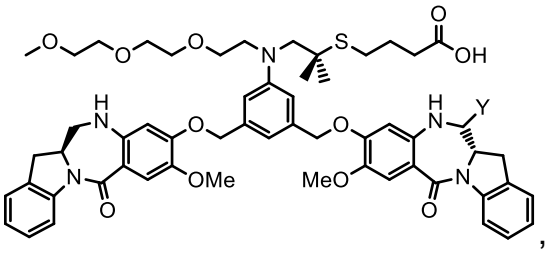
[00594] Em determinadas modalidades, o composto ou o conjugado é:

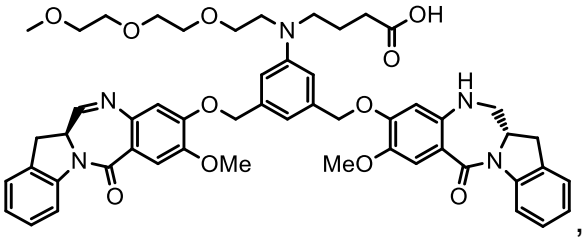

,

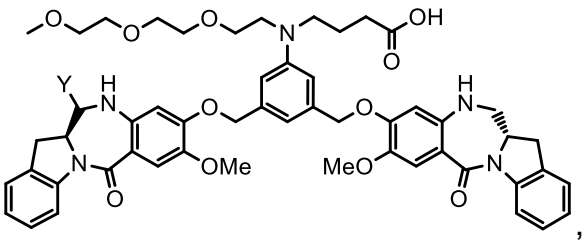

,

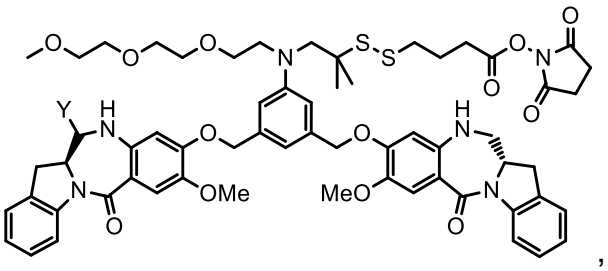

,

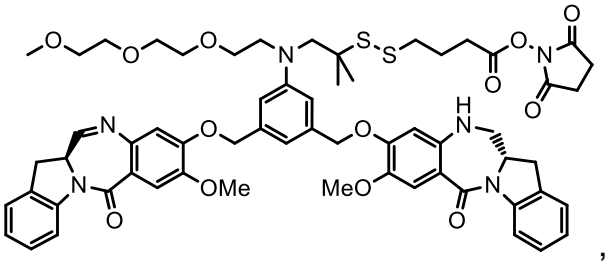

,

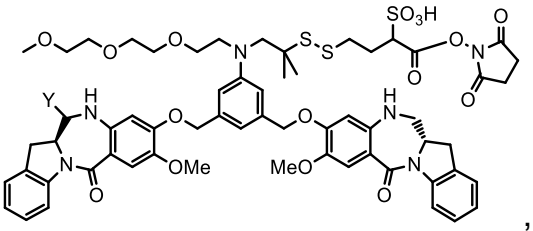

,

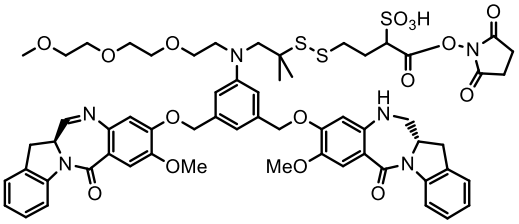

,

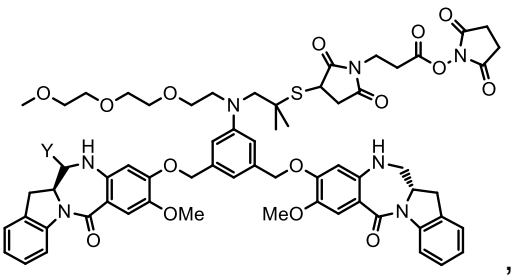

,

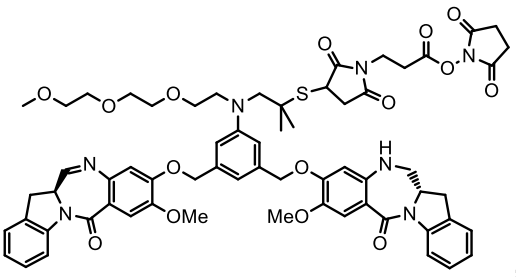

,

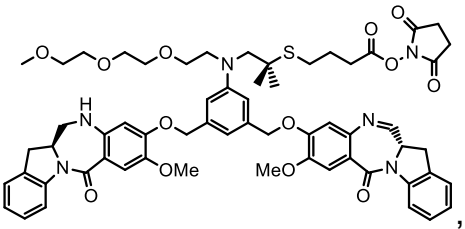

,

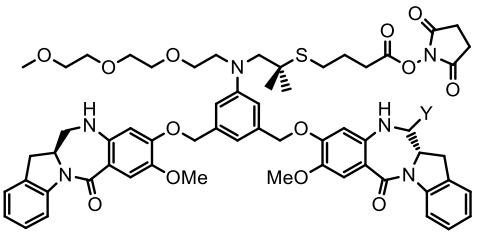

,

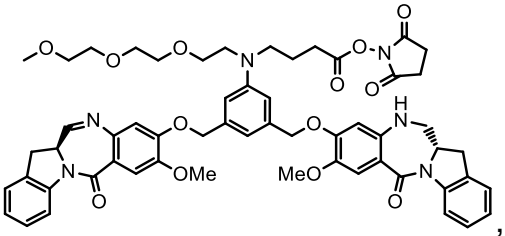

,

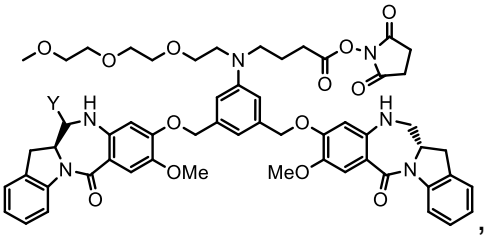

,

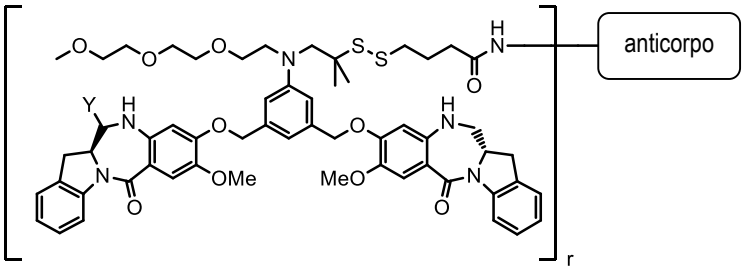

,

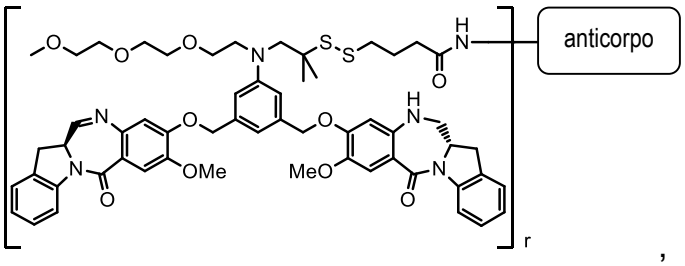

,

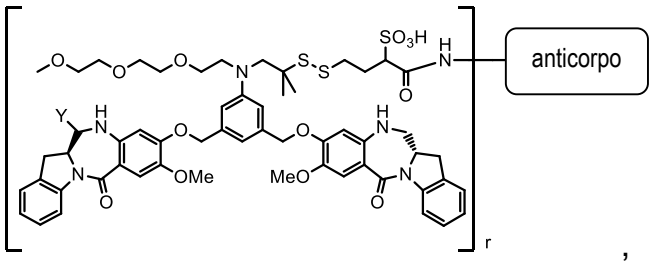

,


,

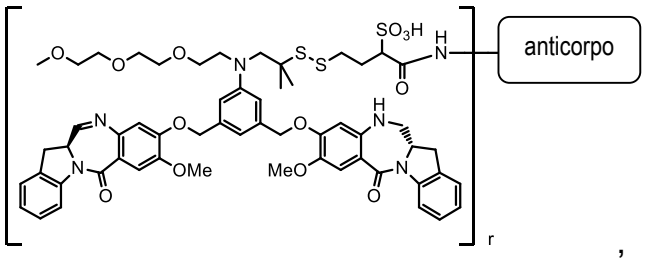

,


anticorpo
r
,

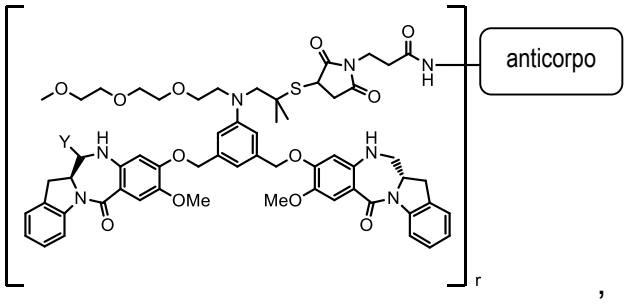

anticorpo
r
,


anticorpo
r

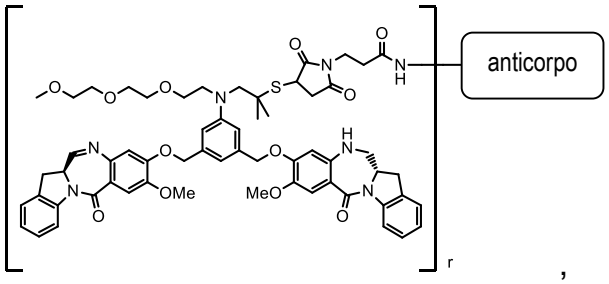
,


anticorpo
r

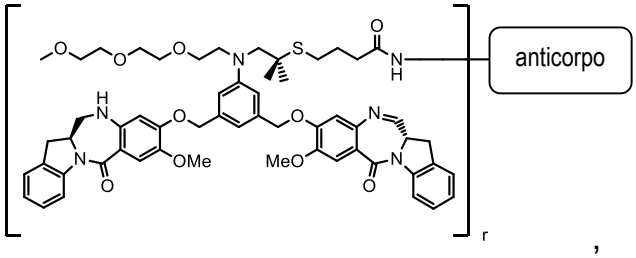
,


anticorpo
r

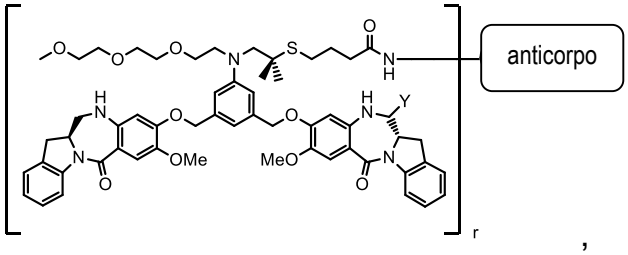
,


anticorpo
r

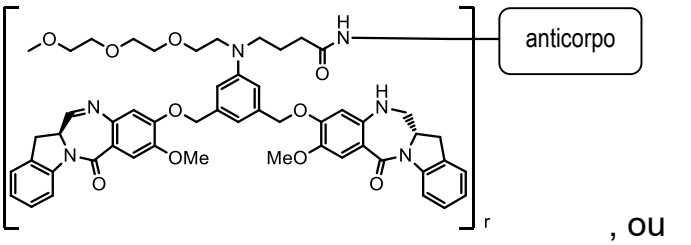
,


anticorpo
r

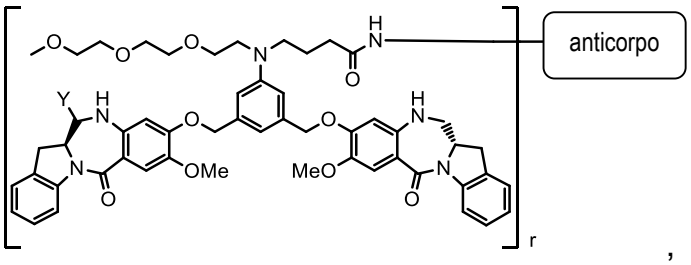
,


anticorpo
r

,



, ou



,

[00595] em que r é um inteiro de 1 a 10, Y é -H ou -SO_3M (por exemplo, Y é -SO_3M), e M é -H ou um cátion farmaceuticamente aceitável.

[00596] Em determinadas modalidades, o segundo agente quimioterápico é administrado ao mamífero sequencialmente ou consecutivamente.

[00597] Em determinadas modalidades, o método é para tratar uma condição selecionada de câncer, artrite reumatoide, esclerose múltipla, doença enxerto-hospedeiro (GVHD), rejeição de transplante, lúpus, miosite, infecção, e deficiência imune.

[00598] Em determinadas modalidades, o método ou conjugado é para tratar um câncer.

[00599] Em determinadas modalidades, o câncer é selecionado de câncer de mama, câncer de colo, câncer cerebral, câncer de próstata, câncer renal, câncer pancreático, câncer ovariano, câncer de cabeça e pescoço, melanoma, câncer colorretal, câncer gástrico, câncer escamoso, câncer pulmonar de célula pequena, câncer pulmonar de célula não pequena, câncer testicular, Carcinoma de célula Merkel, glioblastoma, neuroblastoma, cânceres de órgãos linfáticos e malignidade hematológica incluindo leucemia (Leucemia linfoblástica aguda (ALL), Leucemia mieloide aguda (AML), Leucemia linfocítica

crônica (CLL), Leucemia mieloide crônica (CML), Leucemia monocítica aguda (AMOL), Leucemia de célula pilosa (HCL), Leucemia prolinfocítica de célula T (T-PLL), Leucemia linfocítica granular grande, Leucemia de célula T adulta), Linfoma (linfoma linfocítico pequeno (SLL), Linfoma de Hodgkin (Esclerose nodular, Celularidade misturada, Rica em linfócito, Linfócito depletado ou não depletado, e linfoma de Hodgkin predominante em linfócito nodular), Linfoma não Hodgkin (todos os subtipos), Leucemia linfocítica crônica /Linfoma linfocítico pequeno, Leucemia linfocítica de célula B, Linfoma linfoplasmacítico (como Macroglobulinemia de Waldenström), Linfoma de zona marginal esplênica, Neoplasmas de célula plasmática (Mieloma de célula plasmática, Plasmacitoma, Doenças de deposição de imunoglobulina monoclonal, Doenças da cadeia pesada), Lingoma de célula B de zona marginal extranodal (Linfoma MALT), Linfoma de célula B de zona marginal nodal (NMZL), Linfoma folicular, Linfoma de célula do manto, Linfoma de célula B grande difusa, Linfoma de célula B grande mediastinal (tímica), Linfoma de célula B grande intravascular, Linfoma de efusão primário, Linfoma/leucemia de Burkitt, Leucemia prolinfocítica de célula T, Leucemia linfocítica de célula T granular grande, Leucemia de célula NK agressiva, Leucemia/linfoma de célula T adulta, Linfoma de célula NK/T extranodal (tipo nasal), Linfoma de célula T tipo enteropatia, Linfoma de célula T hepatoesplênica, Linfoma de célula NK blástica, Micose fungoide/Síndrome de Sezary, Distúrbios linfoproliferativos de célula T positiva para CD30 cutâneo primário, Linfoma de célula grande anaplástica cutânea primária, Linfomatoide papulose, Linfoma de célula T angioimunoblástico, Linfoma de célula T periférica (não especificada), Linfoma de célula grande anaplástica), mieloma múltiplo (mieloma de célula plasmática ou Doença de Kahler).

PRODUÇÃO DE CONJUGADOS DE AGENTE DE LIGAÇÃO À CÉLULA-FÁRMACO

[00600] Para ligar os compostos citotóxicos ou derivados dos mesmos da presente invenção ao agente de ligação à célula, o composto citotóxico pode compreender uma porção ligante com um grupo reativo ligado a este. Em uma modalidade, a reagente de reticulação bifuncional pode ser primeiro reagido com o composto citotóxico para fornecer o composto contendo uma porção ligante com um grupo reativo ligado a este (ou seja, composto fármaco-ligante), que pode então reagir com um agente de ligação à célula. Alternativamente, uma extremidade do reagente de reticulação bifuncional pode primeiro reagir com o agente de ligação à célula para fornecer o agente de ligação à célula contendo uma porção ligante com um gurpo reativo ligado a este, que pode então reagir com um composto citotóxico. A porção ligante pode conter uma ligação química que permite a liberação da porção citotóxica em um local particular. Ligações químicas apropriadas são bem conhecidos na técnica e incluem ligações dissulfeto, ligações tioéter, ligações lábeis a ácido, ligações fotolábeis, ligações lábeis a peptidase e ligações lábeis a esterase (ver por exemplo, Patentes US 5.208.020; 5.475.092; 6.441.163; 6.716.821; 6.913.748; 7.276.497; 7.276.499; 7.368.565; 7.388.026 e 7.414.073). Ligações preferenciais são dissulfeto, ligações lábeis a tioéter e peptidase. Outros ligantes que podem ser usados na presente invenção incluem ligantes não cliváveis, como aqueles descritos em detalhes na publicação número U.S. 2005/0169933, ou ligantes carregados ou ligantes hidrofílicos e são descritos em US 2009/0274713, US 2010/01293140 e WO 2009/134976, cada um dos quais é expressamente incorporado aqui por referência, cada um dos quais é expressamente incorporado aqui por referência.

[00601] Os compostos de fórmula (I)-(IV), (IA)-(IVA), e (IB)-(IVB) podem ser ligados por R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3', R_4', L', L'', L''', ou X (quando presente). Destes, grupos de ligação preferenciais são R_2', R_3',

R_4', L', L'', L''' e grupos de ligação mais preferenciais são R_2', R_3', e L'. Exemplos de grupo ligantes para compostos de fórmula (I)-(IV), (IA)-(IVA), e (IB)-(IVB) são descritos acima.

[00602] Em uma modalidade, uma solução de um anticorpo em tampão aquoso pode ser incubada com um excesso molar de um agente de modificação de anticorpo como *N*-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) ou com *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB) para introduzir grupos ditiopiridila. O anticorpo modificado é então reagido com o composto citotóxico contendo tiol, como composto **2a,** para produzir um conjugado dímero de anticorpo ligado a dissulfeto-indolinobenzodiazepina. O conjugado de agente de ligação à célula-fármaco pode então ser purificado usando qualquer método de purificação conhecido na técnica, como aquele descrito na Patente US 7.811.572 e publicação US 2006/0182750, ambas são incorporadas aqui por referência. Por exemplo, o conjugado de agente de ligação à célula-fármaco pode ser purificado usando filtração em fluxo tangencial, cromatografia adsortiva, filtração adsortiva, precipitação seletiva, filtração não absortiva ou combinação dos mesmos. Preferencialmente, filtração em fluxo tangencial (TFF, também conhecida como filtração de fluxo cruzado, ultrafiltração e diafiltração) e/ou resinas de cromatografia adsortiva são usados para a purificação dos conjugados.

[00603] Alternativamente, o anticorpo pode ser incubado com um excesso molar de um agente de modificação de anticorpo como 2-iminotiolano, L-homocisteina tiolactona (ou derivados), ou N-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA) para introduzir grupos sulfidrila. O anticorpo modificado é então reagido com o agente citotóxico contendo dissulfeto apropriado, para produzir um anticorpo ligado ao conjugado de dissulfeto-agente citotóxico. O conjugado anticorpo-agente citotóxico pode então ser purificado por métodos descritos acima. A ligação a

célula pode ainda ser engenheirada para introduzir frações de tiol, como anticorpos engenheiradas por cisteina revelados nas Patentes 7.772.485 e 7.855.275.

[00604] Em outra modalidade, uma solução de um anticorpo em tampão aquoso pode ser incubada com um excesso molar de um agente modificador de anticorpo como *N*-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclo-hexano-1-carboxilato para introduzir grupos maleimido, ou com *N*-succinimidil-4-(iodoacetil)-aminobenzoato (SIAB) para introduzir grupos iodoacetila. O anticorpo modificado é então reagido com o agente citotóxico contendo tiol para produzir um conjugado de anticorpo-citotóxico ligado por tioéter. O conjugado anticorpo-citotóxico pode então ser purificado pelos métodos descritos acima.

[00605] O número de moléculas citotóxicas ligadas por molécula de anticorpo pode ser determinado espectrofotometricamente medindo-se a razão da absorbância a 280 nm e 330 nm. Uma média de 1-10 moléculas de compostos citotóxicos/anticorpo pode ser ligada pelos métodos descritos aqui. O número médio preferencial de compostos citotóxicos ligados por molécula de anticorpo é 2-5, e o mais preferencial é 2,5-4,0.

[00606] Agentes citotóxicos contendo ligantes terminando em um éster N-hidróxi succinimidil (NHS), como compostos **1g** e **10**, podem reagir com o anticorpo para produzir conjugados ligados por amida como huMy9-6-SPDB-**1f** ou huMy9-6-BMPS-**1f**. O conjugado anticorpo-agente citotóxico pode então ser purificado por gel-filtração por qualquer método descrito acima.

[00607] Processos representativos para preparar os conjugados de agente de ligação à célula-fármaco da presente invenção são mostrados nas FIGS. 22 e 23. A composto dímero citotóxico da presente invenção pode ser conjugado com um agente de ligação à célula por um método de conjugação de uma etapa ou de duas etapas. Nas FIGs. 22a

e 22b, exemplares representativos são descritos, em que um composto dímero que possui um ligante como um éster N-hidroxissuccinimida é reagido diretamente com um agente de ligação à célula, como um anticorpo, gerando o conjugado desejado. Na FIG. 22c dímero ligável **1g** foi primeiro tratado com sódio bissulfato para fornecer um composto dímero modificado **26** antes de adicionar anticorpo para formar o conjugado huMy9-6-SBDP**-1f** da presente invenção.

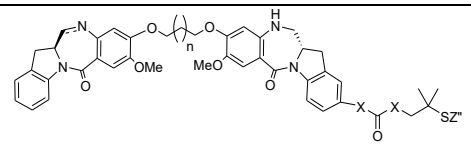
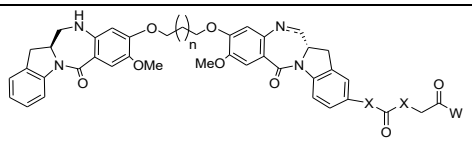
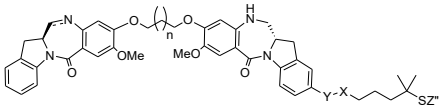
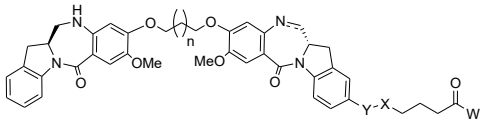
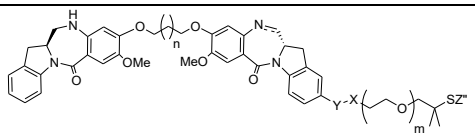
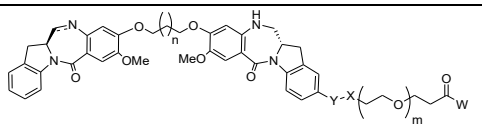
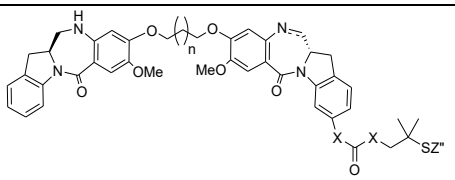
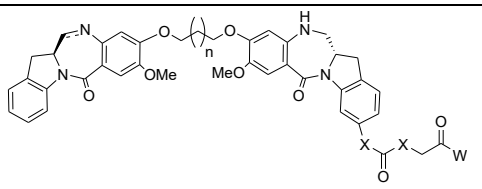
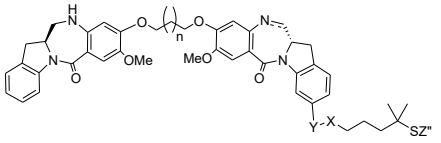
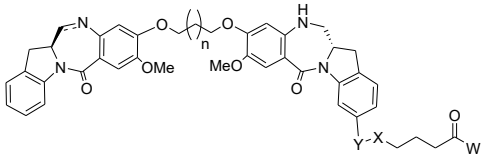
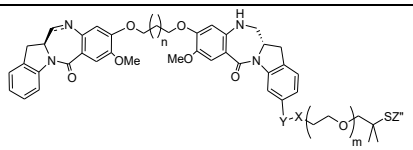
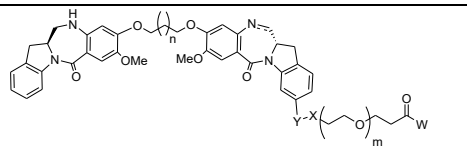
[00608] Um exemplo representativo de um método de conjugação em duas etapas é descrito na FIG. 23, em que um anticorpo é primeiro modificado com um agente de ligação cruzada bifuncional resultando em um anticorpo que possui um número desejado de ligantes apropriados para a reação com um composto dímero contendo uma porção de tiol livre. Neste exemplo o anticorpo huMy9-6 foi primeiro modificado com SPDB para gerar um anticorpo com ligantes contendo a porção ditiopiridila. O anticorpo modificado foi então exposto a um tiol livre, como **2a**, gerando o conjugado desejado huMy9-6-SPDB**-2a**.

[00609] Processos para sintetizar os compostos fármaco-ligante e conjugados da invenção são ainda descritos no pedido de patente provisório US 61/443,092, depositado em 15 de fevereiro de 2011, e um pedido de utilidade US reivindicando o benefício da data de depósito do mesmo e depositado no mesmo dia do presente pedido, intitulado "METHODS OF PREPARATION OF CONJUGATES" os conteúdos completos de cujos pedidos, incluindo todos os desenhos, fórmulas, esquemas de síntese, especificações, e reivindicações, são incorporados aqui por referência.

[00610] As estruturas dos compostos representativos e conjugados da presente invenção são mostrados nas tabelas 1-8. Estes compostos e conjugados podem ser preparados de acordo com os métodos descritos aqui.

Tabela 1. Estruturas de compostos representativos na presente

invenção.

Notas:

n = 1 ou 3; m = 3 ou 4

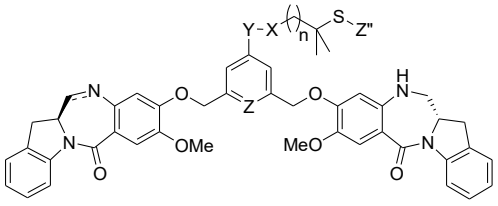
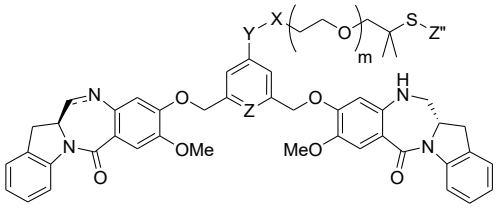
W = OH, OMe, ONHS, $NHNH_2$, H, Me, Ph, Peptídeo

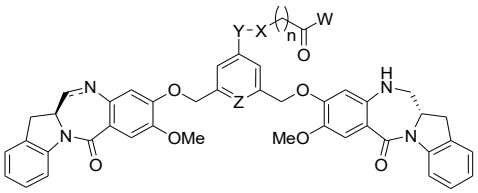
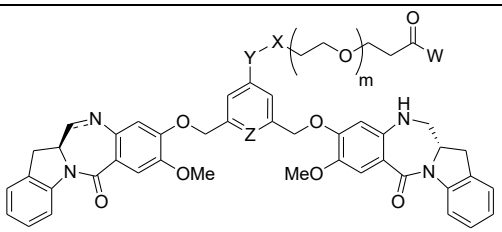
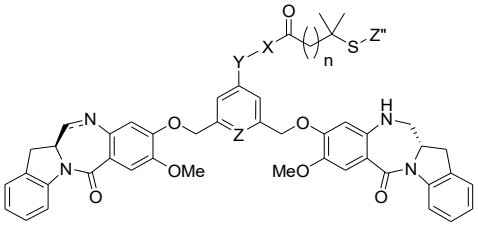
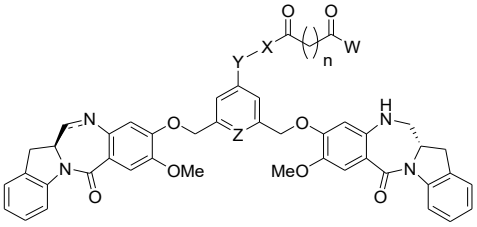
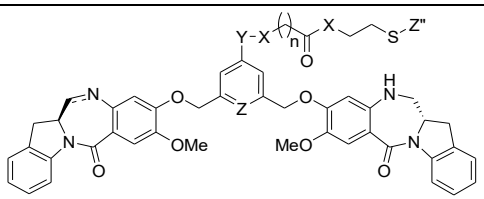
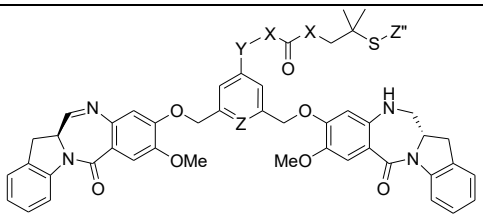
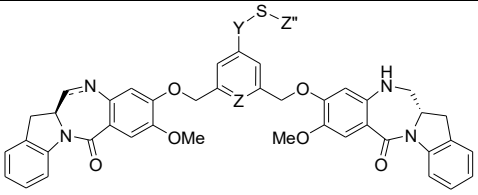
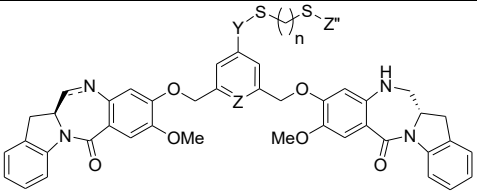
X = CH_2, O, S, NH ou NMe

Y = CH_2 ou ausente

Z" = H, Me, SMe, $S(CH_2)_3C(O)NHS$ ou $CH_2C(O)NHS$ ou BMPS ou SMCC ou SPy ou SPy-NO_2

Tabela 2. Estruturas de compostos representativos na presente invenção (Continuação).

Nota:

n = 1, 2 ou 3

m = 3 ou 4

W = OH, OMe, ONHS, $NHNH_2$, H, Me, Ph, Peptídeo

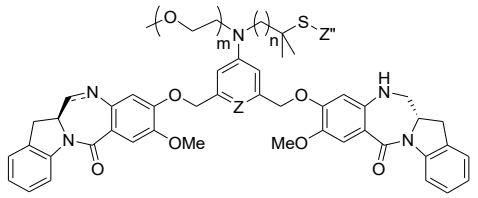
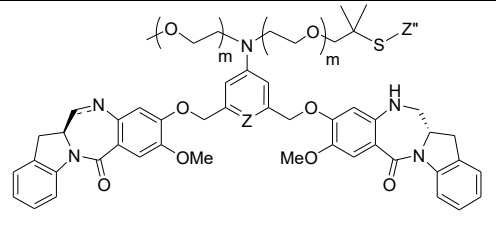
X = CH_2, O, S, NH, NMe

Y = ausente ou CH_2

Z = CH ou N

Z" = H, Me, SMe, $S(CH_2)_3C(O)NHS$ ou $CH_2C(O)NHS$ ou BMPS ou SMCC ou SPy ou SPy-NO_2

Tabela 3. Estruturas de compostos representativos na presente invenção (Continuação).

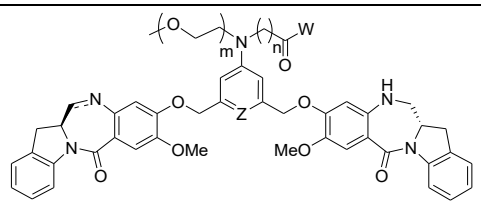
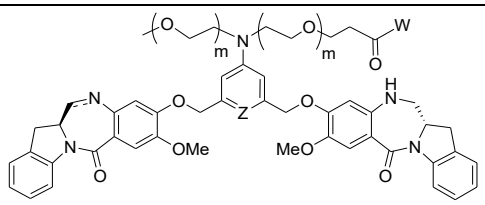
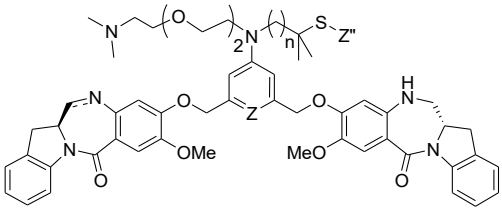
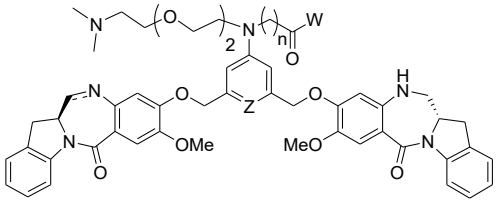
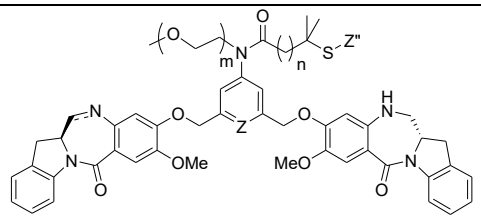
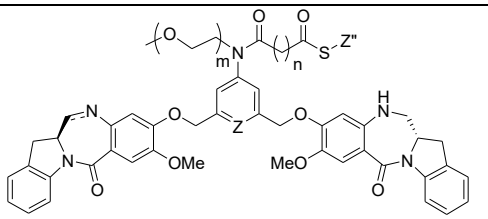
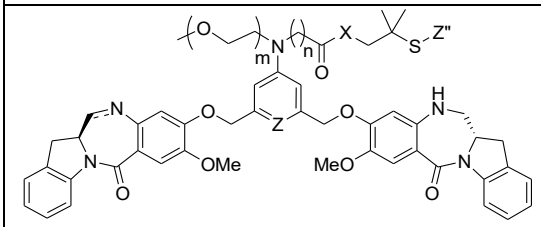
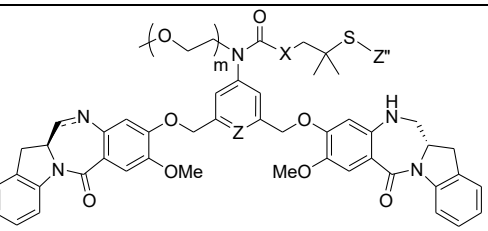
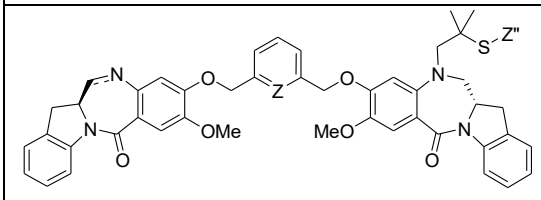
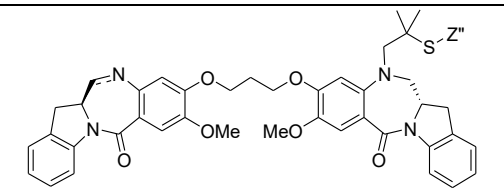
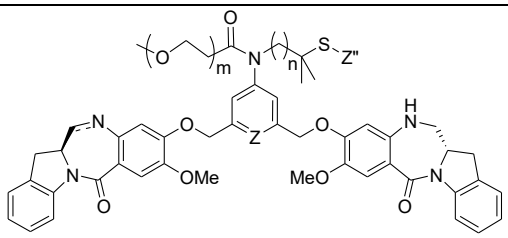
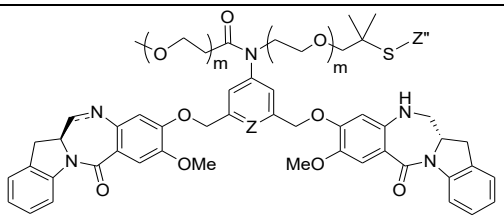
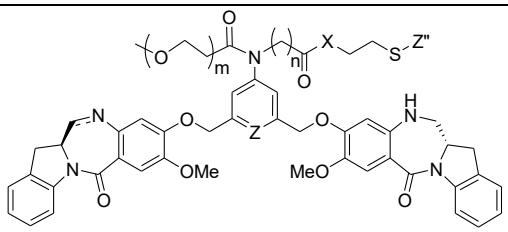
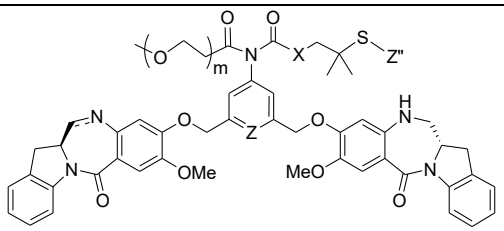
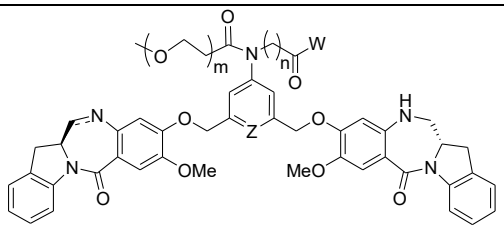
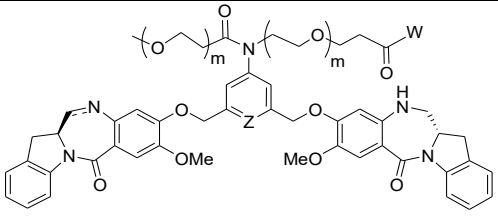
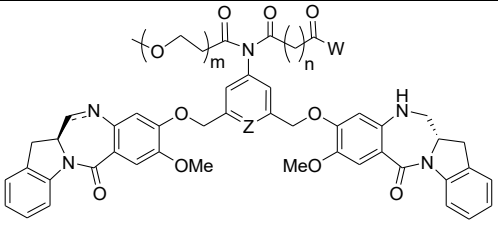
<table>
<tr><td>  </td><td>  </td></tr>
<tr><td>  </td><td>  </td></tr>
<tr><td>  </td><td>  </td></tr>
<tr><td>  </td><td>  </td></tr>
<tr><td>  </td><td>  </td></tr>
<tr><td></td><td></td></tr>
<tr><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Nota:
n = 1, 2 ou 3
m = 3 ou 4
W = OH, OMe, ONHS, $NHNH_2$, H, Me, Ph, Peptídeo
X = CH_2, O, S, NH, NMe
Z = CH ou N
Z" = H, Me, SMe, $S(CH_2)_3C(O)NHS$ ou $CH_2C(O)NHS$ ou BMPS ou SMCC ou SPy ou SPy-NO_2</td></tr>
</table>

Tabela 4. Estruturas de compostos representativos na presente invenção (Continuação).

Nota:

n = 1, 2 ou 3

m = 3 ou 4

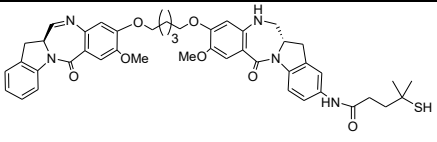
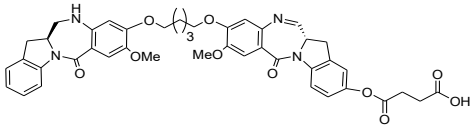
W = OH, OMe, ONHS, $NHNH_2$, H, Me, Ph, Peptídeo

X = CH_2, O, S, NH, NMe

Z = CH ou N

Z" = H, Me, SMe, $S(CH_2)_3C(O)NHS$ ou $CH_2C(O)NHS$ ou BMPS ou SMCC ou SPy ou SPy-NO_2

Tabela 5. Estruturas de compostos representativos na presente invenção.

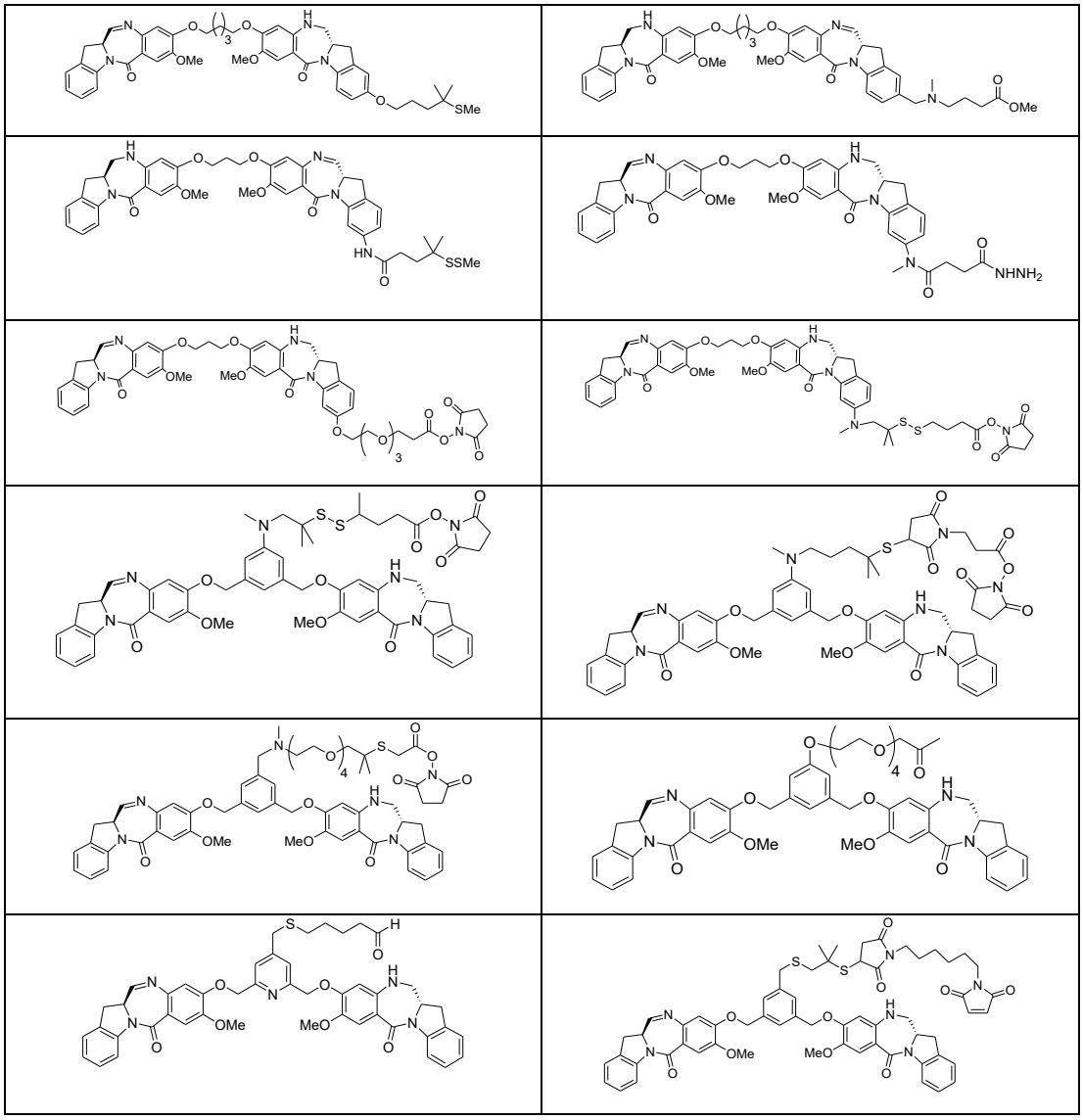
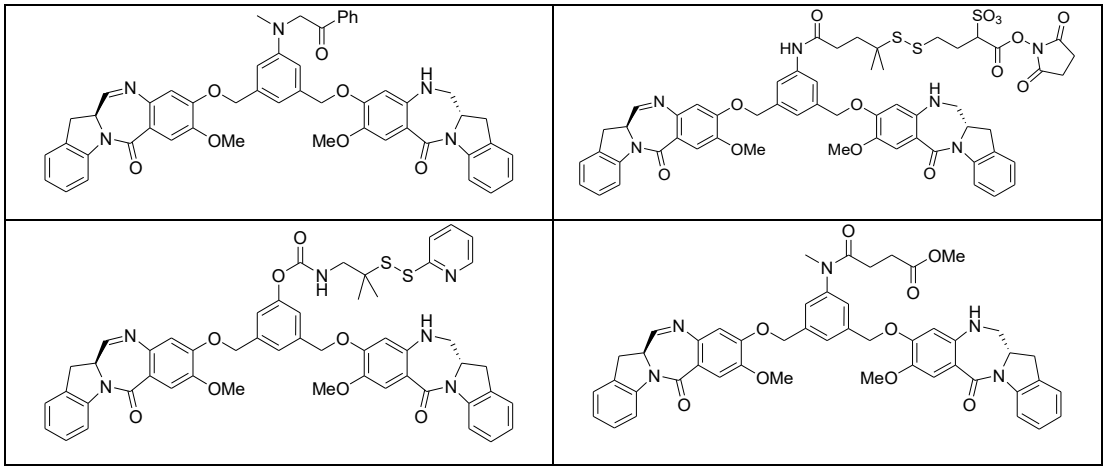


Tabela 6. Estruturas de compostos representativos na presente invenção (Continuação).



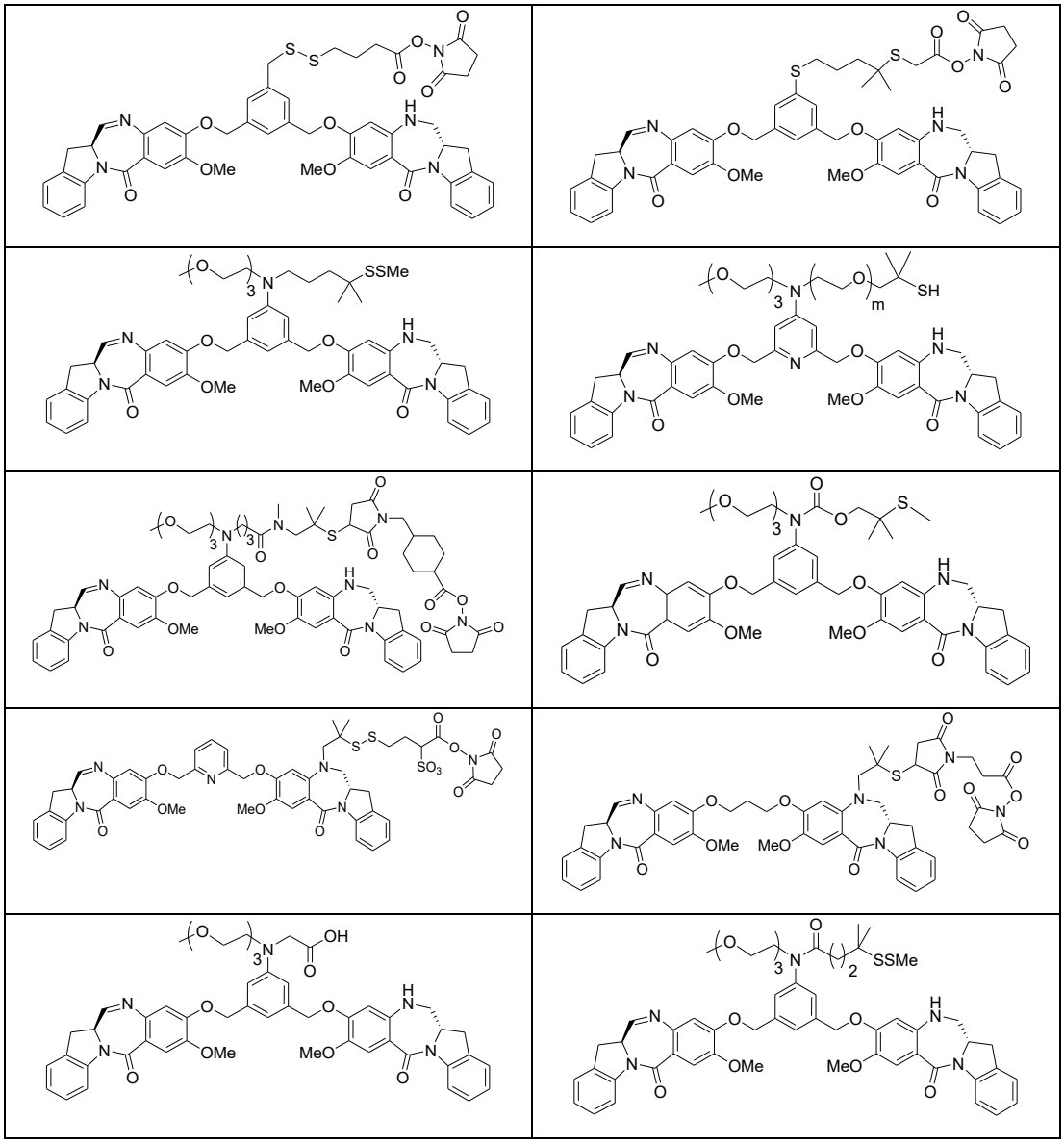


Tabela 7. Estruturas de compostos representativos na presente invenção (Continuação).

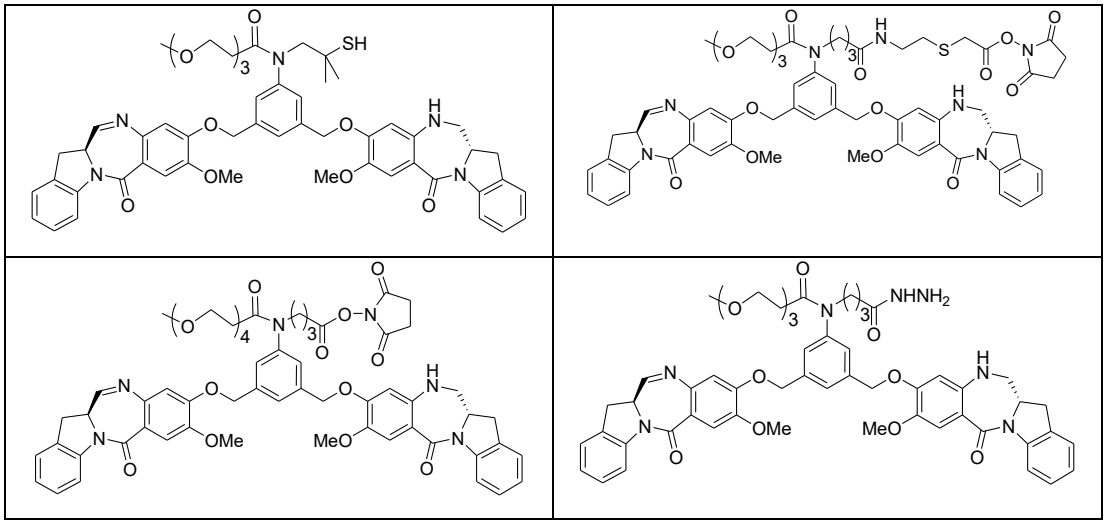
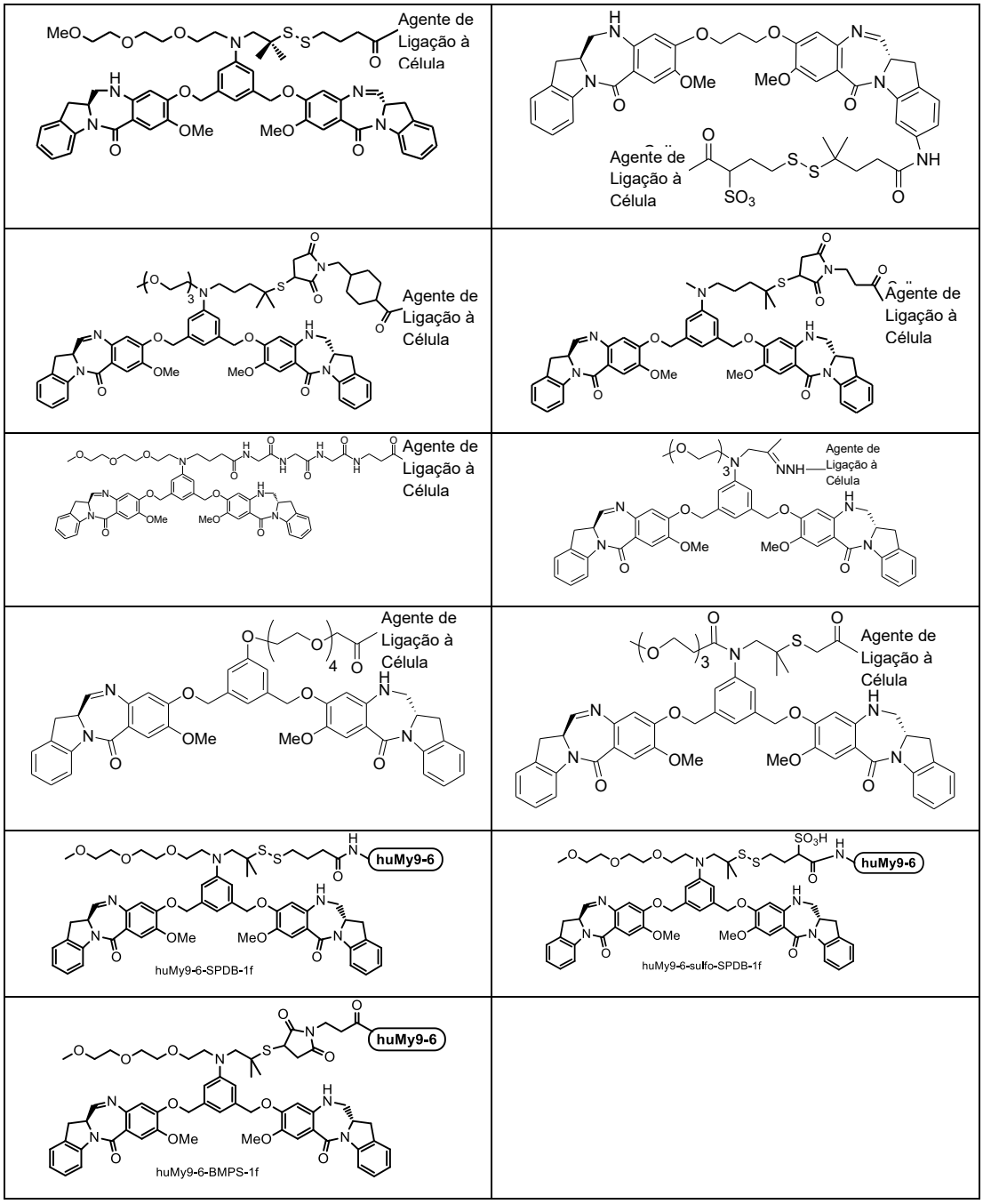


Tabela 8. Estruturas de conjugados representativos da presente invenção.



CITOTOXICIDADE IN VITRO DE COMPOSTOS E CONJUGADOS

[00611] Os compostos citotóxicos e conjugados de agente de ligação à célula-fármaco da invenção podem ser avaliados para suas capacidades de suprimir proliferação de várias linhagens de célula de câncer *in vitro.* Por exemplo, linhagens de células como a linhagem de carcinoma de colon humano COLO 205, a linhagem de célula de

rabdomiosarcoma RH-30, e a linhagem de célula de mieloma múltiplo MOLP-8 pode ser usada par a avaliação de citotoxicidade destes compostos e conjugados. As células a serem avaliadas podem ser expostas aos compostos ou conjugados por 1-5 dias e as frações de sobrevivência das células medidas em ensaios direitos por métodos conhecidos. Valores IC_{50} podem então ser calculados a partir dos resultados dos ensaios. Alternativamente ou além disso, um ensaio de sensibilidade de linhagem de célula *in vitro*, como aquele descrito pelo U.S. National Cancer Institute (ver Voskoglou-Nomikos *et al*., 2003, Clinical Cancer Res. 9: 42227-4239, incorporadas aqui por referência) pode ser usado como um dos guias para determinar os tipos de cânceres que podem ser sensíveis para o tratamento com os compostos ou conjugados da invenção.

[00612] Exemplos de potência *in vitro* e especificidade-alvo de conjugados anticorpo-agente citotóxico da presente invenção são mostrados nas FIGS. 25-26. Todos os conjugados são extremamente citotóxicos nas células de câncer positivas para antígenos com um IC_{50} na faixa picomolar inferior. Linhagens de células negativas ao antígeno permaneceram viáveis quando expostas aos mesmos conjugados. Os dímeros de indolinobenzodiazepina mostraram potência específica-alvo sendo 160 vezes menos potente quando bloqueados com anticorpo não conjugado huMy9-6 (anti-CD33) e 40 menos potente quando bloqueados com anticorpo não conjugado FOLR1 (anticorpo de receptor anti-folato). Por exemplo, o conjugado huMy9-6-SPDB-1f mantou células HL60/QC positivas para antígeno com um valor de IC_{50} de 10,5 pM, enquanto a adição de um excesso de anticorpo não conjugado huMy9-6 reduziu este efeito citotóxico (IC_{50} = 1,69 nM), demonstrando especificidade de antígeno (FIG. 25A). Além disso, o conjugado huMy9-6-SPDB-**1f** é ainda altamente potente na direção de ambas linhagem de célula HL60/ATCC com um valor IC_{50} de 21 pM e a linhagem de célula

NB-4 com um valor IC_{50} de 190 pM (FIGS. 25B e 25C).

[00613] De modo semelhante, o conjugado huFOLR1-SPDB-**1f** foi altamente potente, com um valor IC_{50} de 55 pM para células KB positivas para o antígeno (FIG. 26). A adição de um excesso de anticorpo huFOLR1 não conjugado reduziu este efeito citotóxico >40 vezes, demonstrando especificidade de antígeno.

[00614] O efeito da conjugação em ligação ao anticorpo foi medido por comparação da ligação de ambos anticorpo não conjugado huMy9-6 e o conjugado huMy9-6-SPDB-1f na direção da linhagem de célula HL60/QC (FIG. 27). Análise FACS revelou que não há alteração na capacidade de ligação do conjugado ao anticorpo naked indicando que não há compromisso na ligação devido à conjugação do agente citotóxico ao anticorpo.

[00615] Em um exemplo, eficácia in vivo de um conjugado de agente de ligação à célula/agente citotóxico foi medida. Camundongos nus contendo tumores humanos HL60/QC foram tratados com conjugado huMy9-6-SPDB-**1f** e regressão de tumor significativa foi obsevada em várias doses enquanto em camundongos não tratados os tumores cresceram rapidamente (FIG. 28). A atividade foi observada em doses tão baixas quando 20 μg/kg que é pelo menos 35 vezes menor do que a dose máxima tolerada.

[00616] O efeito de saturação de imina direciona a tolerabilidade é mostrado na tabela 9. Di-imina huFOLR1-fármaco1 foi testado em várias doses todos dos quais demonstraram ser altamente tóxicos deixando somente sobreviventes no grupo mais baixo testado a 50 μg/kg. Em contraste aos conjugados parcialmente reduzidos mono-imina huFOLR1-Fármaco **2** e huFOLR1-SPDB-IGN (huFOLR1-SPDB-**1f**) demonstraram ter tolerabilidade significativamente melhorada com o conjugado huFOLR1-SPDB-IGN (huFOLR1-SPDB-**1f**) mostrando 100% de sobrevivência animal nas maiores doses testadas de 560 μg/kg.

COMPOSIÇÕES E MÉTODOS DE USO

[00617] A presente invenção inclui a composição (por exemplo, uma composição farmacêutica) compreendendo novos compostos benzodiazepina descritos aqui (por exemplo, indolinobenzodiazepina ou oxazolidinobenzodiazepina), derivados dos mesmos, ou conjugados dos mesmos, (e/ou solvatos, hidratos e/ou sais dos mesmos) e um carreador (um carreador farmaceuticamente aceitável). A presente invenção ainda inclui a composição (por exemplo, uma composição farmacêutica) compreendendo novos compostos benzodiazepina descritos aqui, derivados dos mesmos, ou conjugados dos mesmos, (e/ou solvatos, hidratos e/ou sais dos mesmos) e um carreador (um carreador farmaceuticamente aceitável), ainda compreendendo um segundo agente terapêutico. As presentes composições são úteis para inibir crescimento de célula anormal ou tratar um distúrbio proliferativo em um mamífero (por exemplo, humano). As presentes composições são ainda úteis para tratar depressão, ansiedade, estresse, fobias, pânico, disforia, distúrbios psiquiátricos, dor e doenças inflamatórias em um mamífero (por exemplo, humano).

[00618] A presente invenção inclui um método para inibir crescimento de célula anormal ou tratar um distúrbio proliferativo em um mamífero (por exemplo, humano) compreendendo administrar a dito mamífero uma quantidade terapeuticamente eficaz de novos compostos benzodiazepina descritos aqui (por exemplo, indolinobenzodiazepina ou oxazolidinobenzodiazepina), derivados dos mesmos, ou conjugados dos mesmos, (e/ou solvatos e sais dos mesmos) ou uma composição dos mesmos, sozinho ou em combinação com um segundo agente terapêutico.

[00619] A presente invenção ainda fornece métodos de tratamento compreendendo administrar a um sujeito em necessidade de tratamento uma quantidade efetiva de qualquer um dos conjugados descritos

acima.

[00620] De modo semelhante, a presente invenção fornece um método para induzir morte celular em populações de células selecionadas compreendendo contatar células-alvo ou tecido contendo células-alvo com uma quantidade efetiva de um agente citotóxico compreendendo qualquer um de composto citotóxico-agentes de ligação à célula (por exemplo, dímero indolinobenzodiazepina ou oxazolidinobenzodiazepina ligado a um agente de ligação à célula) da presente invenção, um sal ou solvato do mesmo. As células-alvo são células às quais o agente de ligação à célula pode ligar.

[00621] Se desejado, outros agentes ativos, como outros agentes antitumor, podem ser administrados junto com o conjugado.

[00622] Carreadores farmaceuticamente aceitáveis apropriados, diluentes, e excipientes são bem conhecidos e podem ser determinados por especialistas na técnica conforme a situação clínica justificar.

[00623] Exemplos de carreadores apropriados, diluentes e/ou excipientes incluem: (1) salina tamponada em fosfato Dulbecco, pH cerca de 7,4, contendo ou não contendo cerca de 1 mg/mL a 25 mg/mL albumina sérica humana, (2) 0,9% salina (0,9% p/v NaCl), e (3) 5% (p/v) dextrose; e pode ainda conter um antioxidante como triptamina e um agente estabilizador como Tween 20.

[00624] O método para induzir morte celular em populações de célula selecionadas pode ser praticado *in vitro*, *in vivo*, ou *ex vivo*.

[00625] Exemplos de usos *in vitro* incluem tratamentos de medula óssea autóloga antes de seus transplantes no mesmo paciente para matar células doentes ou malignas: os tratamentos da medula óssea antes de seus transplantes para matar células T competentes e prevenir a doença do enxerto-hospedeiro (GVHD); tratamentos de culturas de células para matar todas as células exceto as variantes desejadas que não expressam o antígeno-alvo; ou matar variantes que expressam

antígeno indesejado.

[00626] As condições de uso não clínico *in vitro* são prontamente determinadas por um especialista na técnica.

[00627] Exemplos de uso clínico *ex vivo* são para remover células de tumor ou células linfoides de medula óssea antes de transplante autólogo no tratamento de câncer ou no tratamento de doença autoimune, ou para remover células T e outras células linfoides de medula óssea autóloga ou alogênica ou tecido antes do transplante para prevenir GVHD. O tratamento pode ser realizado como a seguir. A medula óssea é coletada do paciente ou outro indivíduo e então incubada em meio contendo soro no qual é adicionado o agente citotóxico da invenção, faixas de concentração de cerca de 10 μM a 1 pM, por cerca de 30 minutos a cerca de 48 horas em cerca de 37ºC. As condições exatas de concentração e tempo de incubação, ou seja, a dose, são prontamente determinadas por um especialista na técnica. Após a incubação as células da medula óssea são lavadas com meio contendo soro e retornadas ao paciente por via intravenosa de acordo com os métodos conhecidos. Nas circunstâncias onde o paciente recebe outro tratamento com um curso de quimioterapia ablativa ou irradiação de corpo total entre o tempo de coleta de medula e reinfusão das células tratadas, as células de medula tratadas são armazenadas congeladas em nitrogênio líquido usando equipamento médico padrão.

[00628] Para uso clínico *in vivo*, o agente citotóxico da invenção será fornecido como uma solução ou um pó liofilizado que são testados para níveis de esterilidade e para endotoxina. Exemplos de protocolos apropriados de administração de conjugado são como a seguir. Conjugados são administrados semanalmente por 4 semanas como um bolus intravenoso cada semana. As doses de bolus são administradas em 50 a 1000 mL de salina normal às quais 5 a 10 mL de albumina sérica humana podem ser adicionadas. As dosagens serão de 10 μg a

2000 mg por administração, por via intravenosa (faixa de 100 ng a 20 mg/kg por dia). Após quatro semanas de tratamento, o paciente pode continuar a receber tratamento em uma base semanal. Os protocolos clínicos específicos com relação à via de administração, excipientes, diluentes, dosagens, tempos, *etc*., podem ser determinados por um especialista na técnica conforme a situação clínica justificar.

[00629] Exemplos de condições médicas que podem ser tratadas de acordo com os métodos *in vivo* ou *ex vivo* de indução de morte celular em populações de células selecionadas incluem malignidade de qualquer tipo incluindo, por exemplo, câncer pulmonar (célula pequena e célula não pequena), mama, cólon, cérebro, próstata, rim, pâncreas, ovário, cabeça e pescoço, pele (melanoma), Carcinoma de célula Merkel, glioblastoma, neuroblastoma, e cânceres de órgãos linfáticos; doenças autoimunes, como lúpus sistêmico, artrite reumatoide, e esclerose múltipla; rejeições de enxerto, como rejeição de transplante renal, rejeição de transplante hepático, rejeição de transplante pulmonar, rejeição de transplante cardíaco, e rejeição de transplante de medula óssea; doença do enxerto-hospedeiro; infecções virais, como infecção CMV, infecção HIV, AIDS, *etc*.; e infecções de parasitas, como giardíase, amebíase, esquistossomose, e outros como determinado por um especialista na técnica.

[00630] Terapias para câncer e suas dosagens, vias de administração e uso recomendado são conhecidos na técnica e foram descritos em dita literatura como o Physician's Desk Reference (PDR). O PDR revela as dosagens dos agentes que foram usados no tratamento de vários cânceres. O regime de dosagem e dosagens destos fármacos quimioterápicas acima mencionadas que são terapeuticamente eficazs irá depender do câncer em particular sendo tratado, a extensão da doença e de outros fatores familiares ao médico de habilidade na técnica e pode ser determinada pelo médico. Os

conteúdos do PDR são expressamente incorporados aqui em suas totalidades por referência. Um especialista na técnica pode revisar o PDR, usando um ou mais dos seguintes parâmetros, para determinar o regime de dosagem e doses dos agentes quimioterápicos e conjugados que podem ser usados de acordo com os ensinamentos desta invenção. Estes parâmetros incluem:

Índice abrangente

Por fabricante

Produtos (por nome da fármaco da empresa ou marca registrada)

Índice de categoria

Índice genérico /químico (nomes comuns de fármaco não comerciais)

Imagens coloridas de medicamentos

Informação do produto, consistente com rotulagem FDA

Informação química

Função/ação

Indicações e contraindicações

Pesquisa clínica, efeitos colaterais, alertas.

ANALÓGOS E DERIVADOS

[00631] Um especialista na técnica de agentes citotóxicos irá prontamente entender que cada um dos agentes citotóxicos descrito aqui pode ser modificado de tal modo que o composto resultante ainda retém a especificidade e/ou atividade do composto de partida. O especialista na técnica entenderá que muitos destes compostos podem ser usados no lugar dos agentes citotóxicos descritos aqui. Assim, os agentes citotóxicos da presente invenção incluem análogos e derivados dos compostos descritos aqui.

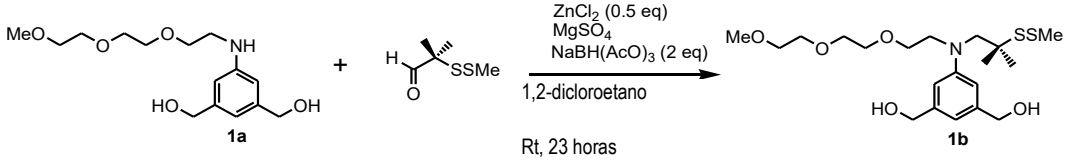
[00632] Todas as referências citadas aqui e nos exemplos que seguem são expressamente incorporados por referência em suas

totalidades.

EXEMPLOS

[00633] A invenção agora será ilustrada com referencia aos exemplos não limitantes. Salvo se declarado de outra forma, todos os percentuais, razões, partes, *etc*. são em peso. Todos os reagentes foram adquiridos de Aldrich Chemical Co., New Jersey, ou outras fontes comerciais. Espectros de ressonância nuclear magnética (^{1}H RMN) foram adquiridos em um instrumento Bruker 400 MHz e espectros de massa foram adquiridos em um instrumento Bruker Daltonics Esquire 3000 usando ionização por eletrospray.

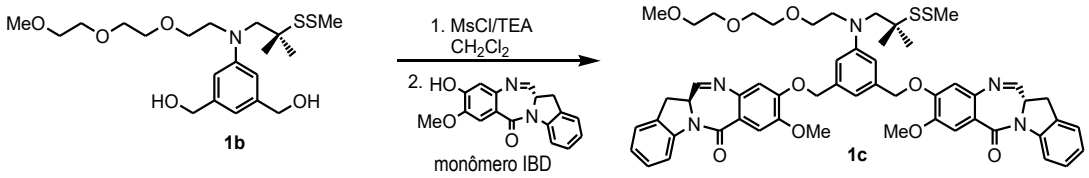
Exemplo 1



*Composto **1b**:*

[00634] A uma solução agitada de a anilina **1a** (1,55 g, 5,18 mmol) e 2-(metilditio)-isobutiraldeído (0,7 mL, 5,18 mmol) em 1,2-diclorometano anidro (20 mL) foi adicionado triacetoxicoborohidreto de sódio (1,1 g, 5,18 mmol) e pó de cloreto de zinco (353 mg, 2,59 mmol) seguido pela adição de sulfato de magnésio anidro (800 mg). A mistura foi agitada em temperatura ambiente (ta) por 6 horas então uma segunda parte de 2-(metilditio)-isobutiraldeído (0,7 mL, 5,18 mmol) e triacetoxicoborohidreto de sódio (1,1 g, 5,18 mmol) foram adicionados. A agitação continuou em ta durante a noite. A mistura de reação foi filtrada por celite e lavada com diclorometano. O filtrado foi concentrado e o restante foi purificado por cromatografia de sílica-gel (Coluna Combiflash, 40 g, diclorometano/MeOH) para gerar composto **1b** (487 mg y = 22%) como óleo incolor. Material de partida não reagido anilina **1a** (1,02 g) foi ainda recuperado em 65% rendimento. ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 6,76 (s, 2H), 6,63 (s, 1H), 4,55 (s, 4H), 3,65-3,51 (m, 14H), 3,35 (s, 3H), 2,44 (s, 3H), 1,33 (s, 6H); ^{13}C RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ

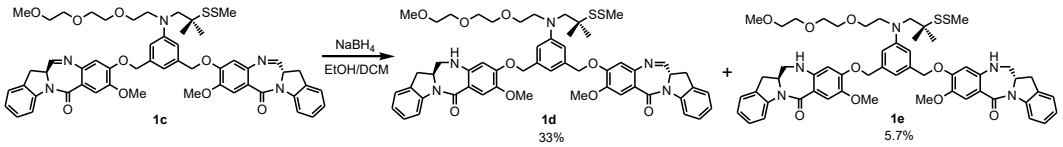
149,0, 142,35, 114,0, 111,1, 71,98, 70,7, 70,6, 70,5, 67,6, 65,5, 59,75, 59,1, 53,9, 51,9, 26,6, 25,7, 20,75; MS (m/z): encontrado 456,2 (M + Na)$^+$. Ver FIG. 1.



*Composto **1c**:*

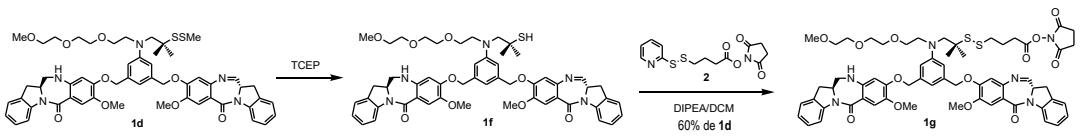
[00635] A uma solução agitada de **1b** (243 mg, 0,56 mmol) em diclorometano anidro (3,5 mL) foi adicionado trietilamina (234 µl, 1,68 mmol). A mistura foi resfriada a -10 C e cloreto de metanosuanossulfonila (113 µl, 1,46 mmol) foi adicionado lentamente por 15 minutos com uma seringa. A solução continuou sendo agitada por 60 minutos a -10 ~ -7ºC e extinta por adição de gelo/água. Foi diluída com acetato de etila e lavada com água fria. A camada orgânica foi seca em sulfato de sódio anidro, filtrada, concentrada e submetida a alto vácuo para gerar os mesilatos como óleo amarelo claro (340 mg). Os mesilatos foram transferidos para um frasco de fundo redondo de 10 mL com acetato de etila/diclorometano, concentrado e submetido a alto vácuo. Monômero IBD (412 mg, 1,4 mmol) foi adicionado seguido pela adição de dimetilformamida anidra (3 mL) e carbonato de potássio anidro (232 mg, 1,68 mmol). A mistura amarelada obtida foi agitada em temperatura ambiente durante a noite. Foi diluída com diclorometano e lavada com salmoura. A camada orgânica foi seca em sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada. O resíduo foi dissolvido em diclorometano e carregado em coluna de sílica-gel e eluída com diclorometano/metanol (15:1 então 10:1). As frações que continha composto **1c** foram combinadas e concentradas para gerar 705 mg de produto bruto que foi ainda purificado por HPLC preparativa fase reversa (coluna C18, eluída com acetonitrila/água) para gerar composto **1c** como um sólido amarelado felpudo (181 mg, y = 33%). ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 8,28

(d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,86 (d, J = 3,6 Hz, 2H), 7,59 (s, 2H), 7,31-7,26 (m, 4H), 7,12 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 6,87-6,80 (m, 5H), 5,18 (dd, J_1 = 20,8 Hz, J_2 = 12,4 Hz, 4H), 4,50-4,47 (m, 2H), 3,99 (s, 6H), 3,75-3,48 (m, 18H), 3,37 (s, 3H), 2,44 (s, 3H), 1,32 (s, 6H); MS (m/z): encontrado 1025,9 (M + H_2O + Na)$^+$, 1043,9 (M + 2H_2O + Na)$^+$, 983,8 (M – H)$^-$, 1055,8 (M + 4H_2O – H)$^-$. Ver FIG. 1.



*Composto **1d**:*

[00636] A uma solução em agitação do composto **1c** (112 mg, 0,114 mmol) em diclorometano anidro (0,3 mL) e etanol absoluto (0,6 mL) foi adicionado borohidreto de sódio (0,9 mg, 0,023 mmol) a 0ºC. O banho de gelo foi removido após 5 minutos e a mistura foi agitada em temperatura ambiente por 3 horas e então resfriada a 0ºC e extinta com cloreto de amônio saturado, diluída com diclorometano, separada e a camada orgânica foi lavada com salmoura, seca em Na_2SO_4 anidro e filtrada por celite e concentrada. O resíduo foi purificado por HPLC fase reversa (coluna C18, acetonitrila/água). As frações correspondentes foram extraídas com diclorometano e concentradas para obter os produtos **1d**, **1e** e o material de partida não reagido **1c**. Composto **1d**: 37,1 mg (y = 33%), MS (m/z): encontrado 1010,4 (M + Na)$^+$, 1028,4 (M + H_2O + Na)$^+$, 1040,3 (M + 3H_2O – H)$^-$; composto **1e**: 6,4 mg (y = 5,7%), MS (m/z): encontrado 1012,4 (M + Na)$^+$; composto **1c**: 44,1 mg (y = 39%). Ver FIG. 1.

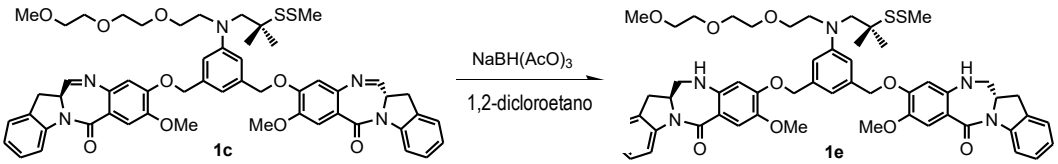


*Composto **1g**:*

[00637] A uma solução agitada de **1d** (23,6 mg, 0,024 mmol) em acetonitrila (3 mL) e metanol (3 mL) foi adicionado solução recém-

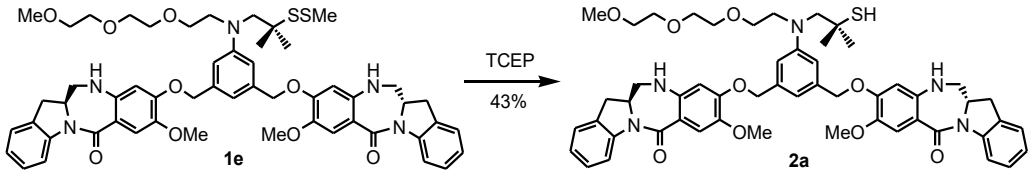
preparada de TCEP (17 mg de TCEP sal HCl foi neutralizado com bicarbonato de sódio saturado a pH 6~6,5 então diluída com 0,5 mL of pH 6,5 fosfato tampão) em temperatura ambiente. A mistura foi agitada em temperatura ambiente por 3 horas e então diluída com diclorometano e água deionizada, separada e a camada orgânica foi lavada com salmoura, seca em sulfato de sódio anidro e filtrada. O filtrado foi concentrado e submetido a alto vácuo para gerar 22 mg de **1f** como espuma amarelo clara. Outros 18 mg de **1f** foram preparados de 19 mg de **1d** seguindo o mesmo procedimento. Os 40 mg combinados (0,042 mmol) de **1f** foram dissolvidos em diclorometano anidro (0,5 mL) e agitado. À esta solução em agitação foi adicionado SPDB éster NHS **2** (34,6 mg, 80% pureza, 0,085 mmol) e di-isopropiletilamina (15 µl, 0,085 mmol). Continuou sendo agitada em temperatura ambiente durante a noite, extinta com cloreto de amônio saturado e diluída com diclorometano, separada e lavada com salmoura, seca em sulfato de sódio, filtrada e concentrada. O resíduo foi purificado por HPLC preparativa fase reversa (coluna C18, acetonitrila/água). As frações contendo produto foram combinadas, extraídas com diclorometano e concentradas para gerar composto **1g** como sólido branco (29,7 mg, y = 60%). ^{1}H RMN (400 Hz, CD_3CN): δ 8,28-8,25 (m, 1H), 8,20-8,17 (m, 1H), 7,87-7,84 (m, 1H), 7,49 (d, J = 4,4 Hz, 1H), 7,39 (d, J = 4,4 Hz, 1H), 7,31-7,19 (m, 4H), 7,13-7,01 (m, 2H), 6,92-6,87 (m, 3H), 6,77 (bs, 1H), 6,31-6,29 (m, 1H), 5,16-5,09 (m, 2H), 5,00 (d, J = 4,4 Hz, 2H), 4,94 (bs, -NH), 4,48-4,43 (m, 1H), 4,40-4,34 (m, 1H), 3,90 (d, J = 4,4 Hz, 3H), 3,77 (d, J = 4,4 Hz, 3H), 3,64-3,39 (m, 18H), 3,26 (d, J = 4,4 Hz, 3H), 2,82-2,70 (m, 8H), 2,17 (d, J = 4,4 Hz, 1H), 2,08-2,01 (m, 3H), 1,30 (d, J = 4,4 Hz, 6H); MS (m/z): encontrado 1025,9 $(M + H_2O + Na)^+$, 1043,9 $(M + 2H_2O + Na)^+$, 983,8 $(M - H)^-$, 1055,8 $(M + 4H_2O - H)^-$; MS (m/z), encontrado 1179,5 $(M + Na)^+$. Ver FIG. 1.

Exemplo 2



*Composto **1e**:*

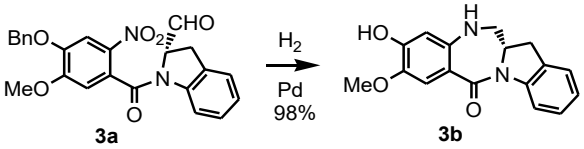
[00638] A uma solução agitada de **1c** (8 mg, 0,0081 mmol) em 1,2-diclorometano anidro (0,2 mL) foi adicionado triacetoxicoborohidreto de sódio (3,8 mg, 0,018 mmol). A mistura foi agitada em temperatura ambiente por 1,5 horas, então a mistura foi diluída com diclorometano e extinta com bicarbonato de sódio saturado, separada e a camada orgânica foi lavada com salmoura, seca em sulfato de sódio, e filtrada. O filtrado foi concentrado e o restante foi purificado por HPLC fase reversa (coluna C18, acetonitrila/água) para gerar composto **1e** como um sólido branco (4,7 mg, y = 58%). MS (m/z), encontrado 1012,4 $(M + Na)^+$, 1024,2 $(M + 2H_2O - H)^-$. Ver FIG. 2.



*Composto **2a**:*

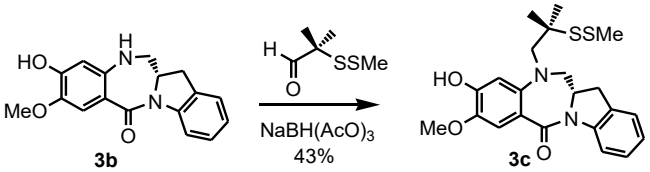
[00639] A uma solução agitada do composto **1e** (12 mg, 0,012 mmol) em acetonitrila (1 mL) e metanol (3 mL) foi adicionado solução recém-preparada de TCEP (11 mg de TCEP sal HCl foi neutralizado com bicarbonato de sódio saturado até pH ~6,5 então diluída com 0,4 mL de pH 6,5 tampão fosfato) em temperatura ambiente. A mistura foi agitada em temperatura ambiente por 3,5 horas e então diluída com diclorometano e água deionizada, separada e a camada orgânica foi lavada com salmoura, seca em sulfato de sódio anidro e filtrada. O filtrado foi concentrado e o restante foi purificado por HPLC fase reversa (coluna C18, acetonitrila/água) para gerar composto **2a** como um sólido branco (4,9 mg, y = 43%). MS (m/z), encontrado 966,4 $(M + Na)^+$, 978,2 $(M + 2H_2O - H)^-$. Ver FIG. 2.

Exemplo 3



*Composto **3b**:*

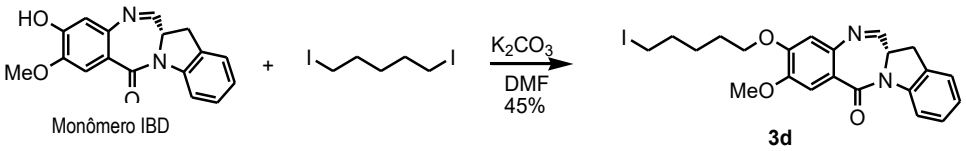
[00640] A uma solução do composto **3a** (830 mg, 1,9 mmol) em metanol (15 mL) foi adicionado Pd/C (10%, 204 mg, 0,19 mmol). O ar no frasco foi removido por vácuo e então substituído com hidrogênio em um balão. A mistura foi agitada em temperatura ambiente durante a noite. A mistura foi filtrada por celite e lavado o celite/Pd/C com diclorometano e metanol. O filtrado foi concentrado e o resíduo diluído com diclorometano e evaporado por alguns ciclos e então foi purificado por cromatografia de sílica-gel (diclorometano/metanol) para gerar composto **3b** como um sólido amarelado claro (558 mg, y = 98%). ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 8,34 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,40 (s, 1H), 7,22 (dd, J_1 = 8,0 Hz, J_2 = 7,6 Hz, 1H), 7,17 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,02 (dd, J_1 = 7,2 Hz, J_2 = 7,6 Hz, 1H), 6,16 (s, 1H), 4,37 (tt, J_1 = 10,4 Hz, J_2 = 7,2 Hz, 1H), 3,76 (s, 3H), 3,49-3,36 (m, 3H), 2,73 (dd, J_1 = 16,8 Hz, J_2 = 3,6 Hz, 1H); ^{13}C RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 167,0, 150,4, 142,6, 141,2, 140,8, 129,9, 127,7, 124,8, 123,96, 117,4, 113,7, 112,5, 104,7, 57,3, 56,3, 54,7, 33,0; MS (m/z), encontrado 295,1 $(M - H)^-$. Ver FIG. 3.



*Composto **3c**:*

[00641] A uma solução de 2-(metilditio)-isobutiraldeído (113 mg, 0,75 mmol) e composto **3b** (148 mg, 0,5 mmol) em 1,2-dicloroetano anidro (2 mL) foi adicionado triacetoxicoborohidreto de sódio (212 mg, 1,0 mmol). A mistura foi agitada em temperatura ambiente por 2 dias. Durante o tempo, outras duas porções (0,05 mL, 0,5 mmol/porção) de 2-

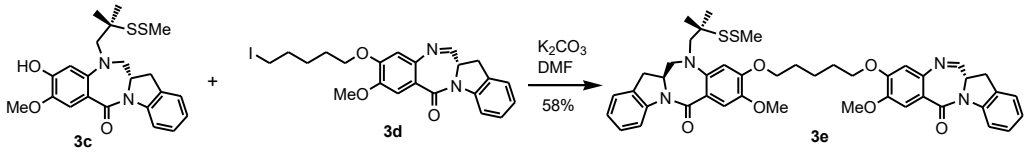
(metilditio)-isobutiraldeído junto com uma porção de triacetoxicoborohidreto de sódio (106 mg, 0,5 mmol) foram adicionados. A reação foi extinta com bicarbonato de sódio saturado, diluída com diclorometano e água. A camada orgânica foi lavada com salmoura, seca em sulfato de sódio e filtrada. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado por cromatografia de sílica-gel (coluna Combiflash, 24 g, hexanos/acetato de etila) para gerar composto **3c** como um sólido branco felpudo (92,5 mg, y = 43%). Material de partida não reagido **3b** foi ainda recuperado (49,3 mg, y = 33%). ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 8,30 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,28 (dd, J_1 = 6,8 Hz, J_2 = 7,6 Hz, 1H), 7,25-7,20 (m, 2H), 7,07 (t, J = 7,6 Hz, 1H), 6,80 (s, 1H), 6,17 (s, 1H), 4,36-4,28 (m, 1H), 3,89 (s, 3H), 3,78 (d, J = 14,4 Hz, 1H), 3,46-3,34 (m, 3H), 2,90 (d, J = 14,4 Hz, 1H), 2,73 (dd, J_1 = 16,4 Hz, J_2 = 2,8 Hz, 1H), 2,34 (s, 3H), 1,17 (s, 3H), 1,05 (s, 3H); ^{13}C RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 167,2, 149,0, 142,5, 142,2, 141,9, 129,9, 128,0, 125,3, 124,5, 124,1, 117,1, 112,0, 108,5, 64,8, 61,4, 58,1, 56,3, 53,4, 32,0, 26,3, 25,7, 25,4; MS (m/z), encontrado 453,3 $(M + Na)^+$, 429,2 $(M - H)^-$. Ver FIG. 3.



*Composto **3d**:*

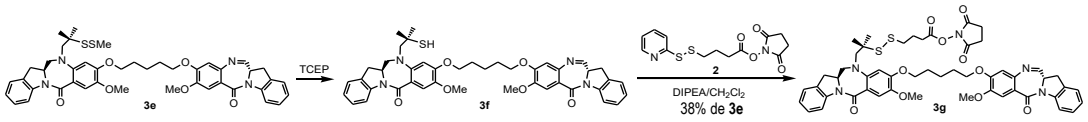
[00642] A uma solução agitada de monômero IBD (125 mg, 0,425 mmol) e 1,5-di-iodopentano (0,63 mL, 4,25 mmol) em dimetilformamida anidro (3 mL) foi adicionado carbonato de potássio (59 mg, 0,425 mmol) e a mistura foi agitada em temperatura ambiente durante a noite. A solução de reação foi diluída com diclorometano, lavada com salmoura e seca em sulfato de sódio anidro. Esta foi filtrada e concentrada. O resíduo foi purificado por cromatografia de sílica-gel (hexanos/acetato de etila) para gerar composto **3d** como espuma amarelada (94 mg, y = 45%). ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 8,27 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,86 (d, J =

4,8 Hz, 1H), 7,56 (s, 1H), 7,27 (dd, J_1 = 8,4 Hz, J_2 = 7,6 Hz, 2H), 7,10 (dd, J_1 = 7,6 Hz, J_2 = 7,2 Hz, 1H), 6,82 (s, 1H), 4,48 (dt, J_1 = 10,8 Hz, J_2 = 4,4 Hz, 1H), 4,15-4,07 (m, 2H), 3,96 (s, 3H), 3,70 (dd, J_1 = 16,8 Hz, J_2 = 10,8 Hz, 1H), 3,49 (dd, J_1 = 16,8 Hz, J_2 = 4,0 Hz, 1H), 3,22 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 1,96-1,87 (m, 4H), 1,64-1,57 (m, 2H); ^{13}C RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 164,0, 163,2, 151,4, 148,3, 142,2, 140,3, 129,6, 128,3, 124,9, 120,5, 117,0, 112,0, 110,6, 68,8, 56,4, 55,1, 33,3, 32,7, 28,0, 27,2, 6,6; MS (m/z), encontrado 513,3 $(M + Na)^+$, 543,2 $(M + 3H_2O - H)^-$. Ver FIG. 3.



*Composto **3e**:*

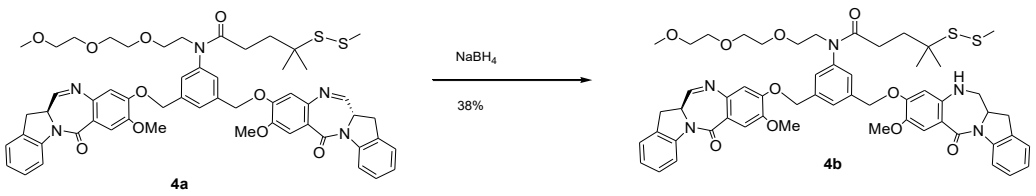
[00643] A uma solução agitada dos materiais de partida **3c** (91 mg, 0,21 mmol) e **3d** (94 mg, 0,19 mmol) em dimetilformamida anidra (1 mL) foi adicionado carbonato de potássio (29 mg, 0,21 mmol) e a mistura foi agitada em temperatura ambiente durante a noite. A solução de reação foi diluída com diclorometano, lavada com salmoura e seca em sulfato de sódio anidro. Esta foi filtrada, concentrada e o resíduo foi purificado por cromatografia de sílica-gel (hexanos/acetato de etila) para gerar composto **3e** como espuma amarelada (89,1 mg, y = 58%). ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 8,32-8,28 (m, 2H), 7,91 (bs, 1H), 7,57 (s, 1H), 7,36-7,21 (m, 5H), 7,15-7,05 (m, 2H), 6,85 (s, 1H), 6,74 (s, 1H), 4,53-4,48 (m, 1H), 4,37-4,31 (m, 1H), 4,21-4,03 (m, 4H), 3,98 (s, 3H), 3,88 (s, 3H), 3,86-3,70 (m, 2H), 3,55-3,35 (m, 4H), 2,93 (d, J = 4,0 Hz, 1H), 2,73 (dd, J_1 = 16,4 Hz, J_2 = 2,4 Hz, 1H), 2,36 (s, 3H), 2,03-1,96 (m, 3H), 1,77-1,67 (m, 3H), 1,21 (s, 3H), 1,06 (s, 3H); MS (m/z), encontrado 815,3 $(M + Na)^+$. Ver FIG. 3.



*Composto **3g**:*

[00644] A uma solução agitada do composto **3e** (33,1 mg, 0,042 mmol) em acetonitrila (2 mL) e metanol (4 mL) foi adicionada solução recém-preparada de TCEP (36 mg de TCEP sal HCl foi neutralizado com bicarbonato de sódio saturado até pH ~6,5 então diluída com 0,4 mL de pH 6,5 fosfato tampão) em temperatura ambiente. A mistura foi agitada em temperatura ambiente por 3 horas e então diluída com diclorometano e água deionizada, separada e a camada orgânica foi lavada com salmoura, seca em sulfato de sódio anidro e filtrada. O filtrado foi concentrado e submetido a alto vácuo para gerar 31 mg do composto **3f** como sólido amarelado. Este foi dissolvido em diclorometano anidro (0,5 mL). Éster SPDB NHS 2 (26 mg, 80% pureza, 0,063 mmol) e di-isopropiletilamina (11 µl, 0,063 mmol) foram adicionados subsequentemente. A mistura continuou sendo agitada em temperatura ambiente durante a noite, extinta com cloreto de amônio saturado e diluída com diclorometano, separada e lavada com salmoura, seca em sulfato de sódio, filtrada e concentrada. O resíduo foi purificado por HPLC preparativa fase reversa (coluna C18, acetonitrila/água). As frações contendo produto foram combinadas, extraídas com diclorometano e concentradas para gerar composto **3g** como sólido amarelado (15,2 mg, y = 38%). MS (m/z), encontrado 984,3 $(M + Na)^+$, 1014,2 $(M + 3H_2O - H)^-$. Ver FIG. 3.

Exemplo 4

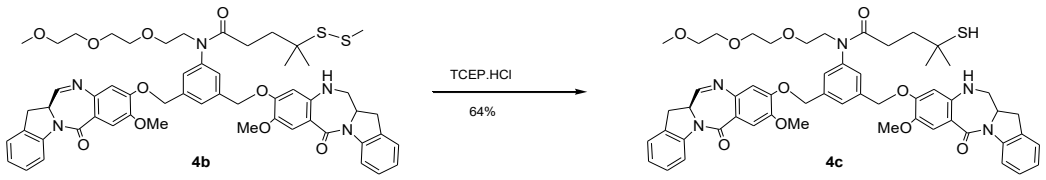


4a 4b

*Composto **4b**:*

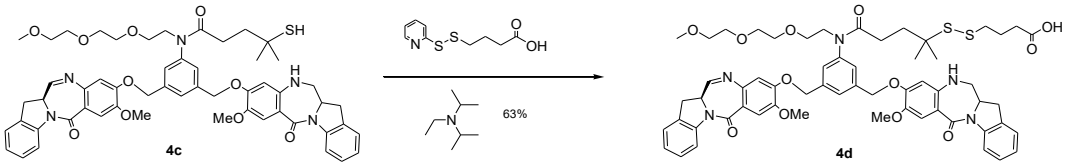
[00645] Uma solução agitada do composto **4a** (111 mg, 0,108 mmol) em etanol absoluto (720 µL) e diclorometano anidro (360 µL) foi resfriada a 0ºC em um banho de gelo. Borohidreto de sódio (0,817 mg, 0,022 mmol) em 50uL de etanol absoluto foi adicionado a 0ºC. A reação

foi agitada em temperatura ambiente por duas horas. A mistura foi resfriada a 0ºC em um banho de gelo, extinta com cloreto de amônio saturado e extraída com diclorometano. Os extratos orgânicos foram lavados com salmoura, secos em sulfato de sódio anidro e filtrados por Celite. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida e o material bruto foi purificado por RP-HPLC (C18 água DI/acetonitrila) para gerar composto **4b** (43mg, 38%). ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ8,26 (d, 1H, *J* = 8,0Hz), 8,18 (d, 1H, *J* = 8,0Hz), 7,77 (d, 1H, *J* = 4,4 Hz), 7,51 (s, 1H), 7,41 (s, 2H), 7,17 (m, 6H), 7,03 (t, 1H, *J* = 7,2Hz), 6,96 (t, 1H, *J* = 7,2Hz), 6,76 (s, 1H), 6,04 (s, 1H), 5,13 (m, 4H), 4,38 (m, 2H), 3,90 (s, 3H), 3,81 (s, 3H), 3,79 (m, 2H), 3,63 (m, 1H), 3,51 (m, 8H), 3,43 (m, 6H), 3,25 (s, 3H), 2,73 (dd, 1H, *J* = 3,6, 16,4Hz), 2,22 (s, 3H), 2,04 (m, 2H), 1,81 (m, 2H), 1,18 (s, 6H); MS (m/z) encontrado, 1051,9 (M+Na), 1069,9 (M+Na+H_2O). Ver FIG. 4.



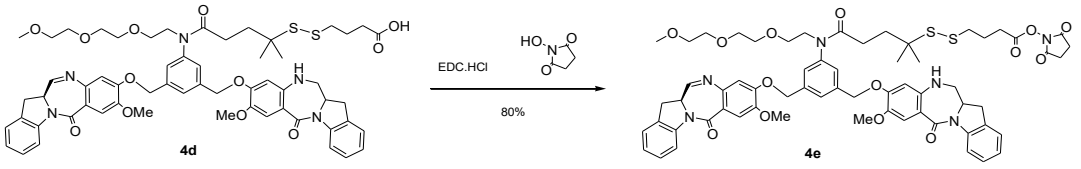
*Composto **4c**:*

[00646] A uma solução agitada do composto **4b** (40 mg, 0,039 mmol) em metanol (4,45 mL) e acetonitrila (2,225 mL) foi adicionado TCEP.HCl (39,0 mg, 0,136 mmol) em tampão fosfato de sódio (0,89mL, pH 6,5). A mistura agitada em temperatura ambiente por 18 horas. A mistura foi diluída com diclorometano e lavada com água e salmoura. Os extratos orgânicos foram secos em sulfato de sódio anidro, filtrados e concentrados. Purificação por RP-hPLC (C18, água DI/acetonitrila) e extração com diclorometano gerou composto **4c** (26,5mg, 64%); MS (m/z) encontrado, 1006,0 (M+Na). Ver FIG. 4.



*Composto **4d**:*

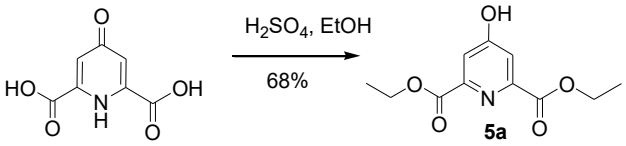
[00647] A uma solução agitada do composto **4c** (24 mg, 0,024 mmol) em diclorometano anidro (800 µL) foi adicionado PBA (11,18 mg, 0,049 mmol) e di-isopropiletilamina (20,18 µL, 0,116 mmol). Após agitação por 18 horas em temperatura ambiente a reação foi diluída com diclorometano e extinta com cloreto de amônio saturado. As camadas foram separadas e a orgânica foi lavada com salmoura, seca em sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. Purificação por PTLC (5% metanol/diclorometano) gerou composto **4d** (17mg, 63%); MS (m/z) encontrado, 1123,9 (M+Na) 1139,9 (M+K); 1099,8 (M-H) 117,9 (M-H+H_2O). Ver FIG. 4.



*Composto **4e**:*

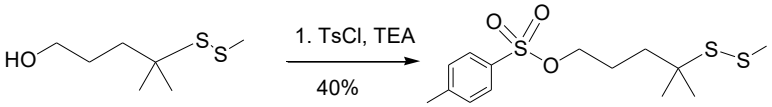
[00648] A uma mistura do composto **4d** (15 mg, 0,014 mmol) e N-hidróxi succinimida (4,70 mg, 0,041 mmol) em diclorometano anidro (1,0 mL) foi adicionado EDC.HCl (7,83 mg, 0,041 mmol). Após agitação por 18 horas em temperatura ambiente a reação foi diluída com diclorometano e extinta com cloreto de amônio saturado. A mistura foi lavada com salmoura, seca em sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O material bruto foi purificado por RP-HPLC (C18, água DI/acetonitrila). As frações contendo produto foram agrupadas e extraídas com diclorometano, secas em sulfato de magnésio anidro, filtradas e concentradas para gerar composto **4e** (13 mg, 80%); MS (m/z) encontrado, 1220,8 (M+Na) 1238,8 (M+Na+H_2O), 1254,8 (M+K+H_2O). Ver FIG. 4.

Exemplo 5



*Composto **5a**:*

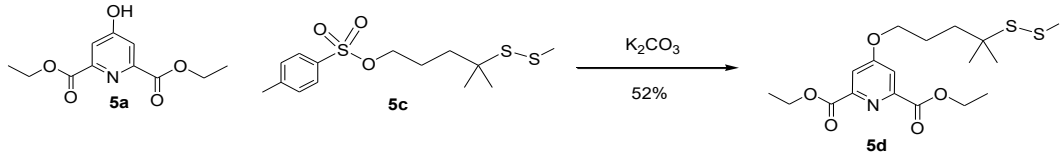
[00649] Uma mistura de ácido chelidamico hidratado (3,0 g, 15,56 mmol) e ácido sulfúrico (0,6 mL, 11,26 mmol) em etanol absoluto (40 mL) foi refluxado por 20 horas. A reação foi resfriada em temperatura ambiente, neutralizada com carbonato de sódio aquoso, e então acidificado com HCl concentrado. Água foi adicionada e a mistura foi extraída com diclorometano. Os extratos foram secos com sulfato de magnésio anidro, filtrados e concentrados. O material bruto foi purificado por cromatografia de sílica-gel (5% metanol/diclorometano) para gerar dietil 4-hidroxipiridina-2,6-dicarboxilato (**5a**) (2,5 g, 68%) como um sólido branco. Ver FIG. 5.



*Composto **5c**:*

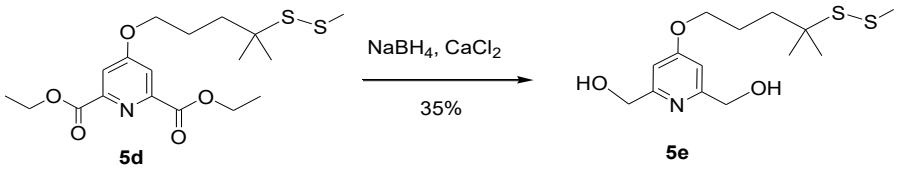
[00650] Uma solução de 4-metil-4-(metildisulfanil)pentan-1-ol (**5b**) (2,0 g, 11,09 mmol) em diclorometano anidro (55,5 mL) foi resfriada em 0ºC em um banho de gelo. Trietilamina (5,41 mL, 38,8 mmol) e cloreto de sulfonil tolueno (3,17 g, 16,64 mmol) foram adicionados a 0ºC. A reação agitada por três horas em temperatura ambiente. A mistura foi extraída com acetato de etila e lavada com salmoura. Os extratos orgânicos foram secos com sulfato de sódio anidro, filtrados e concentrados. Purificação por cromatografia de sílica-gel (5% acetato de etila/hexanos) resultou em 4-metilbenzenosuenossulfonato de 4-metil-4-(metildisulfanil)pentila (**5c**) (1,5g, 40%). **5b**: ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ3,42 (m, 2H), 2,19 (s, 3H), 1,77 (bs, 1H), 1,43 (m, 4H), 1,09 (s, 6H). **5c**: ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ7,66 (d, 2H, *J*=7,6Hz), 7,22 (d, 2H, *J*=8,0Hz), 3,90 (t, 2H, *J* = 6,4Hz), 2,32 (s, 3H), 2,23 (s, 3H), 1,60 (m, 2H),

1,44 (m, 2H), 1,11 (s, 6H). Ver FIG. 5.



*Composto **5d**:*

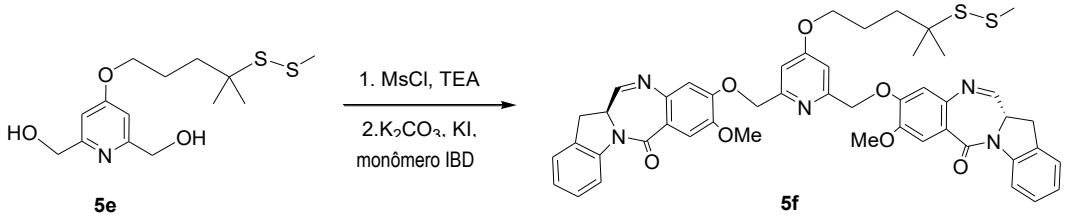
[00651] A uma solução agitada de 4-metilbenzenosuenossulfonato de 4-metil-4-(metildisulfanil)pentila (**5c**) (0,48 g, 1,435 mmol) e dietil 4-hidroxipiridina-2,6-dicarboxilato (**5a**)(0,343 g, 1,435 mmol) em dimetilformamida anidra (6,5 mL) foi adicionado Carbonato de potássio (0,297 g, 2,152 mmol). A reação foi agitada a 90ºC por 18 horas. Então, deixada resfriar em temperatura ambiente e extinta com cloreto de amônio saturado. A mistura foi extraída três vezes com acetato de etila. Os extratos foram secos com sulfato de sódio anidro, filtrados e concentrados sob pressão reduzida. Purificação por cromatografia de sílica-gel (30% hexanos/acetato de etila) gerou 4-(4-metil-4-(metildisulfanil)pentilóxi)piridina-2,6-dicarboxilato de dietila (5d)(300 mg, 52%); ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 7,70 (s, 2H), 4,40 (q, 4H, *J* = 7,2, 14,4Hz), 4,07 (t, 2H, *J*=6. Hz), 2,35 (s, 3H), 1,86 (m, 2H), 1,70 (m, 2H), 1,38 (t, 6H, *J*=7,2Hz), 1,27 (s, 6H); MS (m/z), encontrado 424,1 (M+Na), 440,1 (M+K). Ver FIG. 5.



*Composto **5e**:*

[00652] A uma solução agitada de 4-(4-metil-4-(metildisulfanil)pentilóxi)piridina-2,6-dicarboxilato de dietila (**5d**) (270 mg, 0,672 mmol) em etanol absoluto (7,0 mL) foi adicionado cálcio cloreto (224 mg, 2,017 mmol) e borohidreto de sódio (76 mg, 2,017 mmol). A reação foi deixada agitar em temperatura ambiente por 90 minutos após os quais esta foi extinta com água e concentrada em

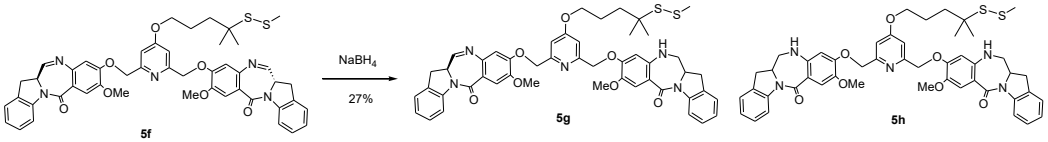
vácuo para remover o etanol. A mistura foi então extraída duas vezes com diclorometano. Os extratos orgânicos foram combinados, lavados com água, secos com sulfato de magnésio anidro e filtrados por celite. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida e o material bruto foi purificado por cromatografia de sílica-gel eluindo com 10% metanol/diclorometano para gerar (4-(4-metil-4-(metildisulfanil)pentilóxi)piridina-2,6-diil)dimetanol (**5e**)(75 mg, 35%); ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 6,63 (s, 2H), 4,60 (s, 4H), 3,95 (t, 2H, *J* = 6,2Hz), 3,54 (bs, 2H), 2,35 (s, 3H), 1,82 (m, 2H), 1,66 (m, 2H), 1,26 (s, 6H); MS (m/z), encontrado 340,1 (M+Na). Ver FIG. 5.



*Composto **5f**:*

[00653] Uma solução agitada de (4-(4-metil-4-(metildisulfanil)pentilóxi)piridina-2,6-diil)dimetanol (**5e**) (51 mg, 0,161 mmol) em diclorometano anidro (1,6 mL) foi resfriada a -5ºC em um banho de acetona/gelo. Trietilamina (0,112 mL, 0,803 mmol) e cloreto de metanosuanossulfonila (0,031 mL, 0,402 mmol) foram adicionados. A mistura foi agitada por 60 minutos a -5ºC. A reação foi extinta com água gelada e extraída com acetato de etila frio. Os extratos orgânicos foram lavados com água gelada, secos com sulfato de sódio anidro, filtrados e concentrados sob pressão reduzida para gerar o dimesilato. A uma mistura em agitação de intermediário dimesilato (179 mg, 0,378 mmol) e monômero IBD (256 mg, 0,869 mmol) em dimetilformamida anidra (3,8mL) foi adicionado carbonato de potássio (261 mg, 1,890 mmol) e iodeto de potássio (31,4 mg, 0,189 mmol). A reação foi deixada agitar em temperatura ambiente por 18 horas. A mistura foi extinta com água e extraída três vezes com diclorometano. Os extratos orgânicos

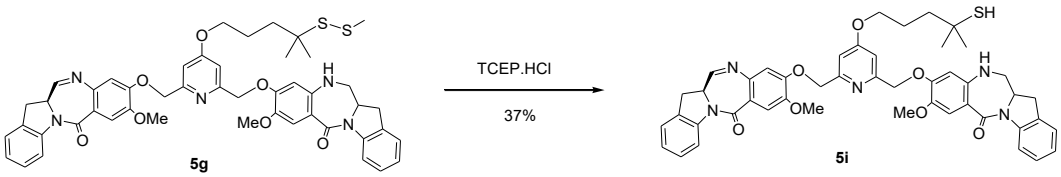
foram secos com sulfato de sódio, filtrados e concentrados. O material bruto foi redissolvido em acetonitrila e purificado em RP-HPLC (C18, água deionizada/acetonitrila). As frações contendo produto foram combinadas e extraídas com diclorometano, secas com sulfato de magnésio anidro, filtradas e concentradas sob pressão reduzida para gerar composto **5f** (65 mg, 20%); ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 8,20 (d, 2H, *J* = 8,0Hz), 7,78 (m, 2H), 7,53 (s, 2H), 7,20 (m, 4H), 7,04 (t, 2H, *J* = 7,4Hz), 6,91 (m, 2H), 6,80 (s, 2H), 5,22 (s, 4H), 4,40 (m, 2H), 3,94 (s, 6H), 3,93 (m, 2H), 3,63 (m, 2H), 3,42 (dd, 2H, *J* = Hz), 2,32 (s, 3H), 1,80 (m, 2H), 1,64 (m, 2H), 1,24 (s, 6H); MS (m/z), encontrado 892,3 (M+Na) 910,3 (M+Na+H_2O) 928,3 (M+Na+2H_2O). Ver FIG. 5.



*Composto **5g** e **5h**:*

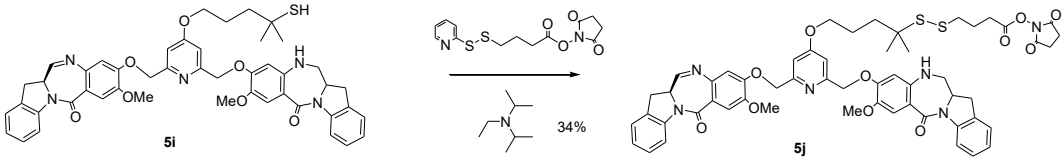
[00654] Uma solução do composto **5f** (74 mg, 0,085 mmol) em etanol absoluto (600 µL) e diclorometano anidro (300 µL) foi resfriada 0ºC em um banho de gelo. Borohidreto de sódio (0,644 mg, 0,017 mmol) em 50 µL de etanol absoluto foi adicionado a 0ºC. A mistura foi deixada agitar em temperatura ambiente por duas horas e foi então resfriada a 0ºC. A reação foi extinta com cloreto de amônio saturado e extraída com diclorometano. Os extratos orgânicos foram lavados com salmoura, secos em sulfato de sódio anidro, filtrados por Celite e concentrados sob pressão reduzida. O material bruto foi redissolvido em dimetilformamida e purificado por RP-HPLC (C18 água deionizada/acetonitrila). As frações contendo compostos **5g** e **5h** foram combinadas separadamente e extraídas com diclorometano, secas com sulfato de magnésio anidro, filtradas e concentradas para gerar composto **5g** (20 mg, 27%) e composto **5h**. **5g**: ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 8,25 (m, 1H), 8,18 (m, 1H), 7,77 (m, 1H), 7,51 (ss, 1H), 7,40 (ss, 1H), 7,18 (m, 4H), 7,08 (m, 1H), 7,03 (m, 1H), 6,92 (m, 2H), 6,86 (ss, 1H) 5,98/6,06 (ss,

1H), 5,24 (m, 4H), 4,40 (m, 1H), 4,30 (m, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,92 (m, 2H), 3,84 (s, 3H), 3,62 (m, 1H), 3,37 (m, 4H), 2,65 (m ou dd, 1H), 2,32 (ss, 3H), 1,77 (m, 2H), 1,64 (m, 2H), 1,24 (s, 6H). **5h**: ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 8,24 (d, 2H, *J* = 8,0Hz), 7,39 (s, 2H), 7,14 (m, 4H), 6,97 (m, 2H), 6,93 (m, 2H), 6,15 (ss, 2H), 5,25 (s, 4H), 4,37 (m ou t, 2H, *J*=9,8Hz), 4,2 (bs, 2H), 3,94 (m, 2H), 3,83 (s, 6H), 3,40 (m, 6H), 2,72 (dd, 2H, *J* = Hz), 2,32 (s, 3H), 1,79(m, 2H), 1,64 (m, 2H), 1,24 (s, 6H). Ver FIG. 5.



*Composto **5i**:*

[00655] A uma solução agitada do composto **5g** (20 mg, 0,023 mmol) em metanol (5,25 mL) e acetonitrila (1,750 mL) foi adicionado TCEP.HCl (19,72 mg, 0,069 mmol) em tampão de fosfato de sódio (0,7mL, pH 6,5). A mistura foi agitada por 3 horas em temperatura ambiente e então diluída com diclorometano e água. As camadas foram separadas e a orgânica foi lavada com salmoura. O produto bruto foi purificado por RP-HPLC (C18, água deionizada/acetonitrila). As frações contendo produto foram combinadas, extraídas com diclorometano e evaporadas para gerar composto **5i** (7 mg, 37%). MS (m/z), encontrado 848,3 (M+Na) 866,3 (M+Na+H_2O) 880,3 (M+Na+MeOH). Ver FIG. 5.



*Composto **5j**:*

[00656] A uma solução agitada do composto **5i** (7 mg, 8,47 µmol) e 2,5-dioxopirrolidin-1-il 4-(piridin-2-ildisulfanil)butanoato (8,64 mg, 0,021 mmol) em diclorometano anidro (113 µL) foi adicionado di-isopropiletilamina (3,69 µL, 0,021 mmol). Após agitação por 18 horas em temperatura ambiente a reação foi extinta com solução de cloreto

de amônio saturado e extraída com diclorometano. Os extratos orgânicos fora lavados com salmoura, secos com sulfato de sódio anidro, filtrados e concentrados sob pressão reduzida. O material bruto foi purificado por RP-HPLC preparativa (C18, água deionizada/acetonitrila). As frações contendo o produto foram extraídas com diclorometano, filtradas e evaporadas para gerar composto **5j** (3 mg, 34%). MS (m/z), encontrado 1063,3 (M+Na) 1081,3 (M+Na+H_2O). Ver FIG. 5.

Exemplo 6

Preparação de conjugado anticorpo-SPDB-fármaco:

[00657] Composto **1g** foi pré-tratado com 3 equivalentes molares de bissulfito de sódio (usando uma solução recém-preparada de $NaHSO_3$ em água) em 96-98% DMA em água por 4-5 horas a 25ºC. Para conjugação, o anticorpo humanizado a 2 mg/mL foi reagido com 5-7 equivalentes molares do composto **1g** (pré-tratado com $NaHSO_3$) por 6 h a 25ºC em 85-90% PBS, pH 7,4, tampão aquoso, ou 50 mM HEPES, pH 8,5, tampão aquoso, contendo 10-15% *N*,*N*-dimetilacetamida (DMA) e então purificado por uma coluna G25 de gel filtração em PBS, pH 7,4, para remover composto de fármaco não reagido hidrolisado. Os conjugados de anticorpo humanizado-SPDB-fármaco foram dialisados em 10 mM Histidina, 250 mM Glicina, 1% sacarose, pH 6,5 tampão. A relação de Anticorpo fármaco (DAR) dos conjugados foi medida sendo 2,2-2,9 por medidas de absorbância UV a 280 e 320 nm e usando os coeficientes de extinção da fármaco e anticorpo a 280 nm (215,000 $M^{-1}cm^{-1}$) e 320 nm (9137 $M^{-1}cm^{-1}$). O percentual de monômero nos conjugados foi determinado como >90% por SEC (Cromatografia por exclusão de tamanho) usando coluna TSK-Gel G300SWXL (7,8 mm × 300 mm, 5 µm tamanho de partícula). Baseado na absorbância UV do pico de monômero em SEC foi ainda demonstrado que os picos de monômero conjugado tinham moléculas da fármaco ligadas. Para o

ensaio de fármaco livre (não conjugada), o conjugado foi extraído com acetona para remover proteína, seco, e reconstituído em fase móvel e injetada em uma coluna de VYDAC 208TP C8 HPLC fase reversa (4,6 × 250 mm, 7 µm tamanho de partícula) e comparado aos padrões. O percentual de composto de fármaco livre no conjugado foi determinado como <0,5% do composto de fármaco conjugado. Ver FIG. 22.

Preparação de conjugado de Ab-SPDB-**2a** humanizado:

[00658] Ab humanizado a 8 mg/mL foi derivatizado com 4-6 equivalentes molares de heteroligante bifuncional SPDB por 1,5 h a 25ºC em 95% PBS, PH 7,4, contendo 5% DMA (v/v), e então purificado por uma coluna dessalinizante G25 em tampão citrato (35 mM tampão citrato, pH 5,5, contendo 2 mM EDTA, 150 mM NaCl) para remover ligante não reagido. A LAR (Relação Ligante Anticorpo) foi medida usando absorbância UV a 280 e 343 nm sem e com 50 mM adição de ditiotreitol (para medir anticorpo total e SPy liberado por ditiotreitol) e foi determinado sendo 2,7-4,1 LAR. O SPDB-anticorpo modificado a 2 mg/mL foi reagido com 2 equivalentes molares de composto **2a** (sal HCl) por SPDB ligado por 20 h em temperatura ambiente em 85% tampão citrato, 15 % DMA (v/v) e então purificado por uma coluna dessalinizante G25 em PBS, pH 7,4 para remover composto de fármaco não conjugado. O DAR do conjugado Ab-SPDB-**2a** humanizado final foi medido por espectrofotometria UV a 280 e 350 nm e calculado sendo ~1,7-2,1 DAR. O percentual de monômero e composto de fármaco ligado no monômero no conjugado foi determinado por HPLC usando coluna SEC (cromatografia por exclusão de tamanho). Ver FIG. 23.

Exemplo 7

Potência *in vitro* de Fármacos Livres e Conjugados:

[00659] Procedimento geral usado: As amostras de compostos da fármaco livre não conjugados de fármaco foram adicionados a placas de cultura de tecido de fundo plano de 96 poços e titulados usando

diluições seriais para cobrir a faixa molar desejada. Células positiva para antígeno (Ag^+) ou negativas para antígeno (Ag^-) foram adicionadas aos poços nas densidades de células específicas de modo que foram amostras triplicatas para cada concentração de fármaco para cada linhagem de célula correspondente. As placas foram então incubadas a 37 ^oC em uma atmosfera de 5% CO_2 por 4-5 dias dependendo da linhagem de células. COLO 205 (1.000 células/poço), Namalwa (3.000 células/poço), HEL 92,1,7 (3.000 células/poço) – 4 dias; RH30(1.000 células/poço), HL60/QC (5.000 células/poço), Ramos (10.000 células/poço), KB (2.000 células/poço), BJAB (2.000 células/poço), NB4 (3.000 células/poço) – 5 dias, RPMI 8226 (8.000 células/poço) – 6 dias.

[00660] Ao fim do período de incubação potências citotóxicos foram então avaliadas usando um ensaio de viabilidade celular baseado em WST-8 e células sobreviventes foram medidas desenvolvendo com WST-8 (2-7 horas). A absorbância em cada poço foi medida e a porção de células sobreviventes em cada concentração foi plotada para revelar a citotoxicidade e/ou especificidade de antígeno (dos conjugados).

[00661] Usando o procedimento geral descrito acima, a citotoxicidade dos compostos livres não conjugados da fármaco foi medida contra sete linhagens celulares: KB, um contaminante de célula HeLa, HL60/QC, uma linhagem de célula de leucemia mieloide aguda, Namalwa, uma linhagem de célula de linfoma de Burkitt, NB4, uma linhagem de célula promielocítica aguda, HEL92.1.7, uma linhagem de célula eritroleucemia, RPMI8226, uma linhagem de célula de mieloma múltiplo e BJAB, uma linhagem de célula de leucemia de célula B. Os resultados, mostrados na FIG. 24 e tabela 10 demonstram a alta potência destes compostos através de uma ampla faixa de tipos celulares. A potência e especificidade dos conjugados de anticorpo-fármaco foram medidos contra células que expressam antígenos, com e sem a adição de uma quantidade em excesso de anticorpo não

conjugado bloqueador para mostrar especificidade do efeito de morte. O conjugado MY9-6-fármaco foi extremamente potente para três diferentes células que expressam o antígeno: HL60/ATCC, HL60/QC e NB-4, apesar da expressão muito baixa de antígeno em células NB4. A potência específica poderia ser bloqueada pela adição de anticorpo não conjugado em excesso, demonstrando que o efeito de morte da célula é específico do antígeno. De modo semelhante, o conjugado huFOLR1-fármaco foi efetivo para matar células KB que expressam antígeno de um modo específico. Os resultados são ilustrados nas Figuras 25 e 26.

Tabela 10. Potência dos fármacos livres contra várias linhagens celulares. Os valores IC_{50} listados na tabela estão listados na unidade de nM.

	Namalwa	KB	HL60/QC	NB4	HEL92,1,7	RPMI8226	BJAB
1c	0,056	0,16	0,023				
1d	0,069	0,18	0,032				
1e	2,4	>3,0	0,67				
27d		0,23	0,05	0,039	0,14	0,07	0,04
27e		0,39	0,09	0,13	0,2	0,24	0,12
27f		4,4	1,7	1,1	1,8	>3,0	1
29a	0,002	0,004	0,001	0,0023	0,0031	0,011	0,001
29b	0,003	0,007	0,006	0,007	0,007	0,005	0,003
29c	0,013	0,057	0,03	0,023	0,027	0,16	0,015

[00662] Resultados semelhantes foram ainda obtidos usando diferentes linhagens celulares e diferentes conjugados da invenção, incluindo: huMY9-6-SPDB-**1f** contra células HL60/QC (Ag^+), células HL60/ATCC (Ag^+), e células NB-4 (Ag^+) (FIG. 25); huFOLR1-SPDB-**1f** contra células KB (Ag^+) (FIG. 26); huMY9-6-SPDB-**1f** contra células HL60/QC positivas para antígeno, células HL60/ATCC, células NB-4, e células HEL 92.1.7 (FIG. 29); huMy9-6-SPDB-**1f**, huMy9-6-sulfoSPDB-**1f**, e huMy9-6-BMPS-**1f** contra células HL60/QC (Ag^+) (FIG. 34);

chB38,1-SPDB-**1f** e chB38,1-sulfoSPDB-**1f** contra células COLO205 (Ag+) (FIG. 35); huMy9-6-SPDB-**1f**, huMy9-6-sulfoSPDB-**1f**, e huMy9-6-BMPS-**1f** contra células OCI-AML3 (Ag+) (FIG. 44). Ver ainda FIG. 49 para a potência dos vários conjugados contra várias linhagens celulares, expressos como valores IC_{50} (nM). Notar que nas FIGs. 25, 29, 34, 35, e 44, conjugados foram preparados na presença de bissulfito de sódio.

[00663] Para comparar medidas de potência *in vitro* para os conjugados objetos preparados com e sem reagente reativo imina, como bissulfito de sódio, huMy9-6-BMPS-**1f**, huMy9-6-sulfo-SPDB-**1f**, e huMy9-6-fármaco **2** foram preparados com e sem bissulfito de sódio usando o método de sulfonação *in situ* (em que os respectivos compostos da invenção foram primeiro misturados com bissulfito de sódio e um ligante de reticulação bifuncional contendo um grupo reativo, então a mistura de reação, sem outra purificação, foi reagida com o anticorpo monoclonal huMy9-6 como o agente de ligação à célula). IC_{50}s para os conjugados nas células HL60-QC são mostrados abaixo. Os dados indicam que a inclusão de grupo reativo imina (como bissulfito de sódio) na etapa de preparação do conjugado não impacta negativamente na potência *in vitro* dos conjugados objetos.

Conjugado	Tratamento $NaHSO_3$	IC_{50} (pM)	IC_{50} (pM) huMy9-6 bloqueador
huMy9-BMPS-**1f**	-	2	130
	+	1,5	55
huMy9-6-sulfo-SPDB-**1f**	-	5,6	1200
	+	7,1	610
huMy9-6-Fármaco **2**	-	16	> 3000
	+	6,8	> 3000

[00664] É aparente que o pré-tratamento de compostos da fármaco com bissulfito de sódio (5 equivalentes molares, 22 h, 4ºC, 90:10 DMA : pH 5,5 água) antes da conjugação com huMy9-6 não teve efeito

significativo na potência dependente do antígeno ou independente do antígeno (antígeno bloqueador com 1 μM de huMy9-6 não conjugado) *in vitro* dos conjugados.

Exemplo 8

[00665] Ligação de Conjugado Anticorpo-fármaco é semelhante a de anticorpo não modificado:

[00666] A ligação de conjugado huMY9-6-fármaco foi comparada com a de anticorpo huMy9-6 não modificado contra células HL60/QC expressando o antígeno usando citometria de fluxo. Brevemente, as células positivas para antígeno foram incubadas com conjugados ou anticorpos não modificado a 4ºC, então com um conjugado de anticorpo secundário-FITC a 4ºC, fixado com formaldeído (1% em PBS) e analisado por citometria de fluxo. Nenhuma diferença significativa foi observada entre a ligação do conjugado versus aquela do anticorpo não modificado. Um exemplo é mostrado na FIG. 27, onde um conjugado huMY9-6-fármaco ligado às células positivas para antígeno com um afinidade alta semelhante a do anticorpo não modificado.

Exemplo 9

Eficácia in vivo de conjugado huMy9-6-SPDB-**1f** em camundongos nus contendo tumor HL60/QC:

[00667] Neste estudo, a atividade anti-tumor de huMY9-6-SPDB-**1f** foi investigada em camundongos nus fêmeas contendo tumores HL60/QC, um modelo de leucemia mieloide aguda humana. Células de tumor HL60/QC, 2×10^6 células/camundongo foram subcutaneamente inoculadas em um volume de 0,1 mL/camundongo na área sobre o ombro direito de camundongos nus fêmeas atímicas, 5 semanas de idade. Oito dias após inoculação de camundongos com célula de tumor foram randomizados em grupos (n = 6 por grupo) por volume de tumor. O tratamento foi iniciado no dia da randomização, e os grupos incluída um grupo de controle dosado com PBS (200 μL/injeção), ou um único

tratamento em várias doses (5 a 100 µg/kg) de huMY9-6-SPDB**-1f** (50 µg/kg **1f** dose correspondeu a 2,5 mg/kg dose de anticorpo). Todos os tratamentos foram bem tolerados com os pesos corporais médios comparáveis a perda observada em camundongos de controle com PBS. Volume de tumor médio vs tempo é mostrado (FIGS. 28 e 36) com os dados demonstrando uma atividade antitumor dependente da dose de conjugado huMY9-6-SPDB**-1f**. A dose efetiva mínima foi estimada sendo 20 µg/kg, que é cerca de 35 vezes menor do que a dose máxima tolerada.

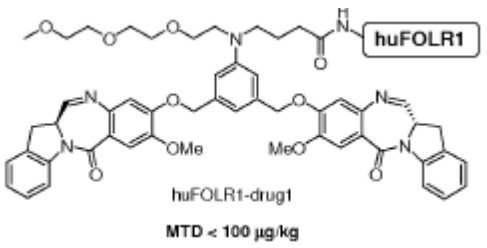
Exemplo 10

[00668] A tolerabilidade de conjugados huFOLR-1 foi investigada em camundongos fêmeas CD-1. Os animais foram observados por sete dias antes do início do estudo e demonstraram estar livres de doença ou enfermidade. Os camundongos foram administrados com uma única injeção *i.v.* do conjugado e os animais foram monitorados diariamente para perda de peso corporal, morbidade ou mortalidade. A tabela 9 mostra que para o conjugado huFOLR1-fármaco1 foi tolerado em somente a menor dos testada de 50 µg/kg. Em contraste, ambos os conjugados mono-imina huFOLR1-Fármaco**2** e huFOLR1-SPDB**-1f** demonstraram ser melhor tolerados com uma dose máxima tolerada de <198 µg/kg e >560 µg/kg respectivamente.

Tabela 9. Dados de comparação de tolerabilidade para conjugados (A) huFOLR1-fármaco1, (B) huFOLR1-fármaco**2**, e (C) huFOLR1-SPDB**-1f**.

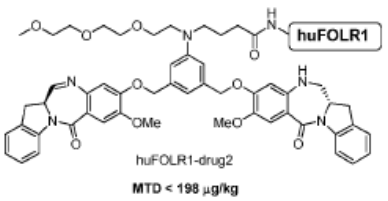
A)

Dose (µg/kg)	% Sobrevivência
50	100
100	0
200	0
300	0
400	0



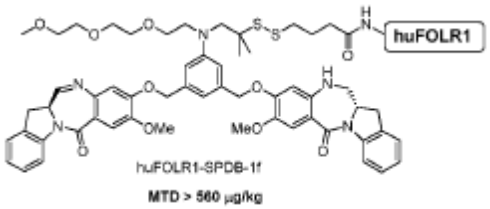
B)

Dose (µg/kg)	% Sobrevivência
66	100
132	100
198	50
264	25

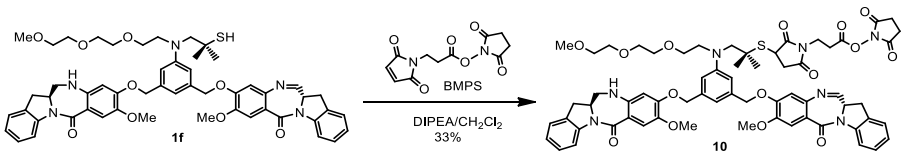


C)

Dose (µg/kg)	% Sobrevivência
120	100
160	100
200	100
320	100
560	100



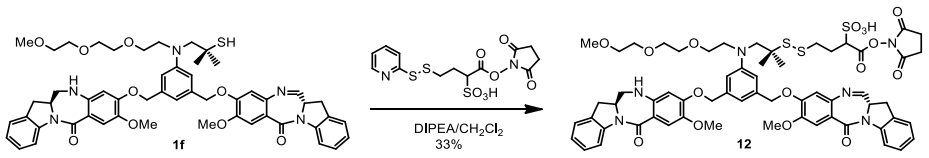
Exemplo 11



*Composto **10**:*

[00669] A uma solução agitada de **1f** (18 mg, 0,019 mmol) e N-(β-maleimidopropilóxi)succinimida (BMPS) éster (9,2 mg, 0,034 mmol) em diclorometano anidro (0,3 mL) foi adicionado di-isopropiletilamina anidro (5 µL, 0,029 mmol). A mistura foi agitada em temperatura ambiente por 27 horas, extinta com cloreto de amônio saturado e diluída com diclorometano. A camada orgânica foi lavada com salmoura, seca em sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por HPLC preparativa fase reversa (coluna C18, CH_3CN/H_2O). As frações contendo produto foram combinadas, extraídas com diclorometano e evaporadas para gerar composto **10** como um sólido branco (7,6 mg, y = 33%). MS (m/z): encontrado 1208,3 $(M + H)^+$. Ver FIG. 13.

Exemplo 12



*Composto **12**:*

[00670] A uma solução agitada de **1f** (16,5 mg, 0,018 mmol) e sulfo-SPDB (14,2 mg, 0,036 mmol) em diclorometano anidro (0,3 mL) foi adicionado di-isopropiletilamina anidro (9 µL, 0,054 mmol). A mistura foi agitada em temperatura ambiente durante a noite e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por HPLC preparativa fase reversa (coluna C18, CH_3CN/H_2O). As frações contendo produto foram combinadas, extraídas com diclorometano e evaporadas para gerar 6,6 mg do composto **12** como espuma amarelada. A camada aquosa foi liofilizada para gerar mais 0,5 mg do composto **12** como sólido branco. MS (m/z): encontrado 1235,0 $(M-H)^-$. Ver FIG. 15.

Exemplo 13

Preparação de conjugado anticorpo humanizado-sulfoSPDB-**1f**

[00671] Uma reação contendo 2,5 mg/mL anticorpo huMy9-6 e 10 equivalentes molares de **10** (pré-tratado com 5 vezes excesso de bissulfito de sódio em 90:10 DMA:água) em 50 mM HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanossulfônico) pH 8,5 tampão e 15% v/v DMA (*N,N*-dimetilacetamida) cosolvente foi deixado para conjugar por 6 horas a 25ºC. Após a reação, o conjugado foi purificado e tampão trocado em 250 mM Glicina, 10 mM Histidina, 1% sacarose, 0,01% Tween, 50 µM formulação tampão bissulfito de sódio, usando colunas dessalinizantes NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). A diálise foi realizada no mesmo tampão por 4 horas em temperatura ambiente utilizando cassetes de diálise Slide-a-Lyzer (ThermoScientific 20,000 MWCO). O conjugado purificado foi encontrado para ter um DAR de 2,4 (por UV-Vis usando coeficientes de extinção molar $\varepsilon_{330\ nm}$= 15,484 $cm^{-1}M^{-1}$ e $\varepsilon_{280\ nm}$= 30, 115 $cm^{-1}M^{-1}$ por 1f, e $\varepsilon_{280\ nm}$= 146,000 $cm^{-1}M^{-1}$ para anticorpo My9-6), 96,7% monômero (por Cromatografia por exclusão de

tamanho), <1% composto de fármaco livre não conjugado (por extração por acetona/HPLC fase reversa) e uma concentração final de proteína de 1,4 mg/mL.

[00672] A potência *in vitro* de conjugados anticorpo-sulfoSPDB-**1f** foi medida de acordo com o procedimento geral descrito no Exemplo 7 e os dados são mostrados nas Figuras 34 e 35. Os conjugados de anticorpo-sulfoSPDB-**1f** têm potência comparável ou maior do que os conjugados anticorpo-SPDB-**1f**.

[00673] Uso de reativos imina covalentes, como bissulfito de sódio, melhora as especificações do conjugado Ab-composto (por exemplo, % monômero e carga de fármaco). Em um experimento, formação de aduto foi realizada com 5 equivalentes molares de reativo imina sobre NHS-BMPS-**1f** em 90% DMSO/ 10% PBS pH 7,4 por 4 h a 25ºC. A mistura de reação foi então adicionada ao anticorpo huMy9-6 (4 equivalentes molares IGN, 2 mg/ml, 10% v/v DMSO, 50 mM HEPES tampão, pH 8,5, 5 h, 25ºC). Conjugados preparados usando hidrossulfito de sódio, bissulfito de sódio, ou metabissulfito de sódio tinham relações semelhantes de IGN/Ab e % monômero, enquanto conjugados preparados sem tratamento aditivo levou a incorporação muito baixa da fármaco. Ver tabela abaixo.

Reativo	IGN/Ab (UV)	% monômero (SEC)	% 1f em monômero
Hidrossulfito de Sódio	2,6	88	82
Bissulfito de sódio	2,6	88	83
Metabissulfito de Sódio	2,7	88	82
Sem aditivo	0,1	98	94

Exemplo 14

Preparação de conjugado anticorpo humanizado-BMPS-**1f**

[00674] Uma reação contendo 2,0 mg/mL anticorpo huMy9-6 e 5 equivalentes molares de **12** (pré-tratado com 5 vezes excesso de bissulfito de sódio em 90:10 DMA:água) em 50 mM HEPES (ácido 4-(2-

hidroxietil)-1-piperazina etanossulfônico) pH 8,5 tampão e 15% v/v DMA (*N,N*-dimetilacetamida) cosolvente foi deixado reagir por 6 horas a 25ºC. Após a reação, o conjugado foi purificado e tampão trocado em 250 mM Glicina, 10 mM Histidina, 1% sacarose, 0,01% Tween, 50µM µM formulação tampão bissulfito de sódio, usando colunas dessalinizantes NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). A diálise foi realizada no mesmo tampão por 4 horas em temperatura ambiente utilizando cassetes de diálise Slide-a-Lyzer (ThermoScientific 20,000 MWCO). O conjugado purificado demonstrou ter um DAR de 2,8 (por UV-Vis usando coeficientes de extinção molar $\varepsilon_{330\ nm}$= 15,484 $cm^{-1}M^{-1}$ e $\varepsilon_{280\ nm}$= 30, 115 $cm^{-1}M^{-1}$ por 1f, e $\varepsilon_{280\ nm}$= 146,000 $cm^{-1}M^{-1}$ para anticorpo My9-6), 91,7% monômero (por Cromatografia por exclusão de tamanho), <1% composto de fármaco livre não conjugado (por extração por acetona/HPLC fase reversa) e uma concentração final de proteína de 1,2 mg/mL.

[00675] A potência *in vitro* de conjugados anticorpo-BMPS**-1f** foi medida de acordo com o procedimento geral descrito no Exemplo 7 e os dados são mostrados nas FIGS. 34 e 35. Os conjugados de anticorpo-BMPS**-1f** têm potência comparáveis aos conjugados de anticorpo-SPDB**-1f**.

Exemplo 15

Eficácia in vivo de conjugado hu FOLR1-SPDB**-1f** em camundongos nus contendo tumor KB:

[00676] Neste estudo, a atividade antitumor de hu FOLR1-SPDB**-1f** foi investigada em camundongos nus fêmeas contendo tumores KB, um modelo de carcinoma cervical humano. KB, 1×10^7 células/camundongo foram inoculados por via subcutânea em um volume de 0,1 mL/camundongo na área sobre o ombro direito de camundongos nus fêmeas atímicas, 6 semanas de idade. Seis dias após inoculação de célula tumoral os camundongos foram randomizados em grupos (n = 6

por grupo) por volume de tumor. O tratamento foi iniciado no dia após a randomização, e os grupos incluíram um grupo de controle dosado com PBS (200 µL/injeção), ou um único tratamento em várias doses (20 a 200 µg/kg) de hu FOLR1-SPDB-**1f** (50 µg/kg de dose de fármaco ligada correspondente a 2,8 mg/kg dose de anticorpo). Todos os tratamentos foram bem tolerados sem perda de peso corporal observada em qualquer um dos grupos de teste. Volume de tumor médio vs tempo é mostrado (FIG. 37) com os dados demonstrando uma atividade antitumor dependente da dose de conjugado hu FOLR1-SPDB-**1f**. A dose efetiva mínima foi estimada sendo <50 µg/kg, que é cerca de 14 vezes menor do que a dose máxima tolerada.

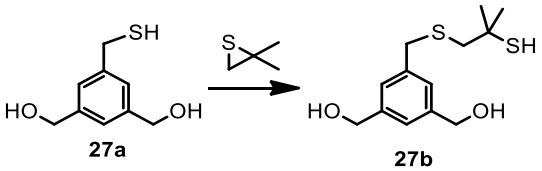
[00677] Resultados semelhantes *in vivo* foram ainda obtidos usando outros conjugados da invenção contra vários outros modelos de câncer, incluindo huMy9-6-sulfo-SPDB-**1f** em camundongos contendo tumor MOLM-13 (FIG. 50); huMy9-6-sulfo-SPDB-**1f** em camundongos contendo tumor NB4 (FIG. 51); huMy9-6-BMPS-**1f** em camundongos contendo tumor HL60/QC (FIG. 52); huMy9-6-BMPS-**1f** em camundongos contendo tumor MOLM-13 (FIG. 53); huMy9-6-fármaco **2** em camundongos contendo tumor HL60/QC (FIG. 56); e huMy9-6-fármaco **2** em camundongos contendo tumor MOLM-13 (FIG. 57). Notar que nas FIGs. 53, 54, 56, e 57, conjugados foram preparados na presença de bissulfito de sódio.

[00678] Para comparar eficácia in vivo de conjugados objetos preparados com ou sem um grupo imina reativo, huMy9-6-fármaco **2** foram formulados com ou sem 50 µM bissulfito de sódio, e os conjugados foram usados para tratar camundongos contendo tumor xenoenxertos HL60-QC. Os dados abaixo mostram que o conjugado formulado com ou sem 50 µM bissulfito de sódio mostrou T/C% comparável a ~20 µg/kg dose da fármaco, indicando que a inclusão de bissulfito de sódio na preparação de conjugado não negativamente

impacta a potência *in vivo* do conjugado objeto.

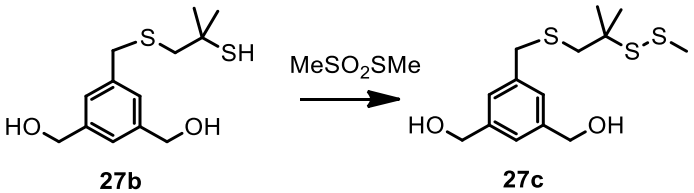
$NaHSO_3$	Dose efetiva mínima (µg/kg fármaco)	T/C %
-	18	20
+	19	16

Exemplo 16



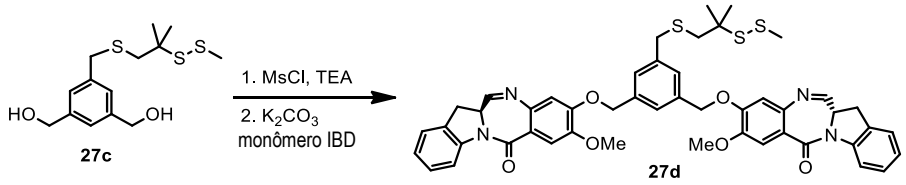
*Composto **27b**:*

[00679] (5-((2-mercapto-2-metilpropiltio)metil)-1,3-fenilenofenileno) dimetanol: (5-(mercaptometil)-1,3-fenileno)dimetanol (0,163 g, 0,885 mmol) foi dissolvido em metanol (3 mL) em um frasco pequeno e uma barra de agitação foi adicionada. A esta solução foi adicionado trietilamina (0,016 mL, 0,118 mmol) seguido por 2,2-dimetiltiirano (0,058 mL, 0,590 mmol) e a mistura resultante foi fechada e agitada durante a noite (16 hrs) em temperatura ambiente. A reação foi então concentrada, redissolvida em diclorometano, carregada em uma placa de sílica ptlc (1000 micron) e a placa foi desenvolvida usando 10% metanol em diclorometano. A banda correspondente ao produto foi raspada, filtrada com acetato de etila líquido, e concentrada para gerar (5-((2-mercapto-2-metilpropiltio)metil)-1,3-fenileno)dimetanol (0,095 g, 0,349 mmol, 59,1 % rendimento). ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 7,26 (s, 3H), 4,69 (s, 4H), 3,82 (s, 2H), 2,74 (s, 2H), 2,17 (s, 1H), 2,12 (br s, 2H), 1,43 (s, 6H); ^{13}C RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 141,6, 138,9, 126,7, 124,3, 65,0, 49,0, 45,4, 38,4, 31,5; MS (m/z), esperado: 272,4, encontrado 295,0 (M+Na). Ver FIG. 30.



*Composto **27c**:*

[00680] (5-((2-metil-2-(metildisulfanil)propiltio)metil)-1,3-fenileno) dimetanol: (5-((2-mercapto-2-metilpropiltio)metil)-1,3-fenileno)dimetanol (0,120 g, 0,440 mmol) foi dissolvido em etanol (5 mL) e 1,0 M fosfato de potássio tampão (pH 7) (5,00 mL) e resfriado em um banho de gelo (um ppt se formou, mas foi ignorado). Metanossulfonotioato de S-metila (0,083 mL, 0,881 mmol) foi adicionado e a mistura agitada durante a noite com aquecimento gradual (por 30 minutos) em temperatura ambiente. A reação foi diluída com diclorometano e a camada orgânica foi removida, lavada com água, seca em sulfato de sódio anidro, e concentrada em vácuo. O resíduo foi dissolvido em diclorometano e carregado em uma placa 500 micron ptlc e desenvolvido com 66% acetato de etila em hexano. A banda correspondente ao produto foi raspada, filtrada usando acetato de etila, e concentrada para gerar (5-((2-metil-2-(metildisulfanil)propiltio)metil)-1,3-fenileno)dimetanol (0,091 g, 0,286 mmol, 64,9 % rendimento). ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 7,27 (s, 3H), 4,71 (s, 4H), 3,78 (s, 2H), 2,77 (s, 2H), 2,41 (s, 3H), 1,94 (br s, 2H), 1,38 (s, 6H); ^{13}C RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 141,6, 139,0, 126,7, 124,2, 65,0, 51,8, 44,0, 38,2, 26,7, 25,3; MS (m/z), esperado: 341,5, encontrado 341,1 (M+Na). Ver FIG. 30.

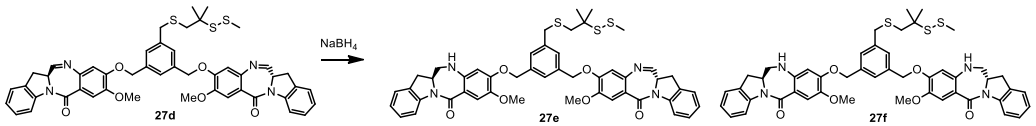


*Composto **27d**:*

[00681] (5-((2-metil-2-(metildisulfanil)propiltio)metil)-1,3-fenileno) dimetanol (80 mg, 0,251 mmol) em diclorometano anidro (1,75 mL) foi resfriado a -5ºC em um banho de salmoura/gelo. Trietilamina (105 µL, 0,753 mmol) foi adicionado seguido pela adição de cloreto de metanosuanossulfonila (50,7 µL, 0,653 mmol) a -5ºC. A reação foi agitada a -5ºC por uma hora após a qual esta foi diluída com acetato de

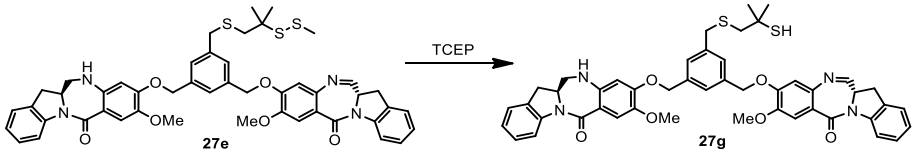
etila frio e gelo foi adicionado. A mistura foi transferida em um funil de separação e extraída com acetato de etila frio. Os extratos orgânicos foram lavados com água gelada e então secos com e sulfato de magnésio e sódio anidros, filtrados e concentrados sob pressão reduzida. O resultante (5-((2-metil-2-(metildisulfanil)propiltio)metil)-1,3-fenileno)bis(metileno)dimetanossulfonato foi usado sem outra purificação.

[00682] Monômero IBD (177 mg, 0,602 mmol) em N, N-dimetilformamida anidro (1,75 mL) foi adicionado a (5-((2-metil-2-(metildisulfanil)propiltio)metil)-1,3-fenileno)bis(metileno) dimetanossulfonato (119 mg, 0,251 mmol) em temperatura ambiente. Carbonato de potássio (173 mg, 1,253 mmol) foi adicionado e a reação foi deixada agitar em temperatura ambiente por 20 horas. A mistura de reação foi extinta com água e extraída com diclorometano. Os extratos foram lavados com salmoura e então secos com sulfato de sódio anidro, filtrados e concentrados em alto vácuo. O produto bruto foi purificado por cromatografia flash em sílica-gel (neat DCM → 2% MeOH/DCM). As frações contendo produto foram combinadas, concentradas e purificadas por semi-prep RP-HPLC (C18, A=DI água B=ACN, 20mL/min). As frações contendo produto desejado foram combinadas, extraídas com diclorometano, secas com sulfato de magnésio anidro, filtradas e concentradas para gerar o produto desejado (46mg, 21%). ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 8,19 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,77 (m, d, *J* = 4,4 Hz, 2H), 7,50 (s, 2H), 7,34 (s, 1H), 7,31 (s, 2H), 7,19 (m, 4H), 7,03 (t, *J* = 7,2, 7,6 Hz, 2H), 6,77 (s, 2H), 5,14 (m, 4H), 4,40 (m, 2H), 3,91 (s, 6H), 3,70 (m, 2H), 3,63 (m, 2H), 3,41 (m, 2H), 2,65 (s, 2H), 2,29 (s, 3H), 1,26 (s, 6H). MS (m/z), calculado. 893,2 $(M+Na)^+$; encontrado 893,2 $(M + Na)^+$, 911,2 $(M + H_2O + Na)^+$, 929,2 $(M + 2H_2O + Na)^+$, 945,1 $(M + 2H_2O + K)^+$. Ver FIG. 30.



*Composto **27e** e **27f**:*

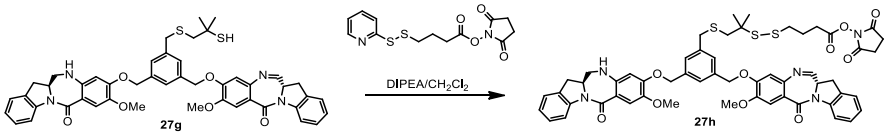
[00683] A uma solução resfriada (0º C) de **27d** (50 mg, 0,057 mmol) em diclorometano anidro (225 µL) e etanol (450 µL) foi adicionado borohidreto de sódio (0,651 mg, 0,017 mmol). A reação foi agitada por cinco minutos a 0 ºC e então em temperatura ambiente por 2,5 hrs. A mistura de reação foi resfriada a 0 ºC, extinta com cloreto de amônio saturado, e extraída com diclorometano. Os extratos orgânicos foram lavados com salmoura, secos em sulfato de sódio anidro, filtrados por Celite e concentrados. O material bruto foi purificado por semi-prep RP-HPLC (C18, A=DI água B=ACN, 20mL/min). As frações contendo produto desejado foram combinadas, extraídas com diclorometano, secas com sulfato de magnésio anidro, filtradas e concentradas para gerar a mono amina reduzida **27e** (11mg, 22%) MS (m/z), Calculado. 895,3 $(M+Na)^+$ encontrado 895,2 $(M + Na)^+$, 913,2 $(M + H_2O + Na)^+$, 929,2 $(M + H_2O + K)^+$ e a amina di-reduzida 27f (5mg, 10%) MS (m/z), Calculado. 897,3 $(M+Na)^+$, encontrado 897,3 $(M + Na)^+$. Ver FIG. 30.



*Composto **27g**:*

[00684] A uma solução agitada de **27e** (10 mg, 0,011 mmol) em metanol (733 µL) e acetonitrila (880 µL) foi adicionado tris(2-Carboxietil) cloridrato fosfino (9,85 mg, 0,034 mmol) em tampão 6,5 (147 µL). A mistura agitada por 3 horas em temperatura ambiente. A reação foi diluída com diclorometano. Água foi adicionada e as camadas foram separadas. A camada orgânica foi lavada com salmoura, seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida para gerar composto **27g** (9mg, 95%). MS (m/z), Calculado. 849,3

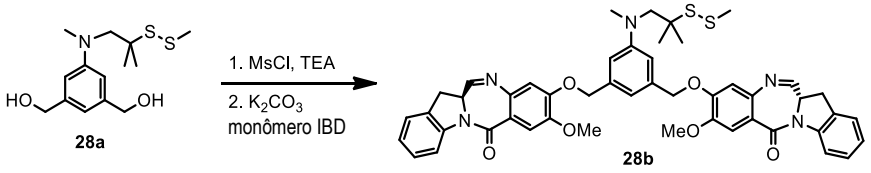
$(M+Na)^+$; encontrado 849,2 $(M + Na)^+$, 867,2 $(M + K)^+$. Ver FIG. 30.



*Composto **27h**:*

[00685] A uma solução agitada de **27g** (9 mg, 10,88 µmol) e 2,5-dioxopirrolidin-1-il 4-(piridin-2-ildisulfanil)butanoato (9,3mg, 0,023 mmol) em diclorometano anidro (0,4 mL) foi adicionado di-isopropiletilamina anidro (9 µl, 0,054 mmol) e a reação foi agitada em temperatura ambiente durante a noite. A mistura foi extinta com solução de cloreto de amônio saturado e extraída com diclorometano. Os extratos foram lavados com salmoura, secos com sulfato de sódio anidro e concentrados sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por HPLC preparativa fase reversa (coluna C18, CH_3CN/H_2O). As frações contendo produto foram combinadas, extraídas com diclorometano e evaporadas para gerar composto **27h** (5mg, 44%). MS (m/z), Calculado. 1064,3 $(M + Na)^+$; encontrado 1064,1 $(M + Na)^+$, 1082,1 $(M + H_2O + Na)^+$, 1098,1 $(M + H_2O + K)^+$. Ver FIG. 30.

Exemplo 17

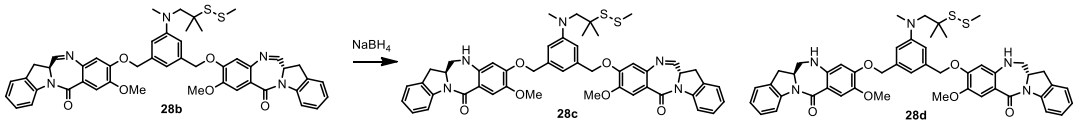


*Composto **28b**:*

[00686] (5-(metil(2-metil-2-(metildisulfanil)propil)amino)-1,3-fenileno) dimetanol (52 mg, 0,172 mmol) foi dissolvido em diclorometano anidro (1,7 mL) e resfriado a -5 em um banho de acetona/gelo. Primeiro, trietilamina (0,120 mL, 0,862 mmol) foi adicionada seguido por cloreto de metanossulfonil (0,040 mL, 0,517 mmol). A mistura foi agitada no banho por 1 hora. A reação foi então diluída com acetato de etila frio e lavada com água fria três vezes e então seca em sulfato de magnésio anidro. O dimesilato foi filtrado, concentrado em vácuo, e colocado em

alto vácuo até secar completamente. O produto foi usado como tal diretamente na etapa seguinte.

[00687] Monômero IBD (115 mg, 0,39 mmol) em N,N-dimetilformamida anidro (1,5 mL) foi adicionado ao dimetanossulfonato de (5-(metil(2-metil-2-(metildisulfanil)propil)amino)-1,3-fenileno)bis (metileno) (72 mg, 0,156 mmol) em temperatura ambiente. Carbonato de potássio (108 mg, 0,780 mmol) foi adicionado e a reação foi deixada agitar em temperatura ambiente por 20 horas. Água (10mL) foi adicionado diretamente a uma mistura com resultante agitação na formação de um precipitado branco. A mistura foi filtrada e os sólidos foram lavados com mais porções de água. O sólido foi então dissolvido em diclorometano, extraído com água, a camada orgânica foi então seca em sulfato de sódio anidro, filtrada, e concentrada em vácuo para gerar composto **28b** (104 mg, 78%) que foi usado na etapa seguinte sem outro tratamento. MS (m/z), encontrado 912,1 (M + $2H_2O$ + Na). Ver FIG. 31.

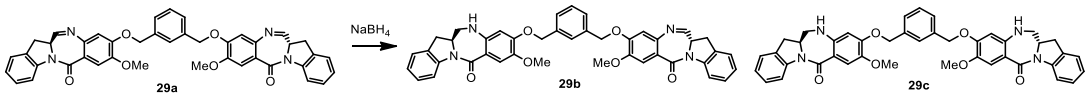


*Composto **28c** e **28d**:*

[00688] Composto **28b** (55 mg, 0,064 mmol) foi dissolvido em uma mistura anidra de diclorometano (0,4mL) e etanol (0,8 mL) e resfriada a 0°C em um banho de gelo. Uma solução de borohidreto de sódio (0,731 mg, 0,019 mmol) dissolvida em etanol (100 µl) foi então adicionada e a mistura foi agitada por 5 minutos e o banho de gelo foi removido. A reação foi deixada agitar por 2 horas, extinta em temperatura baixa adicionando cloreto de amônio saturado e diclorometano, separada e a camada orgânica foi lavada com salmoura, seca em sulfato de sódio anidro, filtrada, e concentrada em vácuo. O resíduo foi purificado por semi-prep RP-HPLC (C18, A=DI água B=ACN, 20mL/min). As frações contendo os produtos desejados foram extraídas com diclorometano e

concentradas para gerar o mono-imina **28c** (19 mg, 32%) MS (m/z), esperado: 855,1, encontrado: 896,2 (M + H_2O + Na) e a amina di-reduzida **28d** (22 mg, 38%) MS (m/z), esperado: 857,1, encontrado: 880,2 $(M + Na)^+$. Ver FIG. 31.

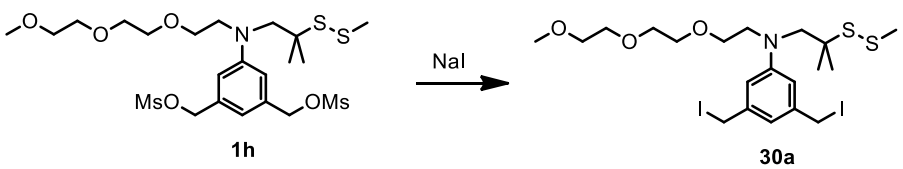
Exemplo 18



*Composto **29b** e **29c**:*

[00689] Composto **29a** (60 mg, 0,043 mmol) foi dissolvido em uma mistura anidro de diclorometano (0,25mL) e etanol (0,5 mL) e resfriado a 0°C em um banho de gelo. Uma solução de borohidreto de sódio (0,493 mg, 0,013 mmol) dissolvido em etanol (50 µL) foi então adicionado e a mistura foi agitada por 5 minutos e o banho de gelo foi removido. A reação foi deixada agitar por 3 horas, extinta em temperatura baixa adicionando cloreto de amônio saturado e diclorometano, separada e a camada orgânica foi lavada com salmoura, seca em sulfato de sódio anidro, filtrada, e concentrada em vácuo. O resíduo foi purificado por semi-prep RP-HPLC (C18, A=DI água B=ACN, 20mL/min). As frações contendo os produtos desejados foram extraídas com diclorometano e concentradas para gerar a mono-imina **29b** (20 mg, 33%) MS (m/z), esperado: 715,7, encontrado: 715,2 $(M + Na)^+$, 733,2 $(M + H_2O + Na)^+$, 749,2 $(M + H_2O + K)^+$ e a amina di-reduzida **29c** (12 mg, 20%) MS (m/z), esperado: 694,7, encontrado: 717,2 $(M + Na)^+$. Ver FIG. 32.

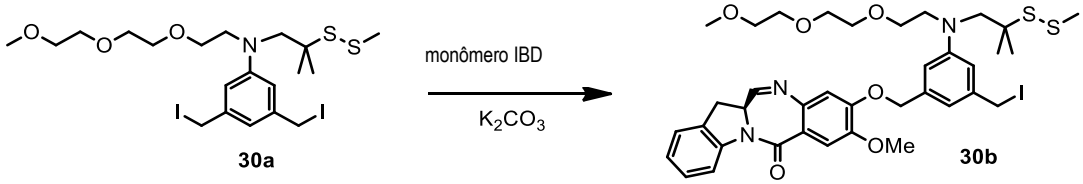
Exemplo 19



*Composto **30a**:*

[00690] (5-((2-(2-(2-metoxietóxi)etóxi)etil)(2-metil-2-(metildisulfanil)

propil)amino)-1,3-fenileno)bis(metileno) dimetanossulfonato (0,566 g, 0,960 mmol) foi dissolvido em acetona (30 mL) e uma solução de iodeto de sódio (0,544 g, 3,63 mmol) dissolvido em acetona (2 mL) foi adicionado com agitação vigorosa. A reação foi monitorada por tlc (50% acetato de etila em hexano) e após 2 horas a reação foi filtrada, concentrada em vácuo e diclorometano foi adicionado ao resíduo. O sal sólido deixado para trás foi filtrado, o filtrado foi concentrado e o resíduo resultante foi purificado em sílica-gel usando uma mistura 3:5:2 de acetato de etila:hexano:diclorometano para gerar 3,5-bis(iodometil)-N-(2-(2-(2-metoxietóxi)etóxi)etil)-N-(2-metil-2-(metildisulfanil)propil)anilina (0,505 g, 0,773 mmol, 74,5 % rendimento) como um óleo amarelo. ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 6,75 (s, 2H), 6,73 (s, 1H), 4,38 (s, 4H), 3,63 (m, 14H), 3,40 (s, 3H), 2,50 (s, 3H), 1,38 (s, 6H); ^{13}C RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 148,7, 140,3, 117,3, 113,4, 71,9, 70,7, 70,6, 67,2, 59,8, 59,1, 53,5, 53,4, 51,8, 26,5, 25,6, 6,11; MS (m/z), Calculado. 676,0 $(M + Na)^+$; encontrado 675,8 $(M + Na)^+$. Ver FIG. 33.



30a 30b

*Composto **30b**:*

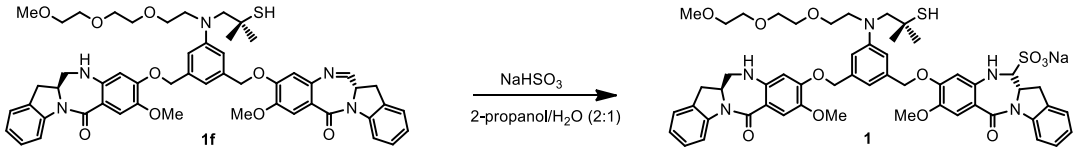
[00691] Monômero IBD (0,060 g, 0,204 mmol) foi dissolvido em acetona (4 ml) em um frasco pequeno, uma barra de agitação foi adicionada, seguido por 3,5-bis(iodometil)-N-(2-(2-(2-metoxietóxi)etóxi)etil)-N-(2-metil-2-(metildisulfanil)propil)anilina (0,167 g, 0,255 mmol) e carbonato de potássio (0,070 g, 0,510 mmol). O frasco foi vedado e agitado em temperatura ambiente durante a noite. Os sólidos foram filtrados e o filtrado foi concentrado. O resíduo foi dissolvido em diclorometano, extraído com água, e a camada orgânica foi seca em sulfato de sódio anidro, filtrada, e concentrada em vácuo para gerar 108 mg de material bruto. O material bruto foi purificado em

sílica-gel usando 30% acetato de etila para remover o material de partida di-iodo seguido por 10% metanol em diclorometano para gerar o produto desejado **30b** (21 mg, 0,026 mmol, 13%). MS (m/z), esperado: 819,1, encontrado: 858,0 $(M + K)^+$, 890,0 $(M + CH_3OH + K)^+$. Ver FIG. 33.

*Composto **1d**:*

[00692] O monômero reduzido **3b** (4,16 mg, 0,014 mmol) foi dissolvido em acetona (2 ml) em um frasco pequeno, uma barra de agitação foi adicionada, seguido por **30b** (10 mg, 0,012 mmol) e carbonato de potássio (4,21 mg, 0,030 mmol). O frasco foi vedado e agitado em temperatura ambiente durante a noite. A reação foi concentrada para remover a acetona e então redissolvida em diclorometano, extraída com água, seca em sulfato de sódio anidro, filtrada, e concentrada em vácuo. O resíduo foi purificado por HPLC C18 de fase reversa para gerar **1d** (2,1 mg, 2,125 µmol, 17,42 % rendimento). MS (m/z): encontrado 1010,4 $(M + Na)^+$, 1028,4 $(M + H_2O + Na)^+$. Ver FIG. 33.

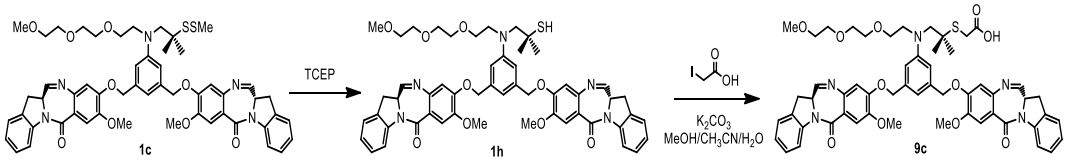
Exemplo 20: Síntese de composto 1



*Composto **1**:*

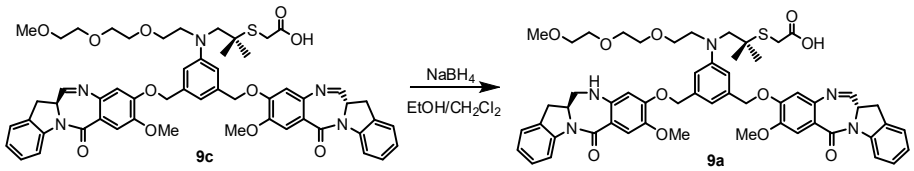
[00693] A uma suspensão agitada de **1f** (226 mg, 0,24 mmol) em IPA (20 mL) e água deionizada (10 mL) foi adicionado bissulfito de sódio (50 mg, 0,48 mmol). A mistura foi agitada vigorosamente em ta por 2 horas. Foi congelado com gelo seco/acetona e liofilizado. O sólido felpudo branco obtido foi dissolvido em CH_3CN/H_2O e purificado por HPLC fase reversa (coluna C18, CH_3CN/H_2O). As frações contendo o produto desejado foram combinadas e congeladas com gelo seco/acetona e liofilizadas para gerar o composto **1** desejado como sólido branco felpudo (179,6 mg, 5 = 71,6%). MS (m/z): encontrado 1022,0 $(M - H)^-$. Ver FIG. 38.

Exemplo 21 Síntese do composto 9c



*Composto **9c**:*

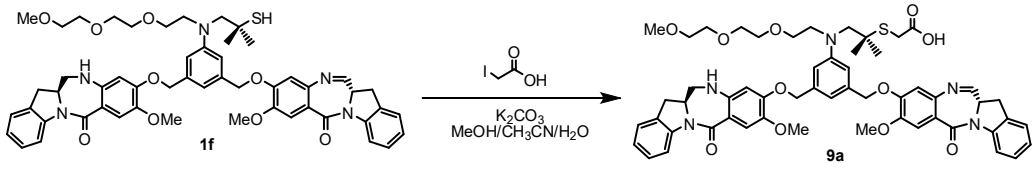
[00694] A uma solução agitada de **1c** (60 mg, 0,061 mmol) em CH_3CN (3 mL) foi adicionada solução recém-preparada de TCEP (49 mg, 0,17 mmol of TCEP sal HCl foi neutralizado com bicarbonato de sódio saturado até pH ~6,5 então diluída com 0,5 mL de pH 6,5 fosfato tampão) em temperatura ambiente. MeOH (2,5 mL) foi adicionado e a mistura foi agitada em temperatura ambiente por 3 horas. A mistura de reação foi diluída com diclorometano e água deionizada, separada e a camada orgânica foi lavada com salmoura, seca em Na_2SO_4 anidro e filtrada. O filtrado foi descascado e submetido a alto vácuo para gerar 60 mg de **1h** como espuma amarelo clara. MS (m/z): encontrado 940,1 $(M + H)^+$. Este foi dissolvido em metanol (1,0 mL) e CH_3CN (1,4 mL) seguido por adição de ácido iodoacético (24 mg, 0,13 mmol), água deionizada (0,1 mL) e carbonato de potássio (27 mg, 0,19 mmol). A mistura foi agitada em ta durante a noite (monitorado por LCMS). Esta foi extinta com cloreto de amônio saturado para preparar a solução ácida então diluída com diclorometano, separada e lavada com salmoura, seca em anidro Na_2SO_4, filtrada e separada para gerar composto **9c** (57,8 mg, y = 91%) que foi diretamente usada para a etapa seguinte sem purificação. MS (m/z): encontrado 998,1 $(M + H)^+$. Ver FIG. 12A.



*Composto **9a**:*

[00695] A uma solução agitada do composto **9c** (57,8 mg, 0,058

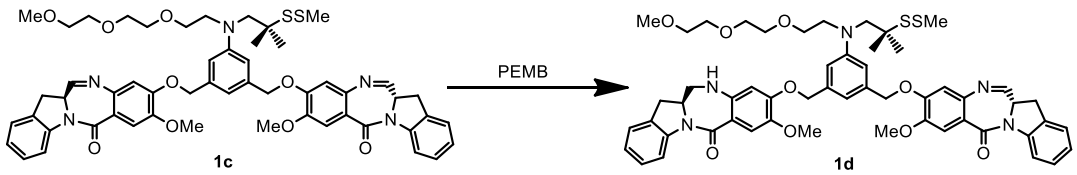
mmol) em diclorometano anidro (0,2 mL) e etanol absoluto (0,6 mL) foi adicionado $NaBH_4$ (2,5 mg, 0,066 mmol) a 0ºC. O banho de gelo foi removido e a mistura foi agitada em temperatura ambiente por 3 horas e então extinta com cloreto de amônio saturado, diluída com diclorometano, separada e a camada orgânica foi lavada com salmoura, seca em anidro Na_2SO_4 e filtrada por celite e separada. O resíduo foi purificado por HPLC fase reversa (coluna C18, CH_3CN/H_2O). As frações do produto foram extraídas com diclorometano e separadas para gerar composto **9a** (13,0 mg, y = 22%). MS (m/z): encontrado 1000,0 $(M + H)^+$, 1015,9 $(M + H_2O – H)^-$. Ver FIG. 12A.



*Composto **9a**:*

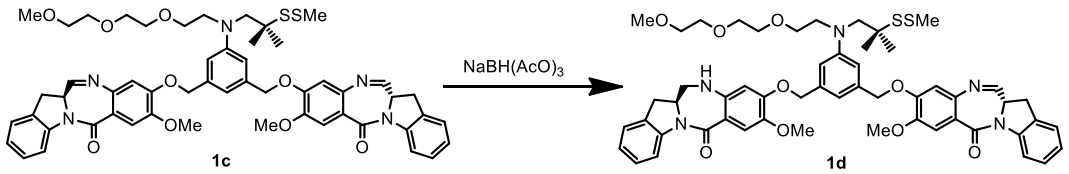
[00696] A uma solução de tiol livre **1f** (45 mg, 0,048 mmol) e ácido iodoacético (18 mg, 0,096 mmol) em metanol (1,0 mL) e CH_3CN (1,4 mL) foi adicionado água deionizada (0,1 mL) e carbonato de potássio (20 mg, 0,14 mmol). A mistura foi agitada em ta durante a noite (monitorado por LCMS). Esta foi extinta com cloreto de amônio saturado para preparar a solução ácida então diluída com diclorometano, separada e lavada com salmoura, seca em anidro Na_2SO_4, filtrada e separada. O resíduo foi purificado por HPLC preparativa fase reversa (C18, CH_3CN/H_2O). As frações de produto puro (baseado em MS) foram extraídas com diclorometano, separadas para gerar o ácido desejado **9a (**18 mg, y = 38%). MS (m/z): encontrado 1000,1 $(M + H)^+$. Ver FIG. 12B.

<u>Exemplo 22 Síntese do composto 1d</u>



*Composto **1d**:*

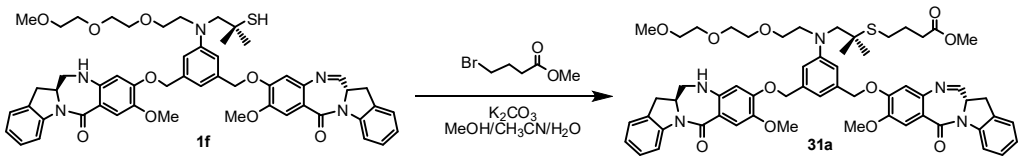
[00697] A uma solução agitada do composto **1c** (178 mg, 0,18 mmol) em diclorometano anidro (1,2 mL) e etanol absoluto ou anidro metanol (0,1 mL) foi adicionado 5-etil-2-metilpiridina borano (PEMB, 0,017 mL, 0,11 mmol) sob gotejamento. A mistura foi agitada em ta por 1 hora e extinta com 88% ácido fórmico. Esta foi basificada com $NaHCO_3$ saturado e diluída com diclorometano, separada e a camada orgânica foi lavada com salmoura, seca em anidro Na_2SO_4 e filtrada por celite e separada. O resíduo foi dissolvido em CH_3CN/H_2O/88% HCOOH (5:1:0,05) e purificado pro HPLC fase reversa (C18, CH_3CN/H_2O). As frações que continham produto puro foram extraídas com diclorometano e separadas para gerar composto **1d** (56 mg, y = 31%). MS (m/z): encontrado 988,1 $(M + H)^+$. Ver FIG. 39.



*Composto **1d**:*

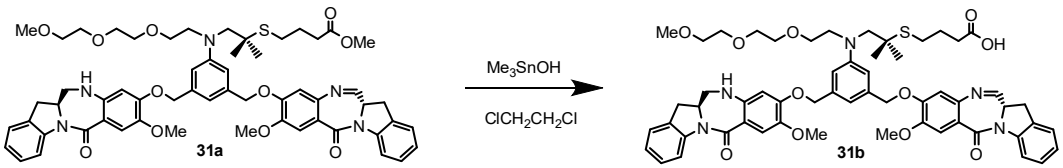
[00698] A uma solução agitada do composto **1c** (71 mg, 0,072 mmol) em 1,2-dicloroetano anidro (0,8 mL) foi adicionado triacetoxicoborohidreto de sódio (14 mg, 0,65 mmol). A mistura foi agitada em ta por 2 horas e extinta com $NaHCO_3$ saturado e diluída com diclorometano, separada e a camada orgânica foi lavada com salmoura, seca em anidro Na_2SO_4 e filtrada por celite e separada. O resíduo foi dissolvido em CH_3CN/H_2O/88% HCOOH (5:1:0,05) e purificado por HPLC fase reversa (C18, CH_3CN/H_2O). As frações que continham o produto puro foram extraídas com diclorometano e separadas para gerar composto **1d** (17 mg, y = 24%). MS (m/z): encontrado 988,1 $(M + H)^+$. Material de partida não reagido **1c** foi ainda recuperado (24 mg, y = 34%). Ver FIG. 40.

Exemplo 23 Síntese do composto 31c



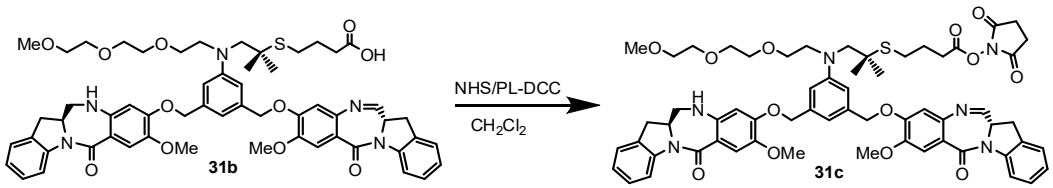
*Composto **31a**:*

[00699] A uma solução do composto **1f** (57,8 mg, 0,061 mmol) e metil 4-bromobutirato (22 mg, 0,12 mmol) em metanol (1,0 mL) e CH_3CN (1,0 mL) foi adicionado água deionizada (0,1 mL) e carbonato de potássio (17 mg, 0,12 mmol). A mistura foi agitada em ta durante a noite então extinta com cloreto de amônio saturado e diluída com diclorometano, separada e lavada com salmoura, seca em anidro Na_2SO_4, filtrada e separada. O resíduo foi purificado por HPLC preparativa fase reversa (C18, CH_3CN/H_2O) para gerar o produto desejado **31a** (14 mg, y = 22%) como espuma amarelada. MS (m/z): encontrado 1042,1 $(M + H)^+$. Ver FIG. 41.



*Composto **31b**:*

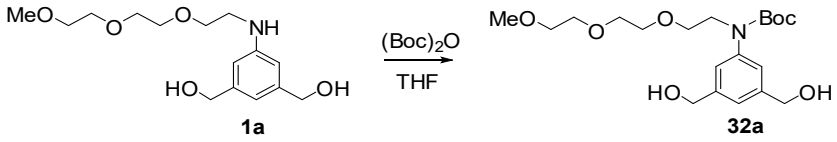
[00700] A uma solução éster de metila **31a** (14 mg, 0,013 mmol) em 1,2-dicloroetano anidro (1,5 mL) foi adicionado hidróxido trimetilestanho (36 mg, 0,2 mmol). A mistura foi agitada durante a noite em um banho de óleo de 80ºC até o material de partida ser completamente consumido. Esta foi resfriada até temperatura ambiente, diluída com diclorometano, lavada com salmoura/gotas 5% HCl e salmoura, seca e filtrada. O filtrado foi separado e purificado com cromatografia de sílica-gel (diclorometano/MeOH) para gerar ácido **31b** como sólido amarelado (10,2 mg, y = 74%). MS (m/z): encontrado 1028,2 $(M + H)^+$, 1044,1 $(M + H_2O - H)^-$. Ver FIG. 41.



*Composto **31c**:*

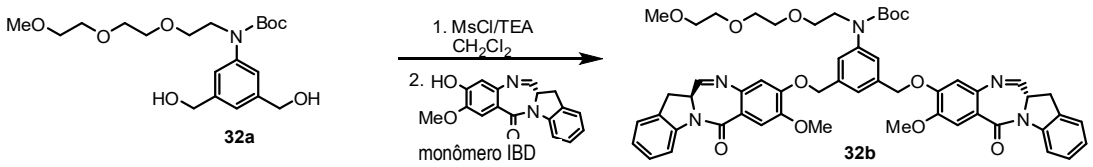
[00701] A uma solução de ácido **31b** (10,2 mg, 0,0099 mmol) em diclorometano anidro (0,5 mL) foi adicionado N-hidroxissuccinimida (3,4 mg, 0,03 mmol) e PL-DCC (26 mg, 0,04 mmol, 1,55 mmol/g). A mistura foi agitada em temperatura ambiente durante a noite e filtrada para remover a resina. A resina foi lavada com diclorometano então acetato de etila. O filtrado foi separado e o resíduo foi purificado por HPLC fase reversa (C18, CH_3CN/H_2O). As frações contendo produto foram combinadas e liofilizadas para gerar éster NHS **31c** como sólido branco (3,6 mg, y = 32%). MS (m/z): encontrado 1125,1 $(M + H)^+$. Ver FIG. 41.

Exemplo 24 Síntese do composto 32c



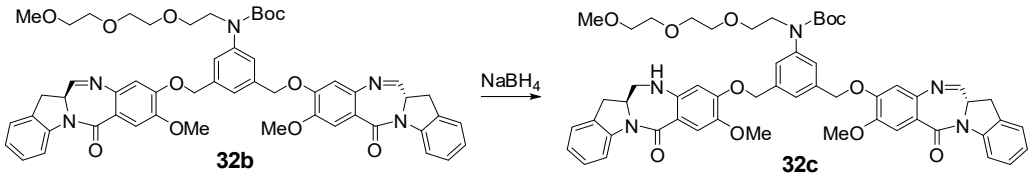
*Composto **32a**:*

[00702] A uma solução agitada de a anilina **1a** (339 mg, 1,1 mmol) em tetra-hidrofurano anidro (4,0 mL) foi adicionado Boc anidreto (272 mg, 1,2 mmol). A mistura continuou sendo agitada em temperatura ambiente por três dias. A mistura de reação foi concentrada sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado por cromatografia de sílica-gel (CH_2Cl_2/MeOH) para gerar composto **32a** (405 mg, y = 90%) como óleo incolor. ^1H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 7,00 (s, 2H), 6,97 (s, 1H), 4,38 (s, 4H), 4,12 (s, 2h), 3,64 (t, J = 5,6 Hz, 2H), 3,48-3,44 (m, 8H), 3,40-3,38 (m, 2H), 3,21 (s, 3H), 1,31 (s, 9H); ^{13}C RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 154,65, 142,3, 142,1, 124,1, 122,7, 80,2, 71,6, 70,3, 70,1, 69,9, 68,5, 63,9, 58,65, 49,4, 28,1. Ver FIG. 42.



*Composto **32b**:*

[00703] A uma solução agitada do composto **32a** (51 mg, 0,128 mmol) em diclorometano anidro foi adicionado trietilamina (0,053 mL, 0,383 mmol) a -5~-10ºC. Cloreto de metanossulfonila (0,026 mL, 0,332 mmol) foi então adicionado lentamente em 15 minutos com uma seringa. A mistura foi agitada a -5-10ºC por 1 hora (TLC, DCM/MeOH 10:1). A reação foi extinta com gelo/água, diluída com AcOEt frio, separada e a camada orgânica foi lavada com água fria, seca em Na_2SO_4/$MgSO_4$ anidro, filtrada e separada. O resíduo foi transferido em um frasco de reação pequeno com diclorometano, separado e submetido a alto vácuo. Foi dissolvido em DMF anidro (0,8 mL) seguido por adição de monômero IBD (90 mg, 0,31 mmol) e potássio (53 mg, 0,38 mmol). A mistura foi agitada em ta durante a noite. Esta foi diluída com diclorometano, lavada com salmoura, seca em sulfato de sódio anidro, filtrada e separada. O resíduo foi purificado por HPLC fase reversa (C18, CH_3CN/H_2O) para gerar composto **32b** (56 mg, 46%) como sólido amarelado. %). ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 8,29 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,87 (d, J = 4,8 Hz, 2H), 7,60 (s, 2H), 7,38-7,36 (m, 3H), 7,33-7,27 (m, 4H), 7,13 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 6,88 (s, 2H), 5,21 (dd, J_1 = 20,0 Hz, J_2 = 12,4 Hz, 4H), 4,49 (dt, J_1 = 11,2 Hz, J_2 = 4,0 Hz, 2H), 3,99 (s, 6H), 3,83 (t, J = 6,0 Hz, 2H), 3,76-3,48 (m, 14H), 3,35 (s, 3H), 1,43 (s, 9H); MS (m/z): encontrado 992,2 $(M + H_2O + Na)^+$, 1010,2 $(M + 2H_2O + Na)^+$. Ver FIG. 42.



*Composto **32c**:*

[00704] A uma solução agitada do composto **32b** (56 mg, 0,059 mmol) em diclorometano anidro (0,3 mL) e etanol absoluto (0,9 mL) foi adicionado $NaBH_4$ (2,7 mg, 0,07 mmol) a 0ºC. O banho de gelo foi removido e a mistura foi agitada em temperatura ambiente por 3 horas e então extinta com cloreto de amônio saturado, diluída com diclorometano, separada e a camada orgânica foi lavada com salmoura, seca em anidro Na_2SO_4 e filtrada por celite e separada. O resíduo foi purificado por HPLC fase reversa (coluna C18, CH_3CN/H_2O). Material de partida recuperado **32b** pesou 12 mg que foi novamente submetido às condições de redução e purificado por HPLC fase reversa. Todas as frações que continham o produto puro foram extraídas com diclorometano e separadas para gerar composto **32c** (20,7 mg, y = 37%) como um sólido amarelado claro. MS (m/z): encontrado 954,2 $(M + H)^+$. Ver FIG. 42.

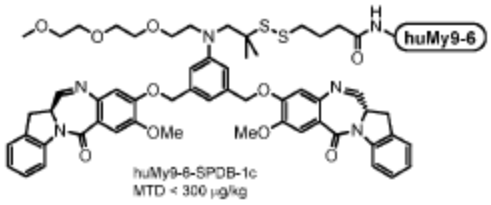
Exemplo 25

[00705] A tolerabilidade de conjugados huMy9-6 foi investigada em camundongos fêmeas CD-1. Os animais foram observados por sete dias antes do início do estudo e demonstraram estar livres de doença ou enfermidade. Os camundongos foram administrados com uma única injeção *i.v.* do conjugado e os animais foram monitorados diariamente para perda de peso corporal, morbidade ou mortalidade. A tabela 10 mostra que para o conjugado huMy9-6-SPDB**-1c** di-imina dissulfeto contendo conjugado foi tolerado em uma dose de menos do que 300 µg/kg. Em contraste, os conjugados mono-imina dissulfetos huMy9-6-SPDB**-1f** e huMy9-6-sulfo-SPDB**-1f** demonstraram ser mais bem tolerados com uma dose tolerada máxima de >729 µg/kg e <750 µg/kg respectivamente.

Tabela 10. Dados de comparação de tolerabilidade para conjugados (A) huMy9-6-SPDB**-1c**, (B) huMy9-6-SPDB**-1f**, (C) huMy9-6-sulfo-SPDB**-1f**, e (D) huMy9-6-BMPS**-1f**.

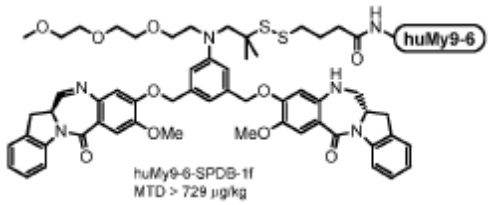
A)

Dose (µg/kg)	% Sobrevivência
100	100
300	50
500	0
700	0



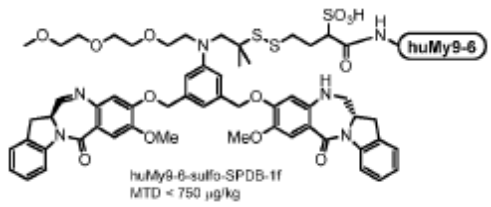
B)

Dose (µg/kg)	% Sobrevivência
405	100
567	100
729	100



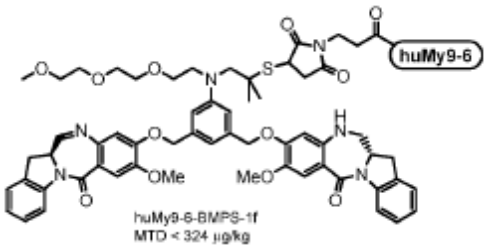
C)

Dose (µg/kg)	% Sobrevivência
450	100
600	100
750	88
900	50

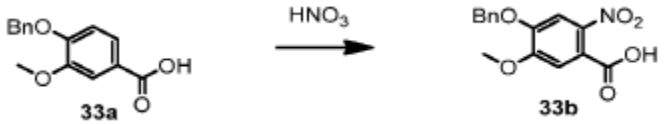


D)

Dose (µg/kg)	% Sobrevivência
100	100
200	100
284	100
324	83
405	50



Exemplo 26

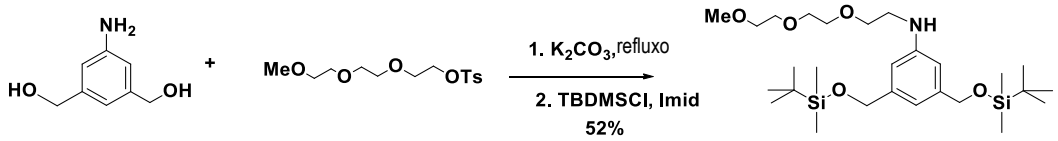


*Composto **33b**:*

[00706] Composto **33a** (20g, 77 mmol) foi adicionado como uma suspensão espessa em diclorometano anidro (100 mL) e foi resfriado a 0 °C. Ácido acético (191mL) foi adicionado, resultando em uma solução

clara que foi agitada a 0 ºC até resfriar. Ácido nítrico (26mL, 581 mmol) foi adicionado lentamente sob gotejamento por um funil de adição. O banho de gelo foi removido e a solução continuou em agitação em temperatura ambiente. Após 3 horas, a reação foi diluída com água deionizada e extraída com diclorometano. A camada orgânica foi lavada com salmoura, seca em sulfato de magnésio anidro e o filtrado concentrado em vácuo. O resíduo bruto foi recristalizado usando acetato de etila e hexanos. O sólido foi filtrado e lavado com hexanos para gerar composto **33b** como um sólido amarelo felpudo (13,8g, y = 59%). ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 7,48-7,43 (m, 6H), 7,25 (s, 1H), 5,25 (s, 2H), 4,02 (s, 3H), MS (m/z): 326,1 $(M + Na)^+$. Ver Figura 45.

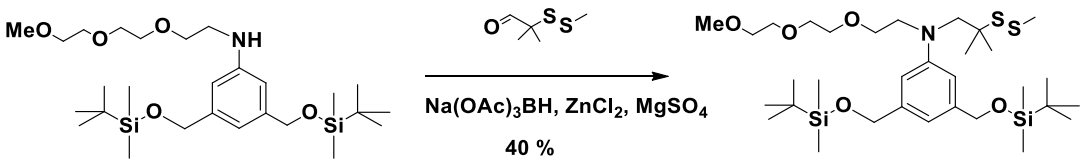
Exemplo 27



3,5-bis(((terc-butildimetilsilil)óxi)metil)-N-(2-(2-(2-metoxietóxi)etóxi) etil)anilina:

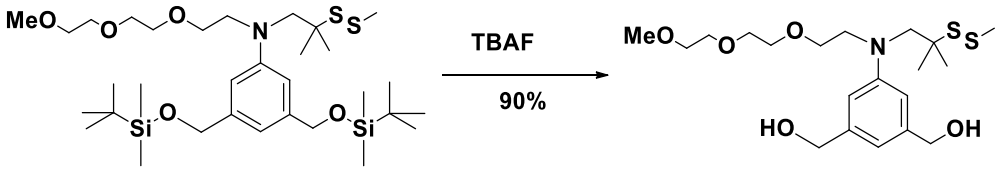
[00707] Uma mistura de (5-amino-1,3-fenileno)dimetanol (11,78 g, 77 mmol), 4-metilbenzenossulfonato de 2-(2-(2-metoxietóxi)etóxi)etila (15,3 g, 48,1 mmol), e carbonato de potássio (13,28 g, 96 mmol) em DMF (96 ml) foi refluxada por 20 horas. A reação foi resfriada em temperatura ambiente e diluída com diclorometano. A mistura foi filtrada por celite e concentrada *em vácuo*. O óleo laranja resultante foi dissolvido em diclorometano (240 ml) e *t*-butildimetilsilil cloreto (18,09 g, 120 mmol) e imidazol (9,80 g, 144 mmol) foram adicionados. A reação foi agitada em temperatura ambiente por 20 horas em que esta foi diluída com diclorometano e filtrada por celite. Purificação por cromatografia de sílica-gel (EtOAc/Hex) gerou 3,5-bis(((terc-butildimetilsilil)óxi)metil)-N-(2-(2-(2-metoxietóxi)etóxi)etil)anilina (13g, 52%). ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ6,52 (s, 1H), 6,40 (s, 2H), 4,56 (s, 4H), 3,60 (t, 2H, J = 5,2 Hz), 3,56 (m, 6H), 3,46 (m, 2H), 3,29 (s, 3H), 3,20 (t,

2H, J = 5,2 Hz), 0,84 (s, 18H), 0,00 (s, 12H). MS (m/z): encontrado 550,1 $(M + Na)^+$. Ver FIG. 46.



3,5-bis(((terc-butildimetilsilil)óxi)metil)-N-(2-(2-(2-metoxietóxi)etóxi)etil)-N-(2-metil-2-(metildisulfanil)propil)anilina:

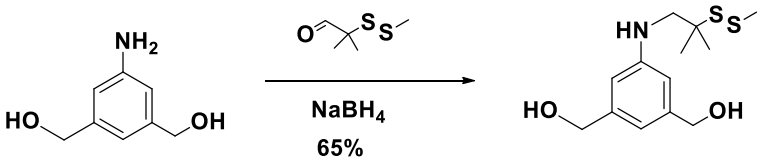
[00708] A uma solução de 3,5-bis(((terc-butildimetilsilil)óxi)metil)-N-(2-(2-(2-metoxietóxi)etóxi)etil)anilina (6,7 g, 12,69 mmol) em 1,2-dicloroetano anidro (50 ml) foi adicionado 2-(metilditio)isobutiraldeído (2,74 ml, 19,04 mmol), triacetoxicoborohidreto de sódio (2,8g, 1eq), cloreto de zinco(II) (0,865 g, 6,35 mmol) e sulfato de magnésio (2,292 g, 19,04 mmol). A mistura foi agitada por cinco horas em temperatura ambiente. Triacetoxicoborohidreto de sódio (2,8g, 1eq) foi adicionado. A reação continuou em agitação em temperatura ambiente por 20 horas. A mistura foi filtrada por celite rinsando com diclorometano e concentrada sob pressão reduzida então extraída com acetato de etila e água. Os extratos orgânicos foram lavados com salmoura, secos em magnésio sulfato, filtrados, concentrados e purificados por combiflash (EtOAc/Hex) para gerar 3,5-bis(((terc-butildimetilsilil)óxi)metil)-N-(2-(2-(2-metoxietóxi)etóxi)etil)-N-(2-metil-2-(metildisulfanil)propil)anilina (3,5g, 40%). ^{1}H RMN (400 Hz, CDCl3): δ 6,73 (s, 2H), 6,59 (s, 1H), 4,56 (s, 4H), 3,65-3,51 (m, 14H), 3,30 (s, 3H), 2,38 (s, 3H), 1,28 (s, 6H), 0,84 (s, 18H), 0,00 (s, 12H). MS (m/z): encontrado 684,2 $(M + Na)^+$. Ver FIG. 46.



*(5-((2-(2-(2-metoxietóxi)etóxi)etil)(2-metil-2-(metildisulfanil) propil)amino)-1,3-fenileno)dimetanol (**1b**):*

[00709] Fluoreto de tetrabutilamônio (1M em THF) (10,57 ml, 10,57 mmol) foi adicionado sob gotejamento à solução em agitação de 3,5-bis(((terc-butildimetilsilil)óxi)metil)-N-(2-(2-(2-metoxietóxi)etóxi)etil)-N-(2-metil-2-(metildisulfanil)propil)anilina (3,5 g, 5,29 mmol) em THF anidro (65 ml) a 0 °C em um banho de gelo. Após adição a mistura foi agitada em temperatura ambiente por duas horas. A mistura foi extinta com cloreto de amônio saturado e extraída com acetato de etila. Os extratos foram lavados com água e salmoura, secos com magnésio sulfato, filtrados e concentrados sob pressão reduzida. Purificação por cromatografia de sílica-gel (MeOH/DCM) gerou (5-((2-(2-(2-metoxietóxi)etóxi)etil)(2-metil-2-(metildisulfanil)propil)amino)-1,3-fenileno)dimetanol (2g, 87%). ^{1}H RMN (400 Hz, CDCl3): δ 6,76 (s, 2H), 6,63 (s, 1H), 4,55 (s, 4H), 3,65-3,51 (m, 14H), 3,35 (s, 3H), 2,44 (s, 3H), 1,33 (s, 6H); 13C RMN (400 Hz, CDCl3): δ 149,0, 142,35, 114,0, 111,1, 71,98, 70,7, 70,6, 70,5, 67,6, 65,5, 59,75, 59,1, 53,9, 51,9, 26,6, 25,7, 20,75; MS (m/z): encontrado 456,2 $(M + Na)^+$. Ver FIG. 46.

Exemplo 28



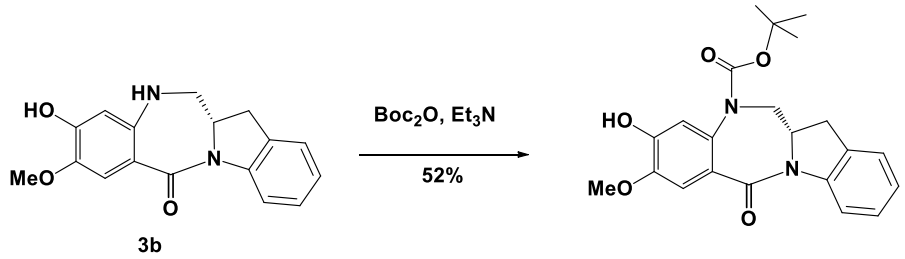
(5-(2-metil-2-(metildisulfanil)propilamino)-1,3-fenileno) dimetanol:

[00710] (5-amino-1,3-fenileno)dimetanol (2,5 g, 16,32 mmol) e 2-(metilditio)isobutiraldeído (2,347 ml, 16,32 mmol) foram agitados em temperatura ambiente em etanol absoluto (82 ml) até completamente dissolvido (3 horas). A mistura foi resfriada a 0 °C em um banho de gelo e borohidreto de sódio (0,741 g, 19,59 mmol) foi adicionado. A reação foi agitada por 1 hora a 0 °C, e foi então extinta lentamente com solução fria de 5% HCl. A mistura foi diluída com diclorometano e o pH foi ajustado a pH=8 com solução de bicarbonato de sódio saturado então

extraída com diclorometano e então lavada com salmoura. Os extratos orgânicos foram secos em sulfato de sódio anidro, filtrados, e concentrados sob pressão reduzida. Purificação por cromatografia de sílica-gel (MeOH/DCM) gerou (5-(2-metil-2-(metildisulfanil)propilamino)-1,3-fenileno)dimetanol (3g, 65%) como um sólido branco.

[00711] ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ6,62 (s, 1H), 6,54 (s, 2H), 4,53 (s, 4H), 3,13 (s, 2H), 2,30 (s, 3H), 1,32 (s, 6H). Ver FIG. 47.

Exemplo 29

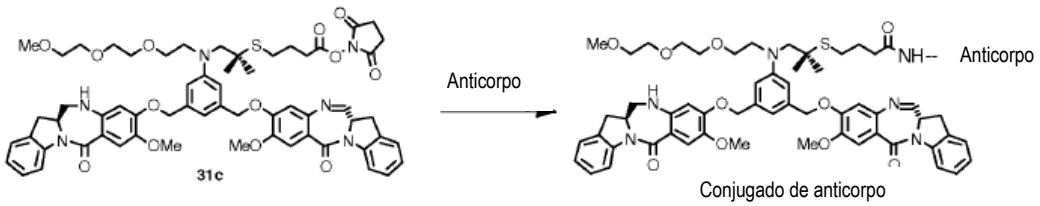


9-hidróxi-8-metóxi-6-oxo-12a,13-di-hidro-6H-benzo[5,6][1,4] diazepino[1,2-a]indol-11(12H)-carboxilato de terc-butila:

[00712] A uma solução de 9-hidróxi-8-metóxi-11,12,12a,13-tetra-hidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-6-ona **3b** (0,3 g, 1,012 mmol) em metanol (5,06 ml) foram adicionados dicarbonato de di-terc-butila (0,265 g, 1,215 mmol), trietilamina (0,212 ml, 1,519 mmol) e DMAP (6,18 mg, 0,051 mmol). Após 5 horas de agitação em temperatura ambiente a mistura de reação foi concentrada *em vácuo*. O resíduo foi redissolvido em diclorometano e filtrada por celite. Purificação por cromatografia de sílica-gel (20% EtOAc/DCM) gerou 9-hidróxi-8-metóxi-6-oxo-12a,13-di-hidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino [1,2-a]indol-11(12H)-carboxilato de terc-butila (0,21g, 52%) como um sólido branco. ^{1}H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 8,25 (d, J = 8,0Hz, 1H), 7,44 (s, 1H), 7,18 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 7,11 (d, J = 7,2Hz, 1H), 6,98 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 6,39 (s, 1H), 4,37 (m, 1H), 3,75 (s, 3H), 3,42 (m, 3H), 2,74 (dd, J = 3,6, 16,4 Hz, 1H), 1,47 (s, 9H). Ver FIG. 48.

Exemplo 30

*Preparação e teste de huMy9-6-**31c***



[00713] Uma reação contendo 2,0 mg/mL anticorpo huMy9-6 e 5 equivalentes molares do composto **31c** (pré-tratado com 5 vezes excesso de bissulfito de sódio em 90:10 DMA:água) em 50 mM HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanossulfônico) pH 8,5 tampão e 10% v/v DMA (*N,N*-Dimetilacetamida) cosolvente foi deixado para conjugar por 6 horas a 25ºC. Após a reação, o conjugado foi purificado e tampão trocado em 250 mM Glicina, 10 mM Histidina, 1% sacarose, 0,01% Tween-20, 50µM bissulfito de sódio formulação tampão, pH 6,2, usando colunas dessalinizantes NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). A diálise foi realizada no mesmo tampão por 4 horas em temperatura ambiente utilizando cassetes de diálise Slide-a-Lyzer (ThermoScientific 20,000 MWCO).

[00714] O conjugado purificado demonstrou ter uma média de 3,1 IGN moléculas ligadas por anticorpo (por UV-Vis usando coeficientes de extinção molar $\varepsilon_{330\ nm}$= 15,484 $cm^{-1}M^{-1}$ e $\varepsilon_{280\ nm}$= 30, 115 $cm^{-1}M^{-1}$ por 1, e $\varepsilon_{280\ nm}$= 207,000 $cm^{-1}M^{-1}$ para anticorpo My9-6), 98% monômero (por Cromatografia por exclusão de tamanho), <0,2% fármaco não conjugada (por análise de HPLC de fase reversa de coluna dupla) e uma concentração final de proteína de 0,4 mg/ml.

[00715] As medidas de potência *in vitro* para os conjugados de huMy9-6 com **31c** em duas cargas diferentes de fármacos foram mostrados abaixo. Ambos conjugados foram altamente potentes para células HL60-QC positivas para antígeno, com valores IC_{50} entre 1,3-1,8 pM. Antígeno bloqueador com 1 µM de huMy9-6 não conjugado significativamente diminuiu a potência, demonstrando a especificidade de antígeno do efeito citotóxico.

Conjugado huMy9-6-**31c**	IC_{50} (pM)	IC_{50} (pM) huMy9-6 bloqueador	Janela de Espcificidade
3,1 IGN/Ab	1,8	940	522
3,9 IGN/Ab	1,3	790	608

Exemplo 31

Eficácia in vivo de vários conjugados em camundongos nus contendo tumor

[00716] Neste estudo, a atividade antitumor de vários conjugados da invenção é investigada em camundongos imuno-comprometidos (nu ou SCID), preferencialmente camundongos nus femininos, contendo vários tumores. Em alguns casos, além ou como uma alternativa, ratos nu podem ser empregados. Os conjugados a serem tesados incluem qualquer um ou mais dos conjugados descritos aqui. As várias linhagens de células tumorais que podem ser usadas para inocular os camundongos nus incluíram HL60/QC, MOLM-13, NB4, HEL92.1.7, OCI-AML3, KB, e/ou qualquer outra linhagem de células de câncer reconhecida na técnica como um modelo apropriado para uma indicação de doença (por exemplo, câncer). Alguns critérios que podem ser aplicados para a seleção de linhagens de tumor apropriadas para avaliação *in vivo* incluem: a) expressão do antígeno-alvo na célula de tumor, e, b) sensibilidade de células de tumor à fármaco não conjugada *in vitro*. Por exemplo, uma triagem de sensibilidade de linhagem de célula *in vitro*, como a triagem de linhagem de célula 60 descrito por U.S. National Cancer Institute (ver Voskoglou-Nomikos *et al*., 2003, Clinical Cancer Res. 9; 42227-4239, incorporadas aqui por referência) podem ser usadas como uma das diretrizes para determinar os tipos de cânceres que podem ser apropriados para o tratamento com os compostos da invenção. A potência dos vários conjugados contra as várias linhagens celulares de tumor, como expresso por valores IC_{50} (nM), é medido por conseguinte.

[00717] As várias linhagens de células de tumor são inoculadas aos

camundongos nus ou SCID usando substancialmente o mesmo protocolo que delineado no Exemplo 15. Por exemplo, cerca de 1×10^6 – 5×10^7 células de tumor (tipicamente 1×10^7) células/camundongo são inoculados por via subcutânea em um volume de aproximadamente 0,1-0,2 mL/camundongo, na área sobre o ombro direito de camundongos nus fêmeas atímicas, 6 semanas de idade. Quando o tumor atingiu um tamanho médio de ~100 mm^3 (tipicamente 6 a 8 dias após a inoculação de célula tumoral), os camundongos são randomizados em grupos (por exemplo, n = 5 - 8 por grupo) pelo volume de tumor. O tratamento é iniciado no dia após a randomização, e os grupos incluíram um grupo de controle com o veículo apropriado (200 µL/injeção), ou um tratamento único em várias doses (5 a 700 µg/kg) dos conjugados de fármaco referenciados acima (50 µg/kg de dose de fármaco ligada correspondendo a cerca de 2 mg/kg de dose de anticorpo). Calendários de várias dosagens (por exemplo, tratamento no dia 1, 3, 5, ou dia 1, 4, 7) podem ainda ser empregados.

[00718] Mediana e volume médio de tumor vs tempo é medido, com os dados demonstrando uma atividade antitumor dependente de dose dos conjugados objeto. A dose efetiva mínima é então calculada e comparada a dose máxima tolerada.

Exemplo 32

*Preparação de huMy9-6-sulfo-SPDB-**1d** usando o ligante 4-nitroPy-sulfo-SPDB*

[00719] Uma reação contendo 6 mg/mL anticorpo huMy9-6 e 5 equivalentes molares do ligante altamente reativo *N*-succinimidil-4-(4-nitropiridil-2-ditio)butanoato (20 mM estoque em etanol) foi incubada por 3 h a 25ºC em 50 mM EPPS tampão em pH 8. Ligante não reagido foi removido usando uma coluna dessalinizante NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). A relação de ligante para o anticorpo (LAR) foi determinada sendo cerca de 2,3 baseado em concentração de

anticorpo e concentração de nitropiridina-2-tiona liberada por DTT por UV-Vis ($\varepsilon_{394\ nm}$= 14205 $cm^{-1}M^{-1}$ por 2-tio-4-nitropiridona).

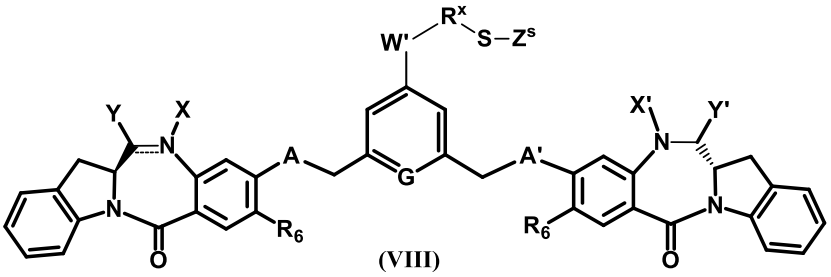
[00720] Ligante modificado huMy9-6 foi diluído a 2 mg/mL em 50 mM HEPES tampão em pH 8,5, 10% v/v DMA, e reagiu com 2 equivalentes molares de composto **1d** por ligante (5 mM estoque em DMA; 4,6 equivalentes por anticorpo) por 30 min a 25ºC. A conclusão de reação de troca de dissulfeto foi determinada monitorando aumento de absorbância em 394 nm por UV.

[00721] Após a reação, o conjugado foi purificado e tampão trocado em 250 mM glicina, 10 mM histidina, 1% sacarose, 0,01% Tween-20, 50 µM bissulfito de sódio em pH 6,2 usando a coluna dessalinizante (G-25 Sephadex, grau fino, GE Healthcare).

[00722] O conjugado purificado demonstrou ter uma média de 2,1 moléculas de **1d** ligado por anticorpo (por UV-Vis usando coeficientes de extinção molar $\varepsilon_{330\ nm}$= 15,484 $cm^{-1}M^{-1}$ e $\varepsilon_{280\ nm}$= 30, 115 $cm^{-1}M^{-1}$ por 1**d**, e $\varepsilon_{280\ nm}$= 207,000 $cm^{-1}M^{-1}$ para huMy9-6), 98% monômero (por Cromatografia por exclusão de tamanho), <1% **1d** não conjugado (por extração por acetona/HPLC fase reversa), a 70% de rendimento de proteína, e um rendimento geral de 32% **1d**. Ver FIG. 60.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto citotóxico, caracterizado pelo fato de que é representado pela seguinte fórmula:



ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo,

em que a linha dupla ⎓ entre N e C representa uma ligação simples ou uma ligação dupla, desde que quando for a ligação dupla, X está ausente e Y é -H, e quando for uma ligação simples, X é -H, Y é -OH ou $-SO_3M$, em que M é H^+, ou um cátion farmaceuticamente aceitável;

X' e Y' são ambos -H;

A e A' são ambos -O-;

R_6 é –OMe;

W' é $-N(R^e)$ -;

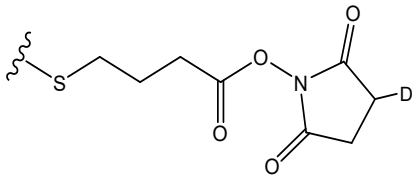
R^x é uma alquila linear ou ramificada com 1 a 6 átomos de carbono;

R^e é $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$, em que R^k é um -H, ou uma alquila linear, ramificada ou cíclica com 1 a 6 átomos de carbono;

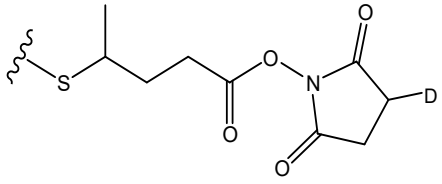
n é um número inteiro de 2 a 8;

G é selecionado de -CH- ou -N-;

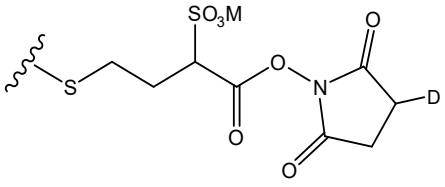
Z^s é -H ou é selecionado em qualquer uma das seguintes fórmulas:



(a7);



(a8); e



(a9),

em que:

D é -H ou -SO_3M.

2. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que Z^s é –H.

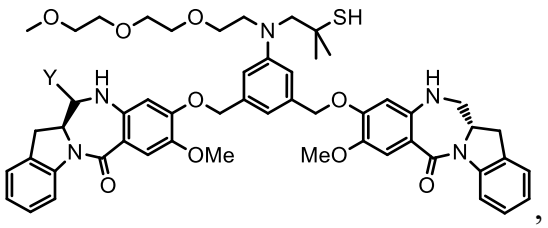
3. Composto, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que R^k é -H ou -Me.

4. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que R^x é -$(CH_2)_p$-(CR^fR^g)-,

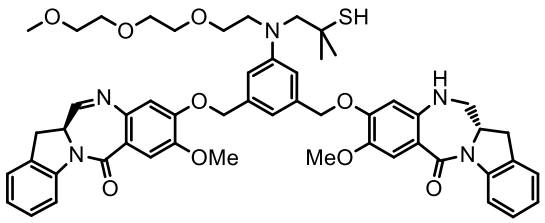
em que R^f e R^g são cada um independentemente selecionados a partir de -H ou uma alquila linear ou ramificada com 1 a 4 átomos de carbono; e p é 0, 1, 2 ou 3.

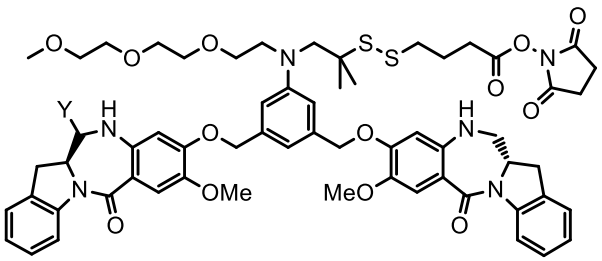
5. Composto, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que R^f e R^g são iguais ou diferentes e são selecionados a partir de -H e -Me; e p é 1.

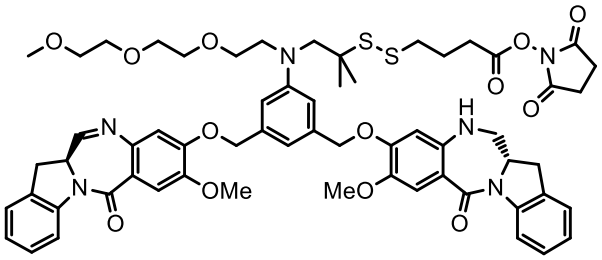
6. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o composto é:

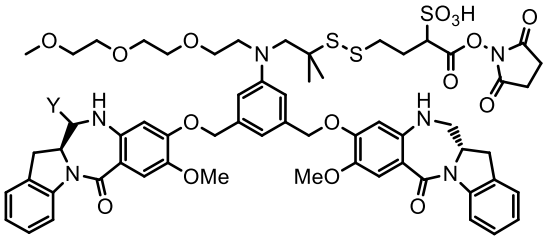


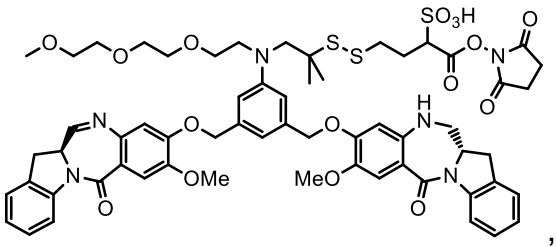
,


,


,

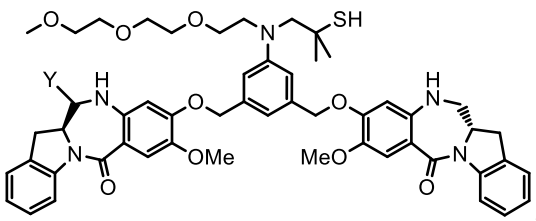

,

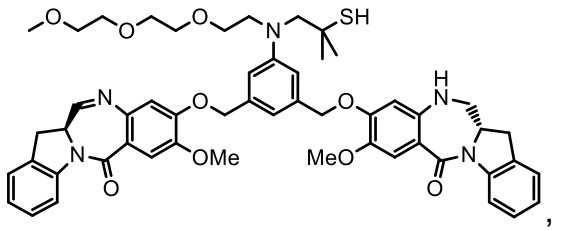

, ou


,

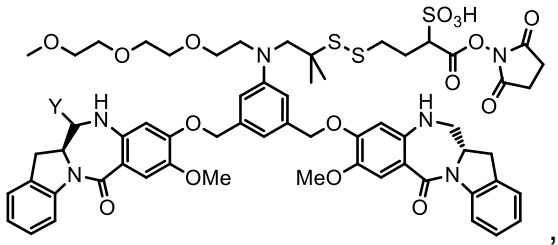
ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

7. Composto, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o composto é representado pela seguinte fórmula:

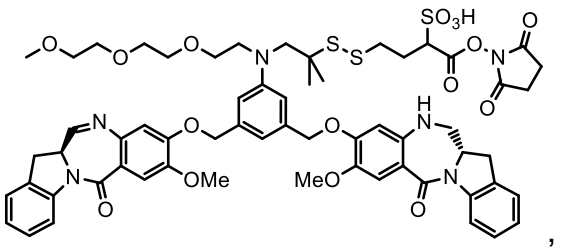

,



,



, ou



,

ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

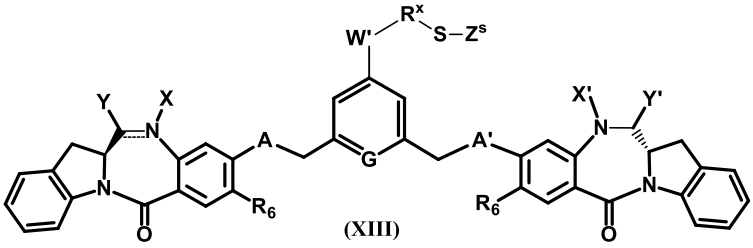
8. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que Y é $-SO_3M$.

9. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que M é -H, Na^+ ou K^+.

10. Conjugado, caracterizado pelo fato de que compreende um composto citotóxico e um agente de ligação à celula (CBA),

em que o composto citotóxico compreende um grupo de ligação que liga covalentemente o composto citotóxico ao CBA, e

em que o dito composto citotóxico é representado pela seguinte fórmula:



(XIII)

ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que:

a linha dupla = entre N e C representa uma ligação simples ou uma ligação dupla, desde que quando for uma ligação dupla, X está ausente e Y é -H, e quando for uma ligação simples, X é -H e Y é -OH ou $–SO_3M$, em que M é H^+ ou um cátion farmaceuticamente aceitável;

W' é -N (R^e)-;

X' e Y' são ambos -H;

A e A' são ambos -O-;

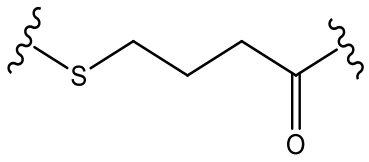
R_6 é -OMe;

R^x é uma alquila linear ou ramificada com 1 a 6 átomos de carbono;

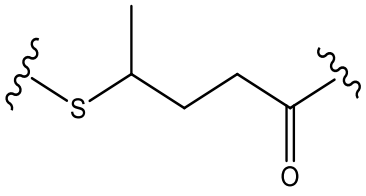
R^e é $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$, em que R^k é -H, ou uma alquila linear, ramificada ou cíclica com 1 a 6 átomos de carbono;

n é um número inteiro de 2 a 6;

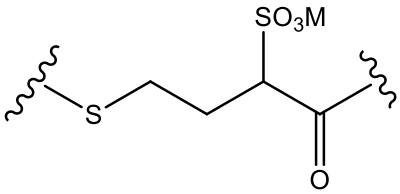
Z^s está vinculado ao CBA e é selecionado a partir de:



(b7);



(b8); e



(b9).

11. Conjugado, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que R^k é -H ou -Me.

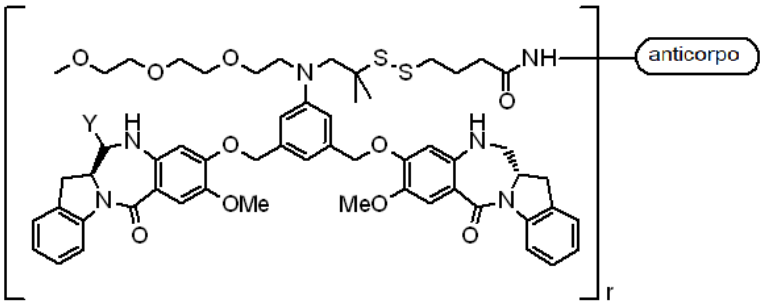
12. Conjugado, de acordo com a reivindicação 10 ou 11, caracterizado pelo fato de que R^x é $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)$ -,

em que R^f e R^g são cada um independentemente

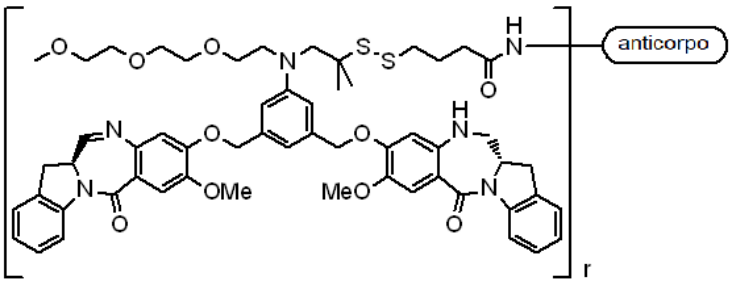
selecionados a partir de H ou uma alquila linear ou ramificada com 1 a 4 átomos de carbono; e p é 0, 1, 2 ou 3.

13. Conjugado, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que R^f e R^g são iguais ou diferentes e são selecionados dentre H e Me; e p é 1.

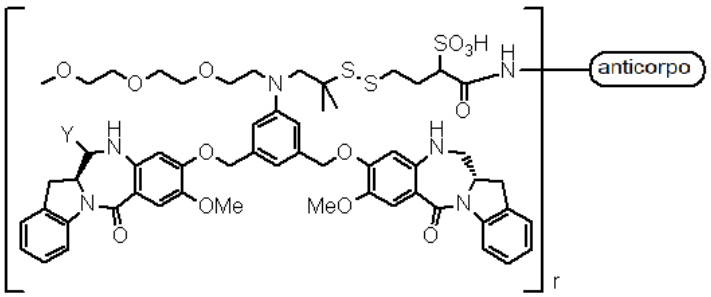
14. Conjugado, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o conjugado é:



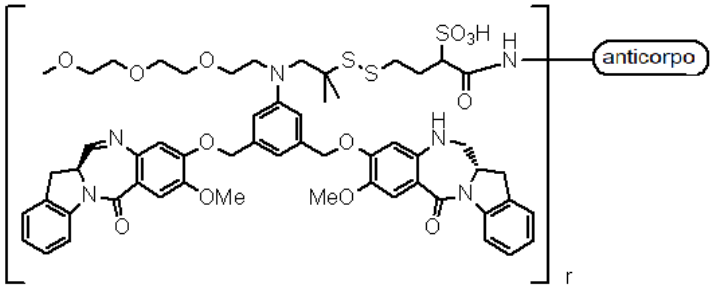
,



,



, ou

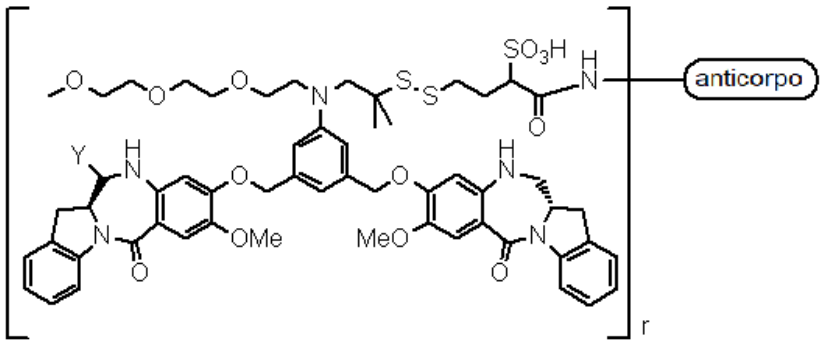


,

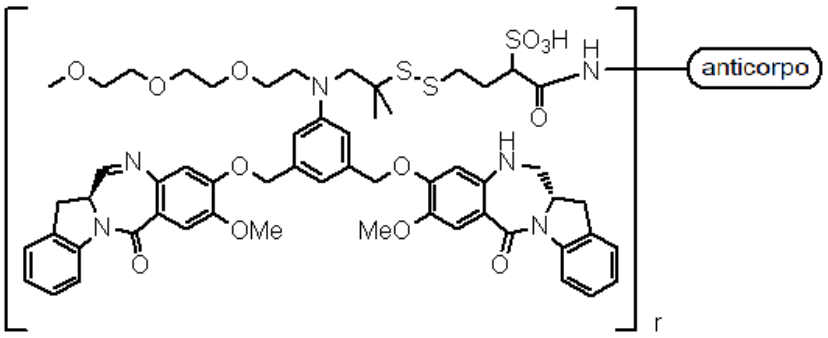
ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que r

é um número inteiro de 1 a 10.

15. Conjugado, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o conjugado é representado pela seguinte fórmula:



, ou



ou um eu sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

16. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 15, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é huMy9-6.

17. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 16, caracterizado pelo fato de que Y é $-SO_3M$.

18. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 17, caracterizado pelo fato de que M é -H, Na^+ ou K^+.

19. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 18, caracterizado pelo fato de que o agente de ligação à célula é um anticorpo, um anticorpo de cadeia simples, um fragmento de anticorpo que especificamente se liga à célula-alvo, um

anticorpo monoclonal, um anticorpo monoclonal de cadeia simples, ou um fragmento de anticorpo monoclonal que especificamente se liga a uma célula-alvo, um anticorpo quimérico, um fragmento de anticorpo quimérico que especificamente se liga à célula-alvo, um anticorpo de domínio, um fragmento de anticorpo de domínio que especificamente se liga à célula-alvo, um anticorpo recapeado, um anticorpo de cadeia simples recapeado, ou um fragmento de anticorpo recapeado, um anticorpo monoclonal, um anticorpo monoclonal de cadeia simples, ou um fragmento de anticorpo monoclonal do mesmo, um anticorpo humanizado, um anticorpo humanizado de cadeia simples, ou um fragmento de anticorpo humanizado, uma linfocina, um hormônio, uma vitamina, um fator de crescimento, um fator estimulante de colônia, ou uma molécula de transporte de nutriente.

20. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 19, caracterizado pelo fato de que o conjugado compreende 1 a 10 compostos citotóxicos, cada composto citotóxico compreendendo o grupo de ligação que liga o composto citotóxico à CBA e cada composto citotóxico no conjugado é o mesmo.

21. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o composto, como definido na reivindicação 1, ou o conjugado, como definido na reivindicação 10, ou um veículo farmaceuticamente aceitável.

22. Uso de um composto, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, ou um conjugado, como definido em qualquer uma das reivindicações 10 a 20, ou um seu cátion farmaceuticamente aceitável, caracterizado pelo fato de que é na a preparação de um medicamento para o tratamento de câncer.

23. Uso, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado de câncer de mama, câncer de cólon, câncer cerebral, câncer de próstata, câncer renal, câncer

pancreático, câncer ovariano, câncer de cabeça e pescoço, melanoma, câncer colorretal, câncer gástrico, câncer escamoso, câncer pulmonar de célula pequena, câncer pulmonar de célula não pequena, câncer testicular, carcinoma de célula Merkel, glioblastoma, neuroblastoma, cânceres de órgãos linfáticos e malignidade hematológica incluindo Leucemia (Leucemia linfoblástica aguda (ALL), Leucemia mieloide aguda (AML), Leucemia linfocítica crônica (CLL), Leucemia mieloide crônica (CML), Leucemia monocítica aguda (AMOL), Leucemia de célula pilosa (HCL), Leucemia prolinfocítica de célula T (T-PLL), Leucemia linfocítica granular grande, Leucemia de célula T adulta, Linfoma (linfoma linfocítico pequeno (SLL), Linfomas de Hodgkin (Esclerose nodular, Celularidade misturada, Rica em linfócito, Esgotada ou não esgotada de Linfócito e linfoma de Hodgkin predominante em linfócito nodular), Linfomas não Hodgkin (todos os subtipos), Leucemia linfocítica crônica/Linfoma linfocítico pequeno, Leucemia lproinfocítica de célula B, Linfoma linfoplasmacítico (tal como macroglobulinemia de Waldenström), Linfoma de zona marginal esplênica, Neoplasmas de célula plasmática (Mieloma de célula plasmática, Plasmacitoma, Doenças de deposição de imunoglobulina monoclonal, Doenças da cadeia pesada), Linfoma de célula B de zona marginal extranodal (Linfoma MALT), Linfoma de célula B de zona marginal nodal (NMZL), Linfoma folicular, Linfoma de célula do manto, Linfoma de célula B grande difusa, Linfoma de célula B grande mediastinal (tímica), Linfoma de célula B grande intravascular, Linfoma de efusão primária, Linfoma/leucemia de Burkitt, Leucemia prolinfocítica de célula T, Leucemia linfocítica granular grande de célula T, Leucemia de célula NK agressiva, Leucemia/linfoma de célula T adulta, Linfoma de célula NK/T extranodal (tipo nasal), Linfoma de célula T tipo enteropatia, Linfoma de célula T hepatoesplênica, Linfoma de célula NK blástica, Micose fungoide/Síndrome de Sezary, Distúrbios linfoproliferativos de célula T

positiva para CD30 cutâneo primário, Linfoma de célula grande anaplástica cutânea primária, Linfomatoide papulose, Linfoma de célula T angioimunoblástico, Linfoma de célual T periférica (não especificada), Linfoma de célula grande anaplástica, mieloma múltiplo (mieloma de célula plasmática ou doença de Kahler).

24. Uso, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o medicamento é para o tratamento de leucemia mieloide aguda (LMA).

Figura 1. Esquemas para a Síntese de Ligantes **1b** e Dímeros **1d-g**

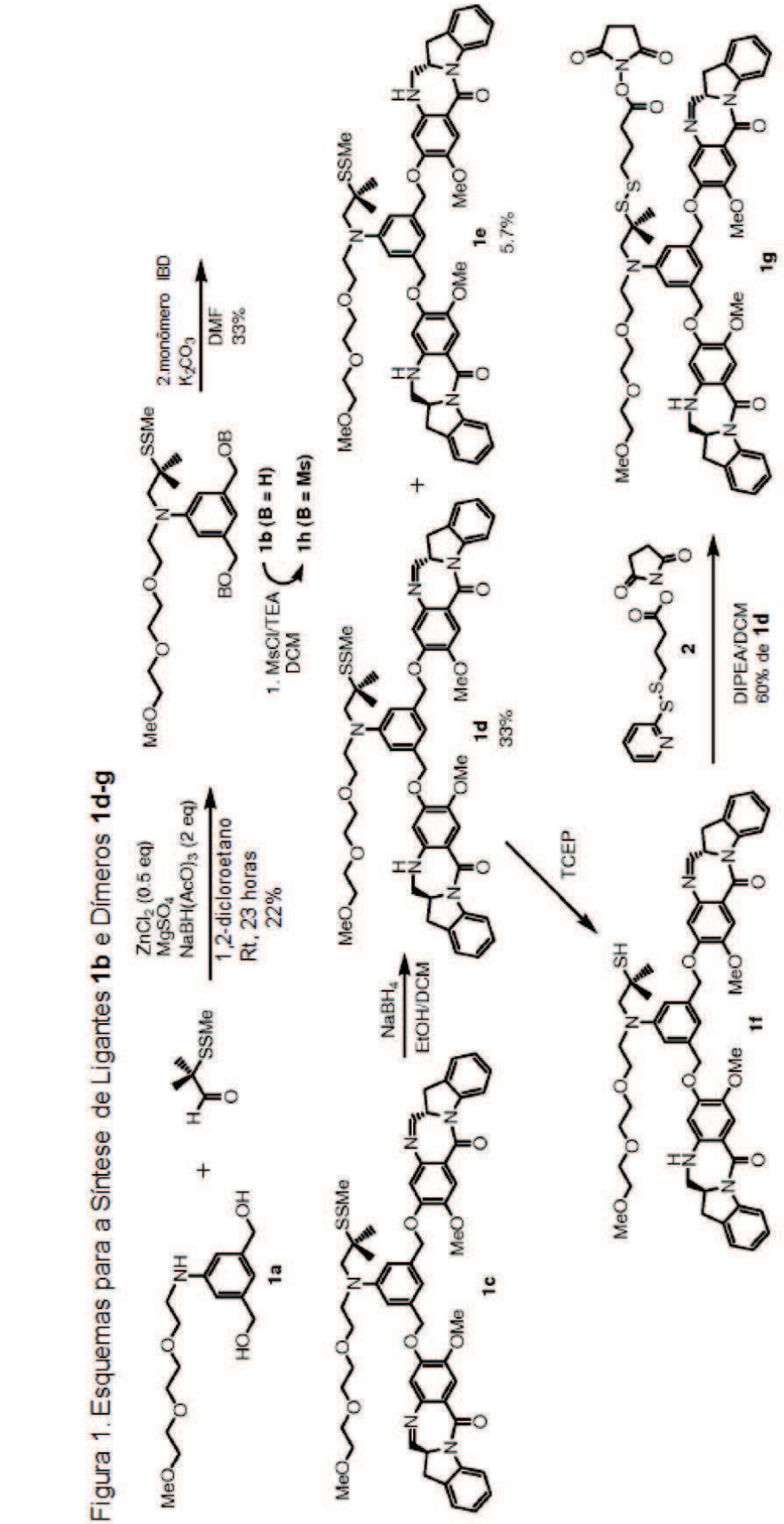


Figura 2. Esquemas para a Síntese de Dímeros **2a-b**

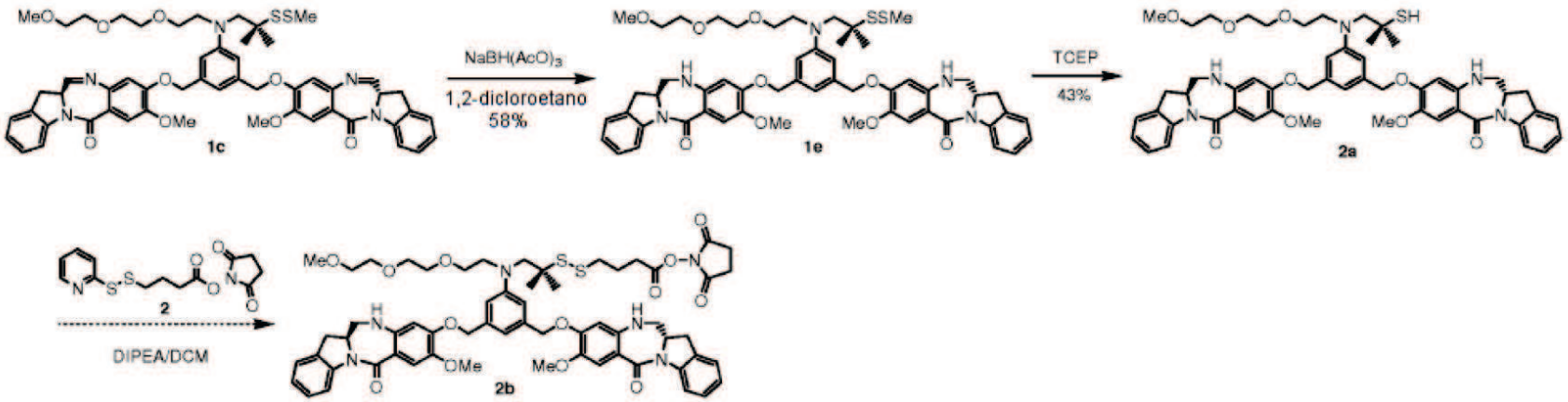
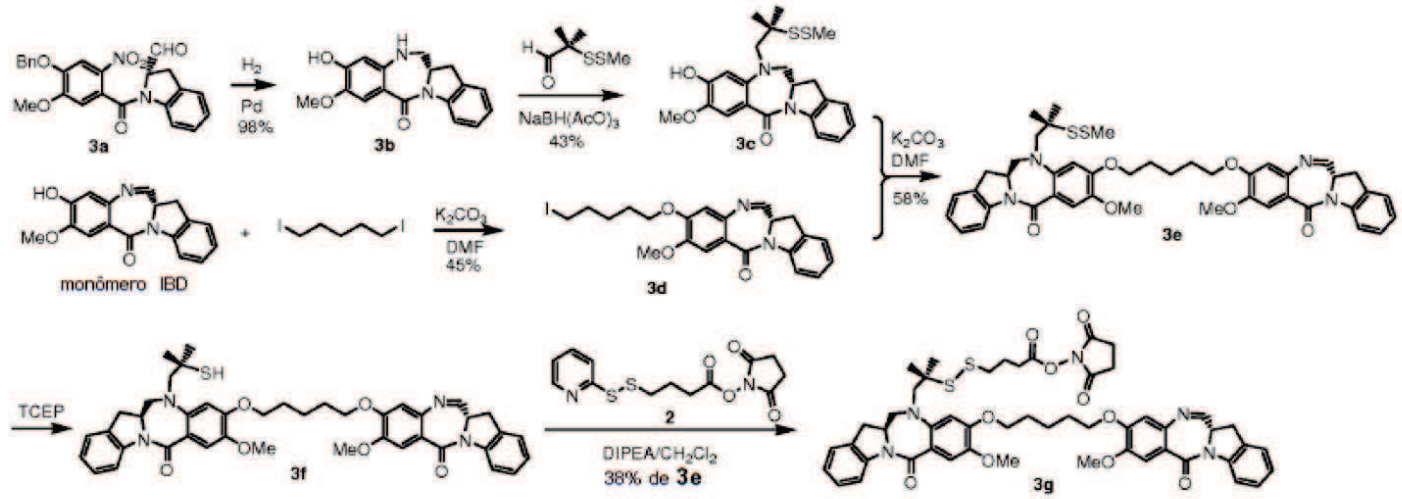


Figura 3. Esquemas para a Síntese de Dímeros **3e-g**



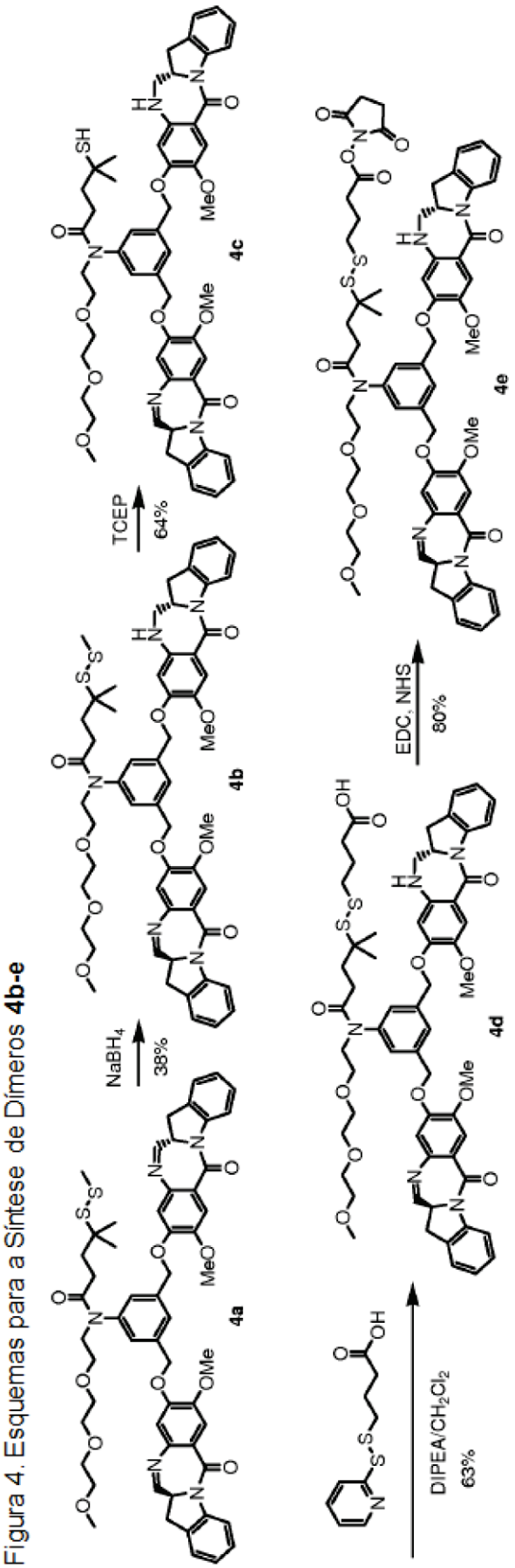


Figura 4. Esquemas para a Síntese de Dímeros **4b-e**

Figura 5. Esquemas para a Síntese de Ligante **5e** e Dímeros **5g-j**

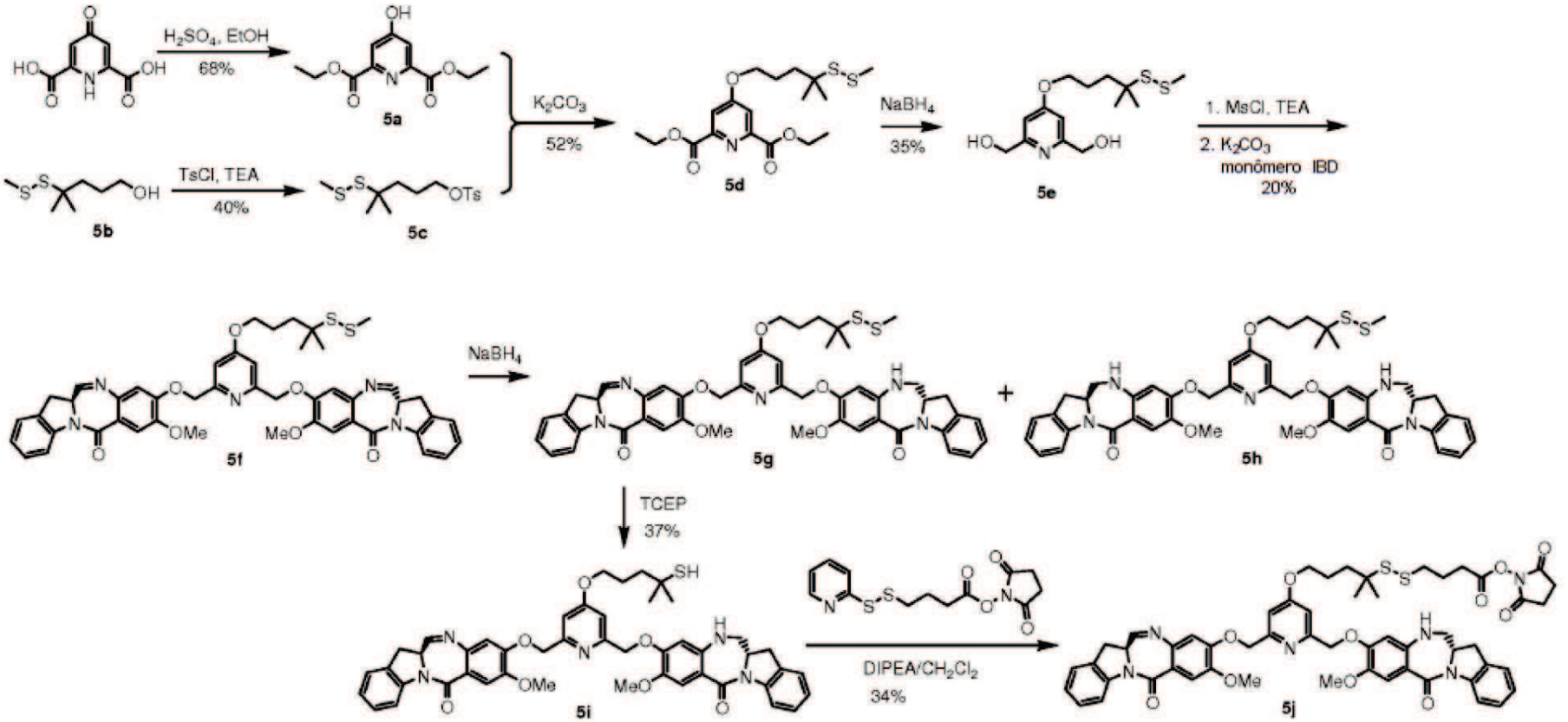


Figura 6. Esquemas para a Síntese de Ligante **6a** e Dímeros **6c-d**

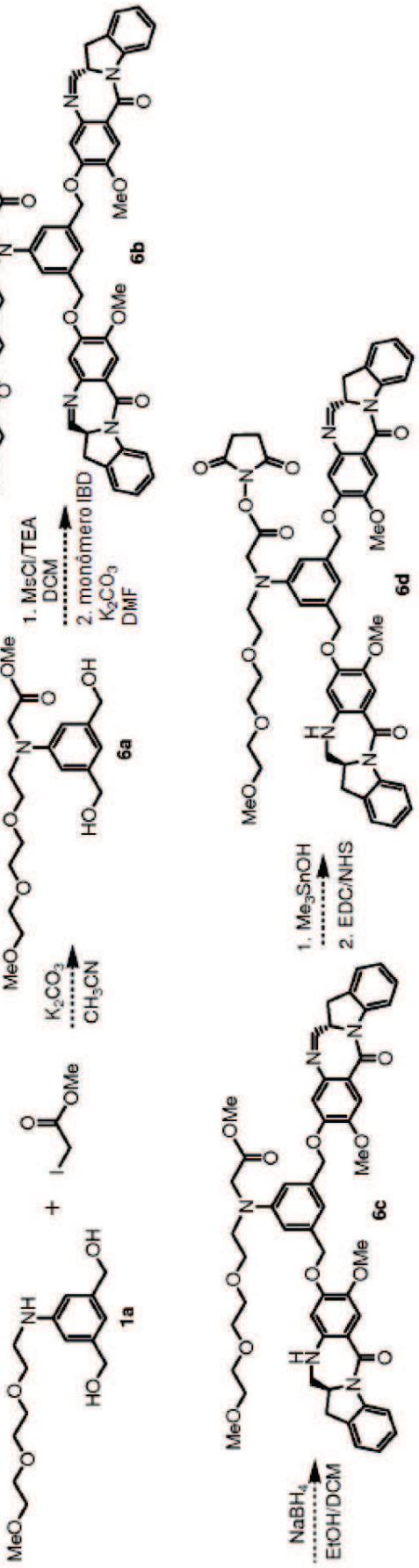


Figura 7. Esquemas para a Síntese de PEG Ligantes Modificados **7b** e Dímeros **7d-f**

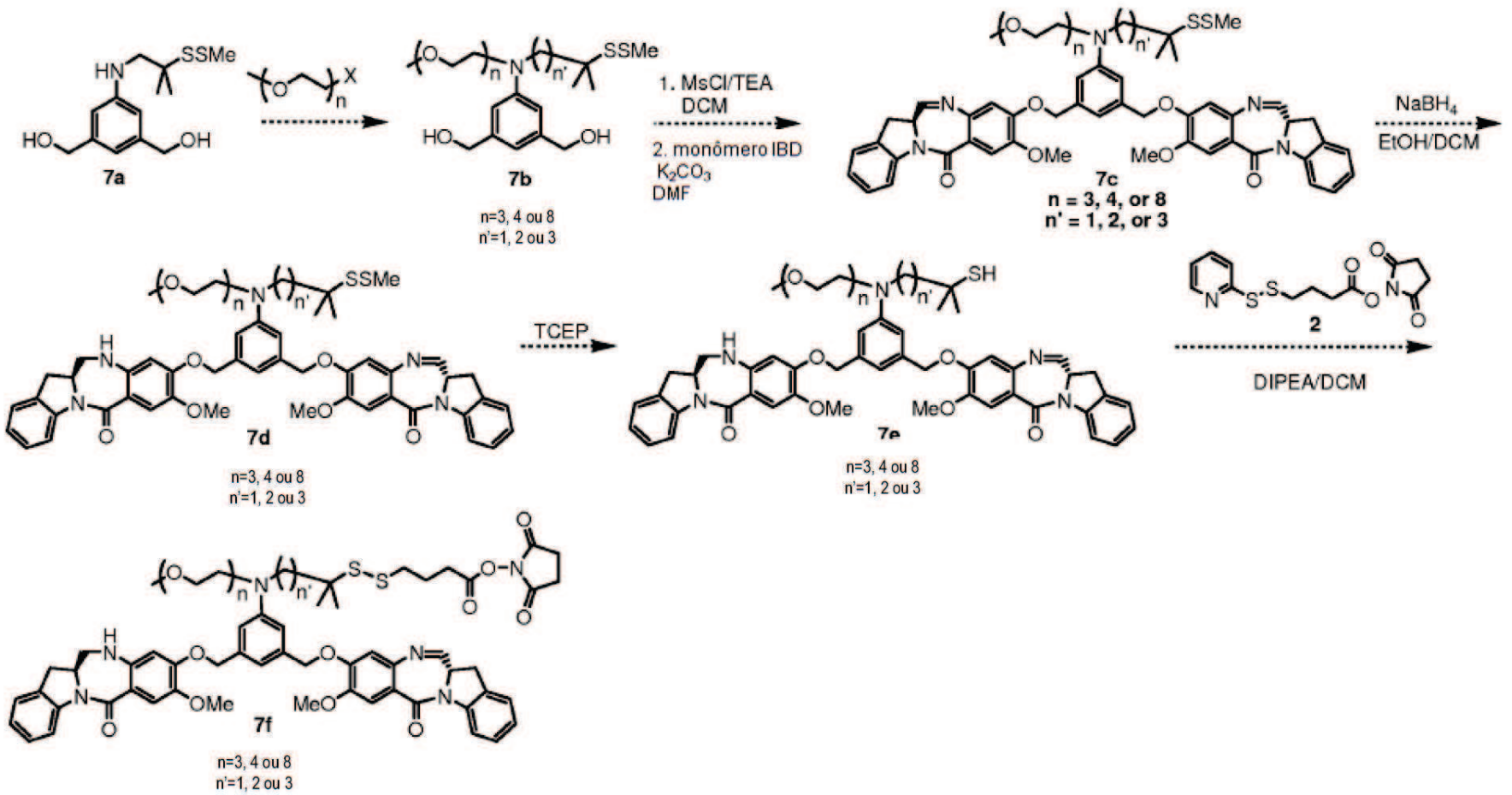


Figura 8. Esquemas para a Síntese de Tiol-contendo Dímeros **8b-e**

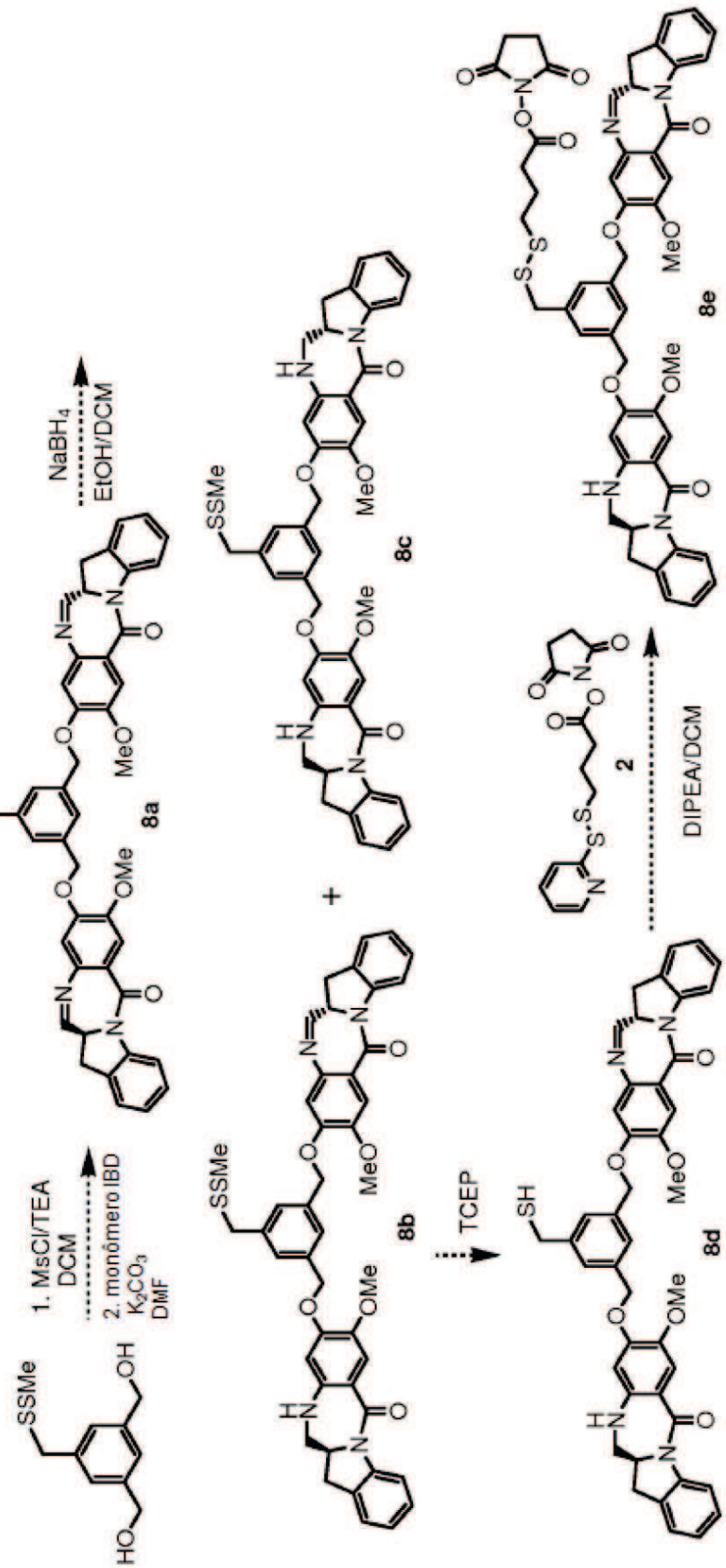


Figura 9. Esquemas para a Síntese de Dímeros **17d-g** Contendo uma Amina Terciária

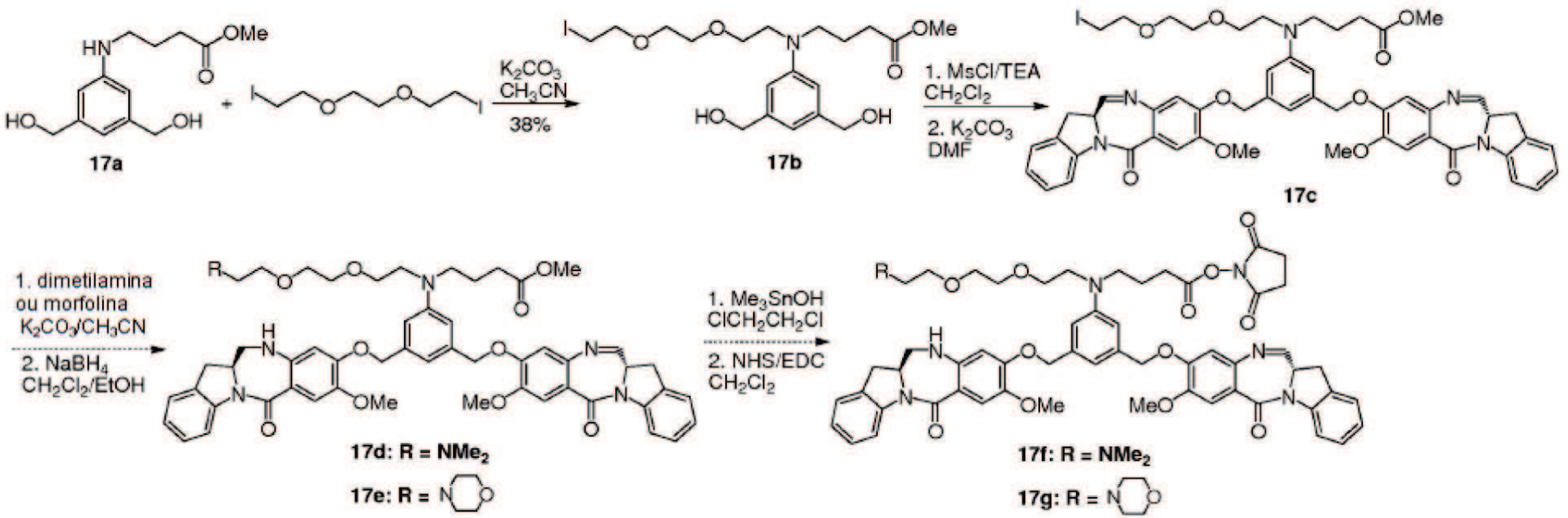


Figura 10. Esquemas para a Síntese de Dímeros **18c-f** Contendo uma Amina Terciária

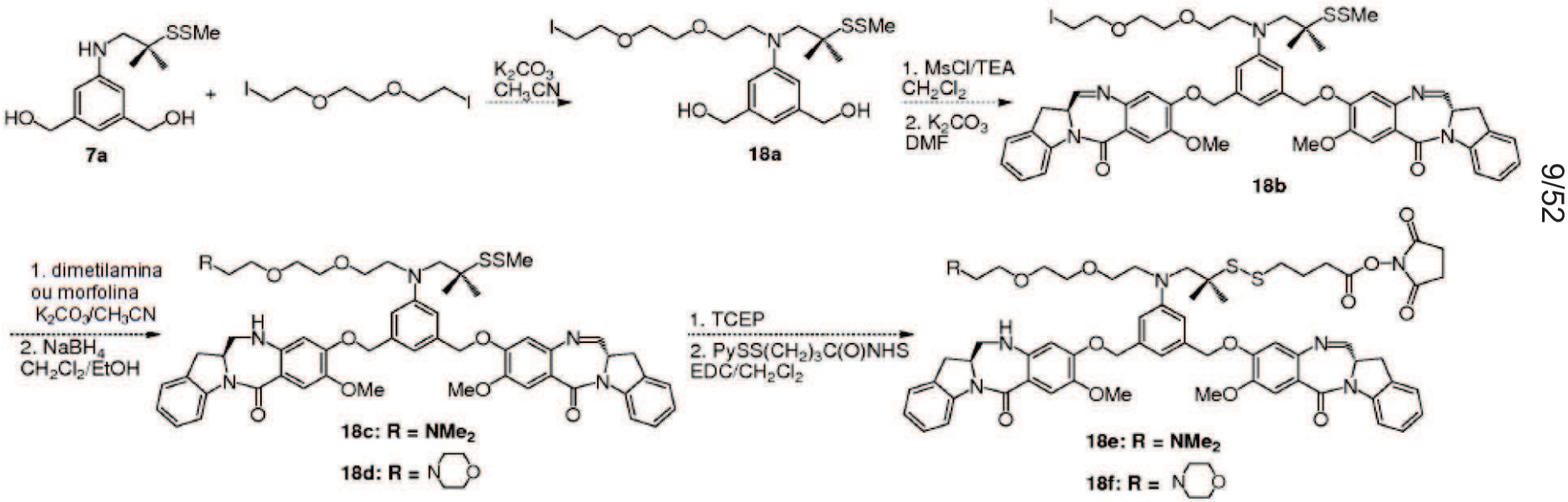
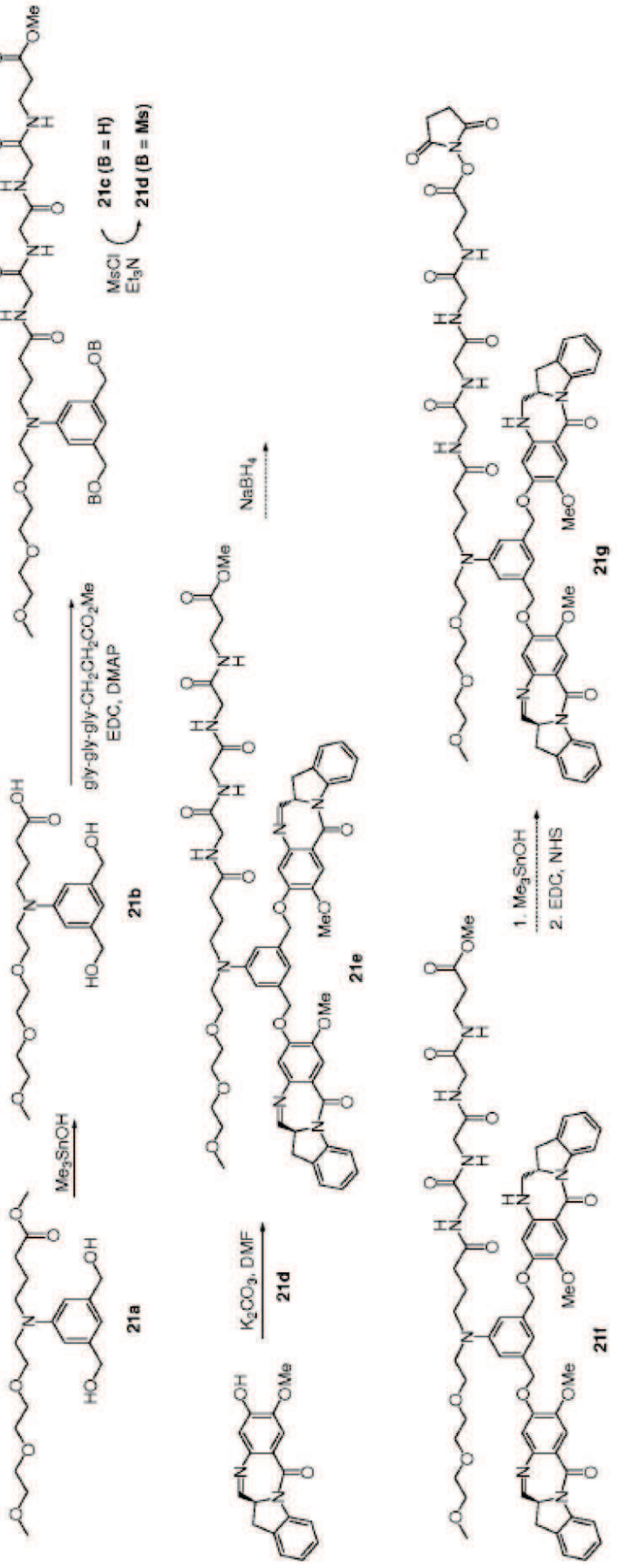


Figura 11. Esquemas para a Síntese de Dímeros **21f-g** Contendo um Ligante Peptídico



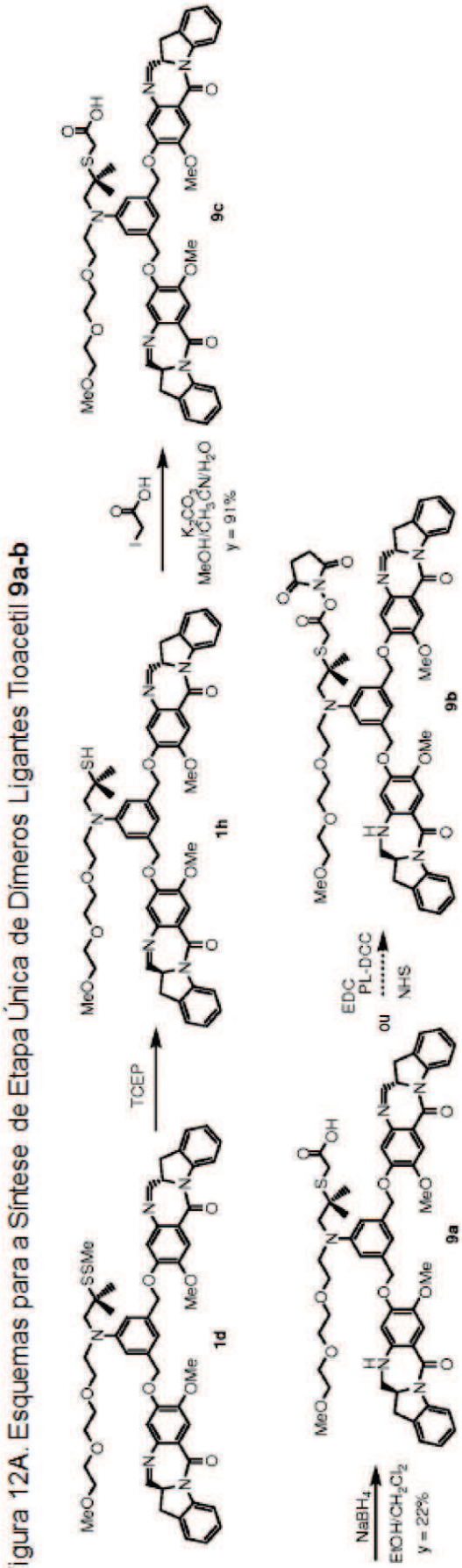


Figura 12A. Esquemas para a Síntese de Etapa Única de Dímeros Ligantes Tioacetil **9a-b**

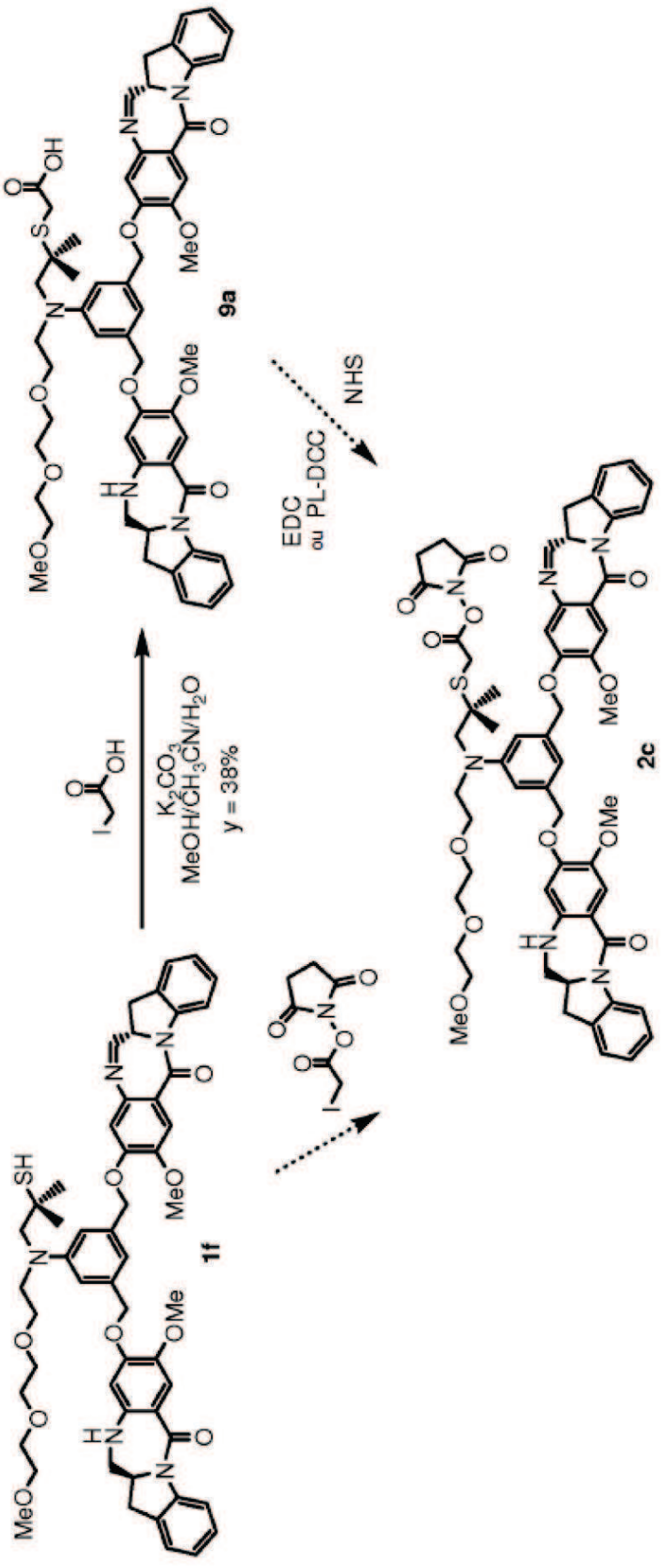


Figura 12B. Esquemas Alternativos para a Síntese de Etapa Única de Dímeros Ligantes Tioacetil **9a-b**

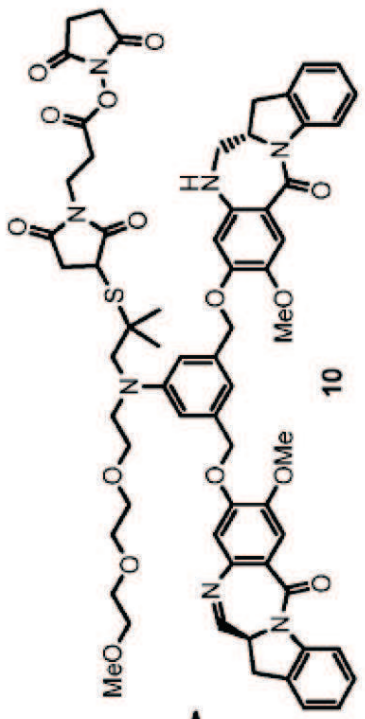


Figura 13. Esquemas para a Síntese de Etapa Única de Dímeros Ligantes BMPS **10**

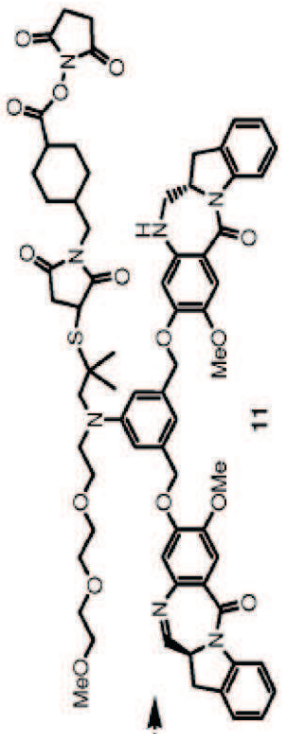


Figura 14. Esquemas para a Síntese de Etapa Única de Dímeros Ligantes SMCC **11**

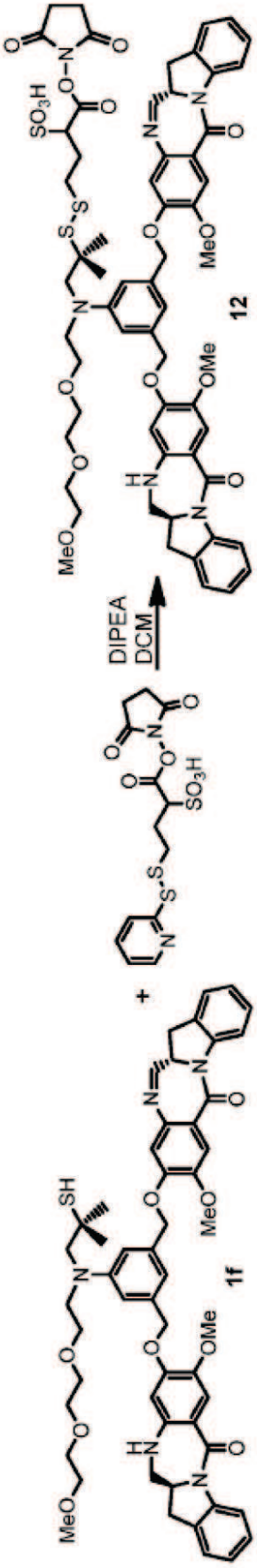


Figura 15. Esquemas para a Síntese de Etapa Única de Dímeros Ligantes Sulfo-SPDB **12**

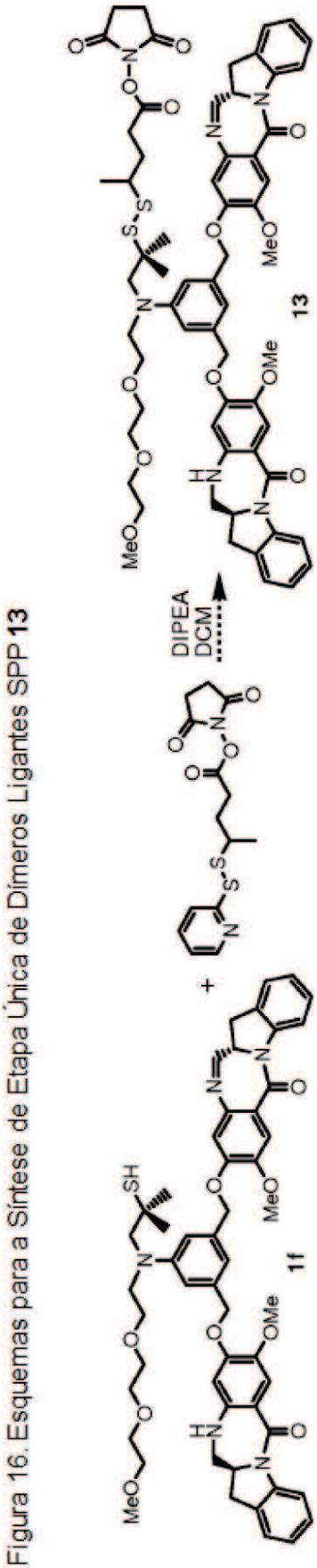


Figura 16. Esquemas para a Síntese de Etapa Única de Dímeros Ligantes SPP **13**

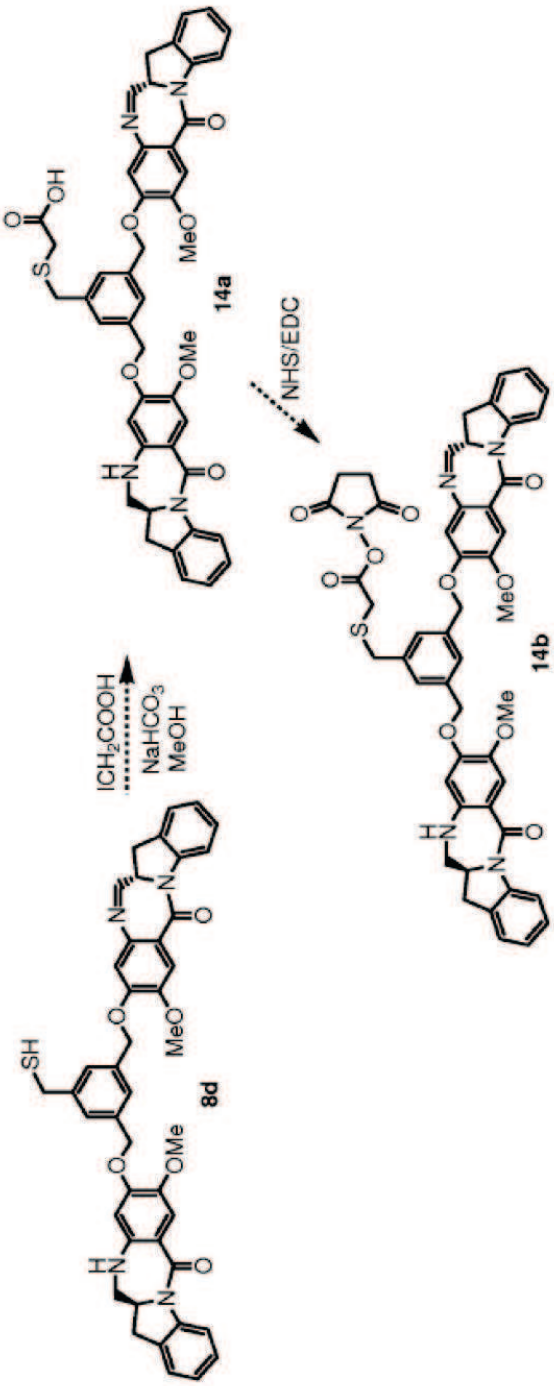


Figura 17. Esquemas para a Síntese de Etapa Única de Dímeros Ligantes Tioacetil **14a-b**

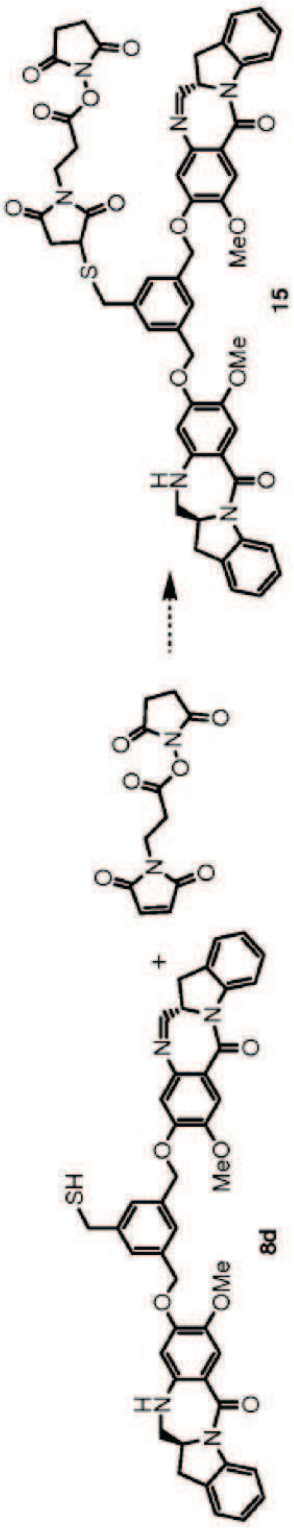


Figura 18. Esquemas para a Síntese de Etapa Única de Dímeros Ligantes BMPS **15**

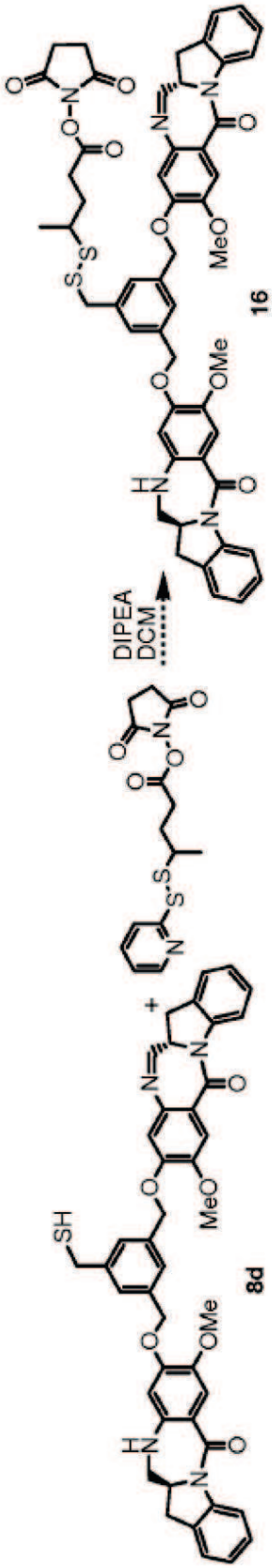


Figura 19. Esquemas para a Síntese de Etapa Única de Dímeros Ligantes SPP **16**

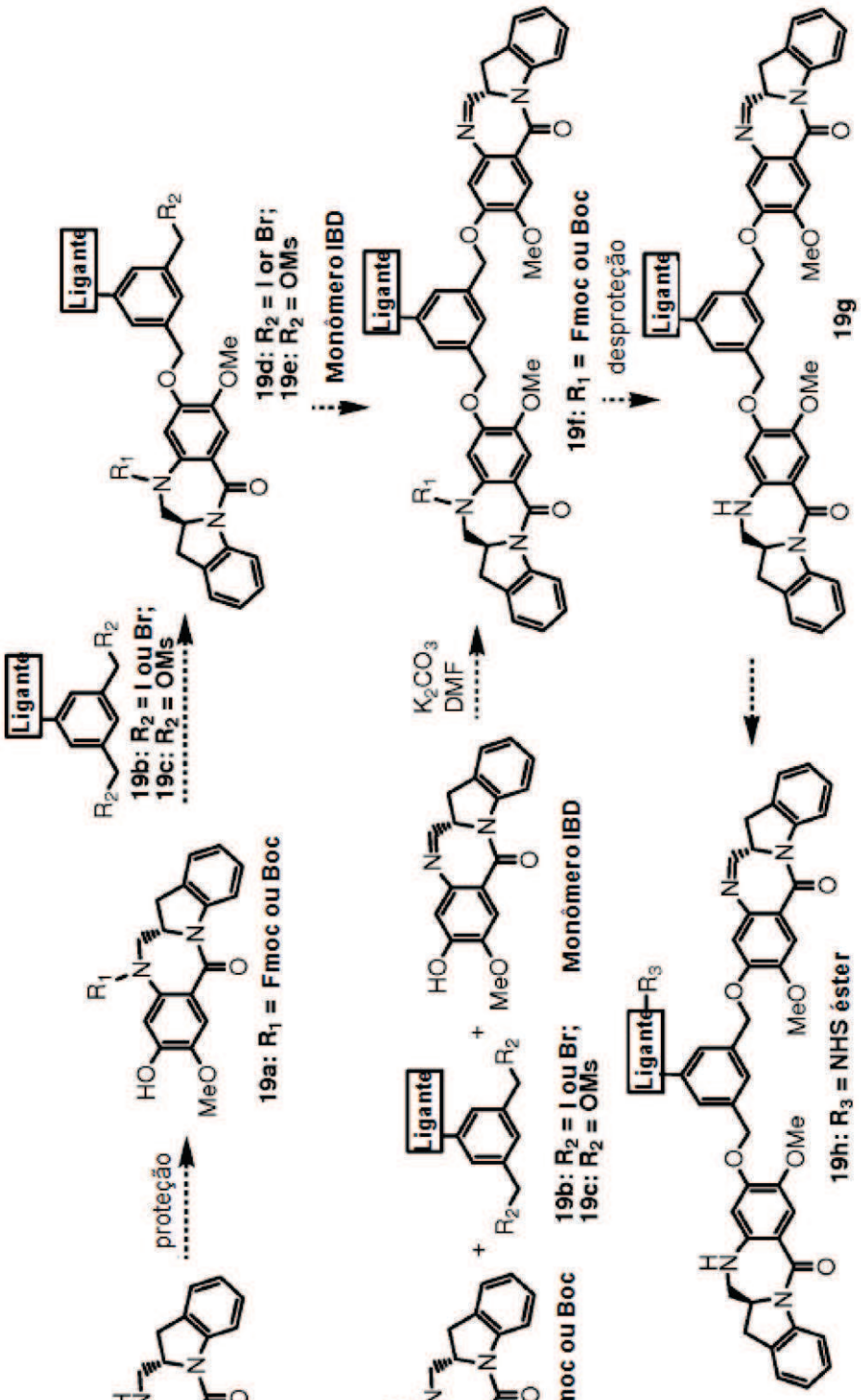


Figura 20. Esquemas para a Síntese de Etapa Única de Dímeros Ligantes Mono-imina

Figura 21. Esquemas para a Síntese de Duas Etapas da Síntese de Dímeros Di-reduzidos

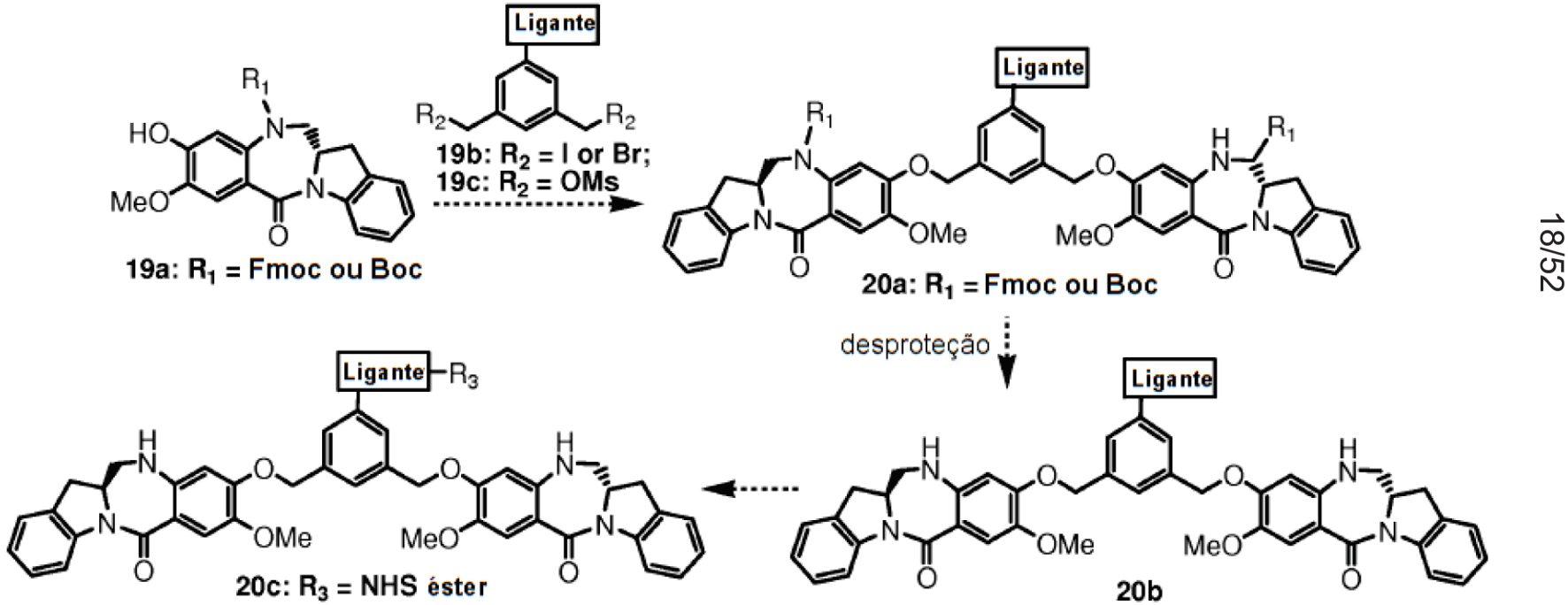


Figura 22. Esquemas de Conjugação Etapa Única

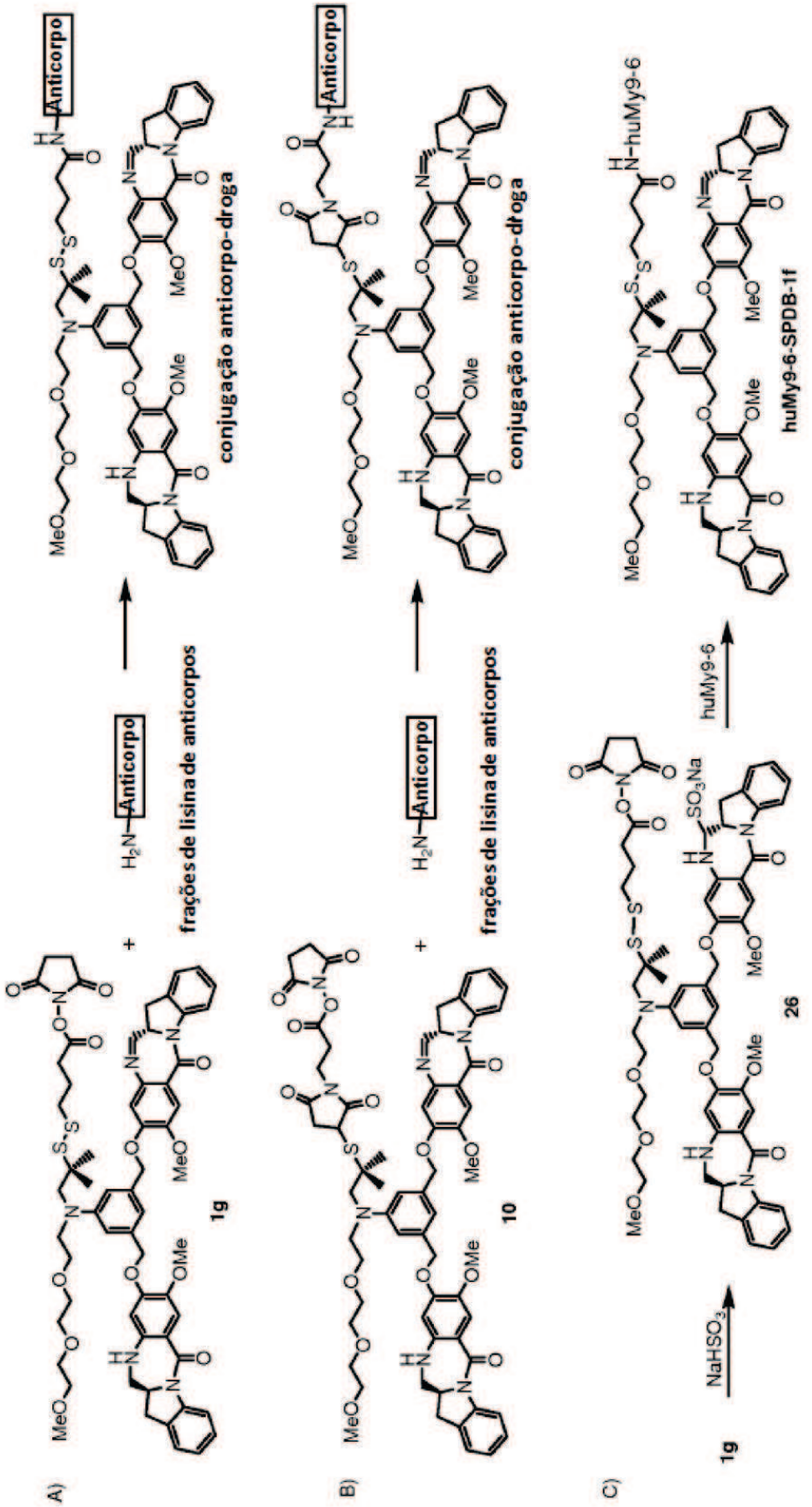
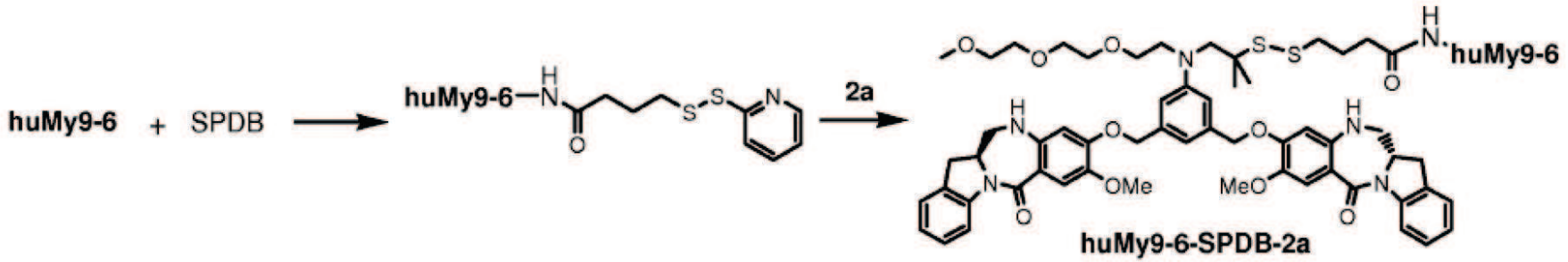


Figura 23. Esquemas de Conjugação Duas Etapas



Ligantes Tiol Reativos Representativos:

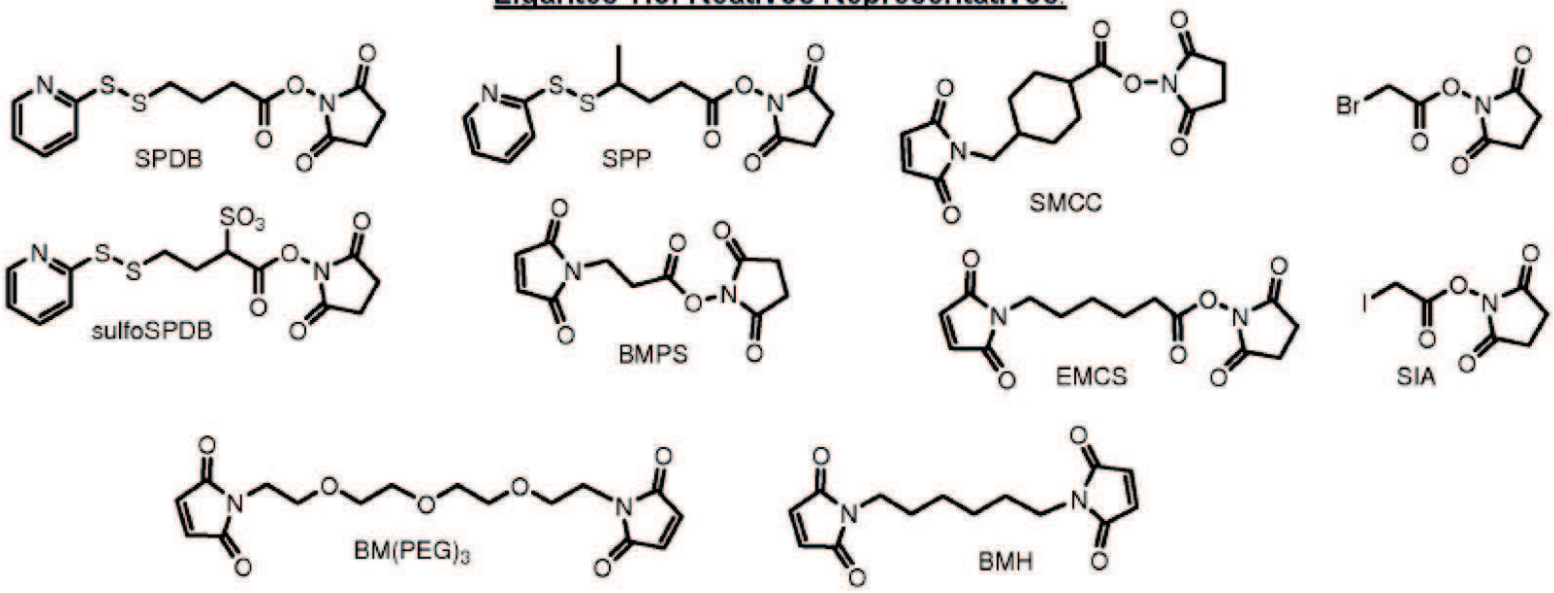


Figura 24: Atividade Antiproliferativa de Dímero Metilditio **1d** contra (A) células Namalwa, (B) HL60/QC, e (C)células KB

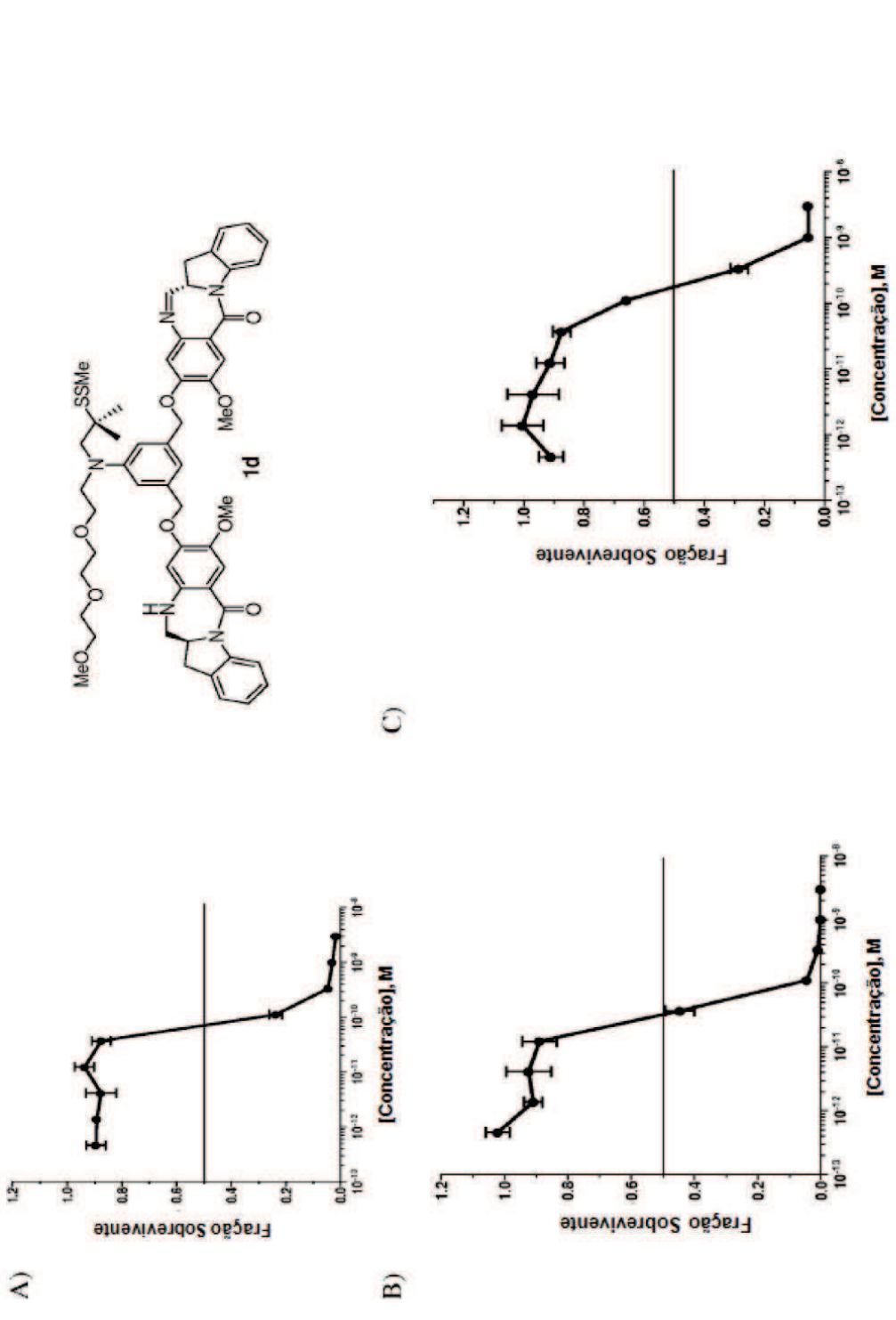


Figura 25. Atividade Antiproliferativa de huMY9-6-SPDB-**1f** contra células (A) HL60/QC (Ag+) com e sem bloqueio de sítios de ligação ao antígeno, (B) células HL60/ATCC (Ag+), e (C) células NB (Ag+)

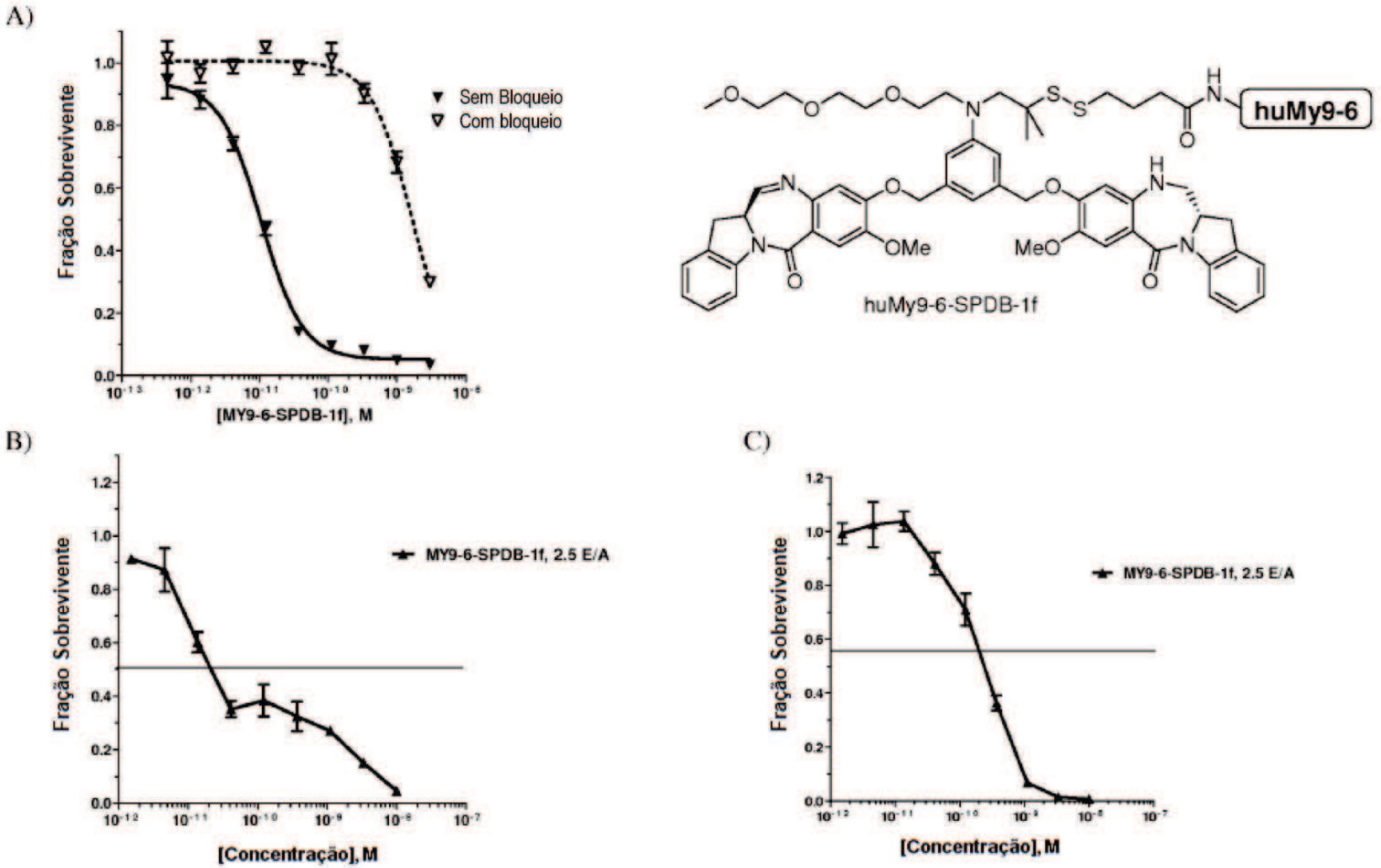
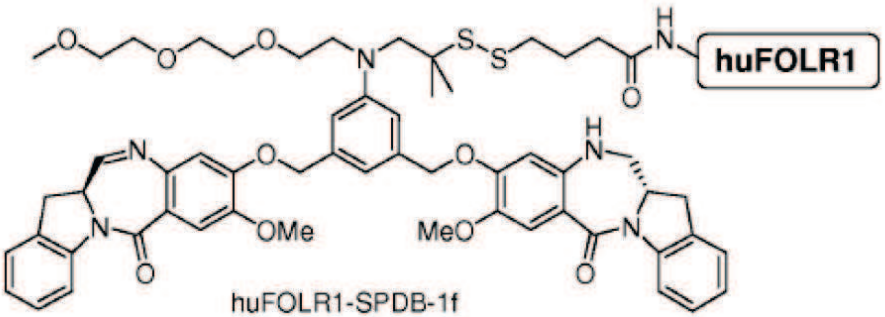


Figura 26. Atividade Antiproliferativa de huFOLR1-SPDB-**1f** contra células KB (Ag+) com e sem bloqueio de sítios de ligação ao antígeno



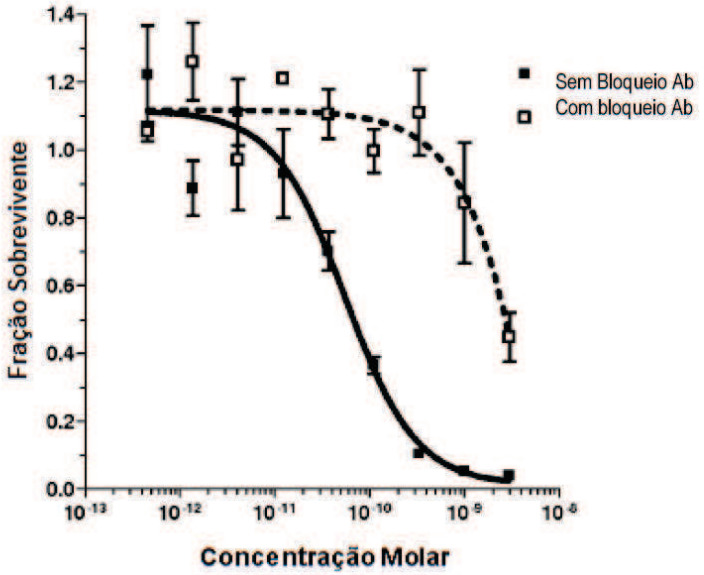
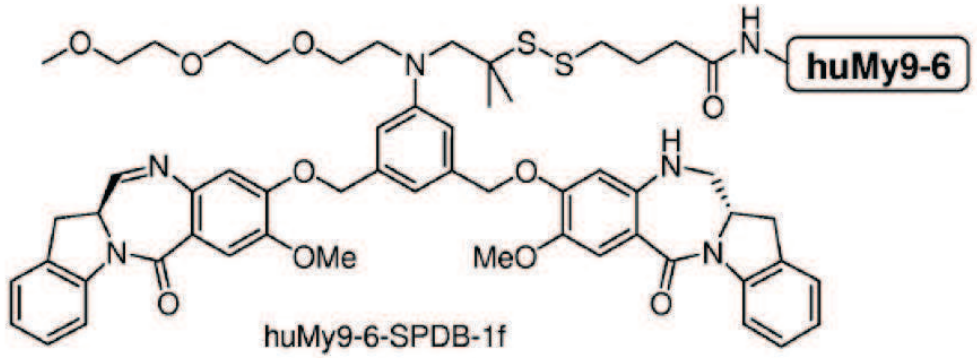


Figura 27. Afinidade de Ligação de huMY9-6-SPDB-**1f** (análise FACS)



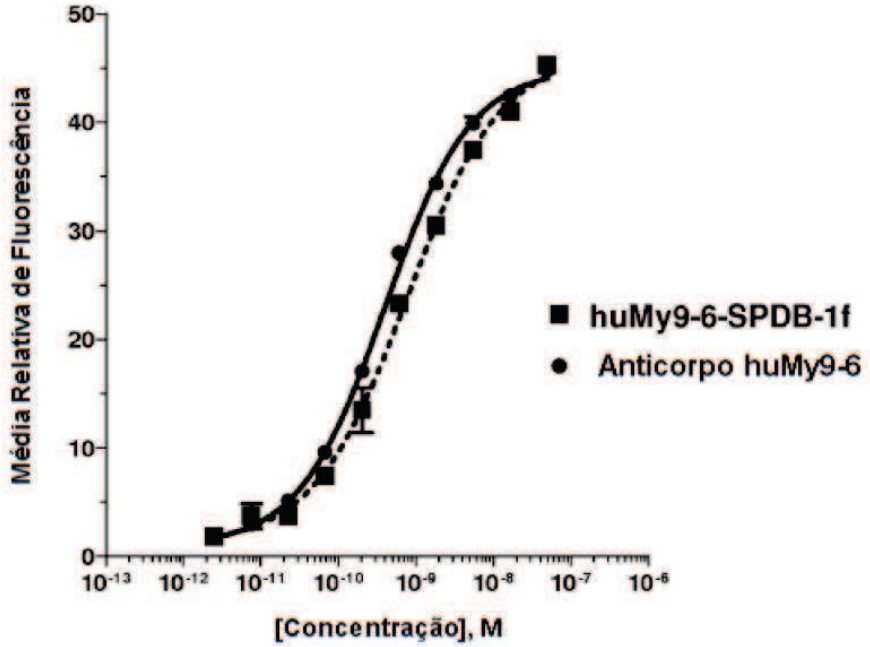
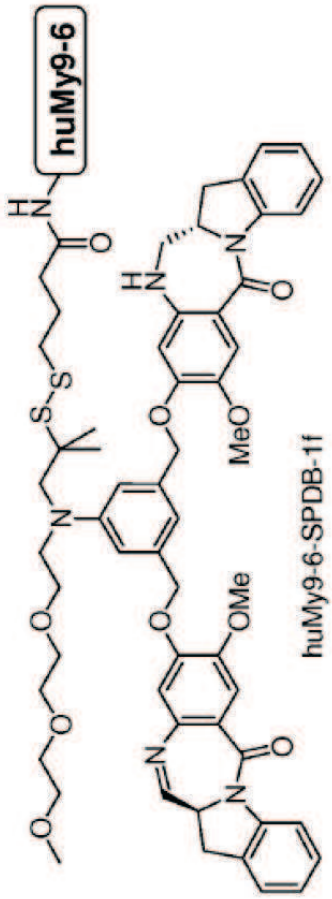


Figura 28. Eficácia *in vivo* de huMy9-6-SPDB-**1f** em Camundongos Puros Contendo Tumor HL60/QC



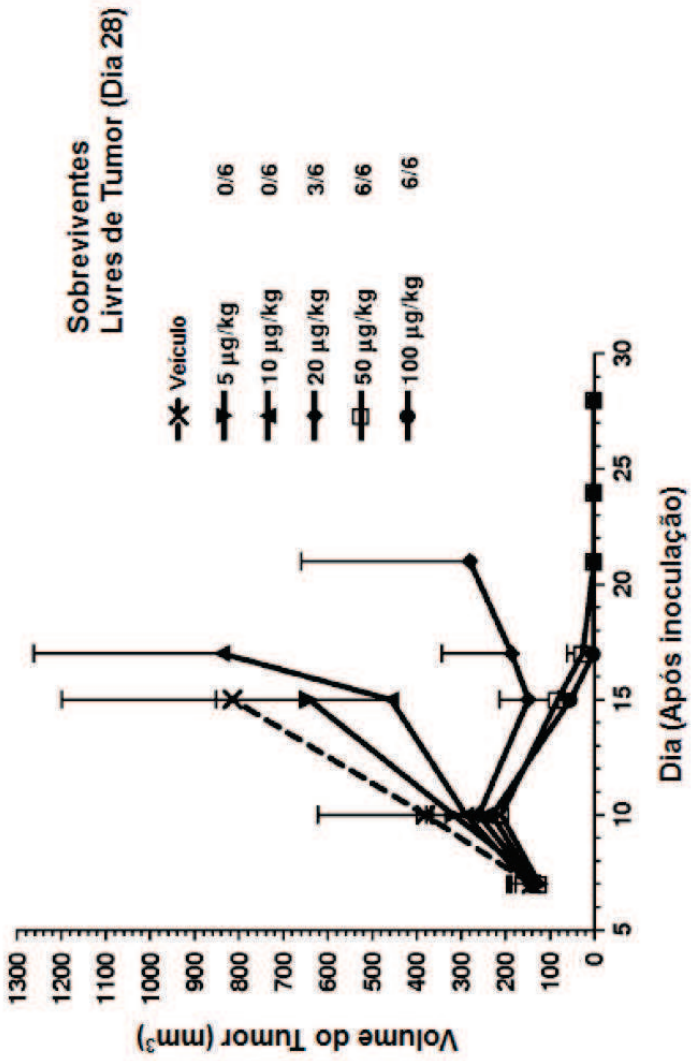
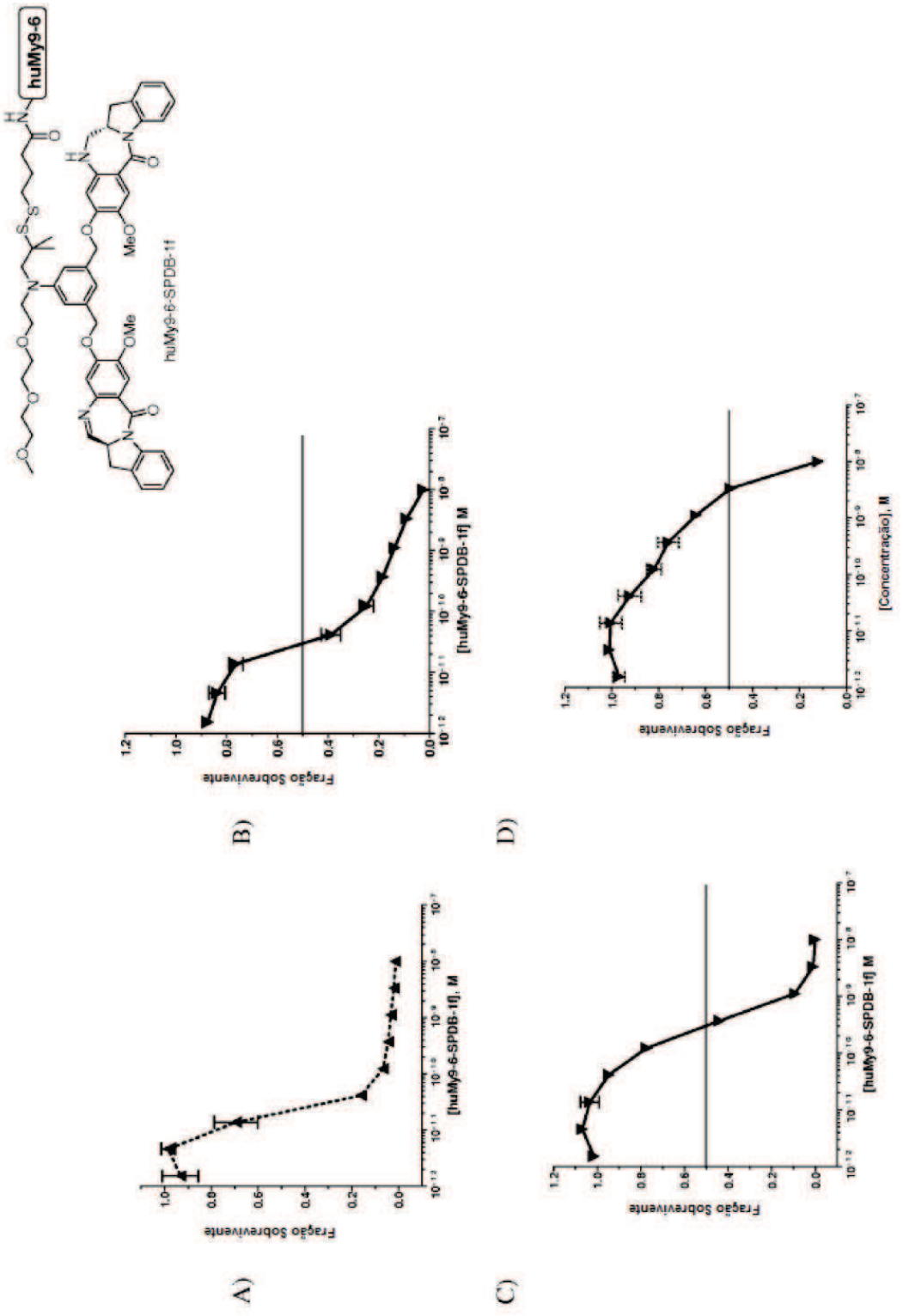


Figura 29. Atividade Antiproliferativa de huMY9-6-SPDB-**1f** contra (A) células HL60/QC, (B) células HL60/ATCC, (C) células NB-4, e células HEL 92.1.7 (D)



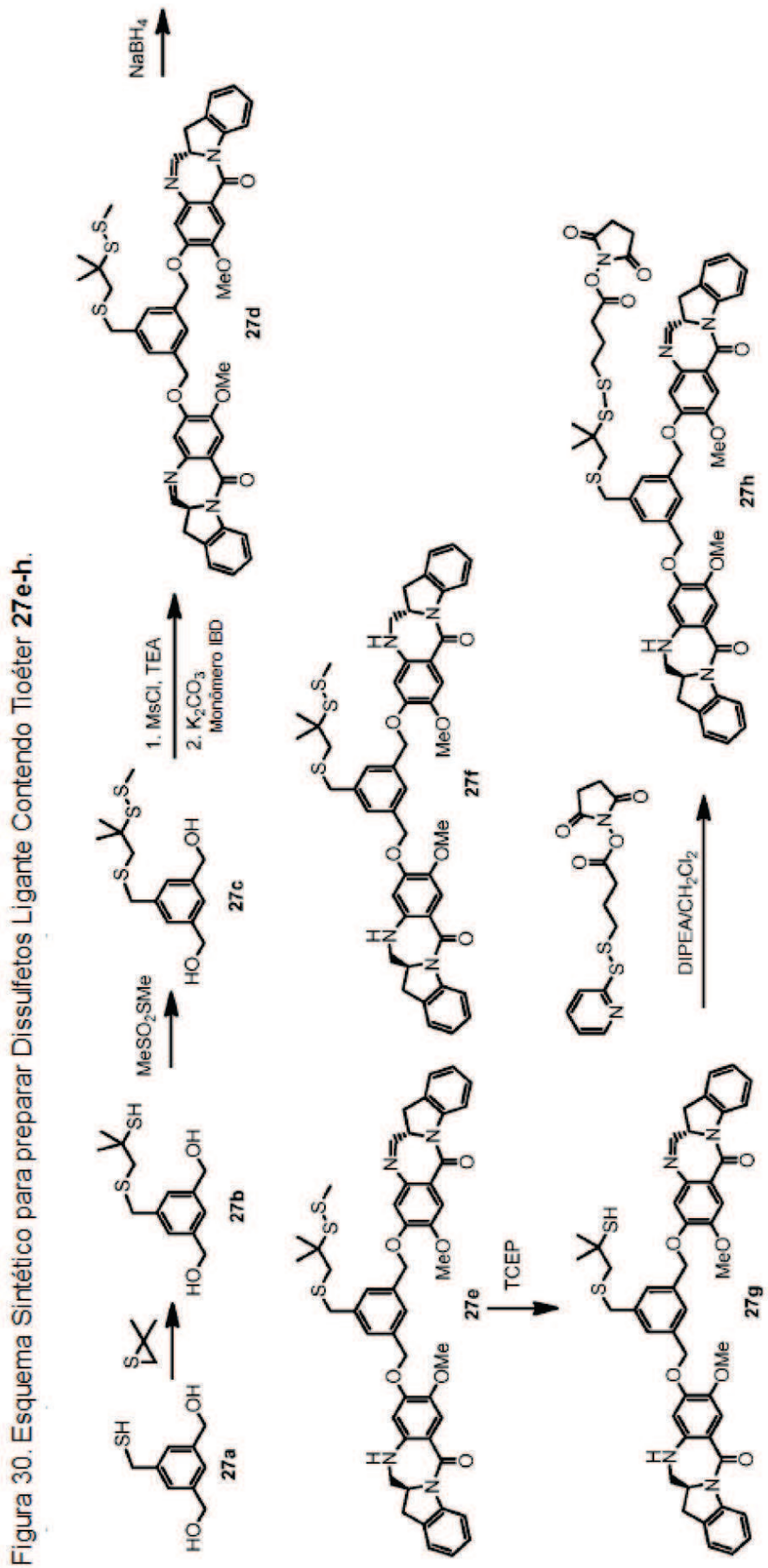


Figura 30. Esquema Sintético para preparar Dissulfetos Ligante Contendo Tioéter **27e-h**.

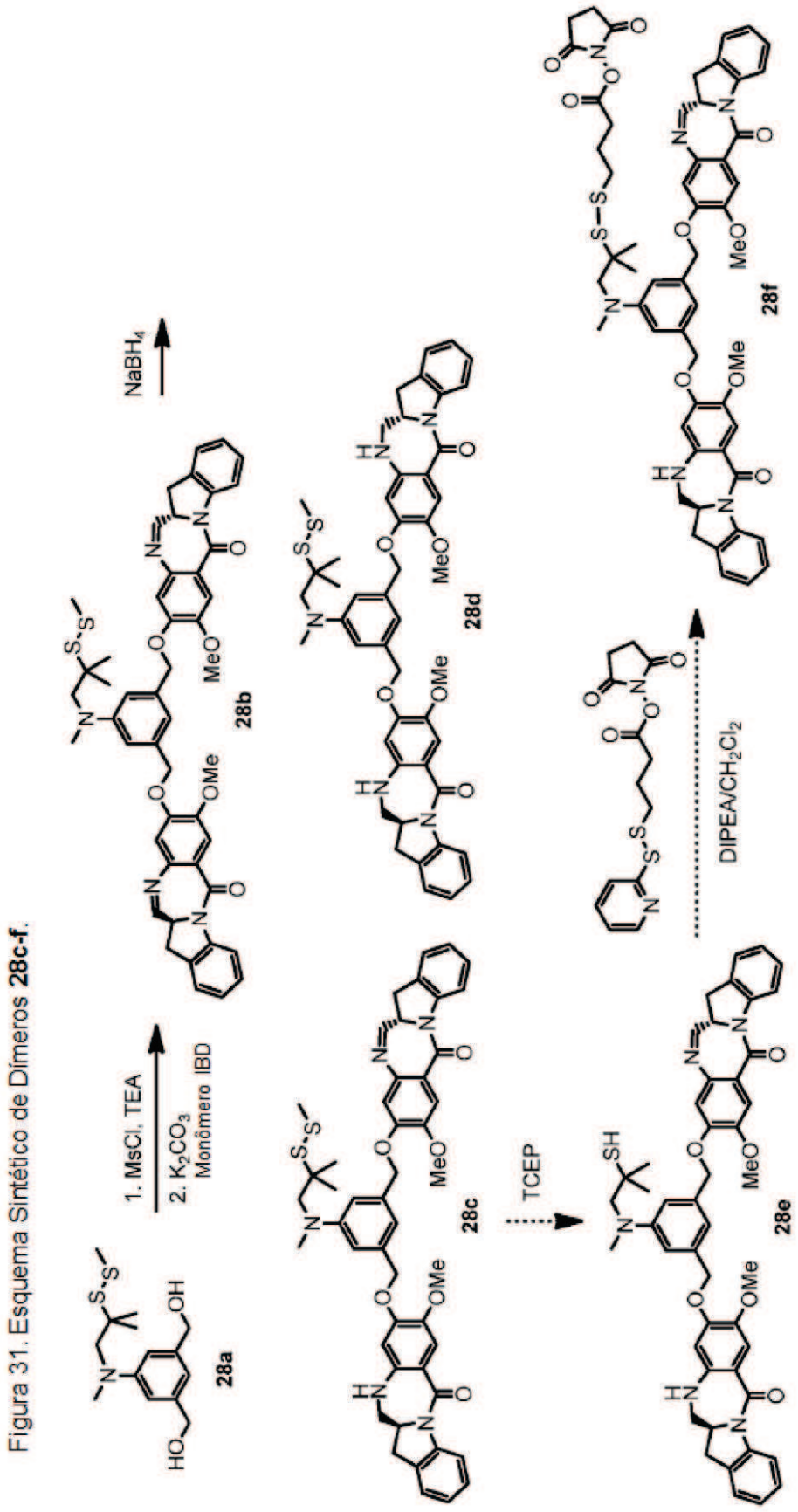


Figura 31. Esquema Sintético de Dímeros **28c-f**.

Figura 32. Esquema Sintético para Dímeros Ligados a Fenil **29b-c**

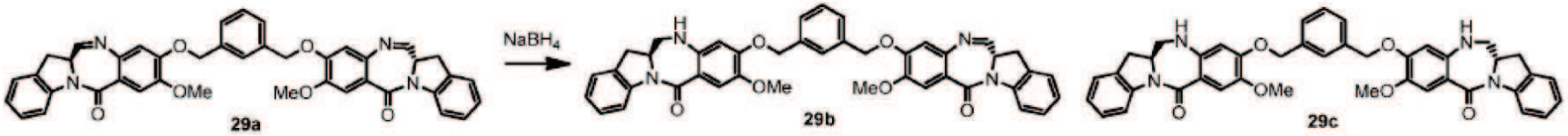


Figura 33. Duas Etapas Alternativas para Síntese de Dímeros Mono-imina

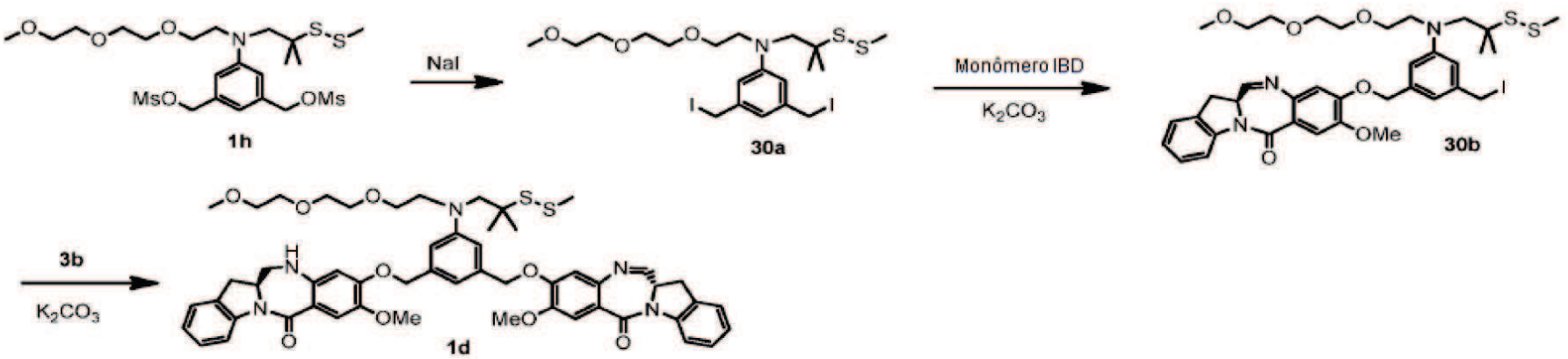


Figura 34. Atividade Antiproliferativa Comparando (A) huMy9-6-1fSPDB-**1f** e (B) huMy9-6-sulfoSPDB-**1f** , e (C) huMy9-6-BMPS-**1f** contra HL60/QC (Ag+) células com e sem Bloqueio de Sítios de Ligação ao Antígeno

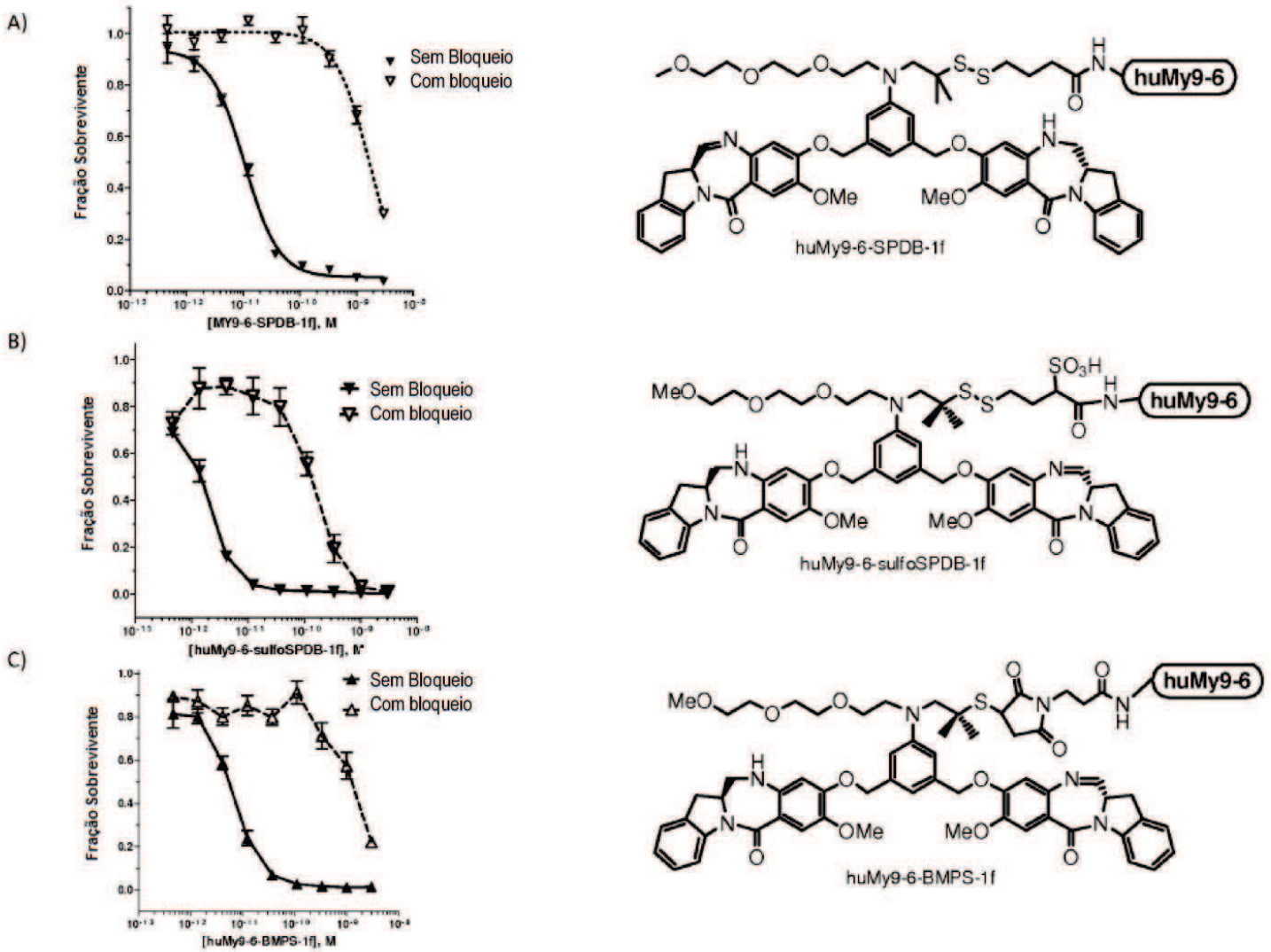


Figura 35. Atividade Antiproliferativa Comparando (A) chB38.1-SPDB-**1f** e (B) chB38.1-sulfoSPDB-**1f** contra células COL0205 (Ag^+)

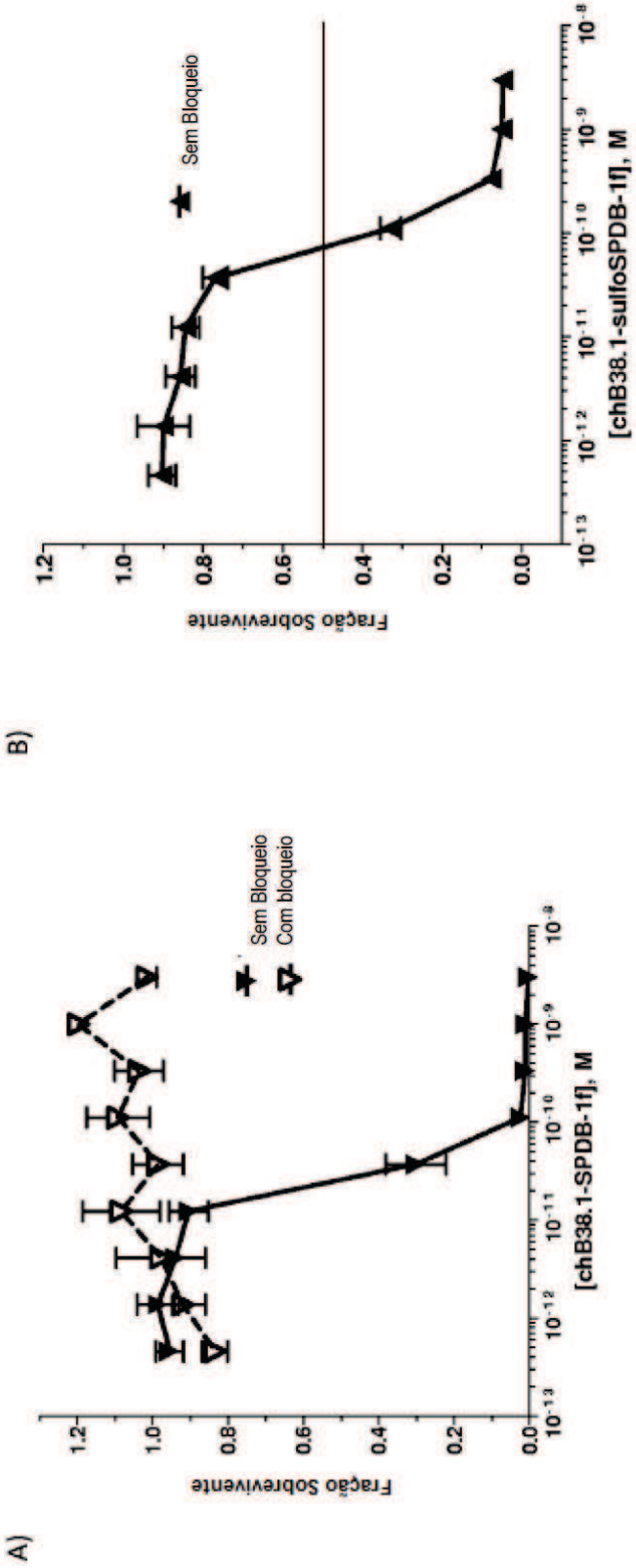


Figura 36. Eficácia *in vivo* de huMy9-6-SPDB-**1f** em Camundongos Contendo Tumores HL60/QC

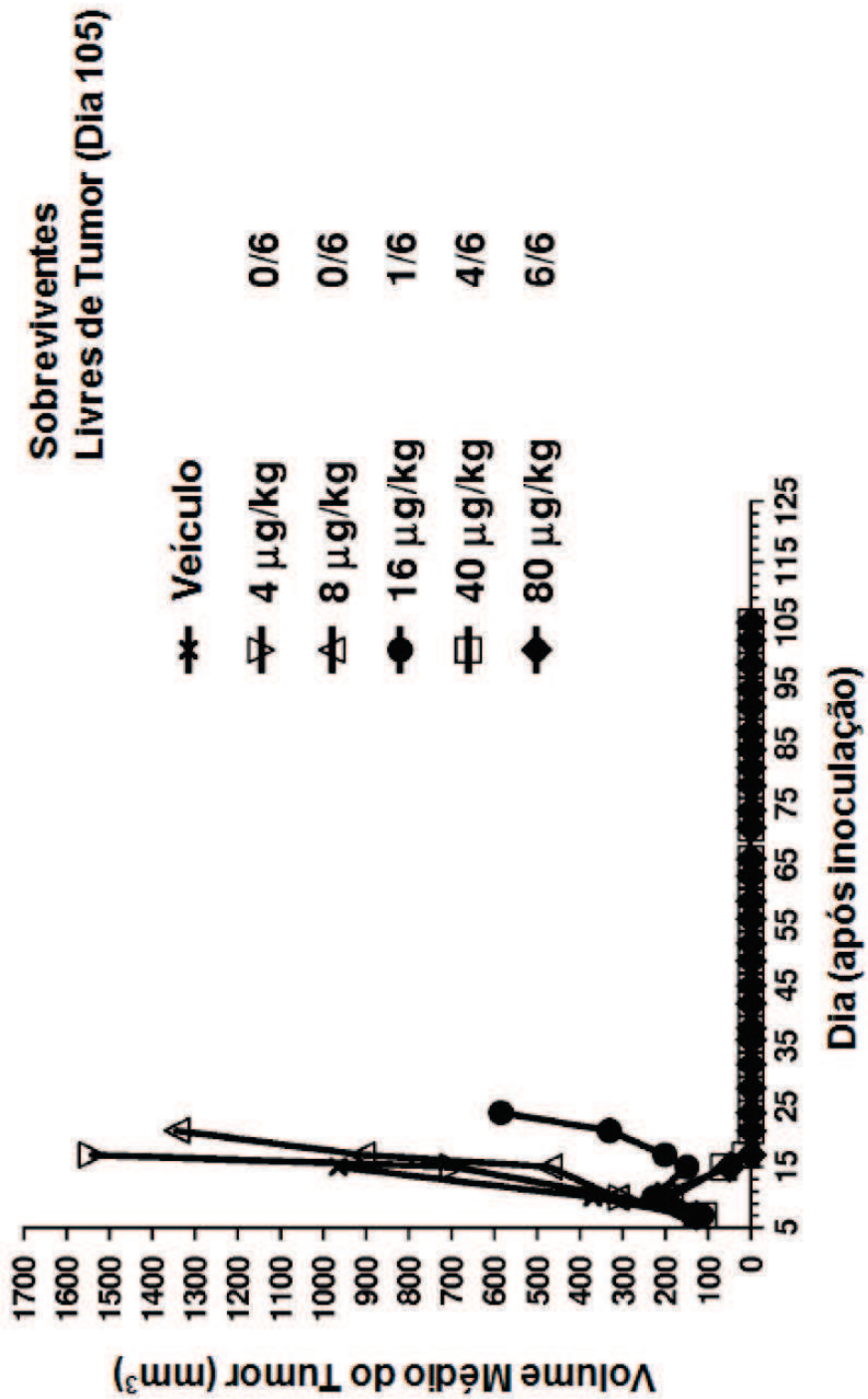


Figura 37. Eficácia *in vivo* de huFOLR1-SPDB-**1f** em camundongos contendo tumor KB.

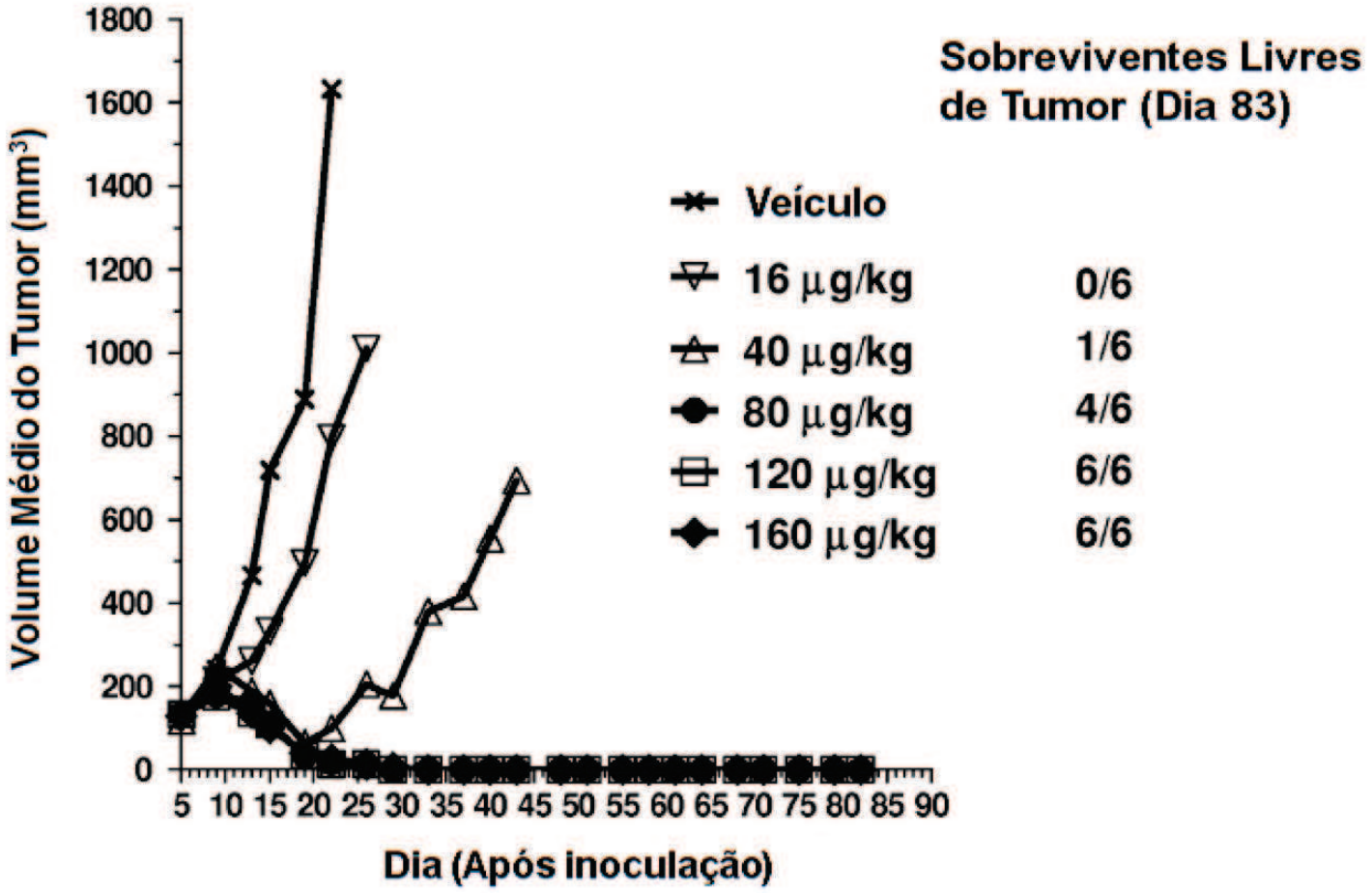


Figura 38. Esquema Sintético do Composto **1**

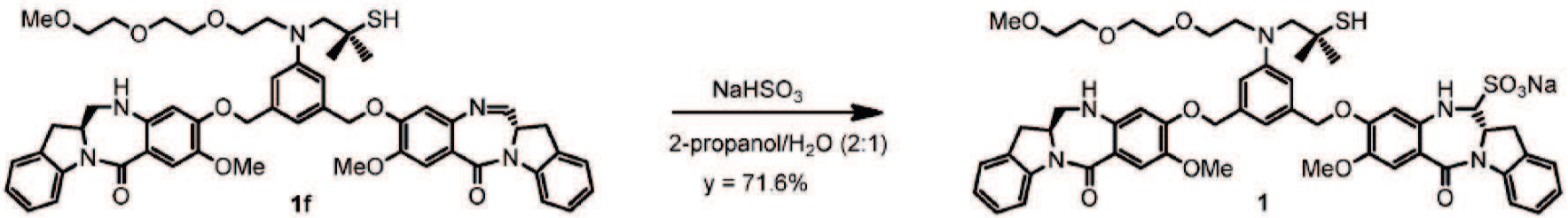


Figura 39. Esquema Sintético do Composto **1d** com 5-etil-2-metilpiridina borano (PEMB)

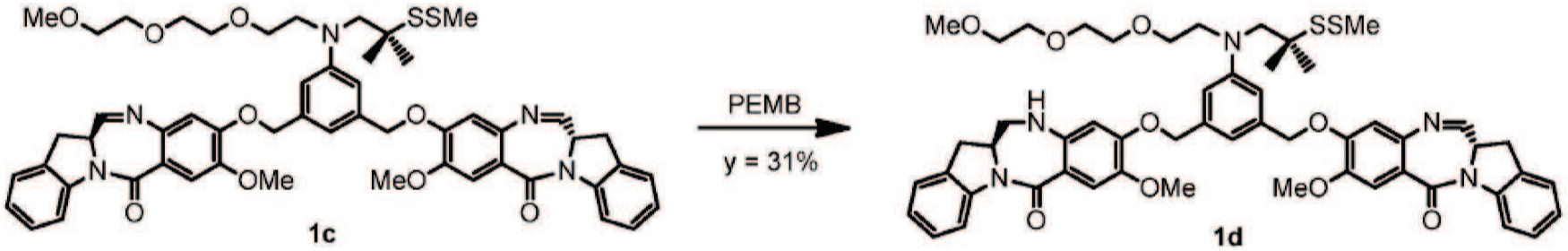


Figura 40. Esquema Sintético do Composto **1d** com triacetóxicoborohidreto de sódio (STAB)

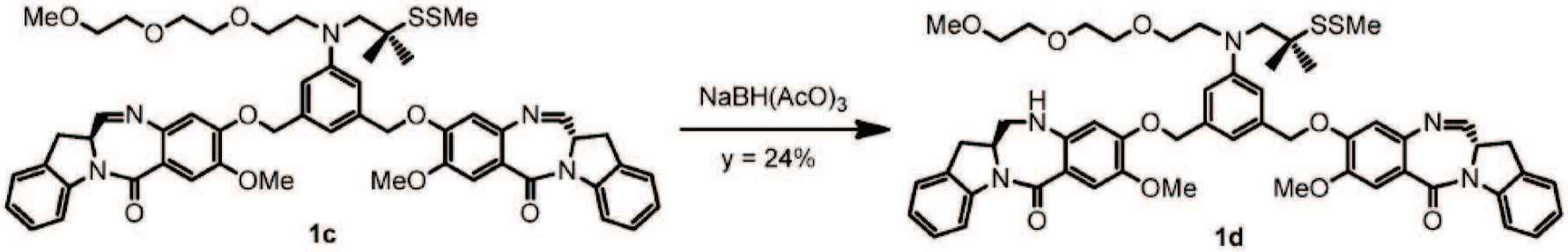


Figura 41. Esquema Sintético do Composto **31a-c.**

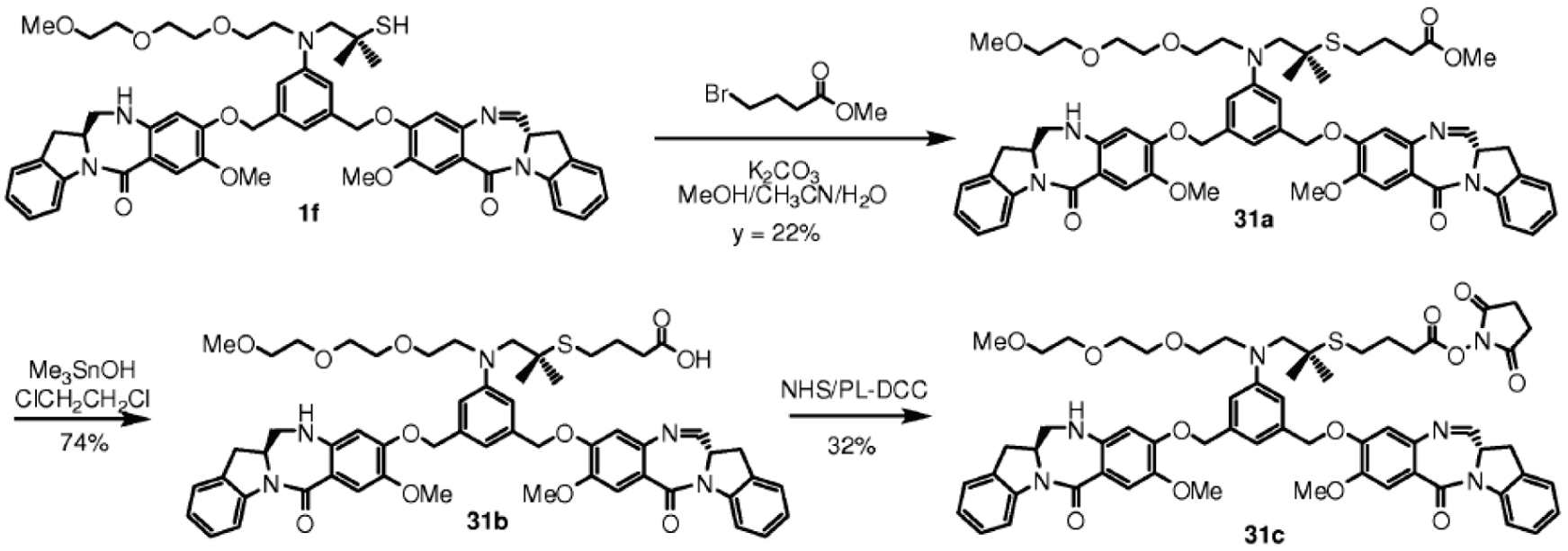
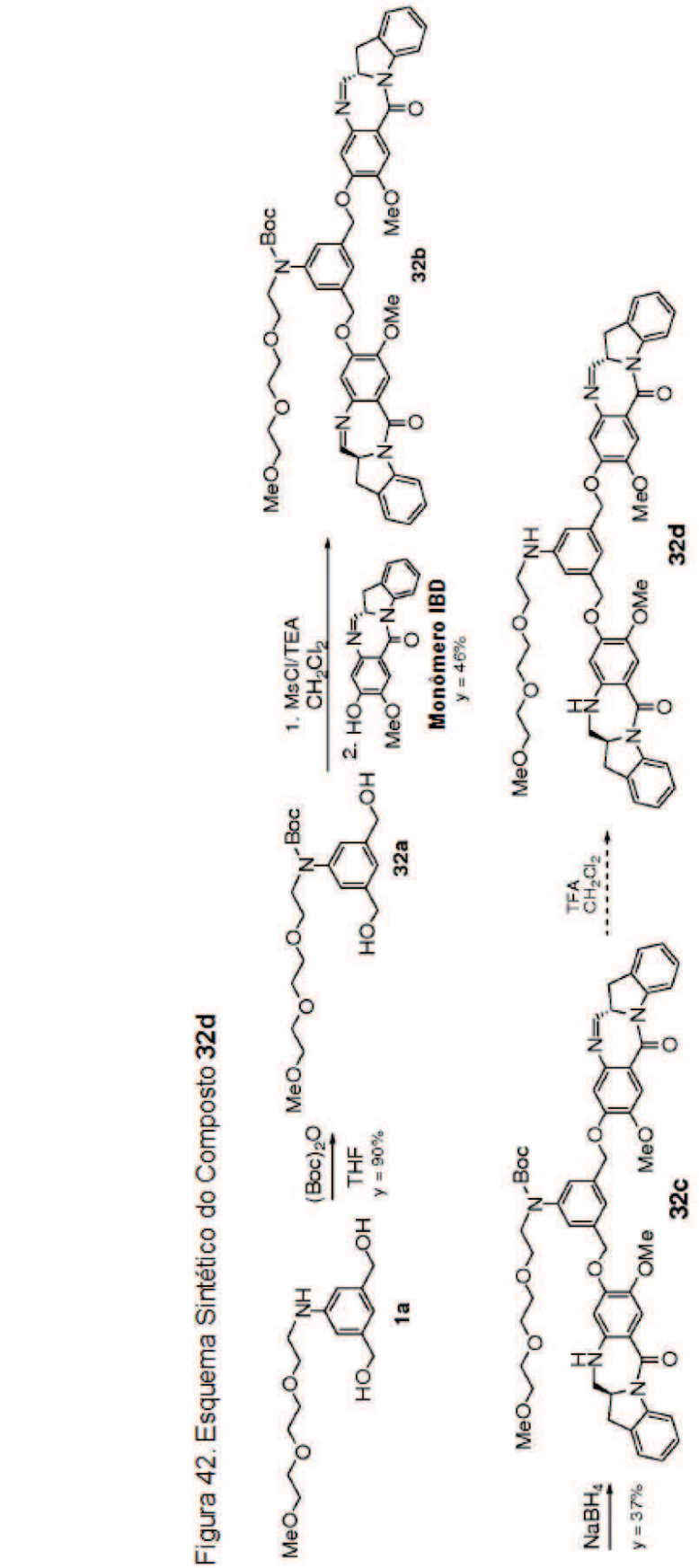


Figura 42. Esquema Sintético do Composto **32d**



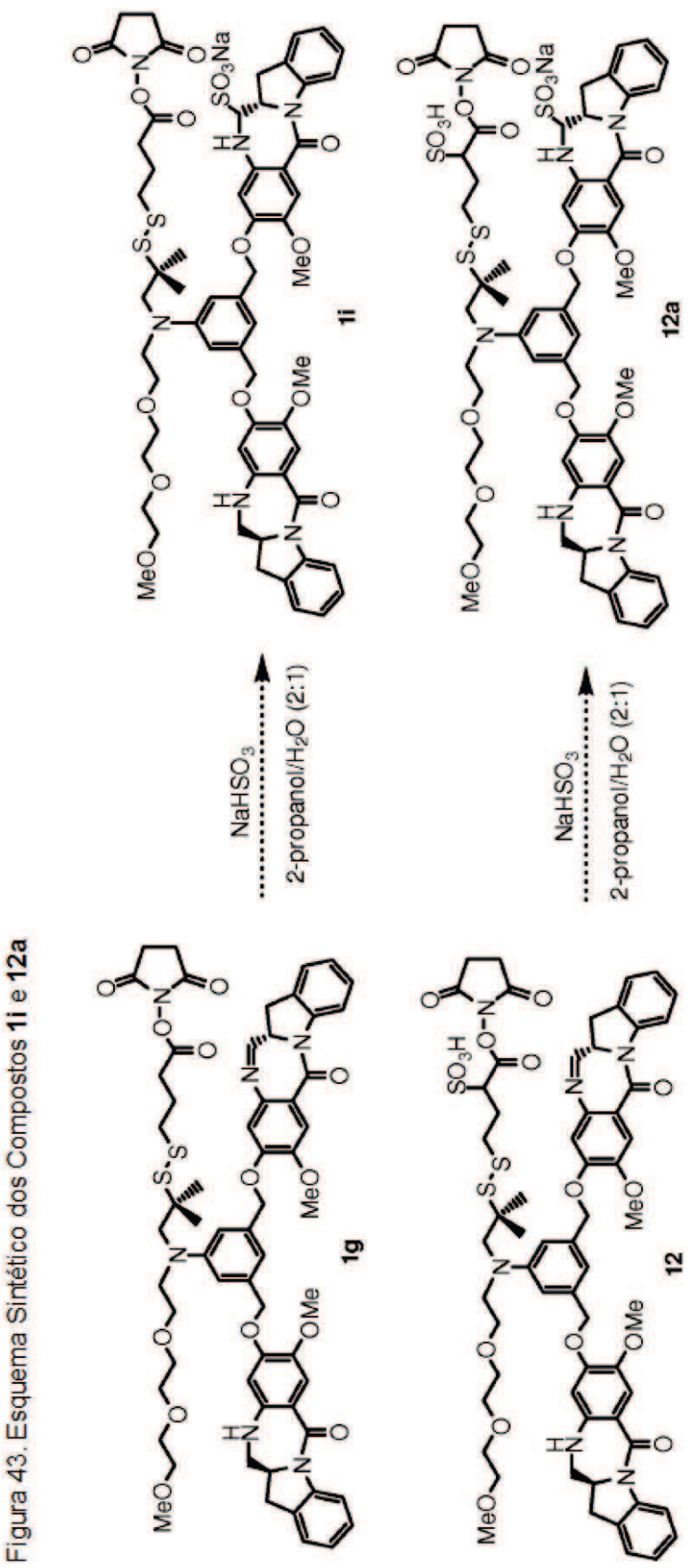
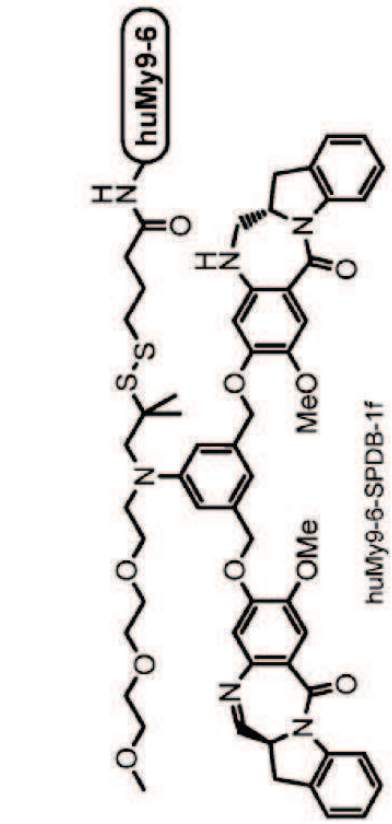
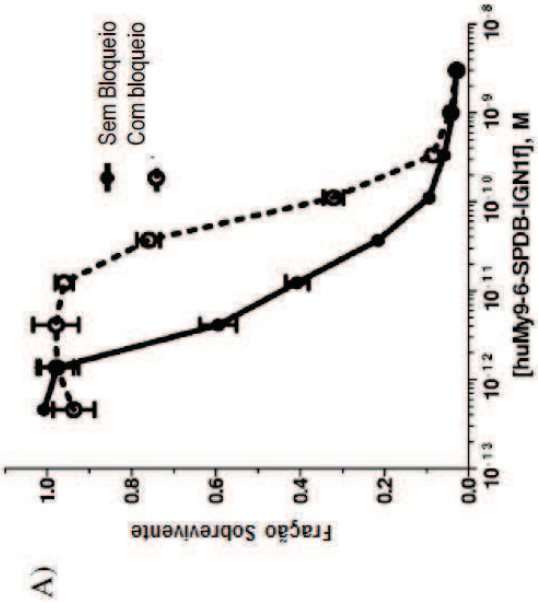
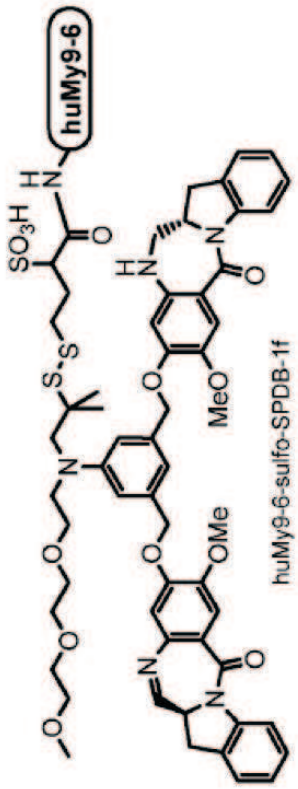


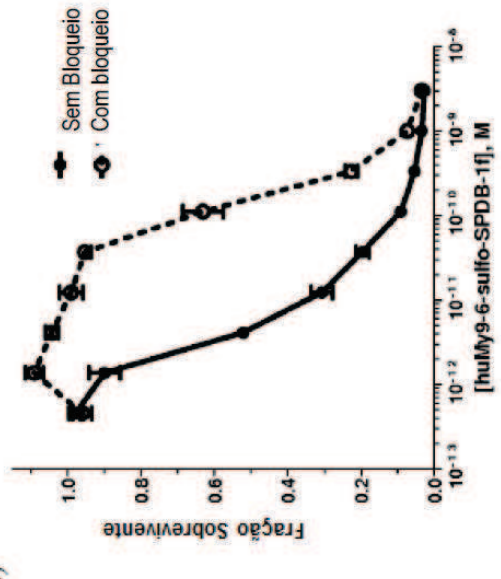
Figura 43. Esquema Sintético dos Compostos **1i** e **12a**

Figura 44. Atividade Antiproliferativa comparando (A) huMy9-6-SPDB-**1f**, (B) huMy9-6-sulfoSPDB-**1f**, e (C) huMy9-6-BMPS-**1f**, contra células OCI-AML3 (Ag+) com e sem bloqueio de sítios de ligação ao antígeno.

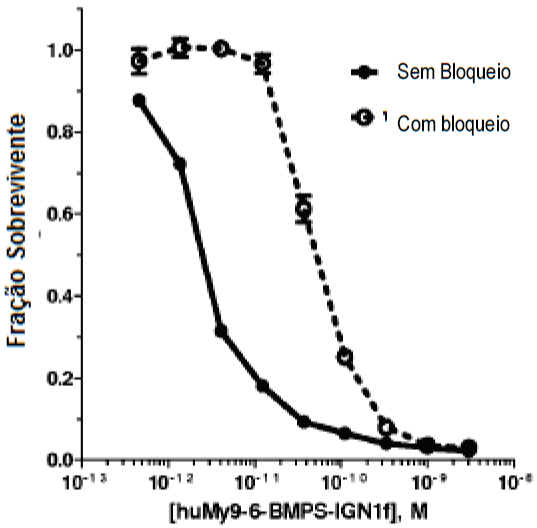








C)



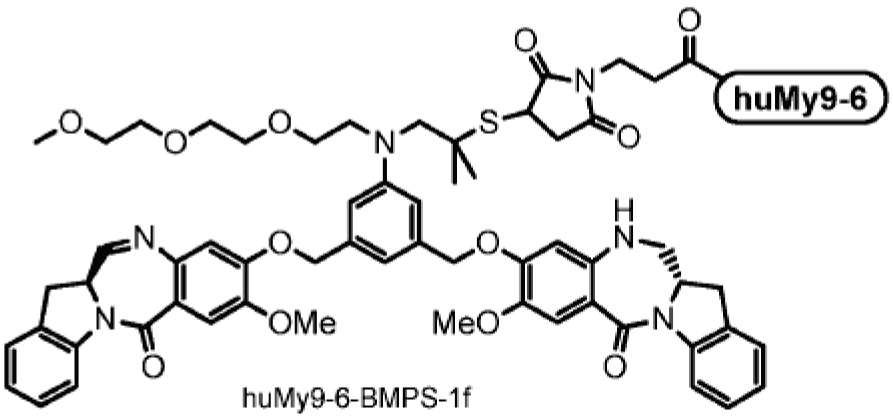


Figura 45. Esquema Alternativo para sintetizar ácido 4-(benziloxi)-5-metoxi-2-nitrobenzoico usado na preparação de monômero IBD

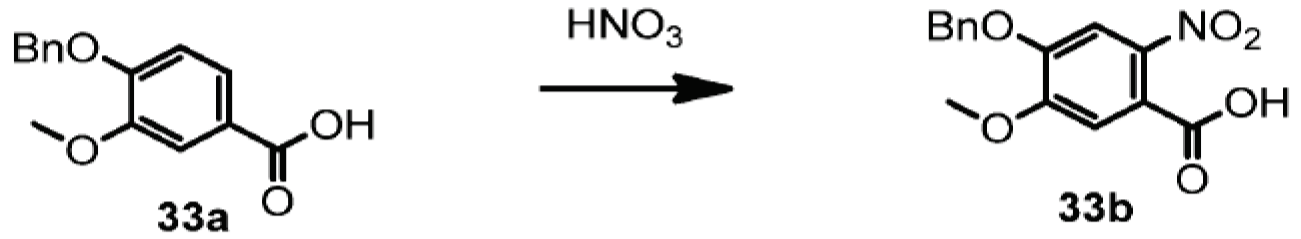


Figura 46. Esquema de Síntese Alternativa para (5-((2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etil)(2-metil-2-(metildisulfanyl)propil)amino)-1,3-fenilene)dimethanol (**1b**)

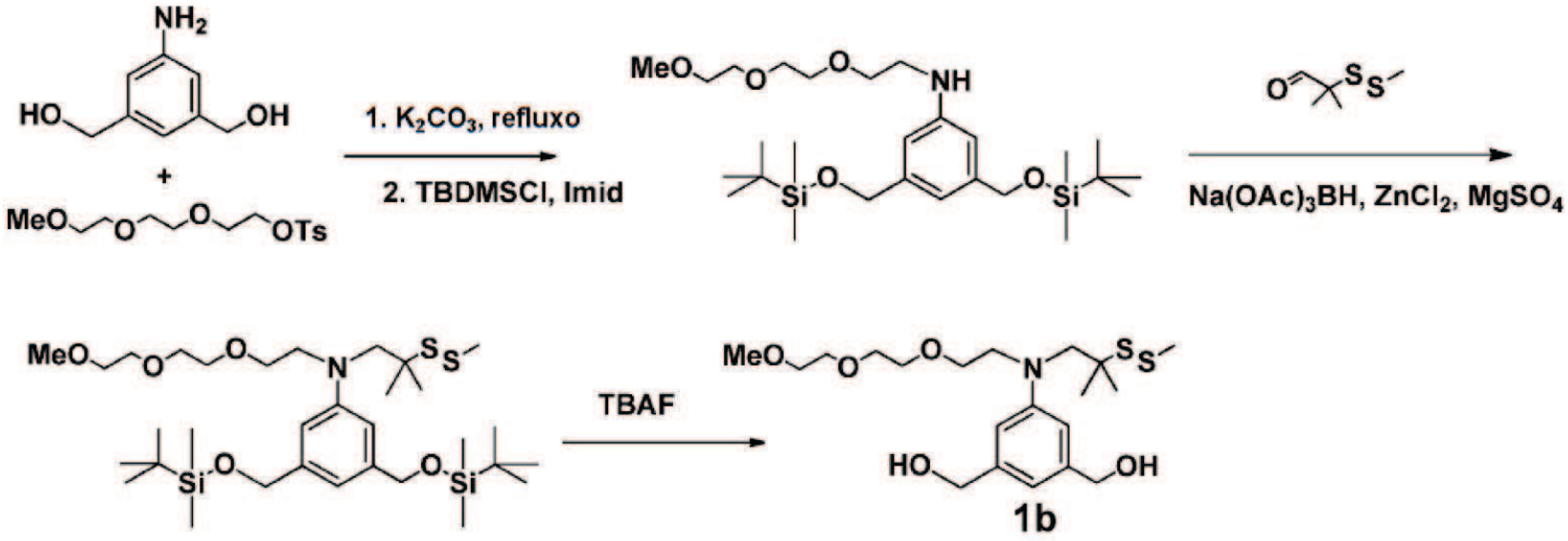


Figura 47. Síntese Alternativa para (5-((2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etil)(2-metil-2-(metildisulfanyl)propil)amino)-1,3-fenilene)dimethanol (**1b**)

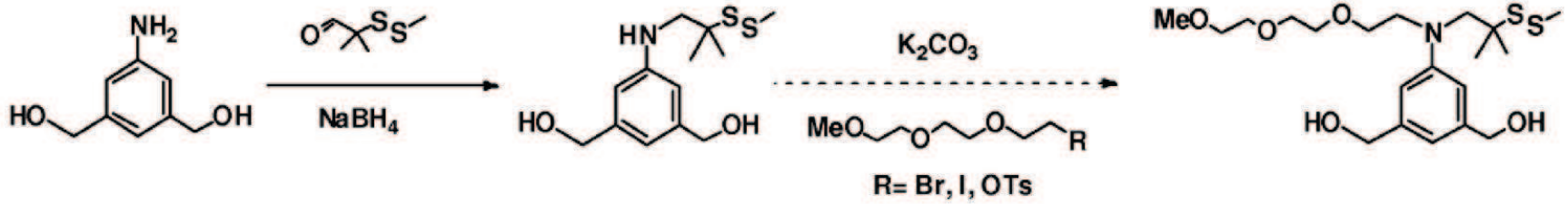


Figura 48. Esquema de Síntese Alternativa para uma Síntese de Dímero Mono-imina de Duas Etapas

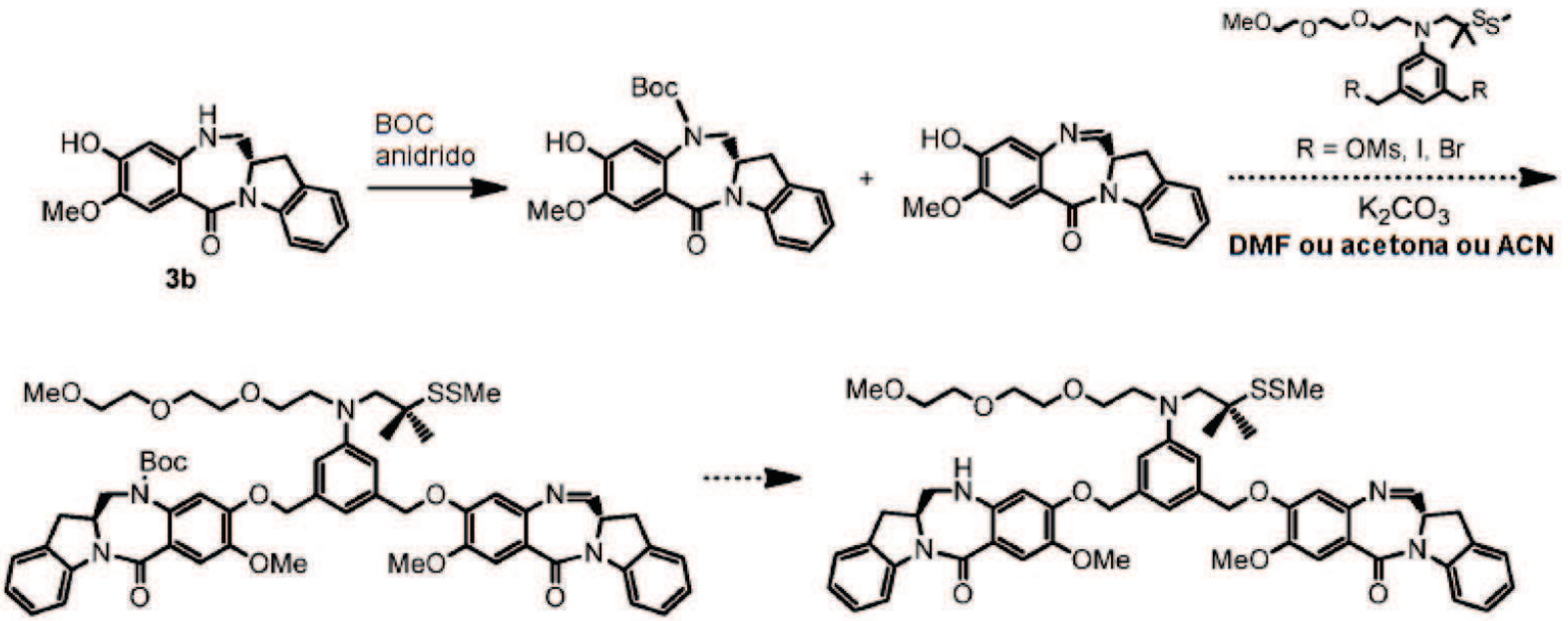


Figura 49. Potência de Conjugados contra Várias Linhagens Celulares Medidas por valores IC_{50} (nM)

conjugado	HL60/QC	MOLM-13	NB4	HEL92.1.7	OCI-AML3
huMy9-6-SPDB-1f	0.005	0.003	0.3	0.5	0.01
huMy9-6-sulfo-SPDB-1f	0.006	0.002	0.4	0.05	0.008
huMy9-6-BMPS-1f	0.003	0.001	0.04	0.04	0.003

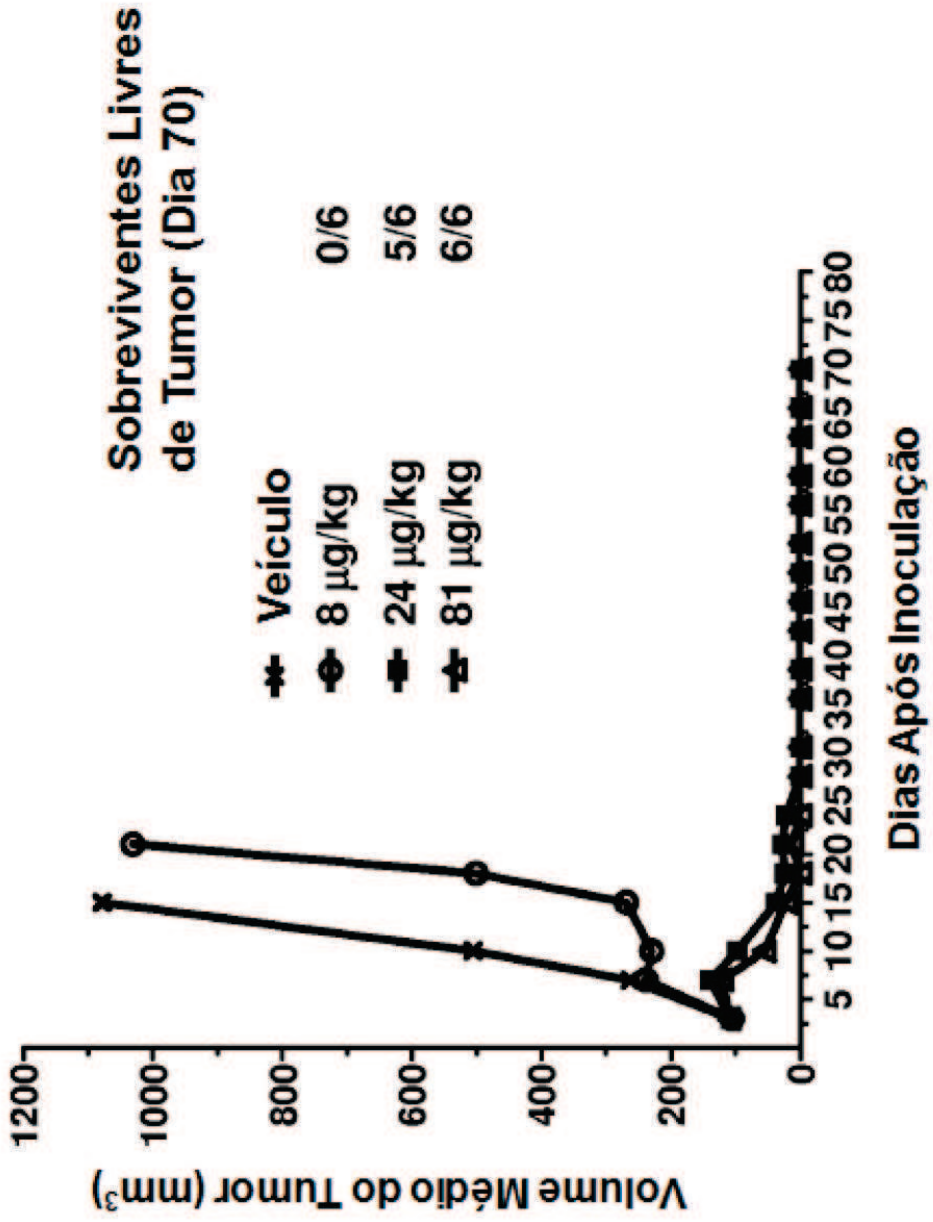
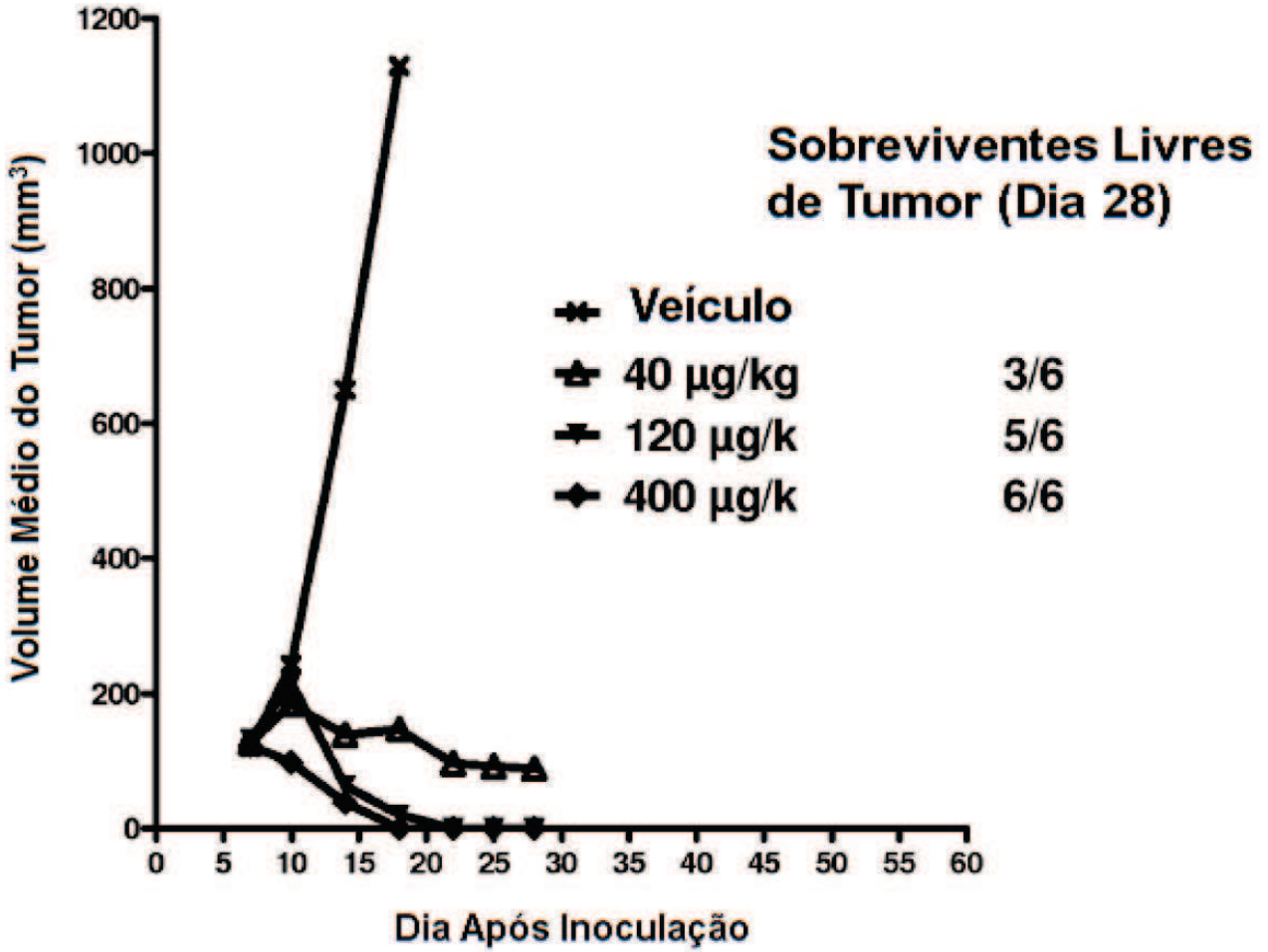


Figura 50. Eficácia *in vivo* de huMy9-6-sulfo-SPDB-**1f** em Camundongos Contendo Tumor MOLM-13

Figura 51. Eficácia *in vivo* de huMy9-6-sulfo-SPDB-**1f** em camundongos contendo tumor NB4



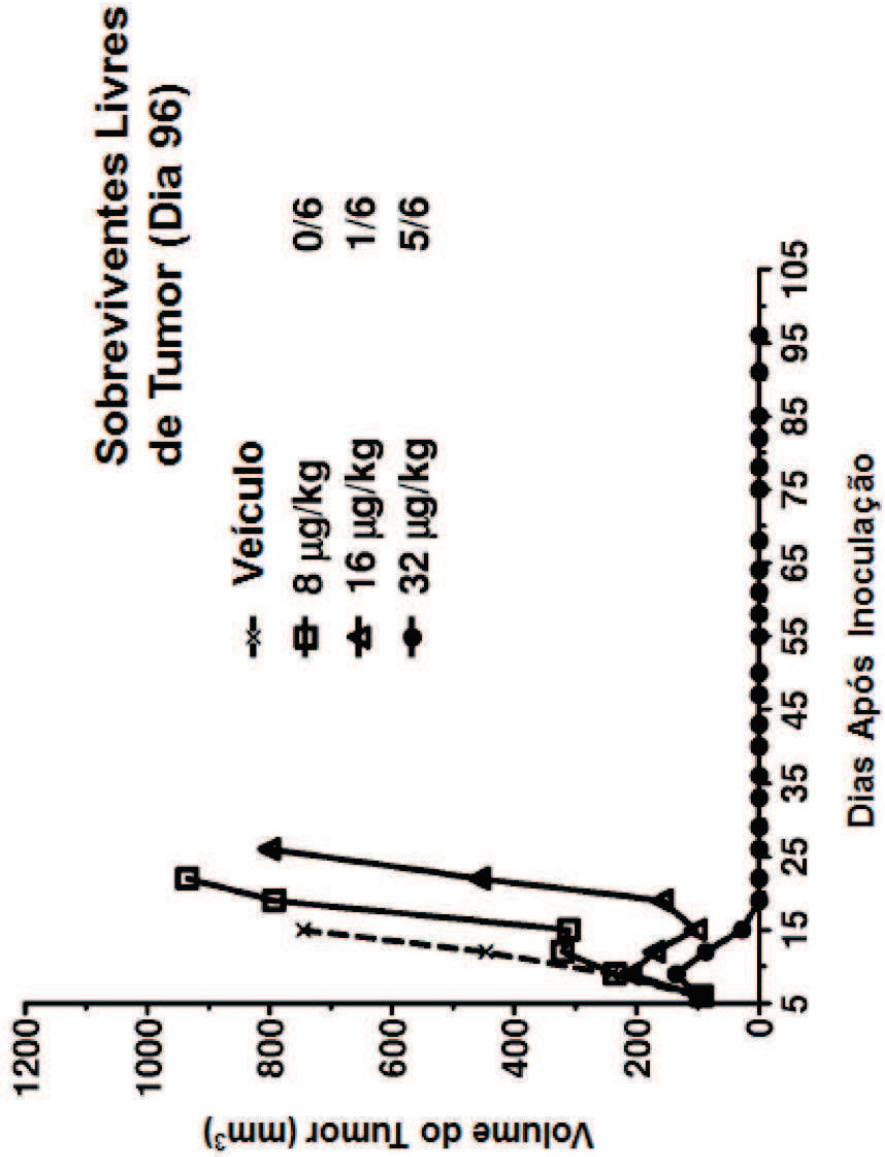


Figura 52. Eficácia *in vivo* de huMy9-6-BMPS-**1f** em camundongos contendo tumor HL60/QC

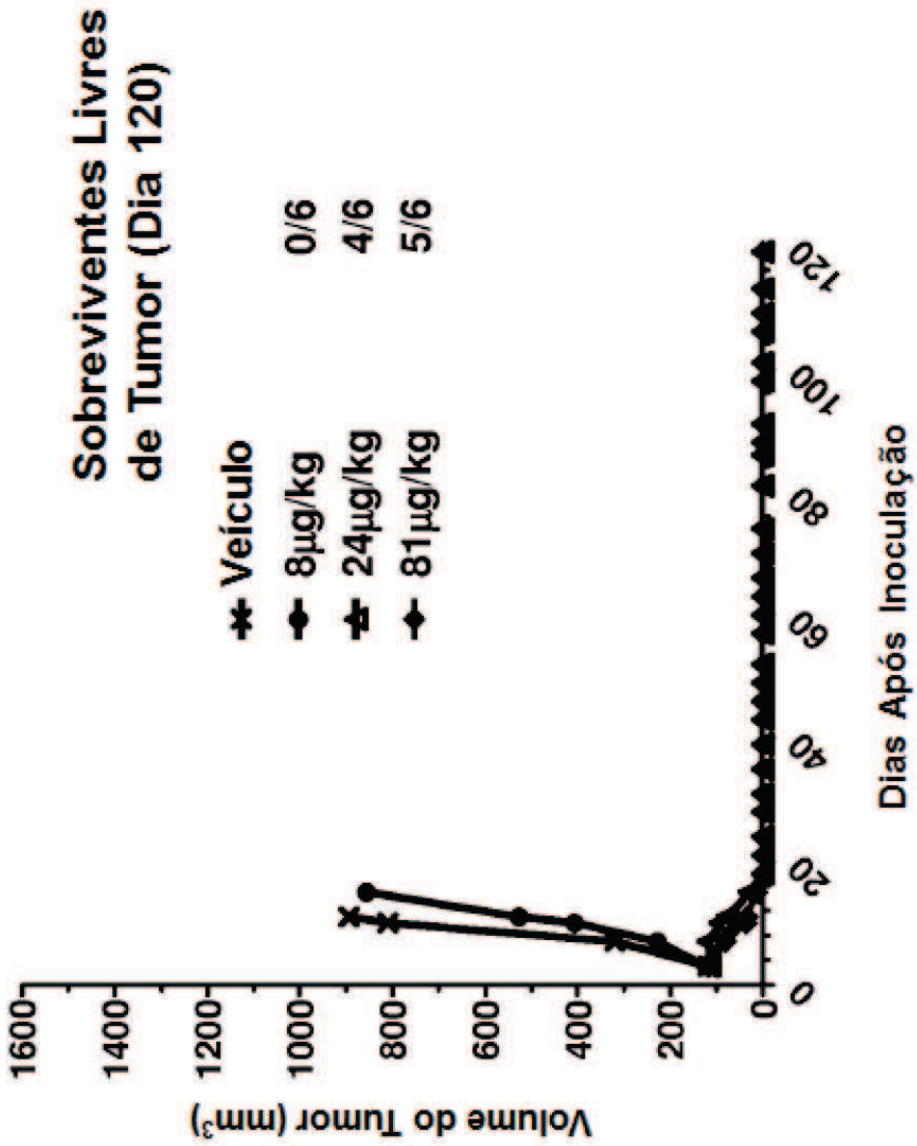
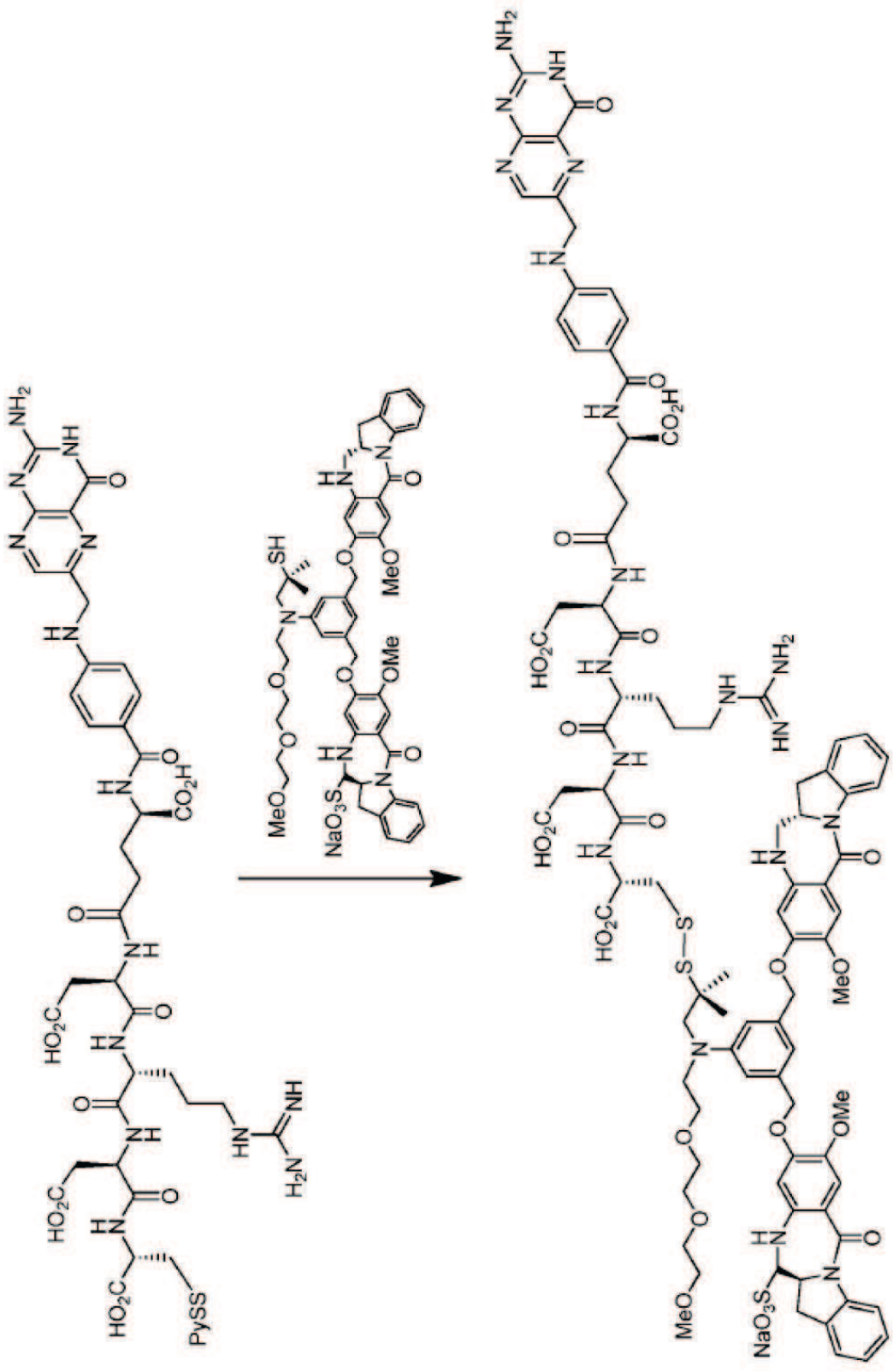


Figura 53. Eficácia *in vivo* de huMy9-6-BMPS-**1f** em camundongos contendo tumor MOLM-13

Figura 54. Esquema Representativo de Síntese para um Conjugado Folato Sulfonatado/Composto Citotóxico



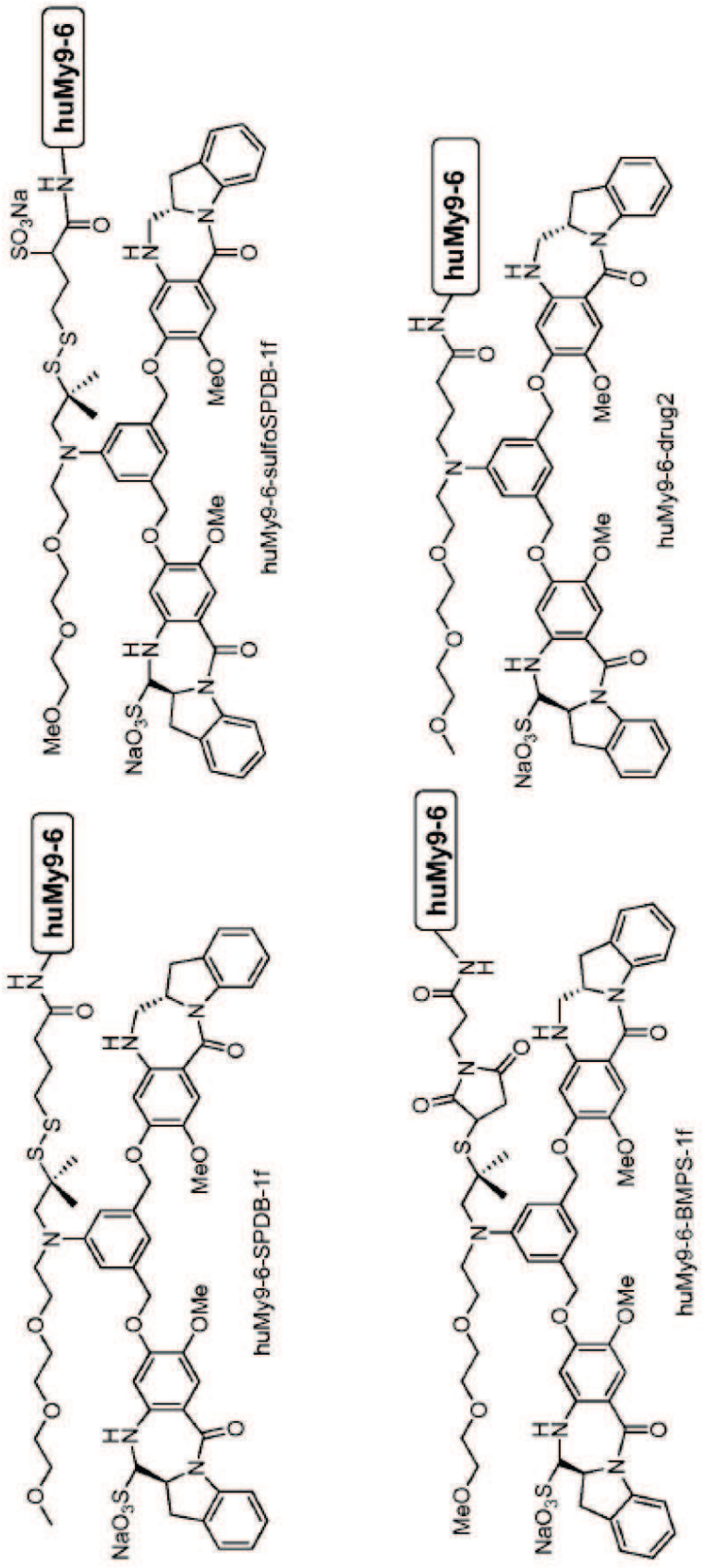


Figura 55. Estruturas de Diferentes Conjugados de Droga Sulfonada-Anticorpo (huMy9-6)

Figura 56. Eficácia *in vivo* de huMy9-6-droga2 em camundongos contendo tumor HL60/QC

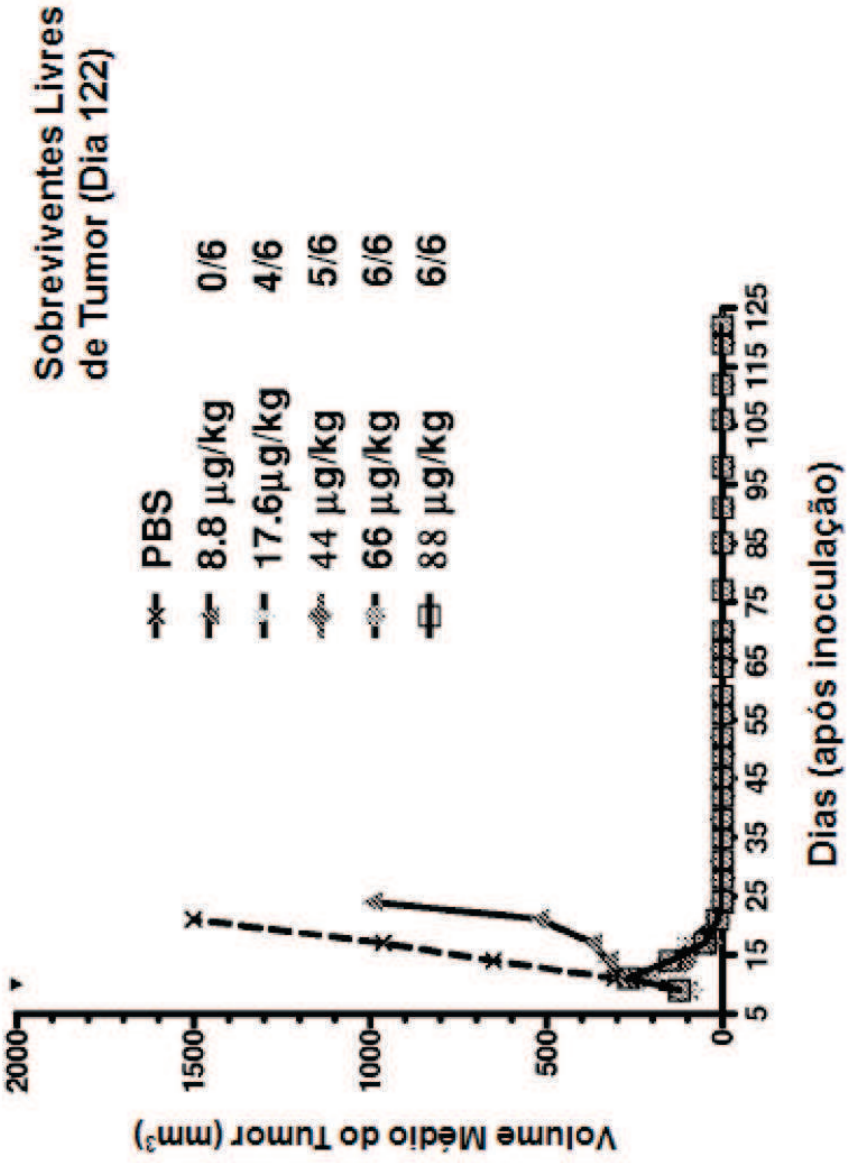


Figura 57. Eficácia *in vivo* de huMy9-6-droga2 em Camundongos Contendo Tumor MOLM-13

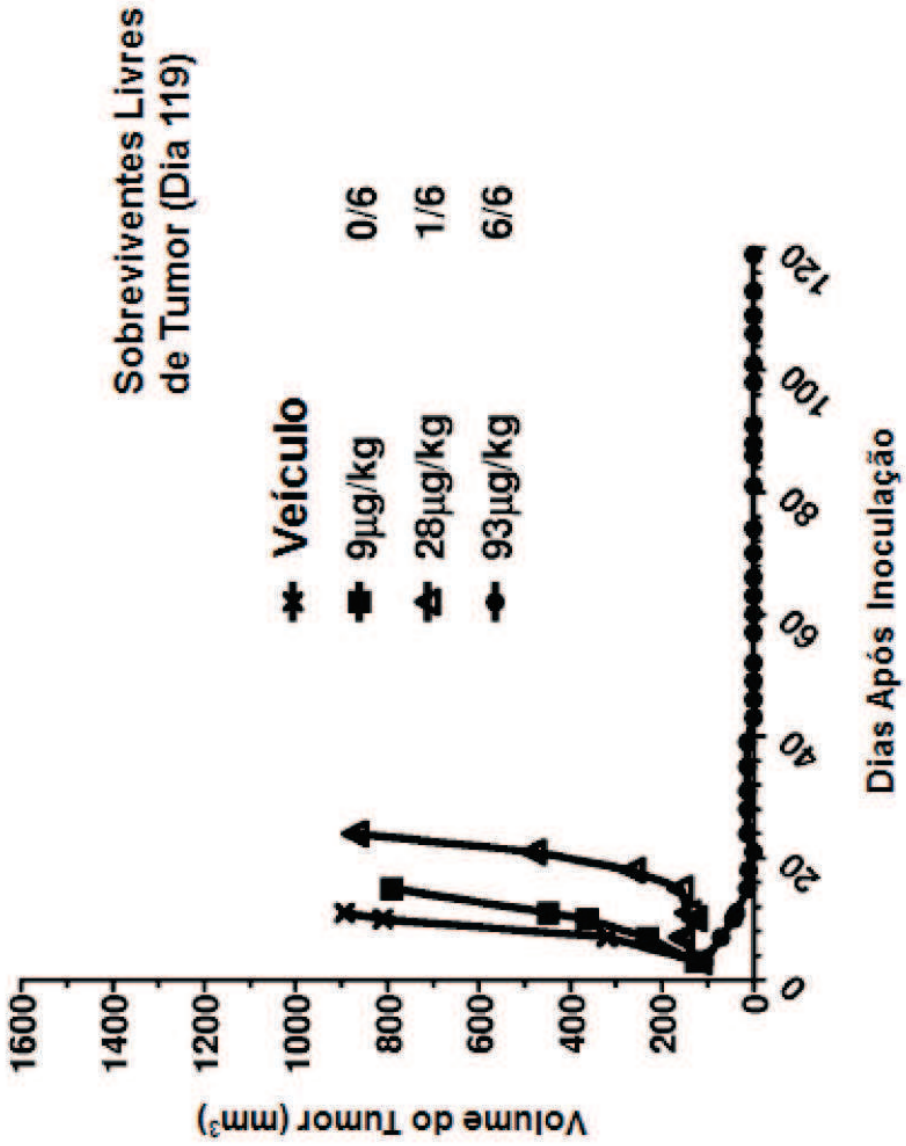
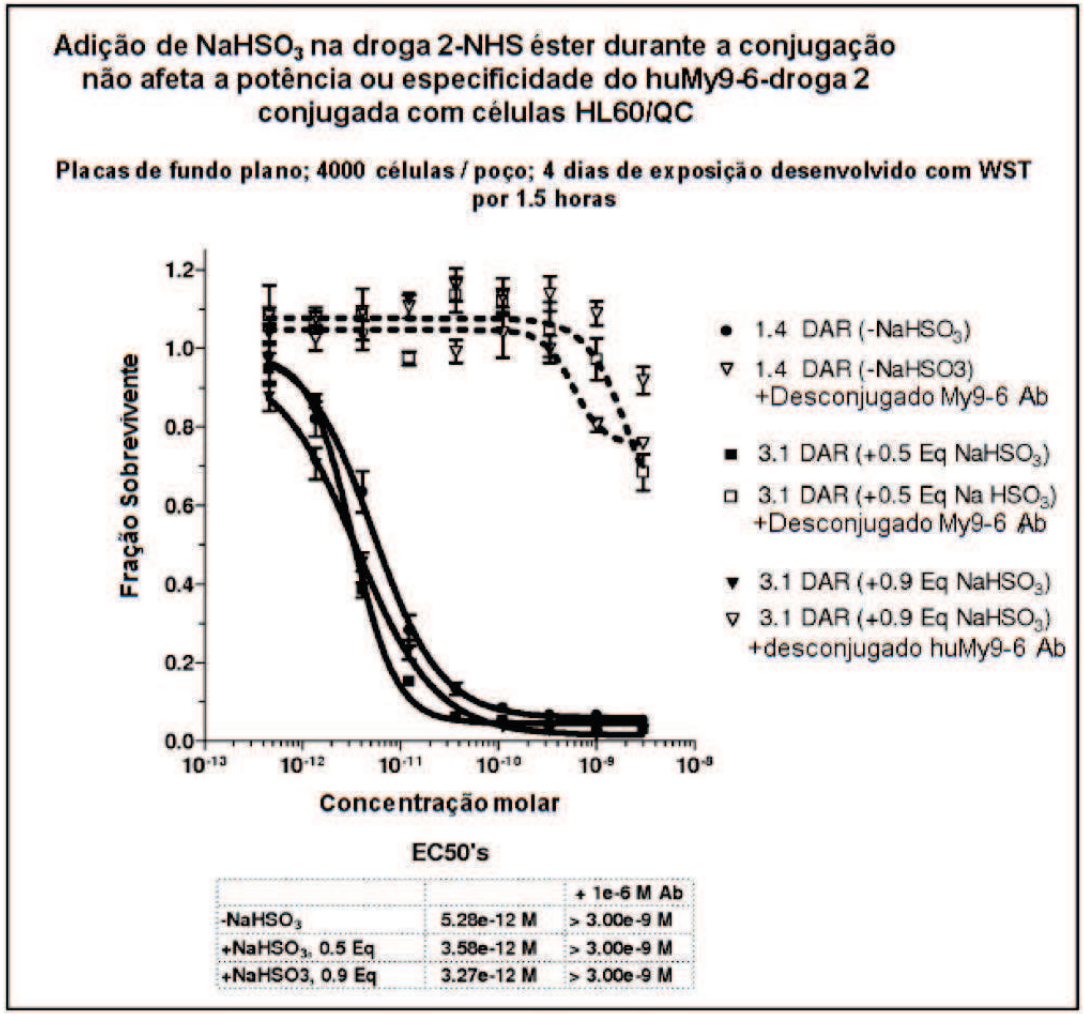


Figura 58.

Conjugados HuMy9-6-2 preparados sem e com bissulfito de sódio mostram citotoxicidade *in vitro* semelhante às células HL60 que expressam o antígeno CD33



		+ 1e-6 M Ab
-$NaHSO_3$	5.28e-12 M	> 3.00e-9 M
+$NaHSO_3$, 0.5 Eq	3.58e-12 M	> 3.00e-9 M
+NaHSO3, 0.9 Eq	3.27e-12 M	> 3.00e-9 M

Figura 59.

Anti-CD22 Ab-2 conjugados preparados sem e com bissulfito de sódio mostra citotoxicidade semelhante *in vitro* para células BJAB que expressam o antígeno CD22

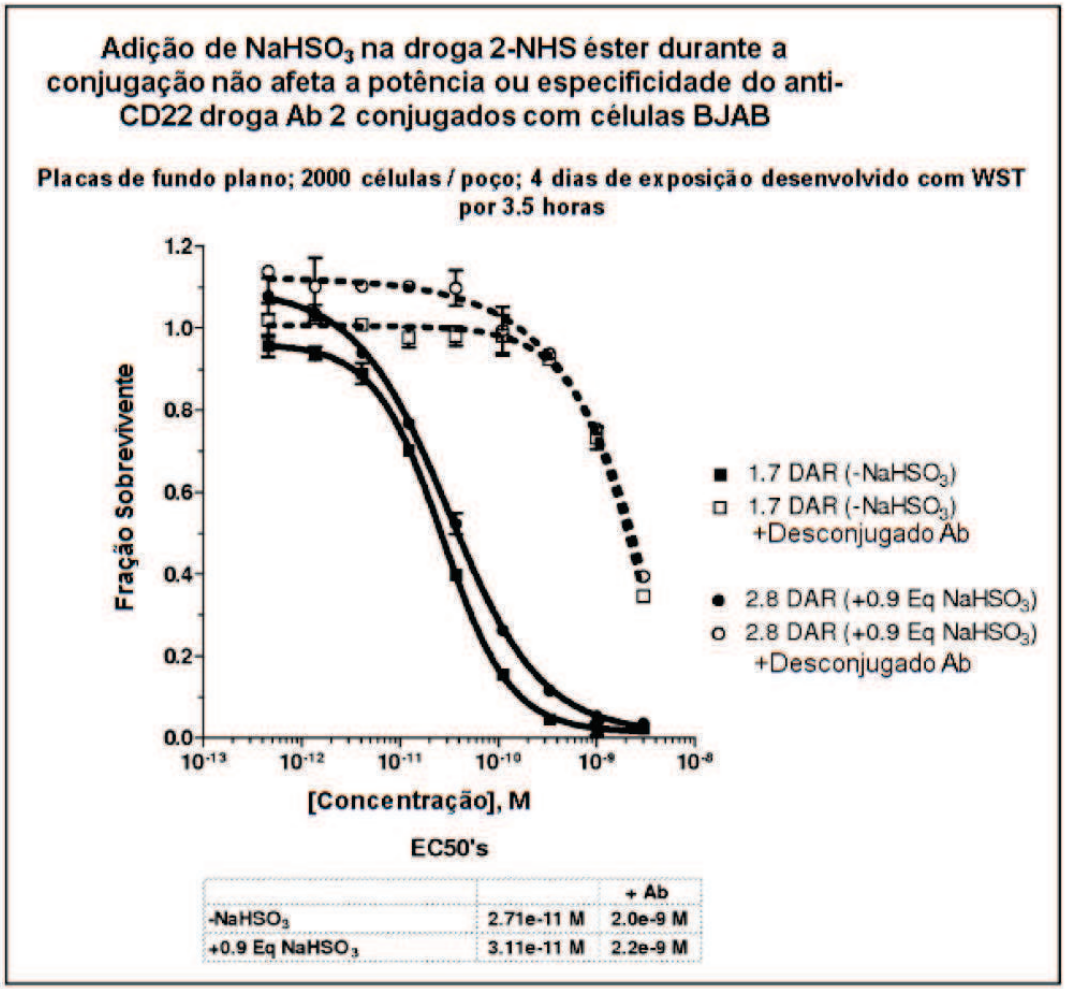


Figura 60.

