



* B R 1 1 2 0 1 5 0 2 2 5 8 5 B 1 *

República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112015022585-3 B1

(22) Data do Depósito: 14/03/2014

(45) Data de Concessão: 04/04/2023

(54) Título: COMPOSTO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, CONJUGADO DROGA-ANTICORPO, E, USO DOS MESMOS

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

(30) Prioridade Unionista: 15/03/2013 US 61/792,216.

(73) Titular(es): REGENERON PHARMACEUTICALS, INC..

(72) Inventor(es): THOMAS NITTOLI.

(86) Pedido PCT: PCT US2014029757 de 14/03/2014

(87) Publicação PCT: WO 2014/145090 de 18/09/2014

(85) Data do Início da Fase Nacional: 11/09/2015

(57) Resumo: COMPOSTO, USO DE UM COMPOSTO, E, CONJUGADO DROGA-ANTICORPO. A presente descrição refere-se a compostos ligadores que são úteis em ligar covalentemente moléculas biologicamente ativas com Ligandos. Os compostos descritos também se referem a moléculas biologicamente ativas e conjugados de Ligando, em que a molécula biologicamente ativa é ligada ao Ligando através de um ligador. A descrição provê adicionalmente composições compreendendo conjugados de molécula ligando biologicamente ativa, métodos para modificar o crescimento celular anormal e métodos para tratamento empregando os conjugados ou as composições.

“COMPOSTO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, CONJUGADO DROGA-ANTICORPO, E, USO DOS MESMOS”

CAMPO TÉCNICO

[001] A presente descrição provê Conjugados de Moléculas Biologicamente Ativas-Ligando, em que o Ligando é conectado à Molécula Biologicamente Ativa através de um composto ligador. A presente descrição também provê compostos conjugados em composições farmacêuticas, para uso em várias aplicações terapêuticas.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] As doenças proliferativas são caracterizadas por crescimento e espalhamento descontrolado de células anormais. Se o espalhamento não for controlado, pode resultar em morte. A proliferação anormal, por exemplo, câncer, é causada por tanto fatores externos (p.ex., tabaco, produtos químicos, radiação e organismos infecciosos) como fatores internos (mutações herdadas, condições do sistema imune, mutações que ocorrem pelo metabolismo). Estes fatores causais podem atuar juntos ou em sequência para iniciar ou promover proliferação anormal. O câncer é tratado por cirurgia, radiação, quimioterapia, hormônios e imunoterapia. Entretanto, há necessidade de drogas antiproliferação mais eficazes.

[003] A terapia antiproliferação ideal possibilitaria o suprimento direcionado de agentes altamente citotóxicos para células tumorais e deixaria as células normais inafetadas. O tratamento quimioterapêutico convencional, com maytansine, por exemplo, é limitado por causa dos efeitos colaterais tóxicos que surgem dos efeitos da droga nas células não-cancerosas. Várias abordagens para o suprimento de droga direcionada têm sido tentadas, incluindo o uso de conjugados de sondas direcionadas ao tumor (tais como anticorpos ou fatores de crescimento) com toxinas tais como pseudomonas ou toxinas de difteria, que detêm a síntese de proteínas e células. Entretanto, os efeitos colaterais incluem reação do sistema imune devido a componentes

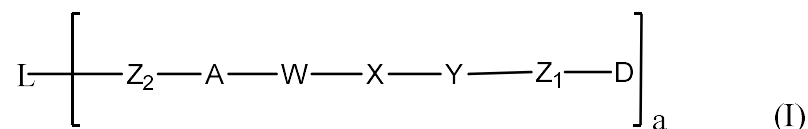
não-humanos dos conjugados. Além disso, a meia-vida dos conjugados de droga foi limitada devido à eliminação da circulação sanguínea através da filtração renal, e degradação esquemática, absorção pelo sistema reticuloendotelial (RES) e acumulação em órgãos e tecidos não direcionados.

[004] Outra abordagem utiliza portadores de droga passivos, tais como polímeros, lipossomos e micelas poliméricas para aproveitar a hiperpermeabilidade dos endotélios vasculares do tecido tumoral. Drogas poliméricas e macromoléculas acumulam-se dentro dos tumores sólidos devido a uma permeabilidade aumentada e mecanismo de retenção. Entretanto, barreiras de utilização de tais suprimentos direcionados incluem rápida depuração de partículas estranhas do sangue e impedimentos tecnológicos na obtenção de sistemas de suprimento de droga farmacologicamente aceitáveis e altamente padronizados, com a necessária especificidade e seletividade para ligar células tumorais.

[005] Assim, existe uma necessidade de compostos antiproliferativos direcionados.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[006] A presente descrição refere-se a compostos conjugados, representados pela seguinte fórmula estrutural (I):



em que:

L está ausente ou é um ligando;

além disso em que:

quando L é um ligando, L é capaz de ligar-se a uma célula ou população de células;

a é um inteiro de 1 a 10;

Z_2 e Z_1 estão, cada um independentemente, ausentes ou são um espaçador;

D é uma Molécula Biologicamente Ativa;

A é uma aminoácido natural ou não-natural, ou um peptídeo compreendendo 2 – 20 aminoácidos;

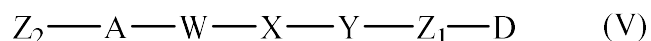
W está ausente, ou é -O-, -S-, -CR₅R₆-, -NR₄-;

ainda em que: R₄, R₅ e R₆ são cada um independentemente H, ou uma substituída ou insubstituída: alquila, alquenila, alquinila, arila, heteroarila, ou hetrociclila;

X está ausente, é arila, heteroarila, cicloalquila, hetrociclila, em que arila, hetroarila, cicloalquila e heterociclila são opcionalmente substituídos; e

Y está ausente, ou é um espaçador.

[007] A presente descrição também provê compostos biologicamente ativos-ligadores, representados pela seguinte fórmula estrutural (V);



em que:

Z₂ e Z₁ são, cada um independentemente, ausentes ou um espaçador;

D é uma Molécula Biologicamente Ativa;

A é um aminoácido natural ou não-natural, ou um peptídeo compreendendo 2-20 aminoácidos;

W está ausente, é -O-, -S-, -CR₅R₆-, -NR₄-;

ainda em que: R₄, R₅ e R₆ são, cada um independentemente, H, ou uma substituída ou não-substituída: alquila, alquenila, alquinila, arila, heteroarila ou heterociclila;

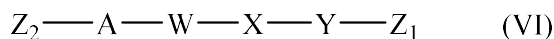
X está ausente, é arila, heteroarila, cicloalquila, heterociclila, em que arila, heteroarila, cicloalquila e heterociclila são opcionalmente substituídos; e

Y está ausente ou é um espaçador.

[008] A presente descrição também provê ligadores representados

pela seguinte fórmula estrutural (VI).

[009] Em uma modalidade, os compostos ligados são representados pela fórmula (VI):



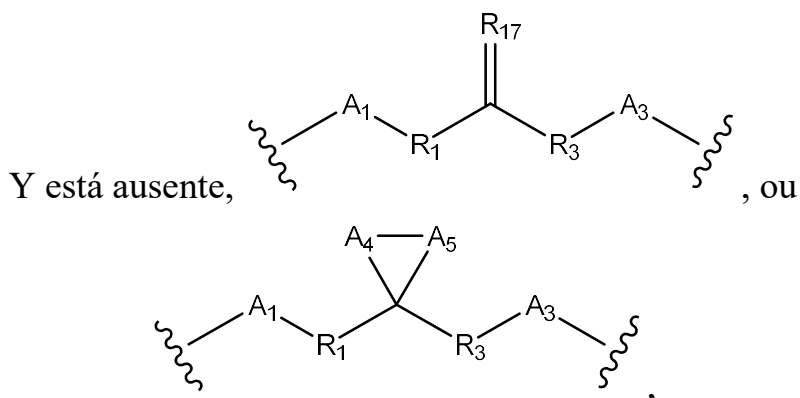
em que:

Z_2 e Z_1 são, cada um independentemente, ausentes ou um espaçador;

A é um aminoácido não natural ou um peptídeo compreendendo 2 – 20 aminoácidos;

W está ausente, é $-O-$, $-S-$, $-CR_5R_6-$, $-NR_4-$;

X está ausente, é arila, heteroarila, cicloalquila, heterociclila, em que arila, heteroarila, cicloalquila e heterociclila são opcionalmente substituídos;



em que A_1 , A_3 , R_1 e R_3 são, cada um independentemente ausente, um aminoácido, um peptídeo tendo 2 – 20 aminoácidos, uma alquila, uma alquinila, uma alquenila, uma cicloalquila, uma arila, uma heteroarila, uma heterociclila, $-CR_5R_6-$, $-O-$, $-C(=O)-$, $-O-C(=O)-$, $-C(=O)-O-$, $-O-C(=O)-O-$, $-C(=O)-(CH_x)_{p1}-$, $-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-$, $-(O-(CH_2)_{p2})_{p3}-$, $-((CH_2)_{p2}-O)_{p3}-$, $-C(=S)-$, $-C(=S)-S-$, $-S-C(=S)-$, $-C(=S)-NH-$, $-S-C(=S)-S-$, $-S-$, $-SO-$, $-SO_2-$, $-NR_4-$, $-N(R_4)-C(=O)-N(R_8)-$, $-N(R_4)-C(=O)O-$, $-N(R_4)-C(=O)-$, $-C(=O)-N(R_4)-$, $-C(=O)-N(R_4)-C(=O)-$, $-O-C(=O)-NR_4-$, em que alquila, alquinila, alquenila, cicloalquila, arila, heteroarila e heterociclila são opcionalmente substituídos;

A_4 e A_5 são, cada um independentemente, -O-, -S-, -NR₁₈-, -CR₅R₆-;

R₁₇ é selecionado do grupo consistindo de O, S, NR₁₈-, CR₅R₆;

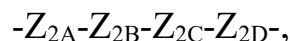
R₁₈ é selecionado do grupo consistindo de H, alquila, alquinila, alquenila, cicloalquila, arila, heteroarila, heterociclila e acila, em que alquila, alquinila, alquenila, cicloalquila, arila, heteroarila, heterociclila e acila são opcionalmente substituídas.

R₄, R₅, R⁶ são, cada um independentemente, H ou uma substituída ou insubstituída: alquila, alquinila, arila, heteroarila ou heterociclila;

p₁, p₂ e p₃ são, cada um independentemente, 0 ou um inteiro de 1 a 100; e

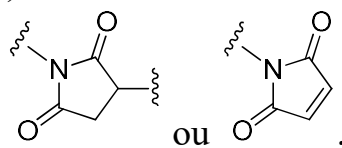
x é 0, 1 ou 2.

[0010] Em um aspecto, a descrição provê compostos de fórmula (VI), em que Z₂ é representado pela seguinte fórmula estrutural:



em que:

Z_{2A}, Z_{2B}, Z_{2C} e Z_{2D} são, cada um independentemente ausente, um aminoácido, um peptídeo tendo 2-20 aminoácidos, uma alquila, uma alquinila, uma alquenila, uma cicloalquila, uma arila, uma heteroarila, uma heterociclila, -CR₅R₆-, -O-, -C(=O)-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -O-C(=O)-O-, -C(=O)-(CH_x)_{p1}-, -C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-, -(CH_x)_{p1}-C(=O)-, -(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-, -(O-(CH₂)_{p2})_{p3}-, -((CH₂)_{p2}-O-)_{p3}-, -C(=S)-, -C(=S)-S-, -C(=S)-NH-, -S-C(=S)-, -S-C(=S)-S-, -S-, -SO-, -SO₂-, -NR₄-, -N(R₄)-C(=O)-N(R₈)-, -N(R₄)-C(=O)O-, -N(R₄)-C(=O)-, -C(=O)-N(R₄)-, -C(=O)-N(R₄)-C(=O)-, -O-C(=O)-N(R₄), -O-C(=S)-N(R₄)-, -C(=S)-N(R₄)-, -N=C=S, -N=C=O,



em que alquila, alquinila, alquenila, cicloalquila, arila, heteroarila e heterociclila são opcionalmente substituídas e R₄, R₅, R₆ e R₈ são cada um independentemente H, ou uma substituída ou insubstituída: alquila, alquenila, alquinila, arila, heteroarila ou heterociclila.

[0011] A presente descrição também se refere a composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto de fórmula (I) ou um sal do mesmo farmacêuticamente aceitável e um ou mais portadores, diluentes ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

[0012] A presente descrição também provê um método de reduzir, retardar ou parar um crescimento de célula anormal, compreendendo contatar a célula anormal com um composto de Fórmula (I), em uma quantidade suficiente para retardar, reduzir ou parar o crescimento de célula anormal e em que o crescimento de célula anormal é retardado, reduzido ou parado.

[0013] A presente descrição também provê um método de matar uma célula, compreendendo contatar a célula com um composto de fórmula (I), em uma quantidade suficiente para matar a célula, e em que a célula é morta.

[0014] A presente descrição também provê um método para tratamento de uma desordem médica em um indivíduo sofrendo do distúrbio médico, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo um composto de fórmula (I).

[0015] A presente descrição também provê um método de reduzir o tamanho do tumor, parar o aumento do tamanho do tumor, reduzir a proliferação do tumor ou evitar proliferação o tumor em um indivíduo em necessidade, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma composição para reduzir o tamanho do tumor, parar o aumento do tamanho do tumor, reduzir a proliferação do tumor ou evitar a proliferação do tumor, em que a composição compreende um composto de fórmula (I).

[0016] A presente descrição também se refere a compostos

precursores de Molécula Biologicamente Ativa-ligador, como representados pela fórmula (V). Os compostos de fórmula (V) proveem blocos de construção para compostos conjugados de fórmula (I). Além disso, os compostos de fórmula (V) podem ser providos como composições, composições farmacêuticas e seus sais farmacêuticamente aceitáveis.

[0017] A presente descrição inclui ainda o uso de qualquer uma das composições compreendendo compostos de fórmula (I) e/ou formulações farmacêuticas na manufatura de um medicamento para o tratamento, prevenção e/ou melhoria de um distúrbio médico.

[0018] A presente descrição inclui ainda o uso de qualquer uma das composições compreendendo compostos de fórmula (I) e/ou formulações farmacêuticas na manufatura de um medicamento para o tratamento, prevenção e/ou melhoria de um tumor.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0019] As Figuras 1 – 8 representam os resultados dos ensaios de viabilidade celular, em que várias linhas de célula de câncer foram cultivadas *in vitro* e tratadas com diluições seriais de anticorpos, conjugados livres de droga ou droga-anticorpo, como mostrado. A viabilidade percentual foi determinada de acordo com os métodos expostos no Exemplo 14.

[0020] **A Figura 1A** mostra os resultados de viabilidade de célula das células C4-2 (linhagem de células de câncer da próstata) tratadas com o composto 2, conjugado de anticorpo de controle de isótipo para composto 3 (“Controle-Isótipo-3”, anticorpo anti-PSMA conjugado com composto 3 (“PSMA-3”) e anticorpo anti-PSMA não-conjugado (“PSMA”).

[0021] **A Figura 1B** mostra resultados de viabilidade celular das células C4-2 (linhagem de células de câncer da próstata) tratadas com o composto 6, anticorpo de controle de isótipo conjugado com o composto 7 (“Controle de Isótipo-7”), anticorpo anti-PSMA conjugado com composto 7 (“PSMA-7”) e anticorpo anti-PSMA não-conjugado (“PSMA”).

[0022] **A Figura C** mostra os resultados da viabilidade celular das células C4-2 (linhagem de células de câncer da próstata) tratadas com o composto 25, anticorpo de controle de isótipo conjugado com o composto 21 (“Controle de Isótipo-21”), anticorpo anti-PSMA conjugado com o composto 21 (“PSMA-21”) e anticorpo anti-PSMA não-conjugado (“PSMA”).

[0023] **A Figura 2** mostra os resultados da viabilidade celular das células PC3/hSTEAP1 (linhagem de célula de câncer da próstata expressando hSTEAP1) tratadas com o composto 6, anticorpo de controle de isótipo conjugado com o composto 7 (“Controle de Isótipo-7”), anticorpo anti-STEAP1 conjugado com o composto 7 (“STEAP1-7”) e anticorpo anti-STEAP1 não conjugado (“STEAP1”).

[0024] **A Figura 3** mostra os resultados da viabilidade celular das células T47D (linhagem de célula de câncer de mama) tratadas com o composto 6, anticorpo de controle de isótipo conjugado com o composto 7 (“Controle de Isótipo-7”), anticorpo anti-PRLR conjugado com o composto 7 (“PRLR-7”) e anticorpo anti-PRLR não-conjugado (“PRLR”).

[0025] **A Figura 4** mostra os resultados da viabilidade celular das células HEK293/hEGFRvIII (células HEK293 expressando hEGFRvIII exógeno), tratadas com o composto 6, anticorpo de controle de isótipo conjugado com composto 7 (“Controle de Isótipo-7”), anticorpo anti-EGFRvIII conjugado com composto 7 (“EGFRvIII-7”) e anticorpo anti-EGFRvIII não conjugado (“EGFRvIII”).

[0026] **A Figura 5** mostra os resultados da viabilidade celular das células MMT/hEGFRvIII (células MMT expressando hEGFRvIII exógeno) tratadas com o composto 6, anticorpo de controle de isótipo conjugado com composto 7 (“Controle de Isótipo-7”), anticorpo anti-EGFRvIII conjugado com composto 7 (“EGFRvIII-7”) e anticorpo anti-EGFRvIII não-conjugado (“EGFRvIII”).

[0027] **A Figura 6** mostra os resultados da viabilidade celular de

células U251/hEGFRvIII (células U251 expressando hEGFRvIII exógena) tratadas com composto 6, anticorpo de controle de isótipo conjugado com composto 7 (“Controle de Isótipo-7”), anticorpo anti-EGFRvIII conjugado com composto 7 (“EGFRvIII-7”) e anticorpo anti-EGFRvIII não-conjugado (“EGFRvIII”).

[0028] **A Figura 7**, painéis A e B, mostra os resultados da viabilidade celular de células HEK293 e U87MG, respectivamente, tratadas com os compostos 6, 27, 29 e 31 (todos não-conjugados).

[0029] A Figura 8, painéis A – E, mostra os resultados da viabilidade celular das células HEK293, U251, C4-2, PC3 E MMT, respectivamente, tratadas com os compostos 6, 9, 33 e 35 (todos não-conjugados).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0030] As referências a certas modalidades feitas na seguinte descrição são consideradas somente ilustrativas dos princípios da descrição. Além disso, uma vez que numerosas modificações e mudanças serão prontamente evidentes para aqueles hábeis na arte, não se pretende limitar a descrição e processo mostrados como descrito aqui. Portanto, todas as modificações e equivalentes adequados podem ser recorridos como situando-se dentro do escopo da descrição e como definidos pelas reivindicações que seguem.

[0031] As palavras “compreendem”, “compreendendo”, “incluem” e “incluindo”, quando usadas neste relatório e nas seguintes reivindicações, são destinadas a especificar a presença dos detalhes, inteiros, componentes ou etapas citadas, porém não impedem a presença ou adição de um ou mais detalhes, inteiros, componentes ou etapas adicionais deles.

[0032] Os termos gerais, usados em qualquer uma das modalidades aqui, podem ser definidos como segue; entretanto, o significado citado não deve ser interpretado como limitando o escopo do termo por si.

[0033] O termo “conjugado” como aqui usado refere-se a composto

tendo um Ligando, ligador e Molécula Biologicamente Ativa. Exemplos ilustrativos incluem compostos de fórmula (I), (III) e (IV).

[0034] O termo “espaçador”, como aqui usado, refere-se a blocos de construção químicos do ligador usado para espacialmente separar o Ligando da Molécula Biologicamente Ativa e para permitir o catabolismo do ligador dentro das células. Um espaçador pode ser representado por Z_1 e Z_2 .

[0035] O termo “macrolídeo”, como aqui usado, refere-se a qualquer Molécula Biologicamente Ativa tendo um anel macrolídeo.

[0036] O termo “alquila” como aqui usado refere-se a um grupo hidrocarboneto tendo uma fórmula geral C_nH_{2n+1} . Exemplos de alquila incluem: metila, etila, 1-propila, 2-propila, 1-butila etc. Alquila típica tem de um a dez átomos de carbono, um a nove átomos de carbono, um a oito átomos de carbono, um a sete átomos de carbono, um a seis átomos de carbono, um a cinco átomos de carbono, um a quatro átomos de carbono, um a três átomos de carbono, um a dois átomos de carbono ou um átomo de carbono.

[0037] O termo “arila”, como aqui usado, refere-se a um hidrocarboneto aromático, monovalente ou policíclico, tipicamente tendo 6 a 18 átomos de carbono. Arila exemplo inclui fenila (como benzeno), benzenos substituídos, naftaleno, antraceno, indenila, tetraidronaftila etc.

[0038] O termo “alquenila”, como aqui usado, refere-se a um radical hidrocarboneto monovalente, linear ou ramificado, alifático, de dois ou mais átomos de carbono, com pelo menos um local de insaturação. A alquenila tem uma fórmula geral $R_2C=CR_2$. Exemplos de alquenila incluem: etilenila, vinila, alila etc.

[0039] O termo “alquinila”, como aqui usado, refere-se a um radical hidrocarboneto alifático univalente, contendo uma tripla ligação. Alquinilas típicas são de dois a vinte átomos de carbono (e incluem pelo menos uma tripla ligação). Alquinilas exemplos incluem etinila, propinila, 1-butinila, 2-butinila, 1-pentinila, hexinila etc.

[0040] O termo “cicloalquila” como aqui usado refere-se a um radical anel carbocíclico saturado monovalente. Cicloalquilas típicas são radicais de anel monocíclico de 3 a 7 membros. Um exemplo de uma cicloalquila é cicloexila.

[0041] O termo “heteroarila”, como aqui usado, refere-se a radical aromático monovalente de 5 ou 6 anéis membrados. Heteroarila inclui sistemas de anéis fundidos (pelo menos um deve ser aromático), que incluem até 5 a 18 átomos, contendo um ou mais heteroátomos, independentemente selecionados de nitrogênio, enxofre ou oxigênio. Heteroarila ilustrativa são piridinila, triazolila, furila, pirazinila, tienila, isoxazolila, indazolila, furazanila, benzotiazolila, quinazolinila e fuopiridinila.

[0042] O termo “heterociclila”, como aqui usado, refere-se a radical carbocíclico saturado ou parcialmente saturado, tipicamente de 3 a 18 átomos de carbono, em que pelo menos um átomo do anel é um heteroátomo selecionado de nitrogênio, oxigênio, fósforo e enxofre. Uma heterociclila pode ser um monociclo ou um biciclo, por exemplo. Heterociclilas exemplos são pirodinila, tetraidrofurana, diidropirana, tioxanila, 2H-pirana, dioxanila, piperidino etc.

[0043] A frase “sal farmacologicamente aceitável”, como aqui usada, refere-se a sais tanto orgânicos como inorgânicos dos compostos conjugados descritos aqui, p. ex., compostos de fórmula (I), (III), (IV) e (V). Os sais são farmacologicamente aceitáveis e incluem: sulfato, citrato, nitrato, fosfato, ascorbato, brometo, gluconato, benzoato, oxalato, pantotenato etc. Observe-se que os sais farmacologicamente aceitáveis aqui podem incluir mais do que um átomo carregado em sua estrutura, bem como um ou mais contraíons. A preparação dos compostos conjugados aqui como sais farmacologicamente aceitáveis é bem conhecida de uma pessoa hábil na arte.

[0044] A expressão “anticorpo humano”, como aqui usado, é destinado a incluir anticorpos tendo regiões variáveis e constantes, derivadas

de sequências de imunoglobulina humana. O mAbs humano da invenção pode incluir resíduos aminoácidos não codificados pelas sequências da imunoglobulina humana (p. ex., mutações introduzidas por mutagênese aleatória ou específica de local *in vitro* ou por mutação somática *in vivo*), por exemplo, em CDRs e em particular CDR3. Entretanto, a expressão “anticorpo humano”, como aqui usada, não é destinada a incluir mAbs em que as sequências derivadas da linha de germes de outra espécie mamífera foram enxertadas nas sequências FR humanas.

[0045] A expressão “quantidade terapêuticamente eficaz”, como aqui usada, refere-se a uma quantidade que produz o desejado efeito para o qual ela é administrada. A quantidade exata dependerá da finalidade do tratamento e será averiguável por uma pessoa hábil na arte empregando técnicas conhecidas (vide, por exemplo, Lloyd (1999) *The Art, Science e Technology of Pharmaceutical Compounding*).

Ligandos e Parceiros de Ligação

[0046] A eficácia das modalidades do composto conjugado descrito aqui depende da seletividade do Ligando ligar-se a seu parceiro de ligação de ligando.

[0047] Em uma modalidade, os Ligandos são qualquer molécula capaz de ligar-se com alguma especificidade a um dado parceiro de ligação dentro de um mamífero, onde a interação pode resultar em um uso terapêutico. Em alguns aspectos, o Ligando é capaz de ligar-se a uma célula ou população de células.

[0048] Os ligandos para uso aqui incluem anticorpos, linfocinas, hormônios, fatores de crescimento, receptores virais, interleucina ou qualquer outra molécula ou substância de ligação de célula ou ligação de peptídeo.

[0049] Em uma modalidade, o Ligando é um anticorpo. Como definido aqui, anticorpo refere-se a anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, fragmentos de anticorpo (Fab, Fab' e F(ab)2, minicorpos,

diacorpos, tricorpos etc.), e anticorpos biespecíficos. Anticorpos aqui podem ser humanizados usando-se métodos descritos na Patente U.S. No. 6.596.541 e Publicação US No. 2012/0095572, cada uma incorporada por referência em sua totalidade.

[0050] Onde o ligando for um anticorpo, ele se liga a um parceiro de ligação antígeno, que é um polipeptídeo, e pode ser uma molécula de transmembrana (p. ex., receptor) ou um fator de crescimento. Antígenos exemplares incluem mas não são limitados a moléculas tais como renina; um hormônio do crescimento, incluindo hormônio do crescimento humano e hormônio do crescimento bovino; fator de liberação do hormônio do crescimento; o hormônio da paratiróide; o hormônio de estimulação da tireóide; lipoproteínas; antitripsina alfa-1; insulina de cadeia-A; insulina de cadeia-B; proinsulina; hormônio estimulante do folículo; calcitonina; hormônio luteinizante; glucagon; fatores de coagulação, tais como fator vmc, fator IX, fator de tecido (TF) e fator de von Willebrands; fatores anticoagulantes, tais como Proteína C; fator natriurético atrial; surfactante pulmonar; um ativador do plasminogênio, ta como urocinase ou urina humana ou atiador do plasminogênio tipo-tecido (t-PA); bombesina; trombina; fator do crescimento hemopoiético; fator-alfa e beta da necrose tumoral; encefalinase; RANTES (célula-T expressa e secretada normalmente regulada na ativação); proteína inflamatória macrófaga humana (MIP-I-alpha); uma albumina do soro, tal como albumina do soro humana; substância inibidora Muellerian; cadeia de relaxina-A; cadeia de relaxina-B; prorrelaxina; peptídeo associado-gonadotropina de camundongo; uma proteína microbiana, tal como betalactamase; Dnase; 19E; um antígeno associado linfócito citotóxico-T. (CTLA), tal como CTLA-4; inibina; activina; fator do crescimento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormônios ou fatores de crescimento; proteína A ou D; fatores reumatóides; um fator neurotrófico, tal como fator neurotrófico derivado-osso (BDNF), fator neurotrófico (BDNF), neurotrofina-

3, 4, 5 ou 6 (NT-3, NT4, NT-5 ou NT-6) ou um fator do crescimento dos nervos, tal como NGF- β ; fator do crescimento derivado de plaqueta (PDGF); fator do crescimento do fibroblasto, tal como aFGF e bFGF; receptor do fator de crescimento do fibroblasto 2 (FGFR2), fator do crescimento epidérmico (EGF); fator do crescimento de transformação (TGF), tal como TGF-alfa e TGF-beta, incluindo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 ou TGF- β 5; fator-1 e II de crescimento semelhante à insulina (IGF-1 e IGF-H); des(1-3)-IGF-1 (IGF-1 cérebro), proteínas de ligação do fator de crescimento semelhante-insulina, receptores EpCAM, GD3, FLT3, PSMA, PSCA, MUC1, MUC16, STEAP, CEA, TENB2, EphA, receptores EphB, receptor do folato, FOLRI, mesotrelina, cripto, alfavbeta6, integrinas, VEGF, VEGFR, EGFR, receptor de transferência, IRTA1, IRTA2, IRTA3, IRTA4, IRTA5; proteínas CD, tais 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-tumor ou receptores de superfície celular descritos na Publicação US No. 2008/0171040 ou Publicação US No. 2008/0305044 incorporadas em totalidade por referência; eritropoietina; fatores osteoindutivos; imunotoxinas; uma proteína morfogenética óssea (BMP); um interferon, tal como um interferon-alfa, beta e gama; fatores estimulantes de colônia (CSFs), p. ex., M-CSF, GM-CSF e G-CSF; interleucinas (ILs), p. ex., IL-1 a IL-10; dismutase superóxido; receptores da célula-T; proteínas de membrana da superfície; fator de aceleração da decadência; antígeno viral, tal como, por exemplo, uma parte do envelope HIV; proteínas de transporte; receptores de retorno, adressinas; proteínas reguladoras; integrinas, tais como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, um ICAM, VLA-4 e VCAM; um antígeno associado a tumor como AFP, ALK, B7H4, proteínas BAGE, catenina- β , bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9 (anidrase carbônica IX), caspase-8, CD20, CD40,

CD123, CDK4, CEA, CLEC12A, kit-c, cMET, CTLA4, ciclina-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, endogлина, Epcam, EphA2, ErbB2/Her2, ErbB3/Her3, ErbB4/Her4, ETV6-AML, Fra-1, FOLR1, proteínas GAGE (p. ex., GAGE-1, -2), GD2, GD3, GloboH, glipicano-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/EBNA1, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, IGF1R, LGR5, LMP2, proteínas MAGE (e.g., MAGE-1, -2, -3, -4, -6, e -12), MART-1, mesotelina, ML-IAP, Muc1, Muc16 (CA-125), MUM1, NA17, NGEF, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PDGFR- α , PDGFR- β , PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, PLAC1, PRLR, PRAME, PSCA, PSGR, PSMA (FOLH1), proteínas RAGE, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, Steap-2, STn, survivina, TAG-72, TGF- β , TMPRSS2, Tn, TNFRSF17, TRP-1, TRP-2, tirosinase e uroplakin-3 e fragmentos de qualquer um dos polipeptídeos acima listados.

[0051] Os ligandos podem também incluir proteínas de repetição da ancirina, interferons, linfocinas tais como IL-2 ou IL-3, hormônios como insulina e glicocorticóides, fatores do crescimento tais como EGF, transferrina, fibronectina tipo III etc.

[0052] As modalidades aqui são específicas de alvo para uso terapêutico. Em uma modalidade, os Ligandos são preparados para interagir com e ligar-se a antígenos definidos como antígenos tumorais, que incluem antígenos específicos para um tipo de tumor ou antígenos que são compartilhados, superexpressos ou modificados em um tipo particular de tumor. Exemplos incluem: alfa-actinina-4 com câncer de pulmão, ARTC1 com melanoma, proteína de fusão BCR-ABL com leucemia mielóide crônica, B-RAF, CLPP ou Cdc27 com melanoma, CASP-8 com carcinoma de células escamosas e hsp70-2 com carcinoma de célula renal, bem como os seguintes antígenos específicos de tumor compartilhados, por exemplo; BAGE-1, GAGE, GnTV, KK-LC-1, MAGE-A2, NA88-A, TRP2-INT2.

Moléculas Biologicamente Ativas

[0053] Moléculas Biologicamente Ativas aqui incluem quaisquer moléculas que tenham um uso terapêutico em um mamífero. Em modalidades típicas, a molécula é benéficamente suprida a um alvo dentro do mamífero e, em particular, é benéficamente suprida e então dentro de uma célula (p. ex., endocitose) em comparação com moléculas liberadas dentro dos sistemas vascular ou linfático.

[0054] Em um aspecto, Moléculas Biologicamente Ativas são compostos que resultam na inibição, retardamento, redução e/ou prevenção do crescimento das células. As Moléculas Biologicamente Ativas são compostos que resultam na inibição, retardamento, redução e/ou prevenção do crescimento das células. As Moléculas Biologicamente Ativas podem também resultar em morte celular via necrose ou apoptose. As Moléculas Biologicamente Ativas ilustrativas para uso em compostos conjugados descritos aqui incluem: maytansinoids (e.g., DM1, DM4, etc.), auristatins (e.g., MMAE, MMAD, MMAF, etc.), duocarmicina (e.g., MGBA), dolastatina, toxóides, e outras drogas quimioterapeuticamente eficazes.

[0055] Outros exemplos específicos de Moléculas Biologicamente Ativas que podem ser usadas no contexto da presente invenção incluem, p. ex., 1-deidrotestosterona, 2-pirrolinodoxorrubicina, 5-fluorouracila, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, actinomicina D, antraciclina, antramicina (AMC), bleomicina, bussulfan, caliqueamicinas, carmustina cisplatina, colchicina, cianomorfolino-doxorrubicina, cicloposfamida, citarabina, citochalasin B, dactinomicina, daunorrubicina, decarbazina, dibromomanitol, diidróxi antracina diona, doxorrubicina, emetina, epirubicina, etídio, brometo, etoposida, gramicidina D, glucocorticóides, lidocaína, lomustina (CCNU), mecloretamina, melfalan, methotrexato, mithramicina, mitomicina, mitoxantrona, morpholino-doxorrubicina, procaína, propranolol, puromicina, pirrolobenzodiazapinas, sibiromicina, estreptozotocina, taxol, tenoposida, tetracaína, tioepa clorambucila, tricotecenos, tubulisina, vincristina, e

estereoisômeros, isósteros, análogos ou derivativos de qualquer um dos precedentes.

[0056] Em uma modalidade, a Molécula Biologicamente Ativa é um maitansinóide ou um análogo da maitansinóide. Maitansinóides exemplares, para uso aqui, são descritas em Widdison et al., J. Med. Chem., 2006, 49, 4392-4408, incorporado aqui por referência para todas as finalidades.

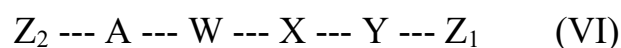
Materiais Ligadores

[0057] A presente descrição inclui um composto ligador, que é quimicamente capaz de covalentemente ligar dois componentes químicos afastados. O ligador espaça e liga dois componentes, por exemplo, o ligador pode ligar um Ligando e uma Molécula Biologicamente Ativa. Em um aspecto, o ligador é auto imolativo, em que o ligador conecta dois ou mais diferentes componentes químicos e libera pelo menos um dos ditos componentes químicos, na presença de uma enzima. Em outro aspecto, o ligador pode ser fixado a outros componentes químicos, incluindo, mas não limitado a agentes analíticos, biomoléculas, agentes de alvejamento, rótulos detectáveis, agentes diagnósticos etc. Em ma modalidade, o ligador fixa uma Molécula Biologicamente Ativa e um Ligando. Em outra modalidade, o ligador fixa um macrolídeo biologicamente ativo e um Ligando. Em outra modalidade, o ligador fixa um macrolídeo biologicamente ativo e um anticorpo ou seus fragmentos.

[0058] Em um aspecto, os ligadores são úteis para covalentemente ligar ligandos com agentes terapêuticos e marcadores. Em outro aspeto, os ligadores melhoram a estabilidade química e/ou sistêmica dos componentes fixados. Em outro aspecto, os ligadores reduzem a toxicidade *in vivo* dos componentes fixados. Em outro aspecto, os ligadores melhoram a farmacocinética, farmacodinâmica e/ou biodisponibilidade dos componentes fixados. Em um aspecto, os ligadores clivam e liberam uma Molécula Biologicamente Ativa em um local dentro ou próximo de uma célula alvo ou

uma população de célula em uma forma farmacologicamente eficaz. Em um aspecto, a clivagem é realizada por enzimas. Em um aspecto, os grupos cliváveis dos ligadores para a clivagem enzimática incluem, mas não limitam as ligações peptídicas, ligações éster e ligações dissulfeto. Em outro aspecto, o ligador é clivado através de mudança de pH.

[0059] Em uma modalidade, os compostos ligadores são representados pela fórmula (VI):



em que:

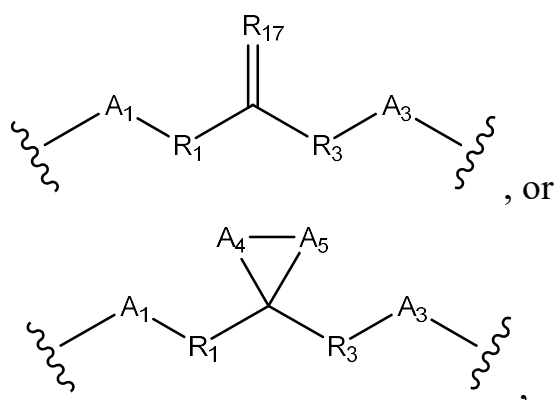
Z_2 e Z_1 são, cada um independentemente, ausentes ou um espaçador;

A é um aminoácido natural ou não-natural, ou um peptídeo compreendendo 2 – 20 aminoácidos;

W está ausente, é -O-, -S-, -CR₅R₆-, -NR₄-;

X está ausente, é arila, heteroarila, cicloalquila, heterociclila, em que arila, heteroarila, cicloalquila e heterociclila são opcionalmente substituídos;

Y está ausente,



em que A_1 , A_3 , R_1 e R_3 são, cada um independentemente ausente, um aminoácido, a peptídeo tendo 2-20 aminoácidos, uma alquila, uma alquinila, uma alquenila, uma cicloalquila, uma arila, uma heteroarila, uma heterociclila, -CR₅R₆-, -O-, -C(=O)-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -O-C(=O)-O-, -C(=O)-(CH_x)_{p1}-, -C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-, -(CH_x)_{p1}-C(=O)-, -(CH_x)_{p1}-C(=O)-

O-, $-(O-(CH_2)_{p2})_{p3}-$, $-((CH_2)_{p2}-O-)_{p3}-$, $-C(=S)-$, $-C(=S)-S-$, $-C(=S)-NH-$, $-S-C(=S)-$, $-S-C(=S)-S-$, $-S-$, $-SO-$, $-SO_2-$, $-NR_4-$, $-N(R_4)-C(=O)-N(R_8)-$, $-N(R_4)-C(=O)O-$, $-N(R_4)-C(=O)-$, $-C(=O)-N(R_4)-$, $-C(=O)-N(R_4)-C(=O)-$, $-O-C(=O)-NR_4-$, em que alquila, alquinila, alquenila, cicloalquila, arila, heteroarila e hetrociclila são opcionalmente substituídas.

[0060] A_4 e A_5 são, cada um independentemente, $-O-$, $-S-$, $-NR_{18}-$, $-CR_5R_6-$;

R_{17} é selecionado do grupo consistindo de O, S, NR_{18} , CR_5R_6 ;

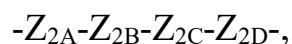
R_{18} é selecionado do ruo consistindo de H, alquila, alquinila, alquenila, cicloalquila, arila, hetroarila, heterociclila e acila, em que alquila, alquinila, alquenila, cicloalquila, arila, heteroarila, heterociclila e acila são opcionalmente substituídos.

[0061] R_4 , R_5 , R_6 e R_8 são, cada um independentemente, H, ou uma substituída ou insubstituída: alquila, alquenila, alquinila, arila, heteroarila ou heterociclila;

p_1 , p_2 e p_3 são, cada um independentemente, 0, ou um ineiro de 1 a 100; e

x é 0, 1 or 2.

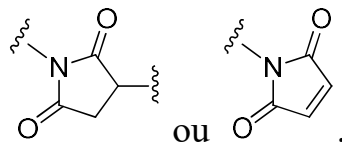
[0062] Em um aspecto, a descrição provê compostos de formula (VI), em que Z_2 is representado pela seguinte fórmula estrutural:



em que:

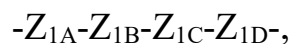
Z_{2A} , Z_{2B} , Z_{2C} e Z_{2D} são, cada um independentemente ausente, um aminoácido, um peptídeo tendo 2 – 20 aminoácidos, uma alquila, uma alquinila, uma alquenila, uma cicloalquila, um arila, uma heteroarila, uma hetrociclila, $-CR_5R_6-$, $-O-$, $-C(=O)-$, $-O-C(=O)-$, $-C(=O)-O-$, $-O-C(=O)-O-$, $-C(=O)-(CH_x)_{p1}$, $-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-$, $-(O-(CH_2)_{p2})_{p3}-$, $-((CH_2)_{p2}-O-)_{p3}-$, $-C(=S)-$, $-C(=S)-S-$, $-C(=S)-NH-$, $-S-C(=S)-$, $-S-C(=S)-S-$, $-S-$, $-SO-$, $-SO_2-$, $-NR_4-$, $-N(R_4)-C(=O)-N(R_8)-$, $-N(R_4)-C(=O)O-$, -

$N(R_4)-C(=O)-$, $-C(=O)-N(R_4)-$, $-C(=O)-N(R_4)-C(=O)-$, $-O-C(=O)-N(R_4)$, $-O-C(=O)-N(R_4)$, $-O-C(=S)-N(R_4)-$, $-C(=S)-N(R_4)-$, $-N=C=S$, $-N=C=O$,



em que alquila, alquinila, alquenila, cicloalquila, arila, hetroarila e heterociclila são opcionalmente substituídas e R_4 , R_5 , R^6 e R_8 são, cada um independentemente, H ou uma substituída ou insubstituída: alquila, alquenila, alquinil, arila, heteroarila ou heterociclila.

[0063] Em um aspecto, a descrição provê compostos de fórmula (VI), em que Z_1 é representado pela seguinte fórmula estrutural:



em que:

Z_{1A} , Z_{1B} , Z_{1C} e Z_{1D} estão, cada um independente, ausentes, são um aminoácido, um pepetídeo tendo 2-20 aminoácidos, uma alquila, uma alquinila, uma alquenila, uma cicloalquila, uma arila, uma heteroarila, uma hetrociclila, $-CR_5R_6-$, $-O-$, $-C(=O)-$, $-O-C(=O)-$, $-C(=O)-O-$, $-O-C(=O)-O-$, $-C(=O)-(CH_x)_{p1}$, $-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-$, $-(O-(CH_2)_{p2})_{p3}-$, $-((CH_2)_{p2}-O-)_{p3}-$, $-C(=S)-$, $-C(=S)-S-$, $-C(=S)-NH-$, $-S-C(=S)-$, $-S-C(=S)-S-$, $-S-$, $-SO-$, $-SO_2-$, $-NR_4-$, $-N(R_4)-C(=O)-N(R_8)-$, $-N(R_4)-C(=O)O-$, $-N(R_4)-C(=O)-$, $-C(=O)-N(R_4)-$, $C(=O)-N(R_4)-C(=O)-$, $-O-C(=O)-N(R_4)$, $-O-C(=S)-N(R_4)-$, $-C(=S)-N(R_4)-$, $-N=C=S$, $-N=C=O$, ou

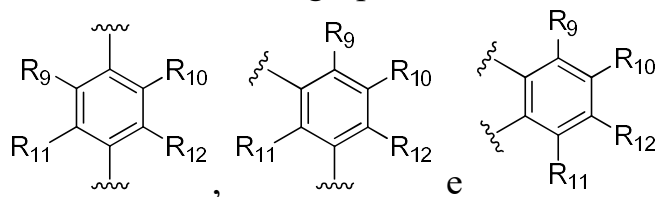
em que em que alquila, alquinila, alquenila, cicloalquila, arila, heteroarila e heterociclila são opcionalmente substituídas e R_4 , R_5 , R_6 e R_8 são, cada um independentemente, H ou uma substituída ou insubstituída: alquila, alquenila, alquinila, arila, heteroarila ou heterociclila.

[0064] Em um aspecto, a descrição provê compostos de fórmula (VI), em que A é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de alanina, ácido aspártico, ácido glutâmico, fenilalanina, glicina, histitina, isoleucina,

lisina, leucina, metionina, asparagina, prolina, glutamina, arginin, serina, treonina, valina, triptofano, tirosina, cisteína e citrulina.

[0065] Em outro aspecto, a descrição provê compostos de fórmula (VI), em que A é um peptídeo selecionado do grupo consistindo de valina-citrulina, citrulina-valina, lisina-fenilalanina, fenilalanina-lisina, valina-asparagina, asparagina-valina, treonina-asparagina, serina-asparagina, asparagina-serina, fenilalanina-asparagina, asparagina-fenilalanina, leucina-asparagina, asparagina-leucina, isoleucina-asparagina, asparagina-isoleucina, glicina-asparagina, asparagina-glicina, ácido glutâmico-asparagina, asparagina-ácido glutâmico, citrulina-asparagina, asparagina-citrulina, alanina-asparagina, asparagina-alanina.

[0066] Em um aspecto, a descrição provê compostos de fórmula (VI), em que X é uma arila selecionada do grupo consistindo de



em que R_9 , R_{10} , R_{11} , e R_{12} são, cada um independentemente, H, uma alquila, cicloalquila, arila, heteroarila, heterociclila, halogêneo, $NR_{13}R_{14}$, nitro, ciano, $-OH$, $-O-C(=O)-R_{15}$, $-C(=O)-R_{15}$, $-C(=O)-O-R_{15}$, $-C(=O)-NR_{13}R_{14}$; e

ainda em que, alquila, cicloalquila, arila, heteroarila, e heterociclila são opcionalmene substituídas;

R_{13} e R_{14} são, cada um independentemente, H ou uma opcionalmente substituída alquila; e R_{15} é uma alquila opcionalmente substituída.

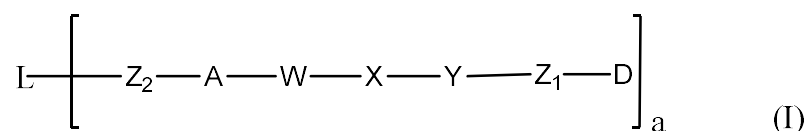
[0067] De acordo com certas modalidades, os ligadores, as Moléculas Biologicamente Ativas e outros compostos da presente descrição podem ser conectados a um anticorpo ou uma molécula de ligação-antígeno, através de uma ligação em um aminoácido particular dentro do anticorpo ou molécula de

ligação-antígeno. Ligações de aminoácidos exemplares, que podem ser usadas no contexto da descrição, incluem, p. ex., lisina (vide, p. ex., US 5.208.020; US 2010/0129314; Hollander et al., *Bioconjugate Chem.*, 2008, 19:358-361; WO 2005/089808; US 5.714.586; US 2013/0101546; e US 2012/0585592), cisteína (vide, p. ex., US 2007/0258987; WO 2013/055993; WO 2013/055990; WO 2013/053873; WO 2013/053872; WO 2011/130598; US 2013/0101546; e US 7,750,116), selenocisteína (vide, e.g., WO 2008/122039; e Hofer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2008, 105:12451-120456), formil glicina (vide, p. ex., Carrico et al., *Nat. Chem. Biol.*, 2007, 3:321-322; Agarwal et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2013, 110:46-51, e Rabuka et al., *Nat. Protocols*, 2012, 10:1052-1067), aminoácidos não-naturais (vide, p. ex., WO 2013/068874, e WO 2012/166559), e ácidos aminoácidos (vide, p. ex., WO 2012/05982). Os ligadores podem também ser conjugados com uma proteína de ligação de antígeno via fixação a carboidratos (vide, p. ex., US 2008/0305497, e Ryan et al., *Food & Agriculture Immunol.*, 2001, 13:127-130) e ligadores de dissulfeto (vide, p. ex., WO 2013/085925, WO 2010/010324, WO 2011/018611, e Shaunak et al., *Nat. Chem. Biol.*, 2006, 2:312-313).

[0068] De acordo com certas outras modalidades, os ligadores, as moléculas biologicamente ativas, tais como drogas, podem ser conectados a um anticorpo ou molécula de ligação-antígeno através de uma fixação em um aminoácido particular dentro do anticorpo ou molécula de ligação-antígeno formando um conjugado de anticorpo-droga (ADC).

Compostos

[0069] Em um aspecto, a presente descrição provê Moléculas Biologicamente Ativas e conjugados de Ligando representados pela seguinte fórmula estrutural (I):



em que:

L está ausente ou é um Ligando;

ainda em que:

quando L é um Ligando, L é capaz de ligar-se a uma célula ou população de células;

a é um inteiro de 1 a 10;

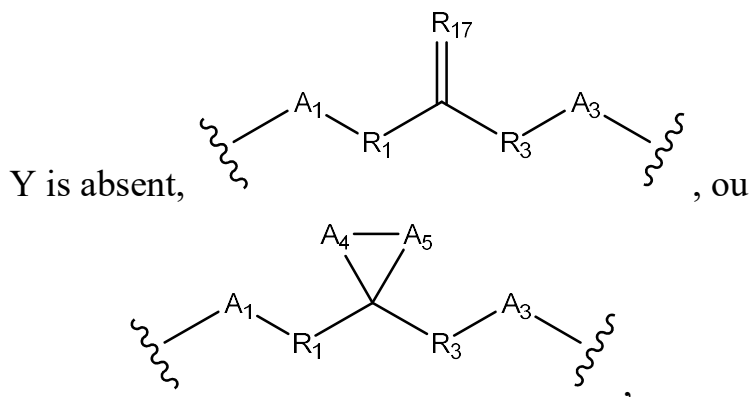
Z_2 e Z_1 estão, cada um independentemente, ausentes or são um espaçador;

D é uma Molécula Biologicamente Ativa;

A é uma aminoácido natural ou não-natural ou um peptídeo compreendendo 2 – 20 aminoácidos;

W está ausente, é -O-, -S-, $-CR_5R_6-$, $-NR_4-$;

X está ausente, é arila, heteroarila, cicloalquila, heterociclila, em que arila, heteroarila, cicloalquila, e heterociclila são opcionalmene substituídas;



em que A_1 , A_3 , R_1 e R_3 estão, cada um independente, ausentes, são um aminoácido, a peptídeo tendo 2-20 aminoácidos, uma alquila, uma alquinila, uma alquenila, uma cicloalquila, uma arila, uma heteroarila, uma hetrociclila, $-CR_5R_6-$, -O-, $-C(=O)-$, $-O-C(=O)-$, $-C(=O)-O-$, $-O-C(=O)-O-$, $-C(=O)-(CH_x)_{p1}-$, $-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-$, $-(O-(CH_2)_{p2-})_{p3-}$, $-((CH_2)_{p2-O-})_{p3-}$, $-C(=S)-$, $-C(=S)-S-$, $-C(=S)-NH-$, $-S-C(=S)-$, $-S-C(=S)-S-$, -S-, $-SO-$, $-SO_2-$, $-NR_4-$, $-N(R_4)-C(=O)-N(R_8)-$, $-N(R_4)-C(=O)O-$, $-N(R_4)-C(=O)-$, $-C(=O)-N(R_4)-$, $-C(=O)-N(R_4)-C(=O)-$, $-O-C(=O)-NR_4-$, em

que alquila, alquinila, alquenila, cicloalquila, arila, heteroarila e heterociclila são opcionalmente substituídas;

A_4 e A_5 são, cada um independentemente, $-O-$, $-S-$, $-NR_{18}-$, $-CR_5R_6-$;

R_{17} é selecionado do grupo consistindo de O, S, NR_{18} , CR_5R_6 ;

R_{18} é selecionado do grupo consistindo de H, alquila, alquinila, alquenila, cicloalquila, arila, heteroarila, heterociclila, e acila, em que alquila, alquinila, alquenila, cicloalquila, arila, heteroarila, heterociclila, e acila são opcionalmene substituídas;

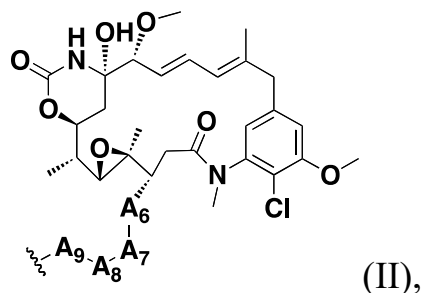
R_4 , R_5 , R_6 e R_8 são, cada um independentemente, H ou uma substituída ou insubstituída: alquila, alquenila, alquinila, arila, heteroarila ou heterociclila;

p_1 , p_2 e p_3 são, cada um independentemente, 0, ou um inteiro de 1 a 100; e

x é 0, 1 ou 2.

[0070] Em outro aspecto, a presente descrição refere-se a compostos em que a Molécula Biologicamente Ativa é um macrolídeo biologicamente ativo citotóxico.

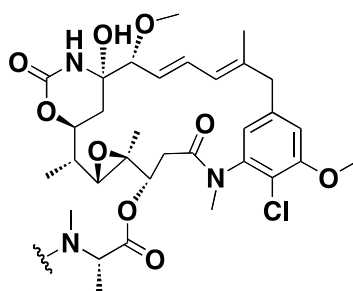
[0071] Em ainda outro aspecto, a presente descrição provê maitansinóides como representados pela fórmula (II) como macrolídeos biologicamente ativos:



em que A_6 , A_7 , A_8 , A_9 estão, cada um independente, ausentes, são um aminoácido, aminoácido de N-alquila, um peptídeo tendo 2-20 aminoácidos, uma alquila, uma alquenila, uma alquinila, uma cicloalquila, uma arila, uma heteroarila, uma heterociclila, $-CR_5R_6-$, $-O-$, $-C(=O)-$, $-O-$

C(=O)-, -C(=O)-O-, -O-C(=O)-O-, -C(=O)-(CH_x)_{p1}, -C(=O)-O-(CH_x)_{p1}, -(CH_x)_{p1}-C(=O)-, -(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-, -(O-(CH₂)_{p2})_{p3}-, -((CH₂)_{p2}-O-) _{p3}-, -C(=S)-, -C(=S)-NH-, -C(=S)-S-, -S-C(=S)-, -S-C(=S)-S-, -S-, -SO-, -SO₂-, -NR₄-, -N(R₄)-C(=O)-N(R₈)-, -N(R₄)-C(=O)O-, -N(R₄)-C(=O)-, -C(=O)-N(R₄)-, -C(=O)-N(R₄)-C(=O)-, -O-C(=O)-NR₄, além disso em que a alquila, alquinila, alquenila, cicloalquila, arila, heteroarila e heterociclila são opcionalmente substituídas; e R₄, R₅, R₆ e R₈ são, cada um independentemente, H ou uma substituída ou insubstituída: alquila, alquenila, alquinila, arila, heteroarila ou heterociclila.

[0072] Em outra modalidade, o maitansinóide é representado pela seguinte fórmula estrutural (II)(a):



(II)(a).

[0073] Em um aspecto, a descrição provê um composto de fórmula (I), em que o Ligando (L) é capaz de ligar-se a uma população celular especificamente alvejada.

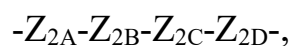
[0074] Em outro aspecto, a descrição provê um composto de fórmula (I), e que o Ligando (L) é selecionado do grupo consistindo de proteínas, anticorpos, fragmentos de anticorpos, ácidos nucleicos, esqueletos de ligação de antígeno e carboidratos.

[0075] Em uma modalidade, a descrição provê um composto de fórmula (I), em que o Ligando (L) é um anticorpo ou um fragmento do mesmo.



[0076] Em uma modalidade, a descrição provê um composto de fórmula (I), em que o Ligando (L) é um anticorpo ou fragmento do mesmo que especificamente liga-se a um antígeno associado a tumor.

[0077] Em uma modalidade, a descrição provê um composto de fórmula (I), em que o anticorpo ou um fragmento do mesmo compreende um grupo enxofre que é covalentemente ligado com Z_2 .

[0078] Em um aspecto, a descrição provê compostos de fórmula (I), em que Z_2 é representado pela seguinte fórmula estrutural:



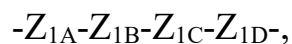
em que:

Z_{2A} , Z_{2B} , Z_{2C} e Z_{2D} estão, cada um independente, ausentes, são um aminoácido, a peptídeo tendo 2-20 aminoácidos, uma alquila, uma alquinila, uma alquenila, uma cicloalquila, uma arila, uma heteroarila, uma heterociclila, $-CR_5R_6-$, $-O-$, $-C(=O)-$, $-O-C(=O)-$, $-C(=O)-O-$, $-O-C(=O)-O-$, $-C(=O)-(CH_x)_{p1}$, $-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-$, $-(O-(CH_2)_{p2})_{p3}-$, $-((CH_2)_{p2}-O)_{p3}-$, $-C(=S)-$, $-C(=S)-S-$, $-C(=S)-NH-$, $-S-C(=S)-$, $-S-C(=S)-S-$, $-S-$, $-SO-$, $-SO_2-$, $-NR_4-$, $-N(R_4)-C(=O)-N(R_8)-$, $-N(R_4)-C(=O)O-$, $-N(R_4)-C(=O)-$, $-C(=O)-N(R_4)-$, $-C(=O)-N(R_4)-C(=O)-$, $-O-C(=O)-N(R_4)$, $-O-C(=S)-N(R_4)-$, $-C(=S)-N(R_4)-$, $-N=C=S$, $-N=C=O$,  or ,

em que alquila, alquinila, alquenila, cicloalquila, arila, heteroarila e heterociclila são opcionalmente substituídas e R_4 , R_5 , R_6 e R_8 são, cada um independentemente, H ou uma substituída ou insubstituída: alquila, alquenila, alquinila, arila, heteroarila ou heterociclila.

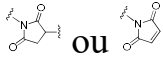

[0079] Em uma modalidade, a descrição provê compostos de fórmula (I), em que o anticorpo ou um fragmento do mesmo compreende um grupo enxofre que é covalentemente ligado com Z_{2A} .

[0080] Em um aspecto, a descrição provê compostos de fórmula (I), em que Z_1 é representado pela seguinte fórmula estrutural:



em que:

Z_{1A} , Z_{1B} , Z_{1C} e Z_{1D} estão, cada um independente, ausentes, são um aminoácido, a peptídeo tendo 2-20 aminoácidos, uma alquila, uma

alquinila, uma alquenila, uma cicloalquila, uma arila, uma heteroarila, uma heterociclila, $-CR_5R_6-$, $-O-$, $-C(=O)-$, $-O-C(=O)-$, $-C(=O)-O-$, $-O-C(=O)-O-$, $-C(=O)-(CH_x)_{p1}$, $-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-$, $-(O-(CH_2)_{p2})_{p3}-$, $-((CH_2)_{p2}-O)_{p3}-$, $-C(=S)-$, $-C(=S)-S-$, $-C(=S)-NH-$, $-S-C(=S)-$, $-S-C(=S)-S-$, $-S-$, $-SO-$, $-SO_2-$, $-NR_4-$, $-N(R_4)-C(=O)-N(R_8)-$, $-N(R_4)-C(=O)O-$, $-N(R_4)-C(=O)-$, $-C(=O)-N(R_4)-$, $C(=O)-N(R_4)-C(=O)-$, $-O-C(=O)-N(R_4)$, $-O-C(=S)-N(R_4)-$, $-C(=S)-N(R_4)-$, $-N=C=S$, $-N=C=O$,  ou 

em que alquila, alquinila, alquenila, cicloalquila, arila, heteroarila e heterociclila são opcionalmente substituídas e R_4 , R_5 , R_6 e R_8 são, cada um independentemente, H ou uma substituída ou insubstituída: alquila, alquenila, alquinila, arila, heteroarila ou heterociclila

[0081] Em uma modalidade, a descrição provê compostos de fórmula (I), em que a Molécula Biologicamente Ativa (D) é covalentemente ligada com Z_1 .

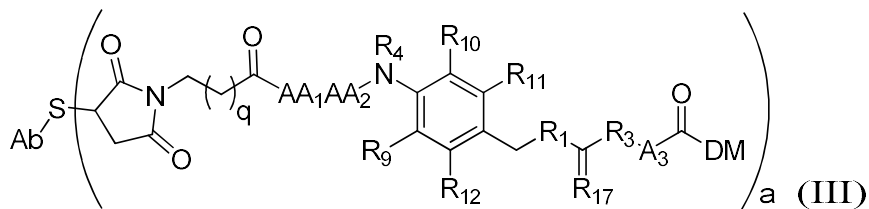
[0082] Em um aspecto, a descrição provê compostos de fórmula (I), em que A é um aminoácido selecionado do grupo consistindo de alanina, ácido aspártico, ácido glutâmico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, asparagina, prolina, glutamina, arginina, serina, treonina, valina, triptofano, tirosina, cisteína e citrulina.

[0083] Em outro aspecto, a descrição provê compostos de fórmula (I), em que A é um peptídeo selecionado do grupo consistindo de valina-citrulina, citrulina-valina, lisina-fenilalanina, fenilalanina-lisina, valina-asparagina, asparagina-valina, treonina-asparagina, serina-asparagina, asparagina-serina, fenilalanina-asparagina, asparagina-fenilalanina, leucina-asparagina, asparagina-leucina, isoleucina-asparagina, asparagina-isoleucina, glicina-asparagina, asparagina-glicina, ácido glutâmico-asparagina, asparagina-ácido glutâmico, citrulina-asparagina, asparagina-citrulina, alanina-asparagina, asparagina-alanina.

[0084] Em um aspecto, a descrição provê compostos de fórmula (I),

em que X é uma arila selecionada do grupo consistindo de

[0085] Em outro aspecto, a descrição provê composto de fórmula (III):



em que:

Ab é um anticorpo ou um fragmento do mesmo;;

AA₁-AA₂ é um peptídeo selecionado do grupo consistindo de valina-citrulina, citrulina-valina, lisina-fenilalanina, fenilalanina-lisina, valina-asparagina, asparagina-valina, treonina-asparagina, serina-asparagina, asparagina-serina, fenilalanina-asparagina, asparagina-fenilalanina, leucina-asparagina, asparagina-leucina, isoleucina-asparagina, asparagina-isoleucina, glicina-asparagina, asparagina-glicina, ácido glutâmico-asparagina, asparagina-ácido glutâmico, citrulina-asparagina, asparagina-citrulina, alanina-asparagina, asparagina-alanina;

a é um inteiro de 1 a 10;

q é 0 ou um inteiro de 1 A 5;

A₃, R₁ e R₃ são, cada um independentemente, ausentes, um aminoácido, um peptídeo tendo 2-20 aminoácidos, uma alquila, alquinila, uma alquenila, a cicloalquila, uma arila, uma heteroarila, uma heterociclila, -CR₅R₆-, -O-, -C(=O)-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -O-C(=O)-O-, -C(=O)-(CH_x)_{p1}-, -C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-, -(CH_x)_{p1}-C(=O)-, -(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-, -(O-(CH₂)_{p2})_{p3}-, -((CH₂)_{p2}-O-) _{p3}-, -C(=S)-, -C(=S)-S-, -C(=S)-NH-, -S-C(=S)-, -S-C(=S)-S-, -S-, -SO-, -SO₂-, -NR₄-, -N(R₄)-C(=O)-N(R₈)-, -N(R₄)-C(=O)O-, -N(R₄)-C(=O)-, -C(=O)-N(R₄)-, -C(=O)-N(R₄)-C(=O)-, -O-C(=O)-NR₄-, em que alquila, alquinila, alquenila, cicloalquila, arila, heteroarila, e heterociclila são opcionalmente substituídas;

R₁₇ é selecionado do grupo consistindo de O, S, NR₁₈, CR₅R₆;

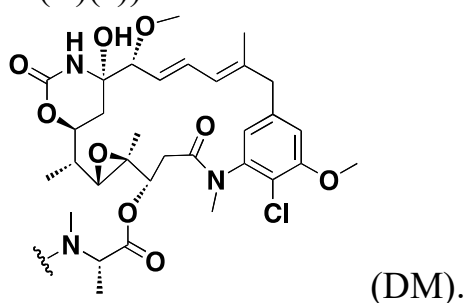
R_4 , R_5 , R_6 e R_8 cada um independentemente H, ou uma substituída ou insubstituída: alquila, alquenila, alquinila, arila, heteroarila e heterociclila;

R_9 , R_{10} , R_{11} , e R_{12} cada um independentemente H, halogêneo, $NR_{13}R_{14}$, nitro, ciano, -OH, -O-C(=O)- R_{15} , -C(=O)- R_{15} , -C(=O)-O- R_{15} , -C(=O)- $NR_{13}R_{14}$, substituída ou insubstituída: alquila, cicloalquila, arila, heteroarila, e heterociclila;

R_{13} e R_{14} cada um independentemente H ou uma opcionalmente substituída alquila; e R_{15} é uma opcionalmente substituída alquila;

p_1 , p_2 e p_3 cada um independentemente 0, ou um inteiro de 1 a 100;

x é 0, 1 ou 2; e DM é representado pela seguinte estrutura (p. ex., composto de fórmula (II)(a)):



[0086] Em uma modalidade, a descrição provê os compostos de fórmula (III)

em que:

q é 4;

R_1 e R_3 são, cada um independentemente, -O-, -S-, NR_4 , - CR_5R_6 ;

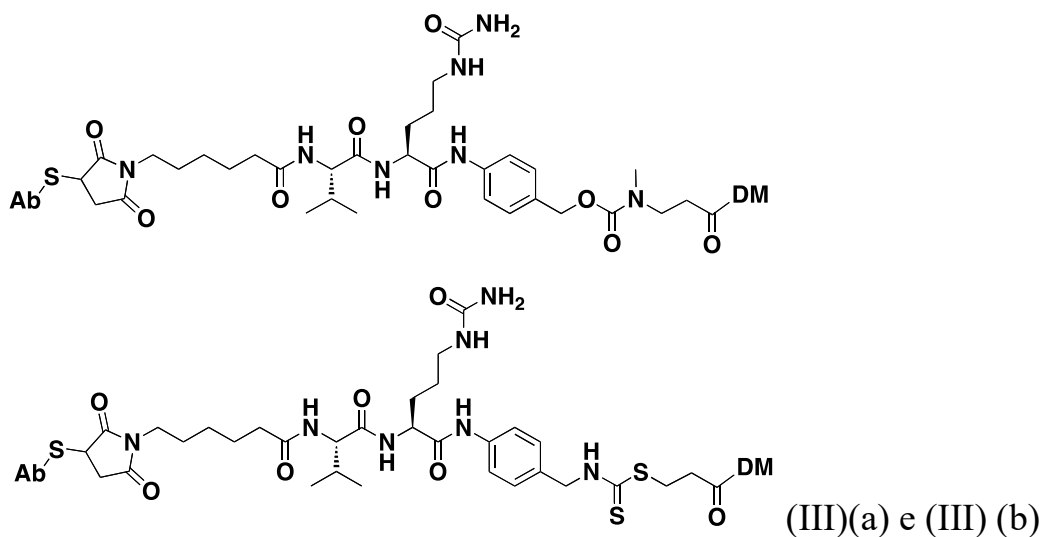
R_{17} é selecionado do grupo consistindo de O, S, NR_{18} , CR_5R_6 ;

R_{18} é selecionado do grupo consistindo de H, alquila, alquinila, alquenila, cicloalquila, arila, heteroarila, heterociclila, e acila, em que alquila, alquinila, alquenila, cicloalquila, arila, heteroarila, heterociclila, e acila são opcionalmente substituídas;

$R_4, R_5, R_6, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}$ são, cada um independentemente, H ou alquila; e

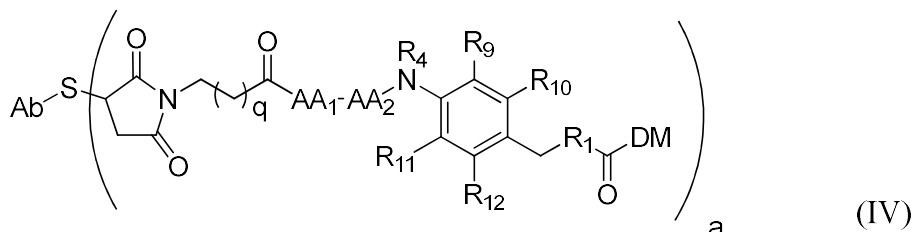
A_3 é uma alquila.

[0087] Em uma modalidade, a descrição provê os compostos de fórmula (III) representados pelas seguintes estruturas (III)(a) e (III)(b):



em que Ab é um anticorpo ou um fragmento do mesmo;

[0088] Em um aspecto, a descrição provê os compostos de fórmula (IV):



em que:

Ab é um anticorpo ou um fragmento do mesmo;

AA_1-AA_2 é um peptídeo selecionado do grupo consistindo de valina-citrulina, citrulina-valina, lisina-fenilalanina, fenilalanina-lisina, valina-asparagina, asparagina-valina, treonina-asparagina, serina-asparagina, asparagina-serina, asparagina-serina, penilalanina-asparagina, asparagina-fenilalanina, leucina-asparagina, asparagina-leucina, isoleucina-asparagina, asparagina-isoleucina, glicina-asparagina, asparagina-glicina, ácido

glutâmico- asparagina, asparagina-ácido glutâmico, citrulina-asparagina, asparagina-citrulina, alanina-asparagina, asparagina-alanina;

a é um inteiro de 1 a 10;

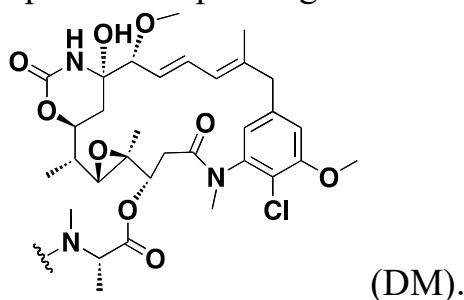
q é 0 ou um inteiro de 1 a 5;

R₁ está ausente, é um aminoácido, um peptídeo tendo 2-20 aminoácidos, uma alquila, uma alquinila, uma alquenila, a cicloalquila, uma arila, uma heteroarila, uma heterociclila, -CR₅R₆-, -O-, -C(=O)-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -O-C(=O)-O-, -C(=O)-(CH_x)_{p1}-, -C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-, -(CH_x)_{p1}-C(=O)-, -(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-, -(O-(CH₂)_{p2})_{p3}-, -((CH₂)_{p2}-O)_{p3}-, -C(=S)-, -C(=S)-S-, -C(=S)-NH-, -S-C(=S)-, -S-C(=S)-S-, -S-, -SO-, -SO₂-, -NR₄-, -N(R₄)-C(=O)-N(R₈)-, -N(R₄)-C(=O)O-, -N(R₄)-C(=O)-, -C(=O)-N(R₄)-, -C(=O)-N(R₄)-C(=O)-, -O-C(=O)-NR₄-, em que alquila, alquinila, alquenila, cicloalquila, arila, heteroarila, e heterociclila são opcionalmente substituídas;

R₄, é H, ou uma substituída ou insubstituída: alquila, alquenila, alquinila, arila, heteroarila e heterociclila;

R₉, R₁₀, R₁₁, e R₁₂ são, cada um independentemente, H, halogêneo, NR₁₃R₁₄, nitro, ciano, -OH, -O-C(=O)-R₁₅, -C(=O)-R₁₅, -C(=O)-O-R₁₅, -C(=O)-NR₁₃ R₁₄, substituída ou insubstituída: alquila, cicloalquila, arila, heteroarila, e heterociclila; e

DM é representado pela seguinte estrutura:



[0089] Em uma modalidade, a descrição provê os compostos de fórmula (IV)

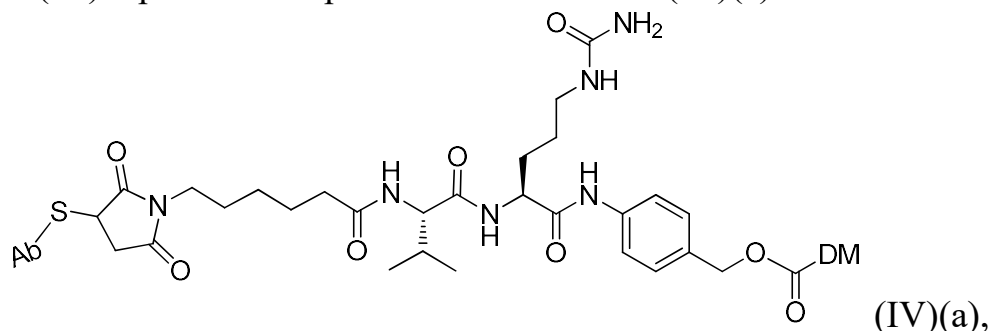
em que:

q é 4; e

R_1 é selecionado do grupo consistindo de $-O-$, $-S-$, NR_4 , e $-CR_5R_6-$; e

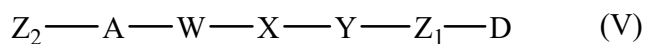
ainda em que R_4 , R_5 , e R_6 são, cada um independentemente, H ou alquila.

[0090] Em uma modalidade, a descrição provê os compostos de fórmula (IV) representados pela seguinte estrutura (IV)(a):



em que Ab é um anticorpo ou um fragmento do mesmo;

Em um aspecto, a descrição provê um composto de Fórmula (V)



em que:

Z_2 e Z_1 são, cada um independentemente, ausentes ou um espaçador;

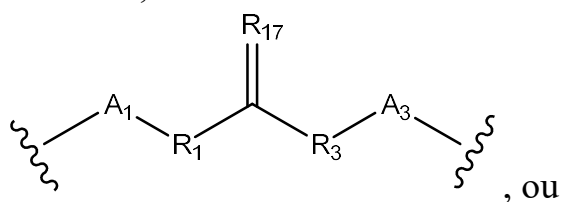
D é uma Molécula Biologicamente Ativa;

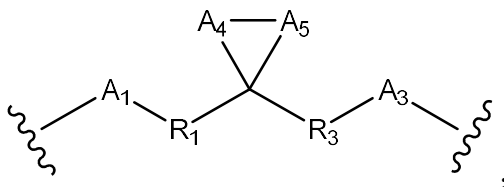
A é um aminoácido natural ou não-natural, ou um peptídeo compreendendo 2-20 aminoácidos;

W está ausente, é $-O-$, $-S-$, $-CR_5R_6-$, ou $-NR_4-$;

X está ausente, ou é uma substituída ou insubstituída: arila, heteroarila, cicloalquila, heterociclila;

Y está ausente,





em que A_1 , A_3 , R_1 e R_3 estão, cada um independentemente, ausentes, um aminoácido, um peptídeo tendo 2-20 aminoácidos, uma alquila, uma alquinila, uma alquenila, a cicloalquila, uma arila, uma heteroarila, uma heterociclila, $-CR_5R_6-$, $-O-$, $-C(=O)-$, $-O-C(=O)-$, $-C(=O)-O-$, $-O-C(=O)-O-$, $-C(=O)-(CH_x)_{p1}-$, $-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-$, $-(O-(CH_2)_{p2})_{p3}-$, $-((CH_2)_{p2}-O)_{p3}-$, $-C(=S)-$, $-C(=S)-S-$, $-C(=S)-NH-$, $-S-C(=S)-$, $-S-C(=S)-S-$, $-S-$, $-SO-$, $-SO_2-$, $-NR_4-$, $-N(R_4)-C(=O)-N(R_8)-$, $-N(R_4)-C(=O)O-$, $-N(R_4)-C(=O)-$, $-C(=O)-N(R_4)-$, $-C(=O)-N(R_4)-C(=O)-$, $-O-C(=O)-NR_4-$, em que alquila, alquinila, alquenila, cicloalquila, arila, heteroarila, e heterociclila são opcionalmente substituídas;

A_4 e A_5 são, cada um independentemente, $-O-$, $-S-$, $-NR_{18}-$, $-CR_5R_6-$;

R_{17} é selecionado do grupo consistindo de O, S, NR_{18} , CR_5R_6 ;

R_{18} é selecionado do grupo consistindo de H, alquila, alquinila, alquenila, cicloalquila, arila, heteroarila, heterociclila, e acila, em que alquila, alquinila, alquenila, cicloalquila, arila, heteroarila, heterociclila, e acila são opcionalmente substituídas;

R_4 , R_5 , R_6 e R_8 são, cada um independentemente, H, ou uma substituída ou insubstituída: alquila, alquenila, alquinila, arila, heteroarila, heterociclila;

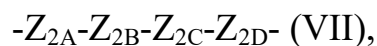
p_1 , p_2 e p_3 são, cada um independentemente, 0, ou um inteiro de 1 a 100; e

x é 0, 1 ou 2.



[0091] Em uma modalidade, a descrição provê o composto de fórmula (V),

em que:

Z_2 é representado pela Fórmula (VII):

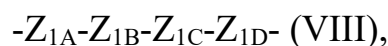


ainda em que:



Z_{2A} , Z_{2B} , Z_{2C} e Z_{2D} são, cada um independentemente, ausentes, um aminoácido, um peptídeo tendo 2-20 aminoácidos, uma alquila, uma alquinila, uma alquenila, a cicloalquila, uma arila, uma heteroarila, uma heterociclila, $-CR_5R_6-$, $-O-$, $-C(=O)-$, $-O-C(=O)-$, $-C(=O)-O-$, $-O-C(=O)-O-$, $-C(=O)-(CH_x)_{p1}$, $-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-$, $-(O-(CH_2)_{p2})_{p3-}$, $-((CH_2)_{p2}-O-)_{p3-}$, $-C(=S)-$, $-C(=S)-S-$, $-C(=S)-NH-$, $-S-C(=S)-$, $-S-C(=S)-S-$, $-S-$, $-SO-$, $-SO_2-$, $-NR_4-$, $-N(R_4)-C(=O)-N(R_8)-$, $-N(R_4)-C(=O)O-$, $-N(R_4)-C(=O)-$, $-C(=O)-N(R_4)-$, $-C(=O)-N(R_4)-C(=O)-$, $-O-C(=O)-N(R_4)$, $-O-C(=S)-N(R_4)-$, $-C(=S)-N(R_4)-$, $-N=C=S$, $-N=C=O$,  ou ,

em que alquila, alquinila, alquenila, cicloalquila, arila, heteroarila, e heterociclila são opcionalmente substituídas e R_4 , R_5 , R_6 e R_8 são, cada um independentemente, H, ou uma substituída ou insubstituída: alquila, alquenila, alquinila, arila, heteroarila, heterociclila;

Z_1 é representado pela Fórmula (VIII):



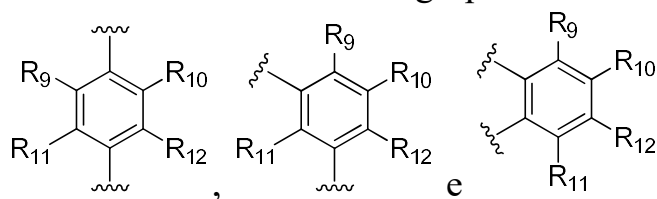
em que:

Z_{1A} , Z_{1B} , Z_{1C} e Z_{1D} são, cada um independentemente, ausentes, um aminoácido, um peptídeo tendo 2-20 aminoácidos, uma alquila, uma alquinila, uma alquenila, a cicloalquila, uma arila, uma heteroarila, uma heterociclila, $-CR_5R_6-$, $-O-$, $-C(=O)-$, $-O-C(=O)-$, $-C(=O)-O-$, $-O-C(=O)-O-$, $-C(=O)-(CH_x)_{p1}$, $-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-$, $-(O-(CH_2)_{p2})_{p3-}$, $-((CH_2)_{p2}-O-)_{p3-}$, $-C(=S)-$, $-C(=S)-S-$, $-C(=S)-NH-$, $-S-C(=S)-$, $-S-C(=S)-S-$, $-S-$, $-SO-$, $-SO_2-$, $-NR_4-$, $-N(R_4)-C(=O)-N(R_8)-$, $-N(R_4)-C(=O)O-$, $-N(R_4)-C(=O)-$, $-C(=O)-N(R_4)-$, $-C(=O)-N(R_4)-C(=O)-$, $-O-C(=O)-NR_4-$, $-N=C=S$, $-N=C=O$,  ou ,

em que alquila, alquinila, alquenila, cicloalquila, arila, heteroarila, e heterociclila são opcionalmente substituídas e R_4 , R_5 , R_6 , R_8 são, cada um independentemente, H, ou uma substituída ou insubstituída: alquila, alquenila, alquinila, arila, heteroarila, heterociclila;

A é um peptídeo selecionado do grupo consistindo de valine-citrulina, citrulina-valine, lisina,-fenilalanina, fenilalanina-lisina,, valine-asparagina, asparagina-valine, treonina-asparagina, serina-asparagina, asparagina-serina, fenilalanina-asparagina, asparagina-fenilalanina, leucina-asparagina, asparagina-leucina, isoleucina-asparagina, asparagina-isoleucina, glicina-asparagina, asparagina-glicina, ácido glutâmico- asparagina, asparagina-ácido glutâmico, citrulina-asparagina, asparagina-citrulina, alanina-asparagina, asparagina-alanina; e

X é uma arila selecionada do grupo consistindo de

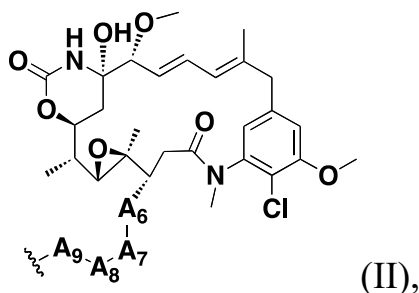


em que R_9 , R_{10} , R_{11} , e R_{12} são, cada um independentemente, H, uma alquila, cicloalquila, arila, heteroarila, heterociclila, halogêneo, $NR_{13}R_{14}$, nitro, ciano, -OH, -O-C(=O)- R_{15} , -C(=O)- R_{15} , -C(=O)-O- R_{15} , -C(=O)- $NR_{13}R_{14}$,

ainda em que, alquila, cicloalquila, arila, heteroarila, e heterociclila são opcionalmente substituídas;

R_{13} e R_{14} são, cada um independentemente, H ou uma opcionalmente substituída alquila; e R_{15} é uma opcionalmente substituída alquila

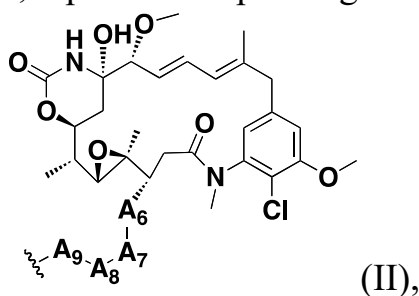
[0092] As Moléculas Biologicamente Ativas (D) podem opcionalmene ser um maitansinóide substituído de Fórmula II:



em que:

A_6 , A_7 , A_8 , A_9 são, cada um independentemente, ausentes, um aminoácido, aminoácido de N-alquila, um peptídeo tendo 2-20 aminoácidos, uma alquila, uma alquenila, uma alquinila, a cicloalquila, uma arila, uma heteroarila, uma heterociclila, $-CR_5R_6-$, $-O-$, $-C(=O)-$, $-O-C(=O)-$, $-C(=O)-O-$, $-O-C(=O)-O-$, $-C(=O)-(CH_x)_{p1}$, $-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-$, $-(O-(CH_2)_{p2})_{p3}-$, $-((CH_2)_{p2}-O)_{p3}-$, $-C(=S)-$, $-C(=S)-S-$, $-C(=S)-NH-$, $-S-C(=S)-$, $-S-C(=S)-S-$, $-S-$, $-SO-$, $-SO_2-$, $-NR_4-$, $-N(R_4)-C(=O)-N(R_8)-$, $-N(R_4)-C(=O)O-$, $-N(R_4)-C(=O)-$, $-C(=O)-N(R_4)-$, $C(=O)-N(R_4)-C(=O)-$, $O-C(=O)-NR_4$, ainda em que alquila, alquinila, alquenila, cicloalquila, arila, heteroarila, e heterociclila são opcionalmente substituídas, e R_4 , R_5 , R_6 e R_8 são, cada um independentemente, H, ou uma substituída ou insubstituída: alquila, alquenila, alquinila, arila, heteroarila, heterociclila.

[0093] Em outra modalidade, a descrição provê compostos de fórmula (V), em que a molécula biologicamente ativa é um maitansinóide opcionalmente substituído, representado pela seguinte fórmula estrutural:

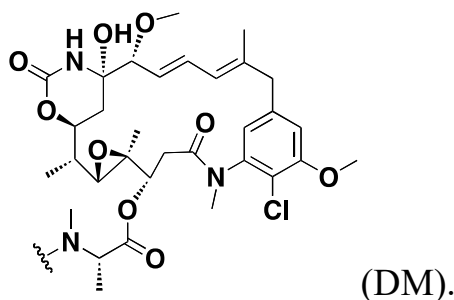


em que:

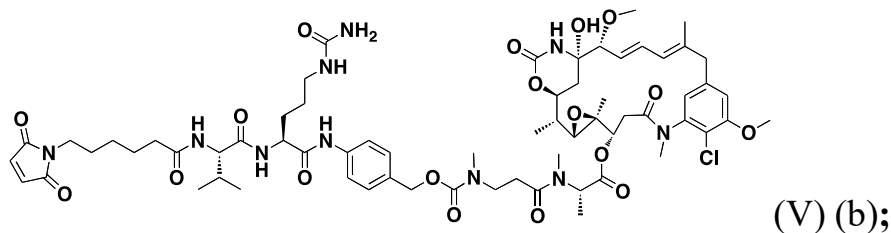
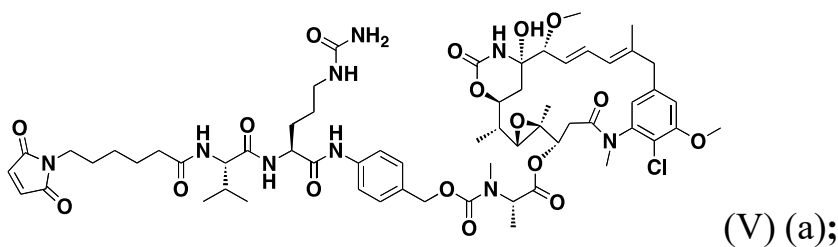
A_6 , A_7 , A_8 , A_9 são, cada um independentemente ausente, um aminoácido, Aminoácido de N-alquila, um peptídeo tendo 2-20 aminoácidos, uma alquila, uma alquenila, uma alquinila, uma cicloalquila, uma arila, uma

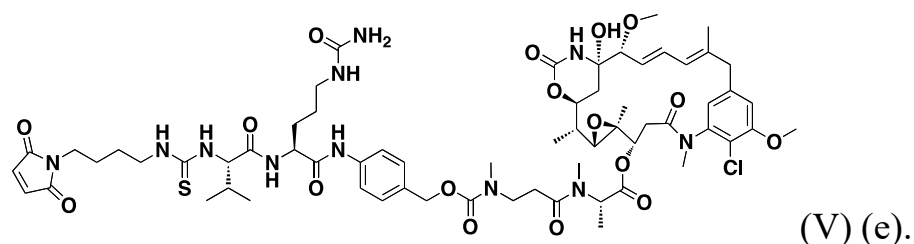
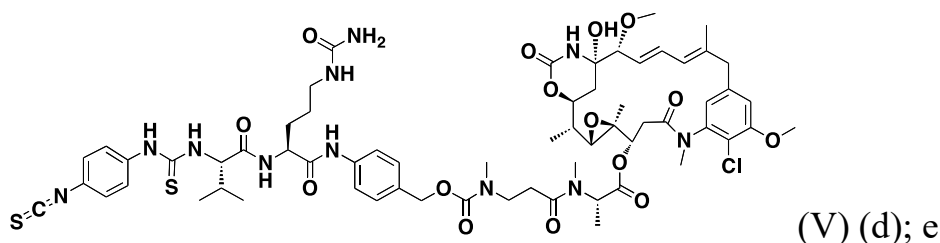
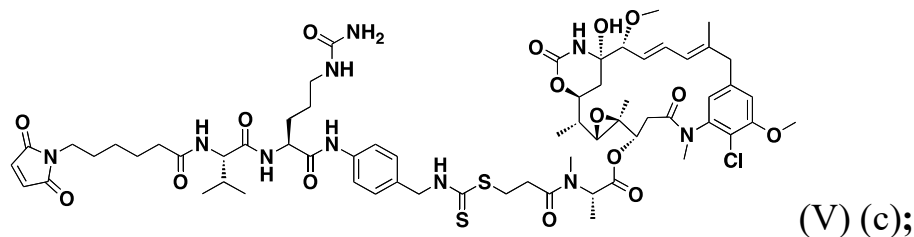
heteroarila, uma heterociclila, $-CR_5R_6-$, $-O-$, $-C(=O)-$, $-O-C(=O)-$, $-C(=O)-O-$, $-O-C(=O)-O-$, $-C(=O)-(CH_x)_{p1}$, $-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-$, $-(O-(CH_2)_{p2})_{p3}-$, $-((CH_2)_{p2}-O)_{p3}-$, $-C(=S)-$, $-C(=S)-S-$, $-C(=S)-NH-$, $-S-C(=S)-$, $-S-C(=S)-S-$, $-S-$, $-SO-$, $-SO_2-$, $-NR_4-$, $-N(R_4)-C(=O)-N(R_8)-$, $-N(R_4)-C(=O)O-$, $-N(R_4)-C(=O)-$, $-C(=O)-N(R_4)-$, $C(=O)-N(R_4)-C(=O)-$, $O-C(=O)-NR_4$, ainda em que alquila, alquinila, alquenila, cicloalquila, arila, heteroarila, e heterociclila são opcionalmente substituídas, e R_4 , R_5 , R_6 e R_8 são, cada um independentemente, H, ou uma substituída ou insubstituída: alquila, alquenila, alquinila, arila, heteroarila, heterociclila.

[0094] Em ainda outra modalidade, a descrição provê compostos de fórmula (V), em que a molécula biologicamente ativa é a maitansinóide representada pela seguint fórmula estrutural:

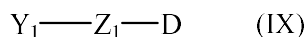


[0095] Em uma modalidade, a descrição provê compostos de fórmula (V) é representado pela sseuinte estruturas: (V)(a), (V)(b), (V)(c), (V)(d), e (V)(e):





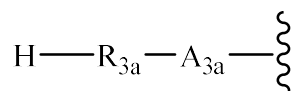
[0096] Em um aspecto, a descrição provê os compostos de fórmula (IX):



em que:

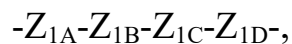
D é uma Molécula Biologicamente Ativa;

Y_1 é





em que R_{3a} e A_{3a} são, cada um independentemente, ausentes, um aminoácido, um peptídeo tendo 2-20 aminoácidos, uma alquila, uma alquinila, uma alquenila, a cicloalquila, uma arila, uma heteroarila, uma heterociclila, $-\text{CR}_5\text{R}_6-$, $-\text{O}-$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$, $-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_x)_{p1}-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-(\text{CH}_x)_{p1}-$, $-(\text{CH}_x)_{p1}-\text{C}(=\text{O})-$, $-(\text{CH}_x)_{p1}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$, $-(\text{O}-(\text{CH}_2)_{p2})_{p3}-$, $-((\text{CH}_2)_{p2}-\text{O})_{p3}-$, $-\text{C}(=\text{S})-$, $-\text{C}(=\text{S})-\text{S}-$, $-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-$, $-\text{S}-\text{C}(=\text{S})-$, $-\text{S}-\text{C}(=\text{S})-\text{S}-$, $-\text{S}-$, $-\text{SO}-$, $-\text{SO}_2-$, $-\text{NR}_4-$, $-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_8)-$, $-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$, $-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_4)-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}_4-$, em que alquila, alquinila, alquenila, cicloalquila, arila, heteroarila, e heterociclila são opcionalmente substituídas; e

Z_1 é representado pela seguinte fórmula estrutural:



em que:

Z_{1A} , Z_{1B} , Z_{1C} e Z_{1D} são, cada um independentemente ausente, um aminoácido, um peptídeo tendo 2-20 aminoácidos, uma alquila, uma alquinila, uma alquenila, uma cicloalquila, uma arila, uma heteroarila, uma heterociclila, $-CR_5R_6-$, $-O-$, $-C(=O)-$, $-O-C(=O)-$, $-C(=O)-O-$, $-O-C(=O)-O-$, $-C(=O)-(CH_x)_{p1}$, $-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-$, $-(O-(CH_2)_{p2})_{p3}$, $-((CH_2)_{p2}-O)_{p3}$, $-C(=S)-$, $-C(=S)-S-$, $-C(=S)-NH-$, $-S-C(=S)-$, $-S-C(=S)-S-$, $-S-$, $-SO-$, $-SO_2-$, $-NR_4-$, $-N(R_4)-C(=O)-N(R_8)-$, $-N(R_4)-C(=O)O-$, $-N(R_4)-C(=O)-$, $-C(=O)-N(R_4)-$, $C(=O)-N(R_4)-C(=O)-$, $-O-C(=O)-N(R_4)$, $-O-C(=S)-N(R_4)-$, $-C(=S)-N(R_4)-$, $-N=C=S$, $-N=C=O$,  ou .

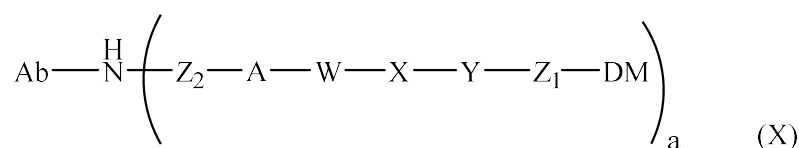
em que alquila, alquinila, alquenila, cicloalquila, arila, heteroarila, e heterociclila são opcionalmente substituídas e R_4 , R_5 , R_6 e R_8 são, cada um independentemente, H, ou uma substituída ou insubstituída: alquila, alquenila, alquinila, arila, heteroarila, ou heterociclila.

[0097] Em outro aspecto, a descrição provê um composto de fórmula (IX) em que uma molécula biologicamente ativa é um macrolídeo biologicamente ativo citotóxico. Em ainda outro aspecto, a descrição provê composto de fórmula (IX) em que o macrolídeo biologicament ativo é um maitansinóide. Em um outro aspecto, a descrição provê composto de fórmula (IX) em que o maitansinóide é representado pela Fórmula (II). Em outro aspecto, a descrição provê um composto de fórmula (IX) em que o maitansinóide é representado pela Fórmula (II)(a).

[0098] Em um aspecto, a descrição provê um composto de fórmula (IX) em que IC_{50} do composto é maior do que cerca de 10 nM.

[0099] Em um aspecto, a descrição provê um composto de fórmula (IX) em que o composto é de cerca de 10 vezes menos citotóxico do que o correspondente composto de fórmula (I).

[00100] Em outro aspecto, a descrição provê compostos de fórmula (X):



em que:

Ab é um anticorpo ou um fragmento do mesmo;

a é um inteiro de 1 a 10;

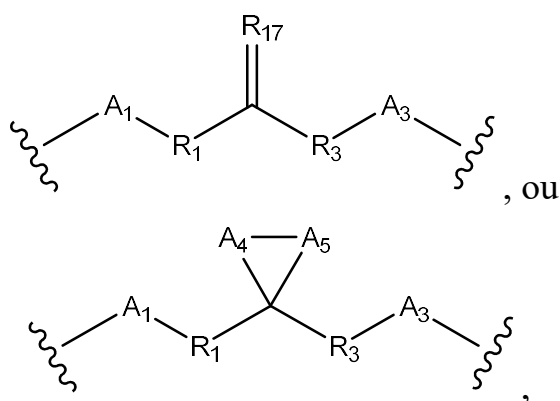
Z₂ e Z₁ são, cada um independentemente, ausentes ou um espaçador;

A é um aminoácido natural ou não-natural, ou um peptídeo compreendendo 2-20 aminoácidos;

W está ausente, é -O-, -S-, -CR₅R₆-, -NR₄-;

X está ausente, é arila, heteroarila, cicloalquila, heterociclila, em que arila, heteroarila, cicloalquila, e heterociclila são opcionalmente substituídas;

Y está ausente, é



em que A₁, A₃, R₁ e R₃ são, cada um independentemente ausente, um aminoácido, um peptídeo tendo 2-20 aminoácidos, uma alquila, uma alquinila, uma alquenila, uma cicloalquila, uma arila, uma heteroarila, uma heterociclila, -CR₅R₆-, -O-, -C(=O)-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -O-C(=O)-O-, -C(=O)-(CH_x)_{p1}-, -C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-, -(CH_x)_{p1}-C(=O)-, -(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-, -(O-(CH₂)_{p2})_{p3}-, -((CH₂)_{p2}-O)_{p3}-, -C(=S)-, -C(=S)-S-, -C(=S)-NH-, -S-

C(=S)-, -S-C(=S)-S-, -S-, -SO-, -SO₂-, -NR₄-, -N(R₄)-C(=O)-N(R₈)-, -N(R₄)-C(=O)O-, -N(R₄)-C(=O)-, -C(=O)-N(R₄)-, -C(=O)-N(R₄)-C(=O)-, -O-C(=O)-NR₄-, em que alquila, alquinila, alquenila, cicloalquila, arila, heteroarila, e heterociclila são opcionalmente substituídas;

A₄ e A₅ são, cada um independentemente, -O-, -S-, -NR₁₈-, -CR₅R₆-;

R₁₇ é selecionado do grupo consistindo de O, S, NR₁₈, CR₅R₆;

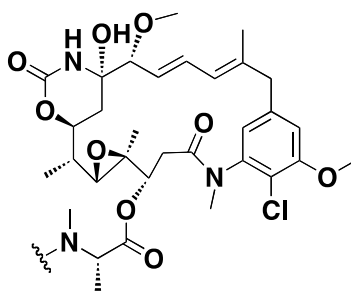
R₁₈ é selecionado do grupo consistindo de H, alquila, alquinila, alquenila, cicloalquila, arila, heteroarila, heterociclila, e acila, em que alquila, alquinila, alquenila, cicloalquila, arila, heteroarila, heterociclila, e acila são opcionalmente substituídas;

R₄, R₅, R₆ e R₈ são, cada um independentemente, H, ou uma substituída ou insubstituída: alquila, alquenila, alquinila, arila, heteroarila ou heterociclila;

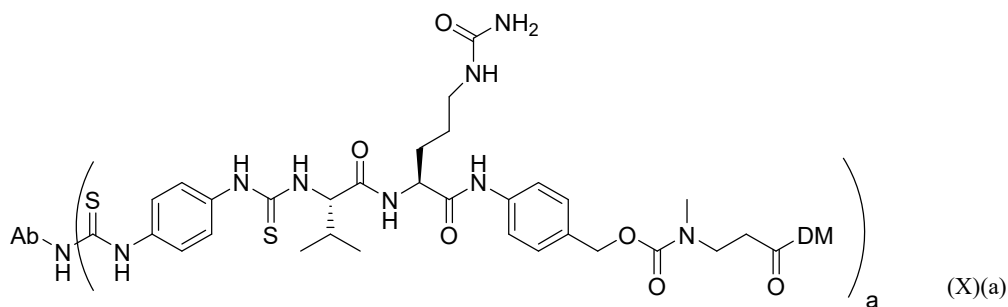
p₁, p₂ e p₃ são, cada um independentemente, 0, ou um inteiro de 1 a 100;

x é 0, 1 ou 2; e

DM é representado pela seguinte estrutura:

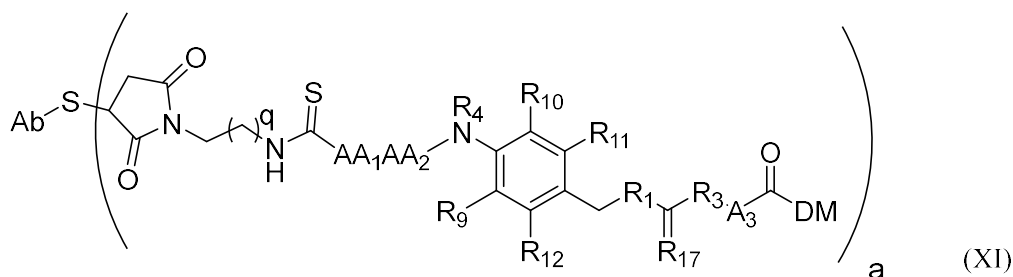


[00101] Em uma modalidade, uma descrição provê o composto de fórmula (X) representado pela seguinte estrutura (X)(a):



em que a é um inteiro de 1 a 10.

[00102] Em outro aspecto, uma descrição provê o composto de fórmula (XI):



em que:

Ab é um anticorpo ou um fragmento do mesmo;

AA_1-AA_2 é um peptídeo selecionado do grupo consistindo de valine-citrulina, citrulina-valine, lisina,-fenilalanina, fenilalanina-lisina,, valine-asparagina, asparagina-valine, treonina-asparagina, serina-asparagina, asparagina-serina, fenilalanina-asparagina, asparagina-fenilalanina, leucina-asparagina, asparagina-leucina, isoleucina-asparagina, asparagina-isoleucina, glicina-asparagina, asparagina-glicina, ácido glutâmico- asparagina, asparagina-ácido glutâmico, citrulina-asparagina, asparagina-citrulina, alanina-asparagina, asparagina-alanina;

a é um inteiro de 1 a 10;

q é 0 ou um inteiro de 1 a 5;

A_3 , R_1 e R_3 são, cada um independentemente, ausentes, um aminoácido, um peptídeo tendo 2-20 aminoácidos, uma alquila, uma alquinila, uma alquenila, uma cicloalquila, uma arila, uma heteroarila, uma heterociclila, $-CR_5R_6-$, $-O-$, $-C(=O)-$, $-O-C(=O)-$, $-C(=O)-O-$, $-O-C(=O)-O-$, $-C(=O)-(CH_x)_{p1}-$, $-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-$, -

(O-(CH₂)_{p2}-)_{p3}-, -((CH₂)_{p2}-O-)_{p3}-, -C(=S)-, -C(=S)-S-, -C(=S)-NH-, -S-C(=S)-, -S-C(=S)-S-, -S-, -SO-, -SO₂-, -NR₄-, -N(R₄)-C(=O)-N(R₈)-, -N(R₄)-C(=O)O-, -N(R₄)-C(=O)-, -C(=O)-N(R₄)-, -C(=O)-N(R₄)-C(=O)-, -O-C(=O)-NR₄-, em que alquila, alquinila, alquenila, cicloalquila, arila, heteroarila, e heterociclila são opcionalmente substituídas;

R₁₇ é selecionado do grupo consistindo de O, S, NR₁₈, CR₅R₆;

R₄, R₅, R₆ e R₈ são, cada um independentemente, H, ou uma substituída ou insubstituída: alquila, alquenila, alquinila, arila, heteroarila e heterociclila;

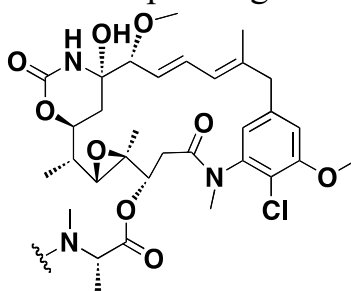
R₉, R₁₀, R₁₁, e R₁₂ são, cada um independentemente, H, halogêneo, NR₁₃R₁₄, nitro, ciano, -OH, -O-C(=O)-R₁₅, -C(=O)-R₁₅, -C(=O)-O-R₁₅, -C(=O)-NR₁₃ R₁₄, substituída ou insubstituída: alquila, cicloalquila, arila, heteroarila e heterociclila;

R₁₃ e R₁₄ são, cada um independentemente, H ou uma opcionalmente substituída alquila; e R₁₅ é uma opcionalmente substituída alquila;

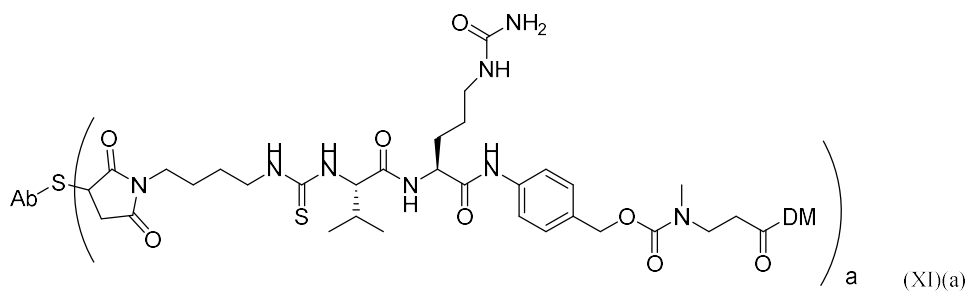
p₁, p₂ e p₃ são, cada um independentemente, 0, ou um inteiro de 1 a 100;

x é 0, 1 ou 2; e

DM é representado pela seguinte estrutura:



[00103] Em uma modalidade, uma descrição provê o composto de fórmula (XI) representado pela seguinte estrutura (XI)(a):



em que a é um inteiro de 1 a 10.

[00104] Em um aspecto, uma descrição provê os compostos de fórmula (I), (III), (IV) (V), e (X), em que a é um peptídeo clivável por uma protease.

[00105] Em um aspecto, uma descrição provê o composto de fórmula (XI) em que o peptídeo é clivável por uma protease.

[00106] Em um aspecto, uma descrição provê os compostos de fórmula (I), (III), (IV) (V), e (X) em que a é um peptídeo clivável por uma protease expressa em tecido tumoral.

[00107] Em um aspecto, uma descrição provê o composto de fórmula (XI) em que o peptídeo é clivável por uma protease expressa em tecido tumoral.

[00108] Em uma modalidade, a descrição provê os compostos de fórmula (I), (III), (IV) (V), (X) em que A é um peptídeo clivável por uma protease ainda em que a protease é uma catepsina ou uma plasmina.

[00109] Em uma modalidade, uma descrição provê o composto de fórmula (XI) em que o peptídeo é clivável por uma protease ainda em que a protease é uma catepsina ou uma plasmina.

Composições

[00110] As modalidades aqui incluem composições compreendendo compostos conjugados de fórmula (I), (III), (IV), (V), (X), ou (XI) bem como suas misturas. Em alguns aspectos, o composto é ainda representado por um composto de fórmula (III)(a), (III)(b), (IV)(a), (V)(a), (V)(b), (V)(c), (V)(d) (V)(e), (X)(a), or (XI)(a).

[00111] As modalidades aqui incluem composições compreendendo compostos de fórmula (I), (III), (IV), (V), (IX), (X), or (XI) bem como suas

misturas.

[00112] As composições podem ser composições farmacêuticas que incluem ainda um ou mais veículos, diluentes e/ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis. Em alguns aspectos, a composição farmacêutica é o sal farmacêuticamente aceitável dos compostos de fórmula (I), (III), (IV), (V), (IX), (X), or (XI) ou suas misturas. Em alguns outros aspectos, a composição farmacêutica é o sal farmacêuticamente aceitável dos compostos de fórmula (I), (III), (IV), (V), (IX), (X), ou (XI) ou suas misturas.

[00113] Veículos, diluentes e excipientes farmacêuticamente aceitáveis são bem conhecidos na arte e podem ser determinados por uma pessoa de habilidade comum na arte quando a situação clínica permite. Exemplos de veículos, diluentes e excipientes incluem: tampões para manutenção do pH apropriado da composição (p. ex., tampões de citrato, tampões de succinato, tampões de acetato, tampões de fosfato, tampões de lactato, tampões de oxalato etc.), proteínas transportadoras (p. ex., albumina do soro humano), solução salina, polióis (p. ex., trealose, sacarose, xilitol, sorbitol etc.), surfactantes (p. ex., polissorbato 20, polissorbato 80, polioxolato etc.), antimicrobianos e antioxidantes.

[00114] Se assim desejado, as composições farmacêuticas aqui podem incluir um segundo ou mais agentes terapêuticos (p. ex., um adjuvante para os compostos conjugados de fórmula (I), (III), (IV), (X), e/ou (XI), agentes antitumor, antibióticos, anti-inflamatórios etc.). O segundo agente terapêutico pode ser incluído na mesma composição que a dos compostos de fórmula (I), (III), (IV), (V), (IX), (X), e/ou (XI), ou pode ser administrado separadamente dos compostos de fórmula (I), (III), (IV), (V), (IX), (X), e/ou (XI) (pelo tempo ou tipo e local de administração).

[00115] Uma pessoa hábil na arte de Moléculas Biologicamente Ativas entenderá que cada um dos compostos de fórmula formula (I), (III), (IV), (V), (IX), (X), e/ou (XI) pode ser modificado de tal maneira que o composto

resultante ainda retém especificidade e/ou atividade similar ao composto de partida. Sob esta luz, a Molécula Biologicamente Ativa (D) dos compostos de fórmula (I), (III), (IV), (V), (IX), (X), e/ou (XI) podem incluir qualquer um ou todos análogos e derivativos das Moléculas Biologicamente Ativas. Em uma modalidade, as Moléculas Biologicamente Ativas são um macrolídeo e, além disso, é maitansina ou um análogo da maitansina, como descrito em Widdison et al., J. Med. Chem., 2006, 49 (14), 4392-4408.

[00116] Em um aspecto, a descrição provê a composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapêuticamente eficaz de um composto de fórmula (I), (III), (IV), (X), (XI), incluindo (III)(a), (III)(b), (IV)(a), (X)(a), e (XI)(a), ou um sal do mesmo farmacêuticamente aceitável e um ou mais transportadores, diluentes ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

[00117] Em um aspecto, a descrição provê a composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapêuticamente eficaz de um composto de fórmula (I), (III), (IV), (V), (IX), (X), (XI) incluindo (III)(a), (III)(b), (IV)(a), (V)(a), (V)(b), (V)(c), (V)(d), e (V)(e), (X)(a), e (XI)(a), ou um sal do mesmo farmacêuticamente aceitável e um ou mais transportadores, diluentes ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

[00118] Em outro aspecto, a descrição provê composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapêuticamente eficaz de um composto de fórmula (V) incluindo (V)(a), (V)(b), (V)(c), (V)(d), e (V)(e), ou um sal do mesmo farmacêuticamente aceitável e um ou mais portadores, diluentes ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

[00119] Em outro aspecto, a descrição provê composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapêuticamente eficaz de um composto de fórmula (IX), ou um sal do mesmo farmacêuticamente aceitável e um ou mais portadores, diluentes ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

[00120] Em outro aspecto, a descrição provê composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapêuticamente eficaz de um composto de

fórmula (V) e (IX) incluindo (V)(a), (V)(b), (V)(c), (V)(d), e (V)(e), ou um sal do mesmo farmacologicamente aceitável e um ou mais portadores, diluentes ou excipientes farmacologicamente aceitáveis.

Método de Uso

[00121] Como descrito acima, compostos conjugados de fórmula (I), (III), (IV), (X), e (XI) podem ser produzidos com vários grupos funcionais, de modo que a fixação do Ligando (L) ao ligador e, desse modo, uma Molécula Biologicamente Ativa forma um conjugado covalente. O Ligando especialmente alveja o composto conjugado ao parceiro de ligação de Ligando, tipicamente um polipeptídeo ou outro antígeno semelhante. Em modalidade típica, o conjugado é projetado para incluir um Ligando tendo um parceiro de ligação encontrado em células sofrendo crescimento celular anormal ou células envolvidas em um distúrbio proliferativo. Surpreendentemente, os compostos conjugados de fórmula (I), (III), (IV), (X), e (XI) foram projetados de modo que cada ligador de composto seja catabolizado dentro da célula ligada pelo conjugado. Como tal, o suprimento de uma Molécula Biologicamente Ativa, através das modalidades do conjugado aqui, permite o suprimento de Moléculas Biologicamente Ativas, que normalmente seriam demasiado tóxicas para administrar convencionalmente. As modalidades aqui permitem suprimento altamente seletivo e específico destas moléculas em células sofrendo crescimento celular anormal ou células envolvidas em distúrbios proliferativos (quando comparado com catabolismo fora da célula, desse modo liberando o composto biologicamente ativo dentro do sangue ou sistema linfático, por exemplo).

[00122] Como pode ser previsto por uma pessoa hábil na arte, os compostos de conjugado covalente descritos aqui podem também ser usados para suprir qualquer tipo de Molécula Biologicamente Ativa útil e pode ser seletivamente direcionado a qualquer tipo de população celular, por exemplo, o conjugado pode ser usado para suprir drogas antiproliferativas nas células

sofrendo crescimento anormal ou drogas antivirais em células infectadas com um vírus, contanto que o Ligando selecionado reconheça um apropriado parceiro de ligação celular.

[00123] Sob esta luz, são providos métodos de uso para as modalidades de composto conjugado descritas aqui.

[00124] As composições farmacêuticas descritas aqui são úteis na inibição, retardamento e/ou evitação de crescimento celular anormal ou no tratamento de vários distúrbios proliferativos ou estados doentios em mamíferos. Em modalidades típicas, o mamífero é um humano (as modalidades aqui serão descritas em relação a humanos). Outros mamíferos incluem qualquer mamífero que possa sofrer de um distúrbio proliferativo detectável, incluindo primatas, cães, gatos, cavalos, cabras, carneiro, gado, camelos etc. Além disso, é entendido que os compostos conjugados das composições farmacêuticas são projetados para direcionamento seletivo às células sofrendo crescimento celular anormal ou para o tratamento dos vários distúrbios proliferativos ou estados doentios descritos aqui.

[00125] Como tal, as modalidades aqui incluem métodos de inibir crescimento celular anormal ou tratamento de um distúrbio proliferativo em um humano, compreendendo administrar ao humano uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma composição farmacêutica descrita aqui.

[00126] A administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma composição farmacêutica descrita aqui pode ser realizada em diferentes maneiras, p. ex., por administração intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, intramuscular, tópica, intradérmica, intranasal ou intrabronqueal. As composições farmacêuticas aqui podem também ser administradas diretamente em um local de crescimento de célula anormal (direta ou indiretamente contatando-se o crescimento celular anormal), por exemplo, por suprimento biolístico (suprimento biolístico das composições farmacêuticas aqui em um pulmão ou tumor cerebral, por exemplo). Os regimes de dosagem

para administração das composições farmacêuticas aqui serão determinados pelo profissional de cuidados de saúde atendendo ou outra pessoa de habilidade na arte, bem como com base na situação clínica particular. Como é bem sabido nas artes farmacêuticas, as dosagens para qualquer um humano, isto é, paciente, depende de numerosos fatores, incluindo tamanho do paciente, área superficial do corpo do paciente, idade do paciente e saúde geral, sexo do paciente, o tempo e via de administração e presença de um segundo agente terapêutico. Em alguns exemplos, os compostos conjugados de fórmula (I), (III), (IV), (X) e/ou (XI) podem estar presentes em quantidades entre 1 µg e 100 mg/kg de peso corporal por dose (observe-se que, onde infusão contínua for considerada como uma via de administração, tão pouco quanto 1 pg/kg de peso corporal por minuto pode ser considerado). As composições farmacêuticas podem ser administradas uma ou mais vezes por dia e durante um período de dias, semanas, meses ou anos.

[00127] O tratamento de distúrbio ou doença proliferativa, por exemplo, um tumor, inclui métodos de reduzir o tamanho do tumor, provocar necrose ou apoptose em um tumor, matar um tumor, parar o crescimento de um tumor e/ou evitar invasividade ou metástase de um tumor.

[00128] Exemplos de condições médicas que podem ser tratadas de acordo com métodos de inibir o crescimento celular anormal, ou tratar distúrbios proliferativos, incluem: malignidade de qualquer tipo, p. ex., câncer do pulmão, cólon, próstata, rins, pâncreas, fígado, ovário, rins, linfoma, leucemia etc.; doenças autoimunes, por exemplo, lúpus sistêmico, artrite reumatóide, esclerose múltipla; infecções virais, p. ex., infecção CMV, infecção HIV, AIDS, hepatite, infecção HPV; dor; distúrbios mentais; e doenças inflamatórias.

[00129] Como citado acima, as composições farmacêuticas descritas aqui são também úteis na prevenção ou tratamento de infecções virais, dor, doenças inflamatórias, doenças autoimunes etc., em um mamífero.

[00130] Em um aspecto, a descrição provê um método de reduzir, retardar ou parar o crescimento celular anormal, compreendendo contatar a célula anormal com um composto de fórmula (I), (III), (IV), (X) e/ou (XI) em uma quantidade suficiente para retardar, reduzir ou parar o crescimento celular anormal, e em que o crescimento celular anormal é retardado, reduzido ou parado.

[00131] Em um aspecto, a descrição provê um método de matar a célula, compreendendo contatá-la com um composto de fórmula (I), (III), (IV), (X) e/ou (XI) em uma quantidade suficiente para matar a célula e em que a célula é morta.

[00132] Em uma modalidade, a descrição provê um método de matar uma célula, compreendendo contatar a célula com um composto de fórmula (I), (III), (IV), (X) e/ou (XI) em uma quantidade suficiente para matar a célula e em que a célula é morta e ainda em que a célula é uma célula tumoral.

[00133] Em um aspecto, a descrição provê um método para tratamento de um distúrbio médico em um indivíduo sofrendo de distúrbio médico, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo um composto de fórmula (I), (III), (IV), (X) e/ou (XI).

[00134] Em um outro aspecto, a descrição provê um método para tratamento de um distúrbio médico em um indivíduo sofrendo do distúrbio médico, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo um composto de fórmula (I), (III), (IV), (X) e/ou (XI).

[00135] Em uma modalidade, a descrição provê um método para tratamento de um distúrbio médico em um indivíduo sofrendo do distúrbio médico, compreendendo administrr ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo um composto de fórmula (I), (III), (IV), (X) e/ou (XI) e compreendendo ainda administrar sequencial ou consecutivamente

uma terapia adicional.

[00136] Em uma modalidade, a descrição provê métodos em que terapia adicional é terapia de radiação, quimioterapia ou uma combinação de ambas.

[00137] Em uma modalidade, a descrição provê métodos para tratamento de um distúrbio médico em um indivíduo sofrendo do distúrbio médico, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo um composto de fórmula (I), (III), (IV), (X), e/ou (XI) e ainda compreendendo administrar sequencial ou consecutivamente uma terapia adicional e administrar pelo menos um agente terapêutico adicional.

[00138] Em uma modalidade, a descrição provê um método para tratamento de um distúrbio médico em um indivíduo sofrendo do distúrbio médico, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo um composto de fórmula (I), (III), (IV), (X), e/ou (XI) e ainda compreendendo administrar, sequencial ou consecutivamente uma terapia adicional ou administrar, pelo menos um agente terapêutico adicional.

[00139] Em um aspecto, o distúrbio médico tratado é selecionado de tumores, cânceres, doenças infecciosas, doenças neurodegenerativas, distúrbios dos ossos e doenças cardiovasculares.

[00140] As modalidades aqui também proveem métodos de preparar compostos de fórmula (I) de compostos precursores ou blocos de construção de fórmula (V). Em alguns aspectos, os compostos de fórmula (V) podem também ser usados em aplicação terapêutica, onde o composto de fórmula (V) é uma composição farmacêutica. Em alguns aspectos, os compostos de fórmula (V) podem ser incluídos em qualquer uma das composições ou composições farmacêuticas do composto (I), (III), (IV), (X), e/ou (XI).

[00141] Finalmente, as modalidades aqui podem incluir misturas de

compostos como representados pela fórmula (I), (III), (IV), (V), (IX), (X), e/ou (XI).

Produção de Conjugados

[00142] Os compostos conjugados de Ligando-Molécula Biologicamente Ativa podem ser gerados por qualquer técnica conhecida do artífice hábil. O conjugado de Ligando-Molécula Biologicamente Ativa compreende uma unidade de Ligando, uma Molécula Biologicamente Ativa e, opcionalmente, um Ligador que liga a Molécula Biologicamente Ativa e o Ligando. A ligação covalente das Moléculas Biologicamente Ativas e/ou Ligadores com o Ligando pode ser realizada usando-se uma variedade de reações, empregando-se os resíduos aminoácidos do Ligando, p. ex., anticorpo, incluindo os grupos amino de lisina, os grupos ácido carboxílicos livres do ácido glutâmico e aspártico, os grupos sulfidril da cisteína e os vários componentes dos aminoácidos aromáticos.

[00143] Além disso, os conjugados de acordo com as várias modalidades descritas aqui podem ser preparados por qualquer método conhecido na arte. Um protocolo ilustrativo para produzir conjugados é provido nos Exemplos abaixo. Entretanto, outros métodos conhecidos podem ser usados, incluindo, por exemplo, protocolos descritos em WO 2009/134977, Patente U.S. No. 7.811.571 e Patente U.S. No. 6.441.163, contanto que os protocolos sejam usados para preparar os compostos como descrito aqui. Estas referências são incorporadas por referência para sua finalidade pretendida.

[00144] Em uma modalidade, os conjugados podem ser preparados i) reagindo-se um Ligando com o Ligador para formar um composto de Ligando-Ligador modificado; ii) opcionalmente purificando-se o composto de Ligador-Ligando; iii) conjugando-se uma Molécula Biologicamente Ativa, p. ex., um macrolídeo, com o Ligando-Ligador para formar um conjugado de fórmula (I), (III), (IV), (X), e/ou (XI); e iv) purificando-se o conjugado.

[00145] Em uma modalidade, os conjugados podem ser preparados i) reagindo-se uma Molécula Biologicamente Ativa com um primeiro componente do Ligador (Z_1), seguido por sucessivas reações para construir o Ligador, incluindo a adição de Y, X, W, A e Z_2 , ou qualquer combinação deles.

[00146] Em uma modalidade alternativa, os conjugados são preparados reagindo-se um Ligando, Ligador e macrolídeo biologicamente ativo em uma única reação. Uma vez os conjugados de acordo com a invenção sejam preparados, eles podem ser purificados.

Identificação da Citotoxicidade dos Compostos Conjugados

[00147] Em uma modalidade, os compostos conjugados descritos aqui podem ser avaliados quanto a sua capacidade de suprimir proliferação de várias linhagens de células de câncer *in vitro*. Os ensaios de citotoxicidade podem ser conduzidos usando-se métodos conhecidos na arte (vide Widdison et al., J.Med. Chem., 2006, 49 (14), 4392 – 408) e como ilustrado no Exemplo 7 aqui. Por exemplo, os compostos conjugados podem ser aplicados em células de câncer colocadas em lâmina *in vitro* por um predeterminado número de dias e as células sobreviventes medidas em ensaios por métodos conhecidos. Controles apropriados podem ser utilizados para assegurar validade dos resultados como podem os valores IC_{50} . Exemplos de potência *in vitro* de compostos conjugados aqui podem ser vistos nas Figuras 1 e 2. Eficácia *in vitro* adicional pode ser usada para confirmar a potência dos compostos conjugados propostos - por exemplo, usando-se um modelo de camundongos nus.

[00148] A especificação, exemplos e dados acima proveem uma descrição completa da manufatura e uso da composição da invenção. Uma vez que muitas modalidades da invenção podem ser feitas sem desvio de seu espírito e escopo, a invenção reside nas reivindicações a seguir anexas.

[00149] Todas as referências citadas aqui e nos Exemplos que seguem

são expressamente incorporadas por referência em suas totalidades.

[00150] A descrição e Exemplos apresentados infra são providos para ilustrar a invenção assunto. Uma pessoa hábil na arte reconhecerá que estes exemplos são providos por meio de ilustração somente e não são incluídos para fins de limitação da invenção.

EXEMPLOS

Detalhes Experimentais

[00151] Espectros NMR de próton (para compostos que não puderam ser detectados por UV) foram adquiridos em um instrumento Varian Inova de 300 MHz, enquanto os espectros de massa foram coletados em um LC/MSD Agilente série 1100 com fonte de ionização de eletropulverização e analisador de aprisionamento de íon triplo-quad. Apropriados conjugados foram analisados usando-se um espectrômetro de massa MALDI-TOF-TOF Bruker ultraFleXtreme. Todos os materiais de partida e solventes foram comprados comercialmente e usados sem purificação, a menos que de outro modo citado.

EXEMPLO 1

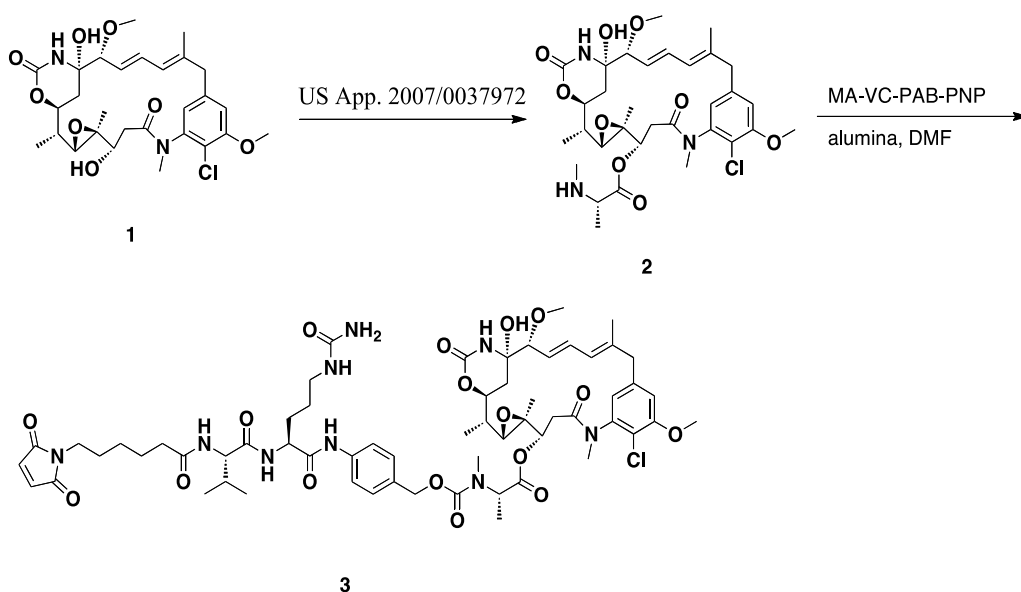
Etapa 1: Maitansina-3-N-metil-L-alanina (2)

[00152] O composto do título foi preparado como um sólido de ouro de maitasinol (1), usando-se os métodos descritos no Pedido de Patente U.S. 2007/0037972 A1. MS (ESI, pos.): calculado para $C_{32}H_{44}ClN_3O_9$, 649,3; encontrado 650,6 (M+H).

Etapa 2: Maitansina-3-N-metil-L-(S)-alanina-N-[4-(amino-citrulina-valina-hexanamida-6-maleimidil)benzil]carbamato (3):

[00153] O produto da etapa precedente (2, 0,020 g, 0,031 mmol) e p-NO₂-Ph-carbonato-Bn-Cit-Val-maleimida (MA-VC-PAB-PNP, 0,027 g, 0,037 mmol; Concertis Biosystems) foram dissolvidos em N,N-dimetilformamida (DMF, ca. 0,25 mL) em um frasco cônico, tratados com alumina básica BrockmannI (0,10 g), o frasco purgado com argônio e a reação agitada em temperatura ambiente por 4 dias. A mistura foi então filtrada, os

sólidos lavados com acetonitrila/água e o filtrado purificado diretamente em uma coluna Phenomex Gemini C18 de 5 μ , 30 x 150 mm via HPLC (30 – 90% acetonitrila em água, 0,1% TFA em ambos, durante 25 min, 15 mL/min). Liofilização das frações mais puras durante a noite forneceu o composto do título como um sólido amarelo pálido (0,021 g, 55%). MS (ESI, pos.): calculado para C₆₁H₈₂ClN₉O₁₇, 1247,6; encontrado 1248,8 (M+H), 1270,7 (M+Na), 1231,5 (M-H₂O+H).



EXEMPLE 2

Etapa 1: N-terc-Butoxicarbonil-beta-alanina succinato éster (4)

[00154] O composto do título foi preparado de Boc- β -alanina comercial por um método bem conhecido na arte (*c.f.*- Widdison et al., J. Med. Chem., 2006, 49 (14), 4401). RMN 1H (300 MHz, CDCl₃): δ 3,62 (bm, 2H), 2,88 (m, 9H), 1,47 (s, 9H).

Etapa 2: Maitansina-3-N-metil-L-(S)-alanina-Boc- β -Ala (5)

[00155] O produto da Etapa precedente (4, 0,45 g, 1,51 mmol) e Maitansina-3-N-metil-L-alanina (2, 0,30 g, 0,23 mmol) foram dissolvidos em 3:1 acetonitrila:água (8 mL), tratados com NaHCO₃ aquoso 1M (0,5 mL), e agitados em temperatura ambiente por 18h. Quando a reação estava completa por TLC, foi então agitada com salmoura por 10 min e extraída tres vezes com acetato de etila (EtOAc). As camadas orgânicas combinadas foram então

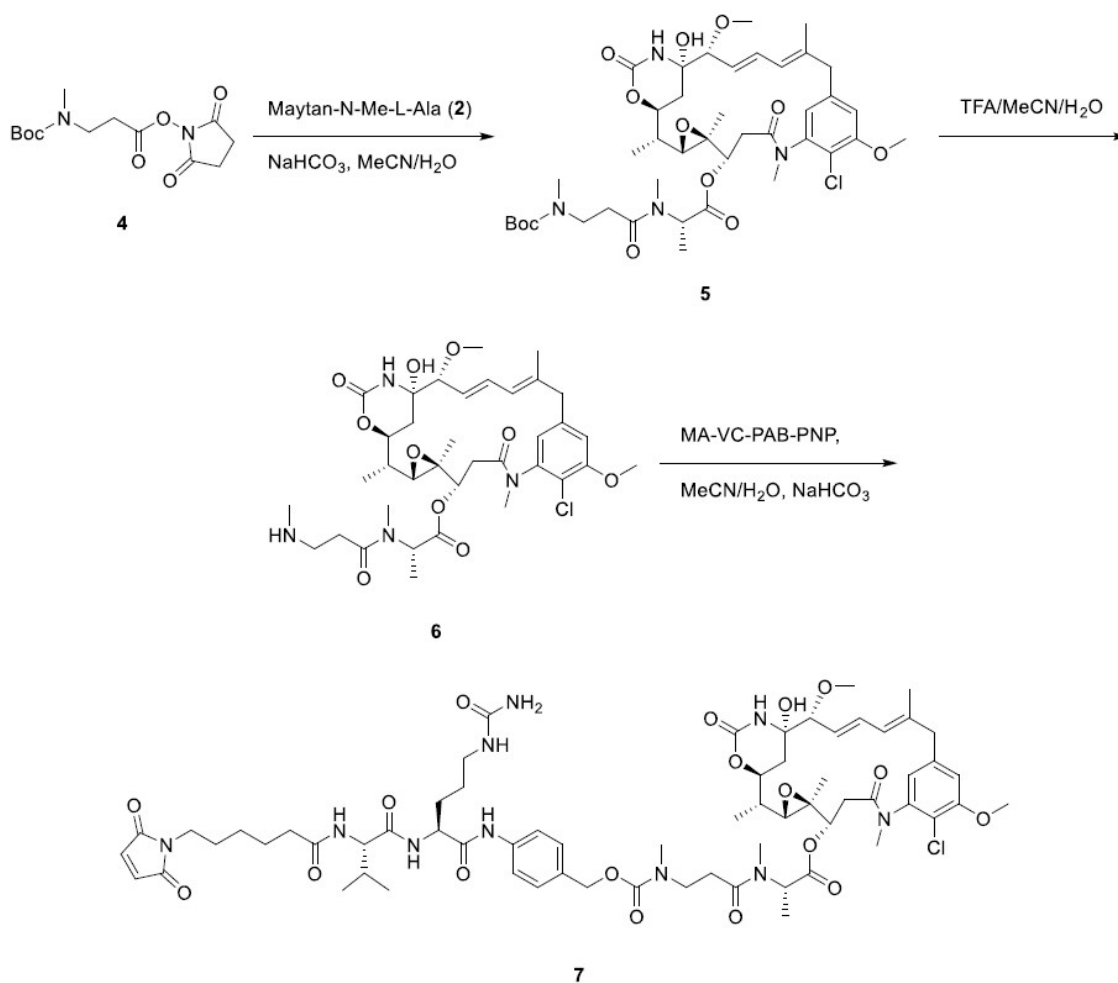
secadas sobre Na₂SO₄, filtradas, e o filtrado concentrado e secado *in vacuo* em um xarope de ouro que foi purificado por cromatografia de coluna flash em um cartucho de gel de sílica de 20 g (0 – 10% MeOH em EtOAc durante 15 min) fornecendo o composto do título como um sólido branco (0,084 g, 43%). MS (ESI, pos.): calculado para C₄₁H₅₉ClN₄O₁₂, 834,4; encontrado 835,2 (M+H), 857,2 (M+Na), 817,4 (M-H₂O+H).

Etapa 3: Maitansina-3-N-metil-L-(S)-alanina-β-Ala (6)

[00156] O produto da Etapa precedente (**5**, 0,080 g, 0,095 mmol) foi dissolvido em uma mistura 3:1:1 de acetonitrila/água/ácido trifluoroacético (4 mL) e agitado em temperatura ambiente por 26 horas. A mistura de reação bruta foi injetada diretamente em uma coluna de gel de sílica C18 de 40 g e eluída via ISCO CombiFlash (10 – 90% acetonitrila em água, 0,1% TFA em cada solvente, durante 18 min, 40 mL/min), e as frações puras combinadas foram liofilizadas para fornecer o composto do título como um sólido amarelo pálido (0,025 g, 31%). MS (ESI, pos.): calculado para C₃₆H₅₁ClN₄O₁₀, 734,3; encontrado 735,5 (M+H).

Etapa 4: Maitansina-3-N-metil-L-(S)-alanina-propanamidil-3-N-metil-N-[4-(amino-citrulina-valina-hexanamida-6-maleimidil)benzil] carbamato (7)

[00157] O produto da Etapa precedente (**6**, 0,014 g, 0,019 mmol) e MA-VC-PAB-PNP (0,020 g, 0,027 mmol; Concortis Biosystems) foram dissolvidos em 4:1 acetonitrila/água (2,5 mL), tratados com NaHCO₃ aquoso 0,1M (0,5 mL), e agitados em temperatura ambiente por 18 h. A reação foi purificada diretamente por cromatografia de fase inversa em sílica C18 (usando-se 0,1% TFA em gradientes de acetonitrila/água). Liofiliação das frações de coluna finais forneceu o composto do título como um sólido branco (0,002 g, 8%). MS (ESI, pos.): calculado para C₆₅H₈₉ClN₁₀O₁₈, 1332,6; encontrado 1333,9 (M+H), 1316,5 (M-H₂O+H), 1355,9 (M+Na).



EXEMPLO 3

Etapa 1: 3-Éster de succinato de ácido metilditio-propiónico (**8**)

[00158] O composto do título foi preparado como um sólido branco de ácido 3-mercaptopropiónico usando-se os métodos de Widdison et al. J. Med. Chem., 2006, 49 (14), 4392-4408. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 3,09 (m, 2H), 3,01 (m, 2H), 2,86 (s, 4H), 2,44 (s, 3H).

Etapa 2: Maitansina-3-N-metil-L-(S)-alanina-propanamidil-3-metildissulfeto (**9**)

[00159] O produto da Etapa precedente (**8**, 2,96 g, 11,9 mmol) e Maitansina-3-N-metil-L-alanina (**2**, 1,54 g, 2,37 mmol) foram dissolvidos em 4:1 acetonitrila/água (25 mL), tratados com NaHCO_3 aquoso saturado (2 mL), e agitados em temperatura ambiente por 24 horas. A mistura de reação foi tratada com salmoura, extraída três vezes com EtOAc, a camaa aquosa saturada com NaCl, extraída novamente com EtOAc, e as camadas orgânicas

combinadas secadas sobre Na_2SO_4 , e filtradas. O filtrado foi concentrado in vacuo em um xarope de ouro (ca. 4,5 g) que foi purificado por cromatografia de coluna flash em um cartucho de gel de sílica de 80 g (0 – 100% EtOAc em hexanos durante 30 min) fornecendo o composto do título como um sólido branco (1,14 g, 61%). MS (ESI, pos.): calculado para $\text{C}_{36}\text{H}_{50}\text{ClN}_3\text{O}_{10}\text{S}_2$, 783,3; encontrado 784,3 (M+H), 766,6 (M-H₂O+H).

Etapa 3: Maitansina-3-N-metil-L-(S)-alanina-propanamida-3-tiol (10)

[00160] O composto do título foi preparado usando-se uma versão modificada do método descrito por Whitesides et al. (J. Org. Chem., 1991, 56, 2648-2650). O produto da Etapa precedente (**9**, 2,42 g, 3,09 mmol) foi dissolvido em acetonitrila (30 mL), tratado com uma solução de cloridreto de tris(2-carboxietil)fosfina (8,23 g, 28,7 mmol) em água (30 mL), o pH elevado a 3 com a adição de NaHCO_3 aquoso saturado (5 mL), o frasco purgado com Ar, e a reação agitada em temperatura ambiente sob um septo de borracha (ventilado devido à efervescência). Após 2 horas, a reação foi tratada com salmoura (ca. 100 mL), borbullhada com Ar por 5 min (para remover o metilmercaptano livre), e as fases separadas. A fase aquosa foi extraída duas vezes com EtOAc, saturada com NaCl e extraída duas vezes mais com EtOAc. As camadas orgânicas combinadas foram então secadas sobre Na_2SO_4 , filtradas, e o filtrado concentrado e secado in vacuo para fornecer o composto do título como um sólido branco (2,24 g, 98%). MS (ESI, pos.): calculado para $\text{C}_{35}\text{H}_{48}\text{ClN}_3\text{O}_{10}\text{S}$, 737,3; encontrado 738,3 (M+H), 720,3 (M-H₂O+H).

Etapa 4: 4-Amino-(N-benziloxicarbonil)benzilamina (14)

[00161] 4-Aminobenzilamina (1,00 g, 8,18 mmol) e trietilamina (1,20 mL, 8,61 mmol) foram dissolvidas em tetraidrofurano anidro (THF, 10 mL) sob N_2 , esfriadas em um banho de gelo de salmoura com agitação, e tratadas em gotas durante 20 min com uma solução de benzil cloroformato (1,20 mL, 8,41 mmol) em THF anidro (10 mL). Após a adição estar completa, o banho de gelo foi removido e a reação foi agitada em temperatura ambiente por 20

horas, em seguida filtrada através de um funil de vidro sinterizado para remover insolúveis. Os sólidos foram lavados com EtOAc, o filtrado evaporado in vacuo, e o resíduo purificado por cromatografia de coluna flash em uma coluna de gel de sílica de 40 g (0 - 100% EtOAc em hexanos, durante 20 min, 40 mL/min). Evaporação das meias frações em realização in vacuo forneceu o composto do título como um sólido amarelo claro (1,47 g, 70%). MS (ESI, pos.): calculado para $C_{15}H_{16}N_2O_2$, 256,1; encontrado 256,9 (M+H), 278,9 (M+Na).

Etapa 5: 6-Éster de succinato de ácido maleimidexanóico (20)

[00162] O composto do título foi preparado como uma goma incolor do ácido 6-aminocapróico comercial por um método similar àquele de Marnett et al. (J. Med. Chem., 1996, 39, 1692-1703). RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6,72 (s, 2H), 3,56 (t, 2H, $J = 7$ Hz), 2,86 (s, 4H), 2,64 (t, 2H, $J = 7$ Hz), 1,81 (penteto, 2H, $J = 8$ Hz), 1,66 (m, 2H), 1,45 (m, 2H).

Etapa 6: Boc-valina-succinato (11)

[00163] O composto do título foi preparado como um sólido branco de Boc-Val-OH por um método bem conhecido na arte (*c.f.*- Widdison et al., J. Med. Chem., 2006, 49 (14), 4401). RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 5,03 (d, 1H, $J = 10$ Hz), 4,60 (dd, 1H, $J = 9$ Hz, 5 Hz), 2,85 (s, 4H), 2,32 (m, 1H), 1,47 (s, 9H), 1,05 (m, 6H).

Etapa 7: Boc-valina-citrulina (12)

[00164] O produto da Etapa precedente (**11**, 4,23 g, 13,5 mmol) foi dissolvido em acetonitrila (70 mL), tratado com uma solução de L-citrulina (3,20 g, 18,3 mmol) em água (30 mL) e uma solução saturada de $NaHCO_3$ (18 mL), frasco purgado com N_2 , e reação agitada em temperatura ambiente por 24 horas. A mistura foi concentrada in vacuo para remover a acetonitrila, lavada uma vez com EtOAc para remover impurezas não-polares, e a camada aquosa saturada com NaCl e acidificada a pH 3 com 10% HCl. A mistura turva resultante foi extraída quatro vezes com 10% isopropanol em EtOAc, as

camadas orgânicas combinadas secadas sobre Na₂SO₄, e filtradas. A concentração e secagem do filtrado in vacuo forneceram o composto do título como um sólido branco (4,53 g, 90%). MS (ESI, neg.): calculado para C₁₆H₃₀N₄O₆, 374,2; encontrado 373,0 (M-H).

Etapa 8: Boc-valina-citrulina-amino-4-benzilamino-N-benziloxicarbamato (15)

[00165] O produto da Etapa precedente (**12**, 3,08 g, 8,23 mmol) foi dissolvido em N,N-dimetilformamida (DMF, 30 mL, secado sobre peneiras moleculares), tratados com diciclohexilcarbodiimida (DCC, 2,31 g, 11,2 mmol) e hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt, 1,51 g, 11,2 mmol), o frasco purgado com N₂ e agitado, em temperatura ambiente por 1 hora. Uma solução de 4-amino-(N-benziloxicarbonil)benzilamina (**14**, 2.30 g, 8.97 mmol) em DMF (15 mL) foi então adicionada, e a reação agitada por outros 3 dias., filtradas sobre um funil de vidro sinterizado, e os sólidos lacados com etil acetato. O filtrado foi lavado com 1:1 água/NaHCO₃ saturado (100 mL), a camada aquosa extraída três vezes com 10% isopropanol/EtOAc, e as camadas orgânicas combinadas lavadas com salmoura, secadas sobre Na₂SO₄, e filtradas. Durante a filtração, um gel insolúvel formou-se que foi dissolvido com metanol/EtOAc. A concentração do filtrado in vacuo forneceu um gel ouro gomoso, que foi tratado com dietil éter (50 mL), sonicação, filtrado e secado por sucção em um sólido amarelo pálido. Este foi purificado por cromatografia de coluna flash em uma coluna de gel de sílica de 330 g (0 - 10% metanol em diclorometano, 100 mL/min) fornecendo o composto do título como um sólido amarelo pálido (4,07 g, 81%). MS (ESI, pos.): calculado para C₃₁H₄₄N₆O₇, 612,3; encontrado 613,4 (M+H)

Etapa 9: Boc-valina-citrulina-amino-4-benzilamina (16)

[00166] O produto da Etapa precedente (**15**, 3,04 g, 4,96 mmol) e 10% paládio (0) sobre carvão ativado (0,286 g, 0,269 mmol) foram tratados sob Corrente de N₂ com metanol (50 mL) e ácido acético glacial (0,57 mL, 9,95

mmol), a reação borbulhada alguns minutos cada com N₂ em seguida hidrogênio, e agitada vigorosamente sob um balão de hidrogênio em temperatura e pressão ambientes por 1 hora. Quando a reação estava completa por TLC, o balão foi removido, a suspensão borbulhada diversos minutos com N₂, e filtrada através de Celite 521. Celite foi lavado com metanol, o filtrado evaporado à secura in vacuo, e o resíduo triturado uma vez com dietil éter e secado sob alto vácuo fornecendo o composto do título como um sólido branco (2,95 g, 99%). MS (ESI, pos.): calculado para C₂₃H₃₈N₆O₅, 478,3; encontrado 479,2 (M+H).

Etapa 10: Boc-valina-citrulina-amino-4-benzilisotiocianato (17)

[00167] O produto da Etapa precedente (**16**, 0,586 g, 0,979 mmol) foi dissolvido em tetraidrofurano seco (20 mL) e N,N-dimetilformamida seco (5 mL) sob N₂, tratado com trietilamina (0,40 mL, 2,87 mmol), esfriado em um banho de gelo e traado em gotas com dissulfeto de carbono (0,10 mL, 1,66 mmol) durante 5 min. A reação foi aquecida à temperatura ambiente e agitada por 2 horas, esfriada novamente em gelo, e tratada com p-toluenesulfonil cloreto (0,281 g, 1,47 mmol). Após aquecer à temperatura ambiente e agitar por 18 horas, a reação foi lavada com 1:1 água/salmoura, extraída duas vezes com etil acetato, a camada aquosa saturada com NaCl, extraída duas vezes mais com EtOAc, e as camadas orgânicas combinadas lavadas com salmoura, secadas sobre Na₂SO₄, e filtradas. O filtrado evaporado foi purificado por cromatografia de coluna flash em uma coluna de 20 g de gel de sílica (0 - 100% acetonitrila em EtOAc, 35 mL/min) fornecendo o composto do título como um sólido ouro (0,391 g, 77%), após azeotropagem com diclorometano e secagem sob alto vácuo. MS (ESI, pos.): calculado para C₂₄H₃₆N₆O₅S, 520,3; encontrado 521,1 (M+H).

Etapa 11: Maitansina-3-N-metil-L-(S)-alanina-propanamidil-3-N-[4-(amino-citrulina-Boc-valina)-benzil]-ditiocarbamato (18)

[00168] O produto da Etapa precedente (**17**, 0,068 g, 0,131 mmol) e

Maitansina-3-N-metil-L-(S)-alanina-propanamida-3-tiol (**10**, 0,048 g, 0,065 mmol) foram dissolvidos em THF seco (3 mL) sob Ar, tratados com trietilamina (0,050 mL, 0,359 mmol) via seringa, e agitados em temperatura ambiente sob septo de boracha por 18 horas. A reação foi concentrada *in vacuo*, dissolvida em 10% isopropanol/etil acetato, e lavada com 0,5N HCl aquoso. A camada aquosa foi extraída três vezes com 10% IPA/EtOAc, as camadas orgânicas combinadas lavadas com salmoura, secadas sobre Na₂SO₄, e filtradas. O filtrado evaporado foi purificado por cromatografia de coluna flash em uma coluna de gel de sílica de 12 g (0 - 20% metanol em EtOAc, 30 mL/min) fornecendo o composto do título como um sólido branco (0,042 g, 51%). MS (ESI, pos.): calculado para C₅₉H₈₄ClN₉O₁₅S₂, 1257,5; encontrado 1258,8 (M+H), 1241,5 (M-H₂O+H), 1280,6 (M+Na).

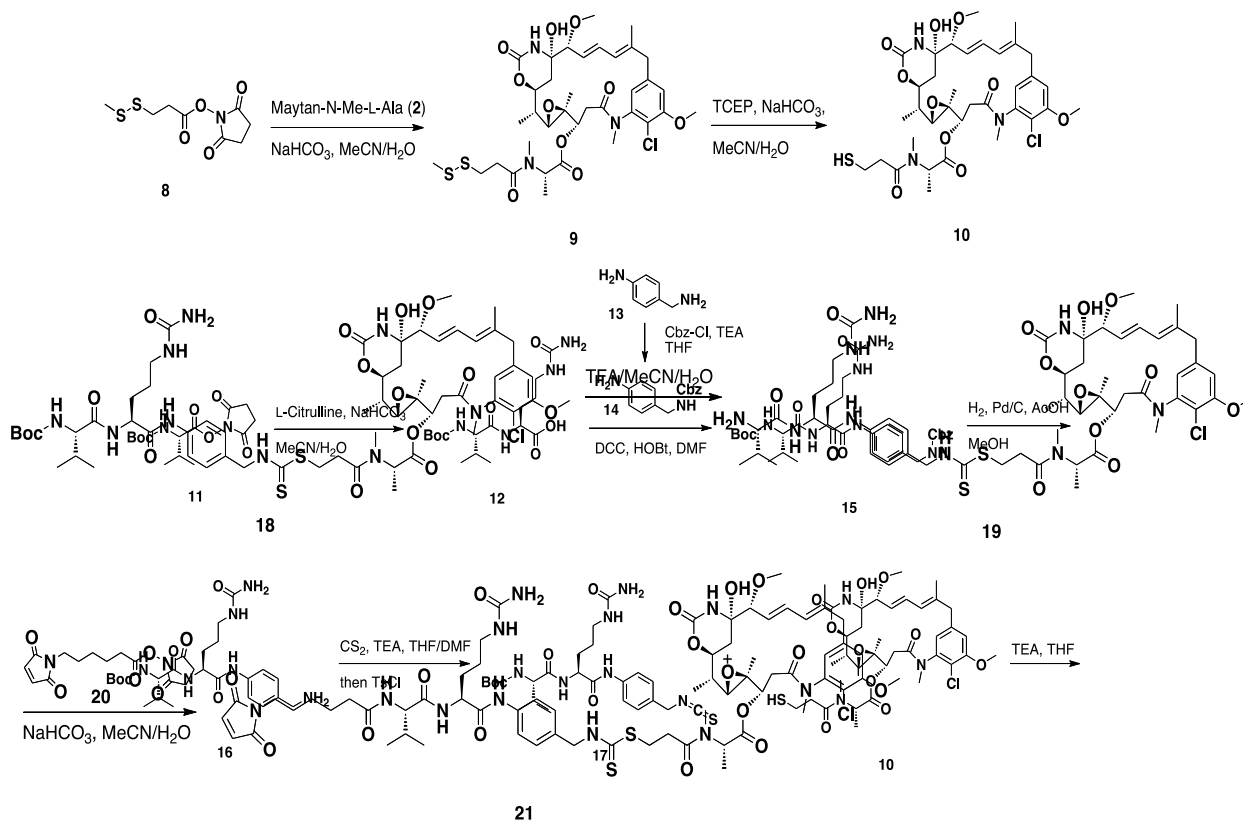
Etapa 12: Maitansina-3-N-metil-L-(S)-alanina-propanamidil-3-N-[4-(amino-citrulina-valina)-benzil]-ditiocarbamato (19)

[00169] O composto do título foi preparado como um sólido ouro (0,016 g, 100%) do produto da etapa precedente (**18**, 0,014 g, 0,011 mmol) pelo método do exemplo 2, Etapa 3 (composto **6**). O composto foi usado sem mais purificação. MS (ESI, pos.): calculado para C₅₄H₇₆ClN₉O₁₃S₂, 1157,5; encontrado 1159,4 (M+H).

Etapa 13: Maitansina-3-N-metil-L-(S)-alanina-propanamidil-3-N-[4-(amino-citrulina-valina-hexanamida-6-maleimidil)benzil]-ditiocarbamato (21)

[00170] O produto da Etapa precedente (**19**, 0,055 g, 0,032 mmol) foi dissolvido em 1:1 acetonitrila/água (4 mL), tratado com 1N aq. NaHCO₃ (0,5 mL) e uma solução de 6-éster de succinato de ácido maleimidexanóico-6 (**20**, 0,070 g, 2,27 mmol) em acetonitrila (6 mL), e o frasco purgado com Ar sob septo de borracha. Após a reação agitada em temperatura ambiente por 5 horas, ela foi armazenada a -20°C por 3 dias antes de aquecer novamente à temperatura ambiente e diluir com salmoura. A mistura foi extraída três vezes com acetato de etila, as camadas orgânicas combinadas secadas sobre

Na_2SO_4 , e filtradas. O filtrado evaporado foi purificado por cromatografia de coluna flash em uma coluna de gel de sílica de 12 g (0 - 20% metanol em EtOAc durante 18 min, 25 mL/min) fornecendo o composto do título como um sólido amarelo pálido (0,011 g, 26%). MS (ESI, pos.): calculado para $\text{C}_{64}\text{H}_{87}\text{ClN}_{10}\text{O}_{16}\text{S}_2$, 1350,5; encontrado 1352,0 (M+H), 1334,5 (M-H₂O+H), 1373.5 (M+Na).



EXEMPLO 4

Etapa 1: *N*-(4-Aminometil-fenil)-acetamida hidrocloreto (23)

[00171] O composto do título foi preparado como um sólido amarelo claro de 4-aminobenzilamina pelo método de King et al. (J. Am. Chem. Soc., 1992, 114(8), 3033). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.18 (s, 1H), 8,36 (br s, 3H), 7.63 (d, 2H, *J* = 8,7 Hz), 7,41 (d, 2H, *J* = 8,7 Hz), 3,95 (s, 2H), 2,06 (s, 3H).

Etapa 2: *N*-(4-Isotiocianatometil-fenil)-acetamida (24)

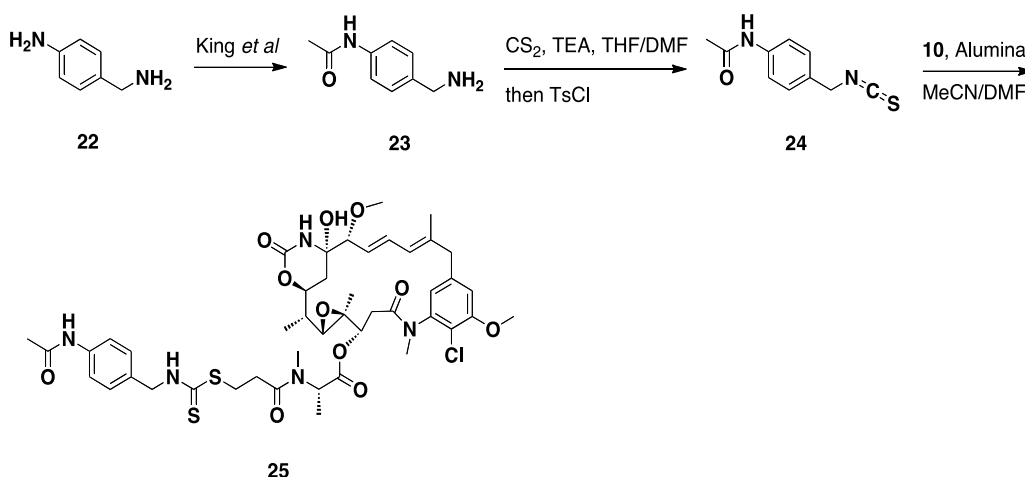
[00172] O produto da Etapa precedente (23, 0,277 g, 1,38 mmol) foi dissolvido em THF (4,5 mL) e DMF (2,0 mL), esfriado em gelo sob N₂,

tratado com trietilamina (0,66 mL, 4,73 mmol), em seguida tratado em gotas com dissulfeto de carbono (0,125 mL, 2,07 mmol). A reação foi aquecida à temperatura ambiente, agitada por 3 horas, então esfriada novamente em gelo. Após tratar com p-toluenesulfonil cloreto (0,274 g, 1,45 mmol), a reação aqueceu lentamente à temperatura ambiente, enquanto agitando por 18 horas. A mistura foi diluída com água, acidificada a pH 2 com 10% HCl aq., e extraída três vezes com EtOAc. As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura, secadas sobre Na₂SO₄, e filtradas. O filtrado evaporado foi purificado por cromatografia de coluna flash em uma coluna de 20 g de gel de sílica (0 - 50% acetonitrila em EtOAc durante 20 min, 30 mL/min) fornecendo o composto do título como um sólido colorido creme (0,157 g, 55%). RMN 1H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,55 (d, 2H, J = 8,7 Hz), 7,29 (m, 3H), 4,70 (s, 2H), 2,23 (s, 3H).

Etapa 3: Maitansina-3-N-metil-L-(S)-alanina-propanamidil-3-N-[4-(acetamidil)benzil]-ditio-carbamato (25)

[00173] O produto da Etapa precedente (**24**, 0,093 g, 0,45 mmol) e o produto do exemplo 3, Etapa 3 (**10**, 0,070 g, 0,095 mmol) foram dissolvidos em acetonitrila (MeCN, 2 mL) e DMF seco (1 mL), e tratados com alumina básica (ativada, Brockmann I, 0,357 g). Após purgar o frasco com argônio, a reação foi agitada em temperatura ambiente por 2 dias, filtrada, e os sólidos lavados com metanol/acetonitrila. O filtrado evaporado foi purificado por cromatografia de coluna flash em uma coluna de gel de sílica de 12 g (0 - 50% acetonitrila em EtOAc durante 15 min, 25 mL/min) e as frações de produto mais lentas concentradas in vacuo a uma goma amarelo pálido impura. Esta foi purificada por RP-HPLC (coluna Phenomenex Gemini C18, 30x150mm, 30 - 90% acetonitrila em água, 0,1% TFA em ambas) e as frações puras foram liofilizadas fornecendo o composto do título como um sólido branco (0,016 g, 18%). MS (ESI, pos.): calculado para C₄₅H₅₈ClN₅O₁₁S₂, 943,3; encontrado 944,7 (M+H), 927,1 (M-H₂O+H), 966,6

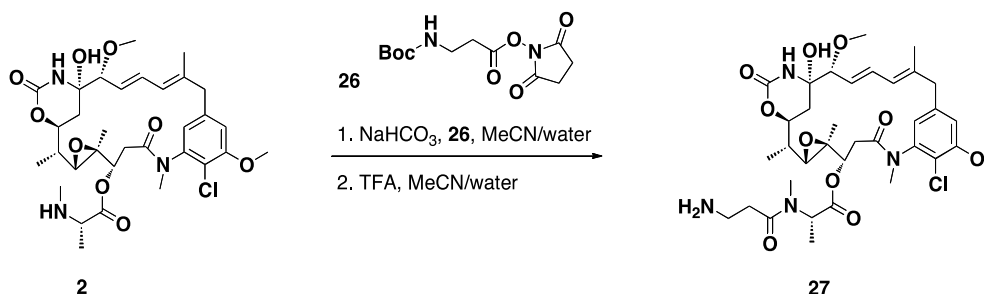
(M+Na).



EXEMPLO 5

Maitansina-3-N-metil-L-(S)-alanina-β-alanina (27)

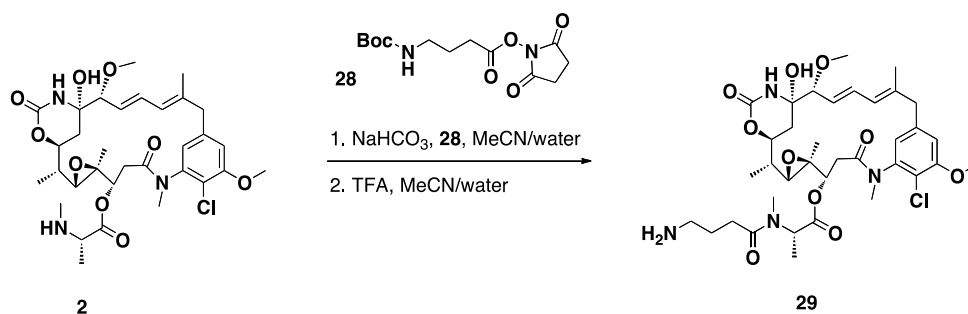
[00174] O composto do título foi preparado como um sólido amarelo pálido de 2,5-dioxopirrolidin-1-il 3-((terc-butoxicarbonil)amino)propanoato (26) pelo método do exemplo 2, Etapas 1-3. MS (ESI, pos.): calculado para C₃₅H₄₉ClN₄O₁₀, 720,3; encontrado 721,4 (M+H).



MÉTODO 6

Maitansina-3-N-metil-L-(S)-alanina-γ-aminobutiramida (29)

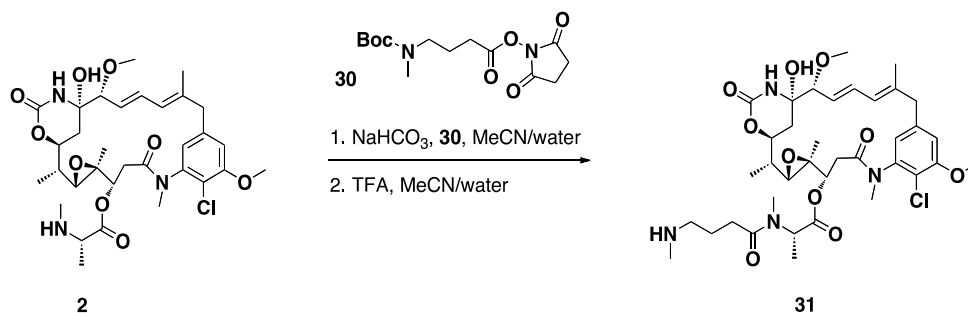
[00175] O composto do título foi preparado como um sólido amarelo pálido de N-Boc-GABA-OH (28) pelo método do exemplo 2, Etapas 1-3. MS (ESI, pos.): calculado para C₃₆H₅₁ClN₄O₁₀, 734,3; encontrado 735,5 (M+H).



EXEMPLO 7

Maitansina-3-N-metil-L-(S)-alanina-N-Me-y-aminobutiramida (31)

[00176] O composto do título foi preparado como um sólido amarelo pálido de N-Boc-N-Me GABA-OH (**30**) pelo método do exemplo 2, Etapas 1-3. MS (ESI, pos.): calculado para C₃₇H₅₃ClN₄O₁₀, 748,4; encontrado 749,5 (M+H).



EXEMPLO 8

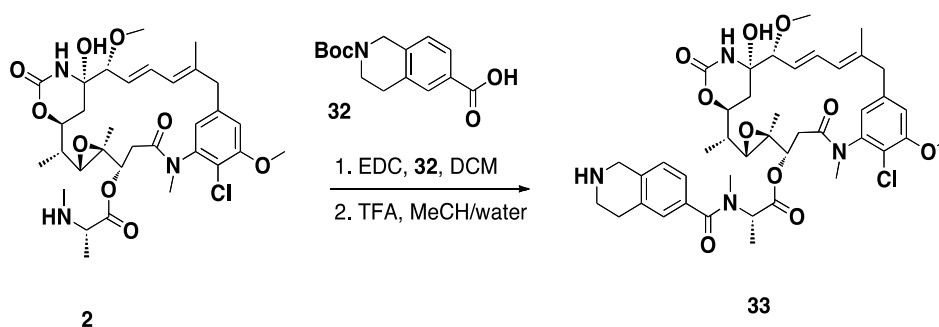
Etapa 1: Maitansina-3-N-metil-L-(S)-alanina-N-carboxi-6-[3,4-diidro-2-(terc-butoxicarbonil)-1H-isoquinolina]

[00177] Maitan-3-N-metil-L-(S)-alanina (2, 0,034 g, 0,052 mmol), ácido N-Boc-1,2,3,4-tetraidroisoquinolina-6-carboxílico comercial (32, 0,019 g, 0,069 mmol), e cloridreto de 1-(3-Dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC, 0,024 g, 0,125 mmol) foram pesados dentro de um frasco de fundo redondo com barra agitadora, dissolvidos em diclorometano (3 mL), o frasco purgado com Ar e selado com um septo de borracha, e a reação agitada em temperatura ambiente. Após 2 dias, a reação foi diluída com EtOAc e lavada com NaHCO₃ diluído aq., e a camada aquosa foi extraída duas vezes com EtOAc. As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura, secadas sobre Na₂SO₄, e filtradas. O filtrado evaporado foi então purificado em uma coluna de gel de sílica RediSep Gold de 12 g via O sistema ISCO (EtOAc – 5:5:1 EtOAc/DCM/MeOH durante 12 mins, 30 mL/min), e as frações puras-TLC combinadas evaporadas e secadas in vacuo, fornecendo o composto do título como um sólido pálido (0,026 g, 55%). MS (ESI, pos.): calculado para C₄₇H₆₁ClN₄O₁₂, 908,4; encontrado 909,2 (M+H), 891,2 (M-

H₂O+H).

Etapa 2: Maitansina-3-N-metil-L-(S)-alanina-N-carbóxi-6-(1,2,3,4-tetraidroisoquinolina) (33)

[00178] O composto do título foi preparado como um sólido branco (0,013 g, 52%) do produto da etapa precedente (0,025 g, 0,027 mmol) pelo método do exemplo 2, Etapa 3 (composto **6**). MS (ESI, pos.): calculado para C₄₂H₅₃ClN₄O₁₀, 808,3; encontrado 809,2 (M+H).



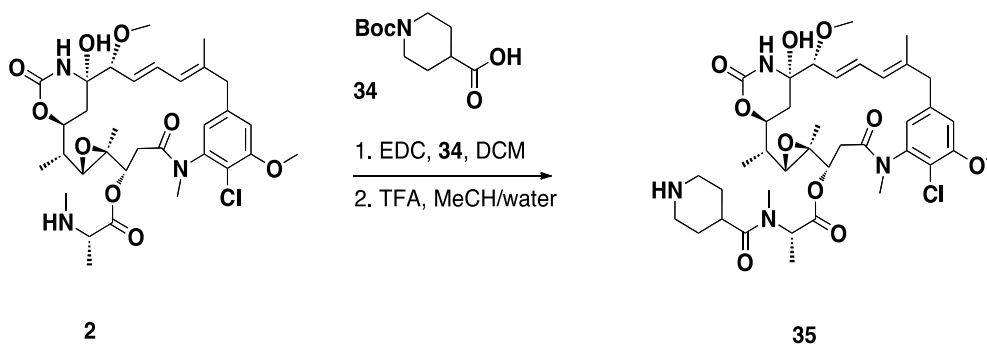
EXEMPLO 9

Etapa 1: Maitansina-3-N-metil-L-(S)-alanina-N-carbóxi-4-[1-(terc-butoxicarbonil)-piperidina]

[00179] O composto do título foi preparado como um sólido branco (0,027 g, 46%) de maitan-3-N-metil-L-(S)-alanina (**2**, 0,045 g, 0,069 mmol) e ácido 1-t-butoxicarbonilpiperidina-4-carboxílico comercial (**34**, 0,024 g, 0,105 mmol) pelo método do exemplo 8, Etapa 1. MS (ESI, pos.): calculado para C₄₃H₆₁ClN₄O₁₂, 860,4; encontrado 861,2 (M+H), 843,2 (M-H₂O+H).

Etapa 2: Maitansina-3-N-metil-L-(S)-alanina-N-carbóxi-4-piperidina (35)

[00180] O composto do título foi preparado como um sólido branco (0,012 g, 50%) do produto da etapa precedente (0,025 g, 0,029 mmol) pelo método do exemplo 2, Etapa 3 (composto **6**). The composto purificado em uma coluna C18 usando-se um diferente gradiente e modificador (20 - 80% MeCN em água, 0.05% acetic acid em ambos). A liofilização das frações puras forneceu o composto do título (0,008 g, 35%). MS (ESI, pos.): calculado para C₃₈H₅₃ClN₄O₁₀, 760,3; encontrado 761,2 (M+H).



EXEMPLO 10

Etapa 1: Maitansina-3-N-metil-L-(S)-alanina- N-metil-beta-alanina-N-[4-(terc-butoxicarbonil-valina-citrulina-amino)benzilóxi]-carbamato

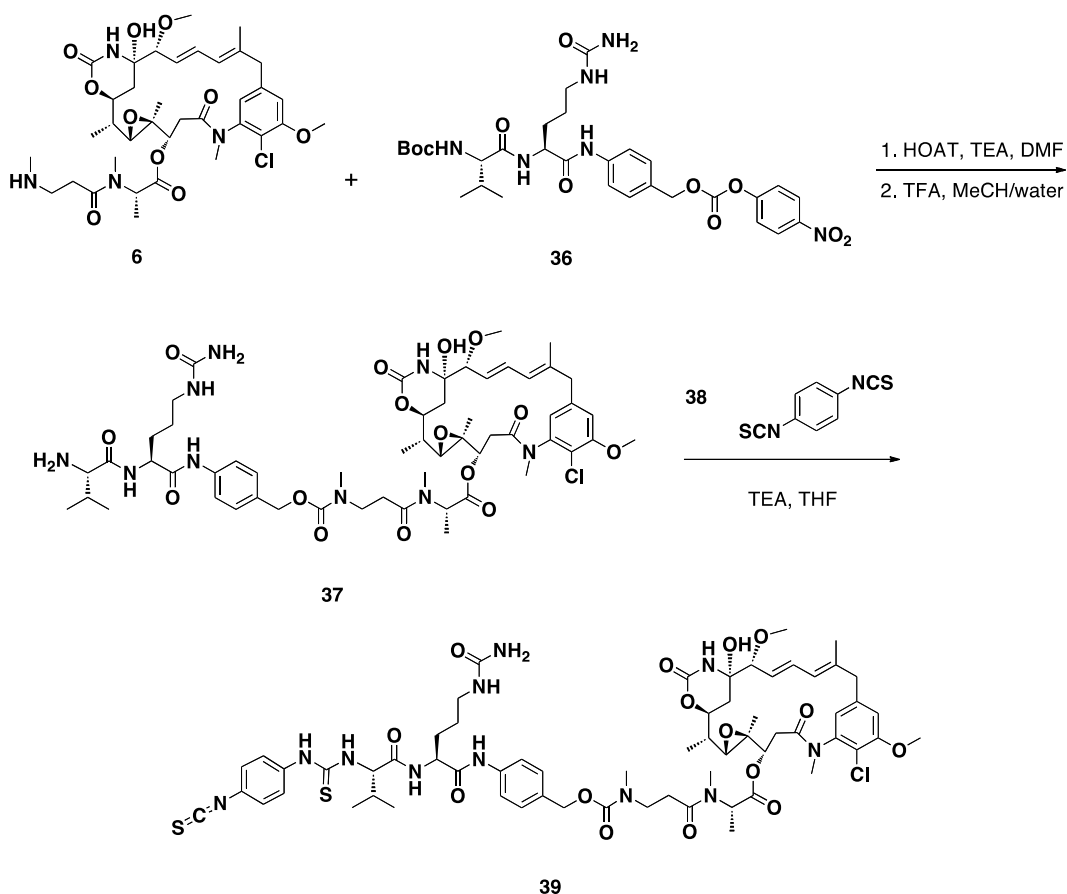
[00181] O Boc-valina-citrulina-p-aminobenzilóxi-(p-nitrofenilóxi)-carbonato (**36**), preparado de acordo com WO 2005112919, (0,092 g, 0,143 mmol), o produto do exemplo 2, Etapa 3 (**6**, 0,110 g, 0,130 mmol), e 1-Hidróxi-7-azabenzotriazol (HOAT, 0,037 g, 0,272 mmol) foram dissolvidos em DMF (7 mL), tratados com trietilamina (0,100 mL, 0,717 mmol), e agitados em temperatura ambiente em um frasco tampado. Após 18 horas, a mistura de reação foi concentrada em um óleo in vacuo, dissolvida em diclorometano, e purificada em uma coluna RediSep Gold 24 g via ISCO Combiflash (0 – 20% metanol em etil acetato). Evaporação do produto in vacuo então forneceu o composto do título como um sólido amarelo pálido (0,129 g, 80%). MS (ESI, pos.): calculado para $\text{C}_{60}\text{H}_{86}\text{ClN}_9\text{O}_{17}$, 1239,6; encontrado 1240,8 (M+H).

Etapa 2: Maitansina-3-N-metil-L-(S)-alanina- N-metil-beta-alanina-N-[4-(valina-citrulina-amino)benzilóxi]-carbamato (37)

[00182] O composto do título foi preparado como um sólido branco (0,074 g, 63%) do produto da etapa precedente (0,128 g, 0,103 mmol) pelo método do exemplo 2, Etapa 3 (composto **6**). MS (ESI, pos.): calculado para $\text{C}_{55}\text{H}_{78}\text{ClN}_9\text{O}_{15}$, 1139,5; encontrado 1141,4 (M+H).

Etapa 3: Maitansina-3-N-metil-L-(S)-alanina-N-metil-beta-alanina-N-[4-(4-{isotiocianato-fenil}-tioureído-valina-citrulina-amino) benzilóxi]-carbamato (39)

[00183] O produto da Etapa precedente (**37**, 0,037 g, 0,029 mmol) foi dissolvido em tetraidrofurano (THF, 5 mL) em um frasco, tratado com trietilamina (0,020 mL, 0,143 mmol), e a solução resultante adicionada em gotas em um frasco contendo uma solução agitada de 1,4-fenilenoditiocianato (**38**, 0,055 g, 0,286 mmol) em THF (10 mL) durante 15 min. O frasco foi enxaguado com THF (2 ml) e a solução adicionada ao frasco de reação, que foi selado com um septo de borracha. Após agitar em temperatura ambiente por 24 horas, a reação foi concentrada in vacuo à secura, o produto bruto dissolvido em acetonitrila, e filtrado através de uma membrana PTFE de 0,45 µm. O filtrado foi então purificado em uma coluna RediSep Gold de 30 g via ISCO (20 – 80% MeCN em água, 0,05% HOAc em ambos solventes) e as frações mais puras (por LC) combinadas, congeladas a -78°C, e liofilizadas, fornecendo o composto do título como um sólido branco (0,023 g, 59%). MS (ESI, pos.): calculado para C₆₃H₈₂ClN₁₁O₁₅S₂, 1331,5; encontrado 1332,0 (M+H).



EXEMPLO 11

Etapa 1: 1-(4-Amino-butil)-maleimida

[00184] Uma solução de Boc-1-aminobutil-4-maleimida comercial (0,304 g, 1,13 mmol) em diclorometano (10 mL) was tratada com ácido trifluoroacético (1,00 mL, 13,1 mmol), o frasco purgado com Ar, selado com um septo de borracha e ventilação bubbler, e agitado em temperatura ambiente. A reação estava completa por TLC após 18 horas, de modo que foi concentrada in vacuo, triturada duas vezes em dietil éter, e secada in vacuo em uma goma. Esta foi triturada mais duas vezes com éter (enquanto raspando com a espátula), decantada, e secada novamente in vacuo fornecendo o composto do título como um sólido branco (0,321 g, 100%). MS (ESI, pos.): calculado para C₈H₁₂N₂O₂, 168,1; encontrado 169,0 (M+H).

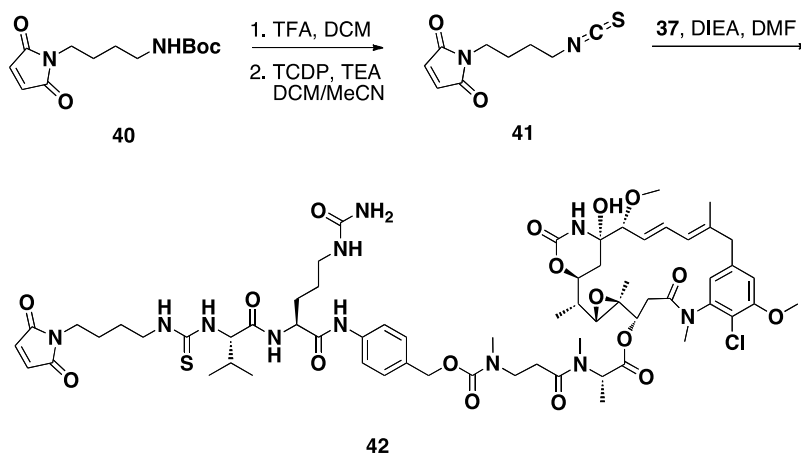
Etapa 2: 1-(4-Isotiocianato-butil)-maleimida (41)

[00185] O produto da Etapa precedente foi dissolvido em acetonitrila (MeCN, 3 x 40 mL) e concentrado in vacuo a 60° C via evaporador rotativo. O produto seco (0,650 g, 2,45 mmol) foi dissolvido em MeCN (75 mL) e clorofórmio (30 mL) em um frasco, tratado com trietilamina (1.0 mL, 7,35 mmol), e a solução resultante adicionada em gotas a um frasco contendo 1,1'-tiocarbonildi-2,2'-piridona (0,68 g, 2,94 mmol) em clorofórmio (25 mL) sob nitrogênio durante 10 min. A reação foi agitada em temperatura ambiente por 18 horas. A reação foi concentrada in vacuo à secura, o produto bruto foi dissolvido em diclorometano (DCM) e purificado em uma coluna RediSep Gold de 120 g de sílica, via cromatografia de coluna flash (0 – 10% MeOH em DCM). As frações mais limpas (por LC) foram combinadas e concentradas à secura fornecendo o composto do título como um sólido branco (0,26 g, 50%). MS (ESI, pos.): calculado para C₉H₁₀N₂O₂S, 210,0; encontrado 211,2 (M+H).

Etapa 3: Maitansina-3-N-metil-L-(S)-alanina- N-metil-beta-alanina-N-[4-(4-{maleimidilbutill}-tioureído-valina-citrulina-amino) benziloxi]-carbamato

(42)

[00186] O produto do exemplo 10, Etapa 2 (**37**, 0,029 g, 0,023 mmol) foi dissolvido em DMF seco (2 mL), tratado com diisopropiletilamina (0,020 mL, 0,115 mmol) via seringa seca, então com uma solução do produto da etapa precedente (**41**, 0,026 g, 0,124 mmol) em DMF seco (2 mL). O frasco de reação foi purgado com Ar, selado com um septo de borracha, e a reação agitada em temperatura ambiente. Após 18 horas a reação pareceu estar 80% completa por LCMS, então ela foi evaporada em um óleo in vacuo, dissolvida em MeCN/água, e e purificada em uma coluna RediSep Gold C18 de 30 g via cromatografia de coluna flash (20 – 80% MeCN em água, 0.05% HOAc em ambos solventes). As frações mais limpas por LCMS foram combinadas, brevemente *rotavapped*, congeladas em gelo seco e liofilizadas durante a noite, fornecendo o composto do título como um sólido branco (0,020 g, 65%). MS (ESI, pos.): calculado para $C_{64}H_{88}N_{11}O_{17}SCl$, 1349,6; encontrado 1351,1 (M+H), 1372,9 (M+Na), 1333,6 (M-H₂O+H).



EXEMPLO 12

Preparação e Caracterização do Conjugado

[00187] Para o conjunto inicial de experimentos, quatro anticorpos foram conjugados em vários compostos de ligador-droga da descrição, empregando-se o procedimento abaixo. Os quatro anticorpos usados nestes experimentos foram: (1) um anticorpo PSMA tendo os domínios variáveis de cadeia pesada e leve do clone AB-PG1-XG1-006 como exposto em WO

2007002222A2, (2) um anticorpo STEAP1 tendo os domínios variáveis de cadeia pesada e leve do clone mu120, expresso como um hIgG1, como exposto em WO 2008052187A2, (3) um anticorpo EGFRvIII tendo os domínios variáveis de cadeia pesada e leve do clone 131, como exposto em WO2013075048A1, e (4) um PRLR tendo os domínios variáveis de cadeia pesada e leve do clone H1H6953N como exposto no Pedido US No. de Série 61/868.185; depositado em 21 de agosto de 2013 (cuja descrição é por este meio incorporada por referência em sua totalidade). Todos os anticorpos monoclonais foram expressos em células CHO e purificados pela Proteína A. Um controle de não-ligação, derivado de um antígeno imunológico, não tendo relação com oncologia, foi também usado.

Método de Conjugação para os Compostos 3, 7, 21 e 42

[00188] O anticorpo (10 mg/ml) em HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5, foi tratado com 1 mM de ditiotreitol a 37 °C por 30 min. Após filtragem gel (G-25, acetato de sódio pH 4,5, G-25), o derivativo de carga útil do ligador maleimido (1,2 equivalentes/grupo SH) em DMSO (10 mg/ml) foi adicionado ao anticorpo reduzido e a mistura ajustada a pH 7,0 com 1M HEPES (pH 7,4). Após 1 h, a reação foi extinta com N-etil maleimida em excesso. Os conjugados foram purificados por cromatografia de exclusão de tamanho e filtrados estéreis. As concentrações de carga útil de proteína e ligador foram determinaas por análise espectral UV. HPLC de exclusão de tamanho estabeleceu que todos os conjugados usados eram >95% monoméricos e RP-HPLC estabeleceu que havia <0,5% de carga útil de ligador não-conjugado. As produções são reportadas na Tabela 1, com base na proteína. Todos os anticorpos conjugados foram analisados por UV para valores de carregamento de carga útil de ligador, de acordo com Hamblett et al, Cancer Res., 2004 10 7063. Os resultados são resumidos na Tabela 1.

Método de Conjugação para o Composto 39

[00189] Ao anticorpo (2-5 mg/ml) em 50 mM carbonato, 150 mM

NaCl, pH 9,0, foram adicionados 15% em volume de dimetil acetamida. O derivativo de carga útil de ligador 39 (5 – 10 equivalentes) em DMSO (10 mg/ml) foi adicionado ao anticorpo e a mistura incubada a 37 °C por 4 – 12 horas. Os conjugados foram purificados por cromatografia de exclusão de tamanho e filtrados estéreis. As concentrações de carga-útil de proteína e ligador foram determinadas por análise espectral UV. HPLC de exclusão de tamanho estabeleceu que todos os conjugados usados eram > 95% monoméricos, e RP-HPLC estabeleceu que havia 0,5% de carga útil de ligador não-conjugado. Para estes conjugados a relação de carga-útil para anticorpo foi determinada por MALDI-TOF (Tabela 1).

Tabela 1

Composto	$\epsilon_{252 \text{ nm}} (\text{cm}^{-1} \text{ M}^{-1})$	$\epsilon_{280 \text{ nm}} (\text{cm}^{-1} \text{ M}^{-1})$
3	32000	8500
7	50600	8100
21	44190	9460
39	--	--

Anticorpo	$\epsilon_{252 \text{ nm}} (\text{cm}^{-1} \text{ M}^{-1})$	$\epsilon_{280 \text{ nm}} (\text{cm}^{-1} \text{ M}^{-1})$
STEAP1	87939	244276
PSMA	77652	224320
PRLR	80673	220420
EGFRvIII	79579	209420
Controle Isótipo	75113	218360

Conjugado	Carga	
Anticorpo	útil:Anticorpo(UV)	Produção %
STEAP1-7	1,4	36
PSMA-3	3,5	44
PSMA-7	3,4	60
PSMA-21	0,9	45
PRLR-7	3,0	70
EGFRvIII-7	3,4	64
EGFRvIII-39	1,3 (MALDI)	40
Controle Isótipo		
-3	3,0	48
Controle Isótipo		
-7	2,3	51
Controle Isótipo	2,3	45

-21

Controle Isótipo-

39

1,1 (MALDI)

40

EXEMPLO 13

Ensaio Enzimático Livres de Células de Conjugado de Anticorpo-Droga (ADC) In Vitro

Incubação de Catepsina B

[00190] Procedimento de ensaio enzimático livre de célula in vitro foi adotado por Dubowchik, et al., Bioconjugate Chem. 2002 13 855. O PRLR-7 corrigido DAR e a concentração de Controle de Isótipo-7 foram estabelecidos em 7,00 uM em tampão de acetato de sódio 25 mM, 1 mM EDTA, pH 5,0 e pré-incubado a 37°C. Catepsina B (Sigma # C8571) was ativada em temperatura ambiente for 15 minutos com 1 equivalente de 30 mM DTT, 15 mM EDTA a 2 equivalentes do estoque de catepsina B. A solução de catepsina B ativada foi adicionada às soluções de ADC em uma relação molar de 1:750. As amostras foram incubadas a 37 °C durante um período de 24 horas e aliqotadas para detecção de HPLC (HISEP)-UV ou detecção LC-MS, vide infra.

Detecção LC-MS

[00191] Em pontos do tempo designados, uma pequena alíquota foi removida e combinada com 2 equivalentes em volume de metanol frio. O sobrenadante foi recuperado e analisado por espectrometria de massa-cromatografia líquida (LCMS) quanto ao composto de produção de clivagem de carga útil do ligador catepsina B 6, usando-se um Merck Chromolith FastGradient RP-18e, coluna 2x50 mm, 10 a 90% MeCN durante 5 mins, em H₂O com 0.05% HOAc em ambos solventes e uma taxa de fluxo de 1 mL. O perfil de eluição foi monitorado a 254 nM. Todas as alíquotas incubadas a 37 °C com composto contendo catepsina B 6 eluindo a 5.1 minuto com uma massa de 735 M+H (calculado para C₃₆H₅₁CIN₄O₁₀, 734,3) e nenhuma das

alíquotas sem catepsina B continha qualquer **6**. Isto foi também confirmado por injeção de composto puro **6** do Exemplo 2, Etapa 3.

Detecção HPLC (HISEP)-UV

[00192] Soluções foram injetadas “como são” em pontos de tempo designados. O seguinte método de gradiente foi utilizado: tampão A 100% 100 mM NH₄OAc, pH 7,0 e tampão B 100% acetonitrila, velocidade de fluxo 0,4 mL/min, de 5 a 70% de tampão B, através de uma coluna Supelco LC-HISEP; 150 mm x 4,6 mm. O perfil de eluição foi monitorado a 280 nm e 252 nm. Todas as alíquotas das ADCs incubadas com catepsina B continham uma espécie que elui a 19,4 minutos. O composto **6** puro elui em tempo de retenção idêntico sob as mesmas condições de gradiente. A espécie de 19,4 minutos não estava presente na alíquota sem catepsina B.

[00193] Os resultados deste Exemplo são significativos em parte porque a proteólise da catepsina B de **6** deve somente ocorrer após internalização do ADC na célula, onde a enzima existe. Os efeitos fora de alvo devem ser reduzidos, uma vez que o anticorpo supre a carga útil citotóxica diretamente às células alvos.

EXEMPLO 14

Ensaio de Citotoxicidade In Vitro

[00194] Neste Exemplo, a capacidade de vários conjugados de anticorpo-droga matar células tumorais expressando antígeno *in vitro* foi avaliada.

[00195] As células foram semeadas em 96 placas de poço revestidas-PDL em 375 células (MMT/hEGFR_{vIII}), 1500 (U251/hEGFR_{vIII}), 2000 (HEK293/hEGFR_{vIII}), ou 3000 (C4-2, PC3/hSTEAP1, T47D, e U87-MG) por poço em meios de crescimento completos e cultivadas durante a noite. Para as curvas de viabilidade celular, conjugados serialmente diluídos ou cargas úteis representativas livres foram adicionados às células nas concentrações finais variando de 500 nM a 1 pM e incubadas por 3 dias. Para

medir a viabilidade em MMT/hEGFRvIII, U251/hEGFRvIII, HEK293/hEGFRvIII, C4-2, PC3/hSTEAP1, e U87-MG, as células foram incubadas com CCK8 (Dojindo) para as 1-3 horas finais e a absorvência a 450nm (OD450) foi determinada em um Flexstation3 (Molecular Diveces). Para medir a viabilidade em T47D, células foram incubadas sobre gelo por 30 min em 4% formaldeído + 3 ug/ml Hoechst. As imagens dos núcleos tingidos Hoechst foram adquiridas no ImageXpress Micro XL (Molecular Devices) e as contagens de núcleo foram determinadas com o software de análise Columbus (PerkinElmer). Níveis de OD450 de fundo (CCK8) ou contagens nucleares de células tratadas com digitonina (40 nM) foram subtraídos de todos os poços e a viabilidade é expressa como uma percentagem dos controles não-tratados. Os valores IC_{50} foram determinados por uma equação logística de quatro-parâmetros através de uma curva de respostas de 10-pontos (GraphPad Prism). Todas as curvas e valores IC_{50} são corrigidos para equivalentes de carga útil.

[00196] Em células C4-2 (linhagem de câncer da próstata), nativamente expressando PSMA a 271 vezes acima da ligação de controle de isótipo, os conjugados de maitansinóide PSMA-3, PSMA-7 e PSMA-21 possuem valores IC_{50} DE 3, 8, 0,5 E 8,3 Nm, respectivamente (Figura 1). O anticorpo PSMA nu foi desprovido de qualquer atividade antiproliferativa.

[00197] Em células PC3/hSTEAP1 (linhagem de câncer de próstata), expressando hSTEAP1 em 352 vezes acima da ligação de controle de isótipo, o conjugado de maitansinóide STEAP1-7 possui um valor IC_{50} de 4 nM (Figura 2). O anticorpo STEAP1 nu foi desprovido de qualquer atividade antiproliferação.

[00198] Em células T47D (linhagem de câncer de mama), nativamente expressando PRLR a 14 vezes acima da ligação de controle de isótipo, o conjugado de maitansinóide PRLR-7 possui um valor IC_{50} DE 1,0 nM (Figura 3). O anticorpo T47D nu foi desprovido de qualquer atividade

antiproliferação.

[00199] Em células HEK293/hEGFRvIII, expressando hEGFRvIII a 360 vezes acima da ligação de controle de isótipo, o conjugado de maitansinóide EGFRvIII-7 possui um valor IC_{50} de 0,4 nM (Figura 4). O anticorpo EGFRvIII nu foi desprovido de qualquer atividade antiproliferação.

[00200] Em células MMT/hEGFRvIII, expressando hEGFRvIII a 280 vezes acima da ligação de controle de isótipo, o conjugado de maitansinóide EGFRvIII-7 possui um valor IC_{50} de 0,3 nM (Figura 5). O anticorpo EGFRvIII nu era desprovido de qualquer atividade antiproliferação.

[00201] Em células U251/hEGFRvIII (linhagem de câncer de glioblastoma), expressando hEGFRvIII a 165 vezes acima da ligação de controle de isótipo, o conjugado de maitansinóide EGFRvIII-7 possui um valor IC_{50} de 0,3 nM (Figura 6). O anticorpo EGFRvIII nu foi desprovido de qualquer atividade antiproliferação.

[00202] A citotoxicidade *in vitro* das cargas úteis liberadas (“drogas livres”) foi também testada nas várias linhagens de célula descritas acima e plotada ao longo dos anticorpos conjugados para comparação (vide quadrados fechados (■) nas Figuras 1 a 6). Para cargas-úteis de ligador 3 e 7, as cargas úteis propostas 2 e 6, respectivamente, podem ser usadas nos ensaios celulares diretamente, uma vez que elas são estáveis. Entretanto, para carga útil-ligador 21 a carga-útil liberada é proposta ser o composto sulfidríla 10. Uma vez que 10 poderia ser um composto muito reativo, que conduziria a resultados inconfiáveis, o composto **25** foi escolhido para representar a carga-útil liberada nestes ensaios.

[00203] Em um conjunto separado de experimentos, o composto **6**, junto com os amino análogos **27**, **29**, e **31**, foi ensaiado em HEK293 e U87MG quanto à atividade antiproliferação (Figura 7). Todos estes compostos tinham valores $IC_{50} < 30$ nM IC_{50} , indicando que eles são altamente citotóxicos somente quando ligados a um anticorpo via um apropriado ligador

(para estes experimentos, correção de fundo com digitonina não foi realizada).

[00204] Em ainda outro conjunto de experimentos, os compostos 6, 9, 33 e 35 foram ensaiados em HEK293, U251, C4-2, PC3 e MMT quanto a atividade antiproliferação (Figura 8). Os compostos aminos 6, 33, e 35 tiveram variados IC₅₀s como listado na Tabela 2. A tendência em potência segue 9 > 33 > 35 > 6 e é consistente para as 5 linhagens de células ensaiadas.

Tabela 2

Composto	IC ₅₀ (nM)				
	HEK293	U251	C4-2	PC3	MMT
9	0,2	0,4	1,5	0,4	0,3
33	20	15	20	30	20
35	50	25	55	65	60
6	200	150	200	250	250

[00205] Sem ficarmos ligados a qualquer teoria, os resultados destes experimentos demonstram que as versões “liberada” ou “droga livre” dos compostos da presente descrição (isto é, os compostos não conjugados com um anticorpo) foram, na maioria dos casos, substancialmente menos citotóxicos do que quando conjugados em um anticorpo alvejante. Este detalhe da presente descrição sugere que os conjugados de anticorpo-droga, compreendendo os compostos da invenção, provocarão menores efeitos colaterais e menos toxicidade indesejada, uma vez que as propriedades de morte de célula serão concentradas no local do antígeno alvo especificamente.

EXEMPLO 15

Os Conjugados de Droga Anticorpo Anti-EGFRvIII são Inibidores Potentes do Crescimento Tumoral em Modelos de Aloenxerto de Câncer da Mama Positivos EGFRvIII

[00206] Neste Exemplo, dois diferentes conjugados de droga-anticorpo do anticorpo anti-EGFRvIII H1H1863N2 foram testados quanto a sua capacidade de inibir crescimento de tumor *in vivo* (a sequência amino ácida e

várias propriedades de H1H1863N2 são expostas em US 61/950.963, depositado em 11 de março de 2014, por este meio incorporado por referência em sua totalidade). H1H1863N2 compreende uma região variável de cadeia pesada (HCVR), compreendendo a SEQ ID NO: 1; uma região variável de cadeia leve (LCVR), compreendendo a SEQ ID NO: 5; regiões determinando complementaridade de cadeia pesada (HCDR1, HCDR2 e HCDR3), compreendendo as SEQ ID NOs: 2, 3 e 4, respectivamente; e regiões determinando complementaridade de cadeia leve (LCDR1, LCDR2 e LCDR3), compreendendo as SEQ ID NOs: 6, 7 e 8, respectivamente.

[00207] Um primeiro ADC foi produzido conjugando-se H1H1863N2 com maitansinóide DM1 via um ligador MCC não-clivável (vide, p. ex., US 5.208.020 e pedido US 20100129314) para produzir “H1H1863N2-MCC-DM1”. Um segundo ADC foi produzido conjugando-se H1H1863N2 a 7, para produzir “H1H1863N2-7”. Quando testado quanto à citotoxicidade *in vitro* em relação às células MMT/EGFRvIII, usando-se o formato de ensaio descrito no Exemplo 14, H1H1863N2-MCC-DM1 exibiu uma IC₅₀ de 12 nM, enquanto H1H1863N2-7 exibiu uma IC₅₀ de somente 0,8 nM. Assim, *in vitro*, o ADC anti-EGFRvIII H1H1863N2-7 exibiu capacidade de morte de célula tumoral muito mais potente do que o correspondente anticorpo conjugado com DM1 via um ligador MCC.

[00208] Para comparar a eficácia *in vivo* dos anticorpos anti-EGFRvIII conjugados com MCC-DM1 e 7, foram realizados estudos em camundongos imunocomprometidos contendo aloenxertos de câncer de mama positivos EGFRvIII. Resumidamente, aloenxertos de tumor foram estabelecidos por implantação subcutânea de 0,5 x 10⁶ células MMT/EGFRvIII no franco esquerdo de camundongos fêmeas CB17SCID (Taconic, Hudson, NY). Umavez os tumores alcançaram um volume médio de 140 mm³ (~Dia 8), os camundongos foram aleatorizados em grupos de sete e dosados com ADCs anti-EGFRvIII usando-se MCC-DM1 ou formato de droga-ligador 7.

Reagentes de controle, incluindo ADCs não-ligantes empregando-se o MCC-DM1 ou formato droga-ligador 7, e veículo PBS foram também avaliados. Os ADCs foram dosados a 1 e 5 mg/kg três vezes por um a semana e, em seguida, monitorados até um tamanho de tumor médio de aproximadamente 2000 mm³ ser obtido no grupo administrado com veículo apenas. Neste ponto, a Inibição de Crescimento do Tumor foi calculada.

[00209] O tamanho médio do tumor em relação ao grupo tratado com veículo foi calculado como segue: os tumores foram medidos com calibres duas vezes por semana, até o tamanho médio do grupo do veículo alcançar 1000 mm³; o tamanho do tumor foi calculado usando-se a fórmula $(\text{comprimento} \times \text{largura}^2)/2$. A inibição de crescimento do tumor foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: $(1 - ((T_{\text{final}} - T_{\text{inicial}})/(C_{\text{final}} - C_{\text{inicial}}))) * 100$, onde T (grupo tratado) e C (grupo de controle) representam a massa média do tumor no dia em que o grupo de veículo alcançou 1000 mm³. Os resultados são resumidos na Tabela 3.

Tabela 3: Tamanho do Tumor e Inibição de Crescimento de Tumor em Seguida à Administração de Conjugados de Anticorpo EGFRvIII-Druga e Controles, administrado em dose repetida.

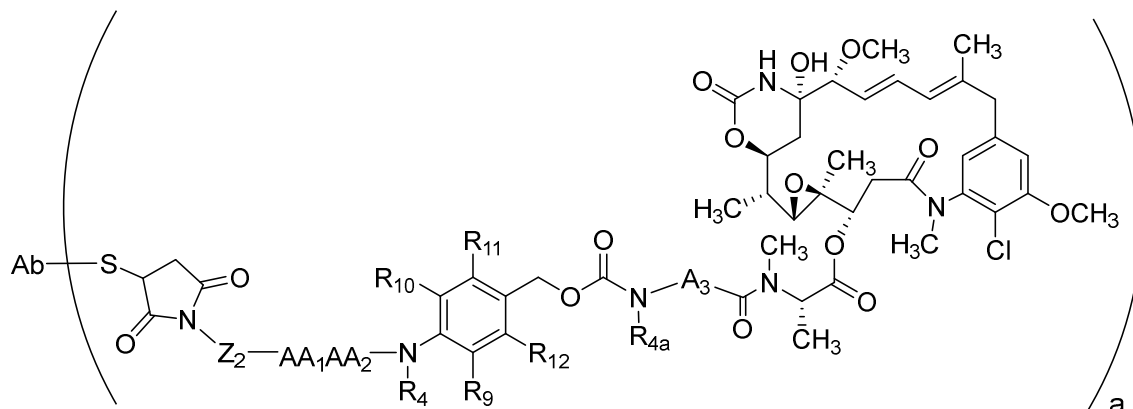
Grupo de Tratamento	Tamanho Final do Tumor no Dia 8 mm ³ (média ± SD)	Inibição Média do Crescimento do Tumor (%)
Veículo PBS	2253 ± 217	0
Controle-MCC-DM1 (1 mg/kg)	2827 ± 278	-27
Controle-MCC-DM1 (5 mg/kg)	2402 ± 256	-7
Controle-7 (1 mg/kg)	2729 ± 470	-22
Controle-7 (5 mg/kg)	2787 ± 503	-25
H1H1863N2-MCC-DM1 (1 mg/kg)	931 ± 292	62
H1H1863N2-MCC-DM1 (5 mg/kg)	471 ± 227	84
H1H1863N2-7 (1 mg/kg)	679 ± 265	74
H1H1863N2-7 (5 mg/kg)	96 ± 34	102

[00210] Como mostrado neste Exemplo, a maior inibição de tumor foi observada em camundongos dosados com 5 mg/kg H1H1863N2-7, onde a

regressão do tumor inicial foi observada. A inibição do crescimento do tumor de 102%, resultante do tratamento com 5 mg/kg de H1H1863N2-7 foi significativamente maior em relação àquela observada em seguida ao tratamento de tumor com 5 mg/kg H1H1862N2-MCC-DM1 (83%). A superioridade da inibição do crescimento do tumor induzida por H1H1863N2-7 comparada com H1H1863N2-MCC-DM1 foi mantida na dose de 1 mg/kg também. Nenhum efeito antitumor foi observado em grupos tratados com o ADC Controle usando-se MCC-DM1 ou 7.

REIVINDICAÇÕES

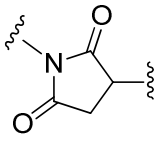
1. Composto, caracterizado pelo fato de ser da seguinte fórmula



em que

a é um inteiro de um a dez;

Z₂ é representado pela seguinte fórmula estrutural **-Z_{2A}-Z_{2B}-Z_{2C}-Z_{2D}-**, em que **Z_{2A}**, **Z_{2B}**, **Z_{2C}** e **Z_{2D}** são, cada um independentemente

ausente, C₁₋₆-alquila, C₆₋₁₈ arila, -C(=O)-, -C(=S)-N(**R₄**)-, ou  ;

Ab é um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo;

AA₁-AA₂ é um resíduo de peptídeo selecionado do grupo consistindo em valina-citrulina, citrulina-valina, lisina-fenilalanina, fenilalanina-lisina, valina-asparagina, asparagina-valina, treonina-asparagina, serina-asparagina, asparagina-serina, fenilalanina-asparagina, asparagina-fenilalanina, leucina-asparagina, asparagina-leucina, isoleucina-asparagina, asparagina-isoleucina, glicina-asparagina, asparagina-glicina, ácido glutâmico-asparagina, asparagina-ácido glutâmico, citrulina-asparagina, asparagina-citrulina, alanina-asparagina, e asparagina-alanina;

A₃ é -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂-, -CH(CH₃)CH₂-, ou -CH₂CH₂CH₂CH₂-;

R₄, **R₉**, **R₁₀**, **R₁₁**, e **R₁₂**, são, cada um independentemente

hidrogênio ou uma C₁₋₆ alquila; e

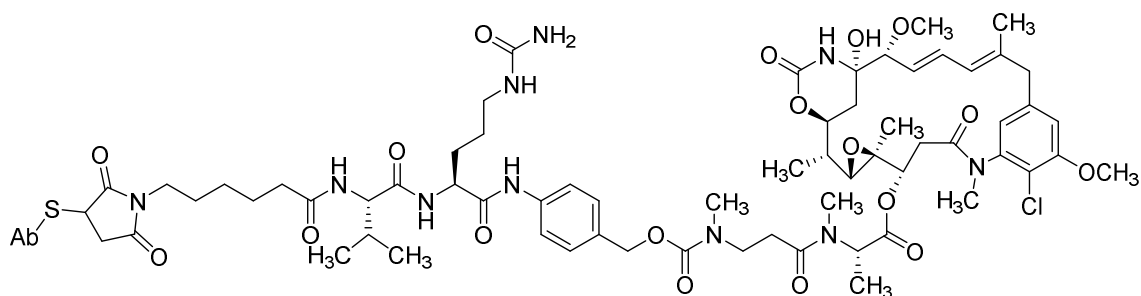
R_{4a} é C₁₋₆ alquila.

2. Composto de acordo com reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que **Ab** é capaz de ligar-se a uma população de células especificamente alvejada.

3. Composto de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que **Ab** é um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

4. Composto de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que **Ab** é um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que especificamente liga-se a um antígeno associado ao tumor.

5. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é representado pela seguinte estrutura



em que **Ab** é um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

6. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que **AA₁-AA₂** é um peptídeo clivável por uma protease.

7. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que **AA₁-AA₂** é um peptídeo clivável por uma protease expressa em tecido tumoral.

8. Composto de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a protease é uma catepsina ou uma plasmina.

9. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende uma quantidade terapêuticamente eficaz de um composto como

definido na reivindicação 1, ou um sal do mesmo farmacologicamente aceitável e um ou mais portadores, diluentes ou excipientes farmacologicamente aceitáveis.

10. Uso de um composto como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o composto é para manufatura de um medicamento para reduzir, retardar ou parar um crescimento anormal de célula em um câncer.

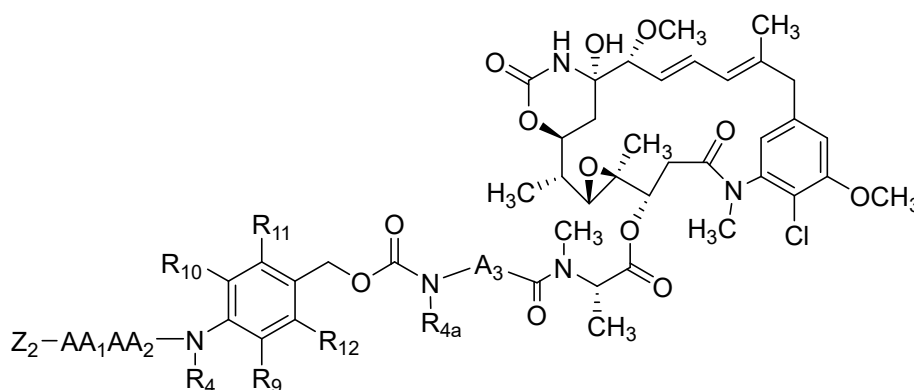
11. Uso de um composto como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o composto é para manufatura de um medicamento para matar uma célula tumoral.

12. Uso de uma composição compreendendo o composto como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a composição farmacêutica é para manufatura de um medicamento para tratamento de tumores, cânceres, doenças infecciosas, doenças neurodegenerativas, distúrbios ósseos e/ou doenças cardiovasculares em um indivíduo sofrendo de tumores, cânceres, doenças infecciosas, doenças neurodegenerativas, distúrbios ósseos e/ou doenças cardiovasculares.

13. Uso de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é um mamífero.

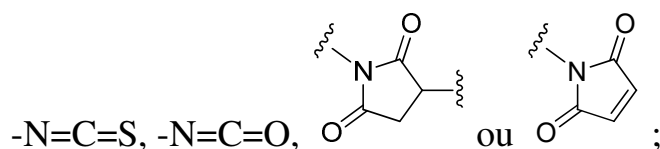
14. Uso de uma composição que compreende o composto como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a composição é para manufatura de um medicamento para reduzir o tamanho do tumor, parar o aumento do tamanho do tumor, reduzir a proliferação do tumor ou evitar a proliferação do tumor em um indivíduo em necessidade disso.

15. Composto, caracterizado pelo fato de que o composto é da seguinte fórmula



em que

Z_2 é representado seguinte fórmula estrutural $-Z_{2A}-Z_{2B}-Z_{2C}-Z_{2D}-$, em que Z_{2A} , Z_{2B} , Z_{2C} e Z_{2D} são, cada um independentemente ausente, C_{1-6} -alquila-, C_{6-18} arila-, $-C(=O)-$, $-O-C(=O)-$, $-C(=O)-N(R_4)-$, $-C(=S)-N(R_4)-$,



AA_1-AA_2 é um resíduo de peptídeo selecionado do grupo consistindo em valina-citrulina, citrulina-valina, lisina-fenilalanina, fenilalanina-lisina, valina-asparagina, asparagina-valina, treonina-asparagina, serina-asparagina, asparagina-serina, fenilalanina-asparagina, asparagina-fenilalanina, leucina-asparagina, asparagina-leucina, isoleucina-asparagina, asparagina-isoleucina, glicina-asparagina, asparagina-glicina, ácido glutâmico-asparagina, asparagina-ácido glutâmico, citrulina-asparagina, asparagina-citrulina, alanina-asparagina, e asparagina-alanina;

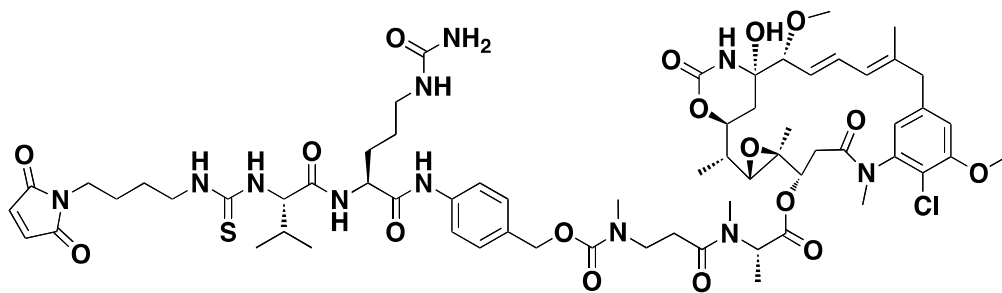
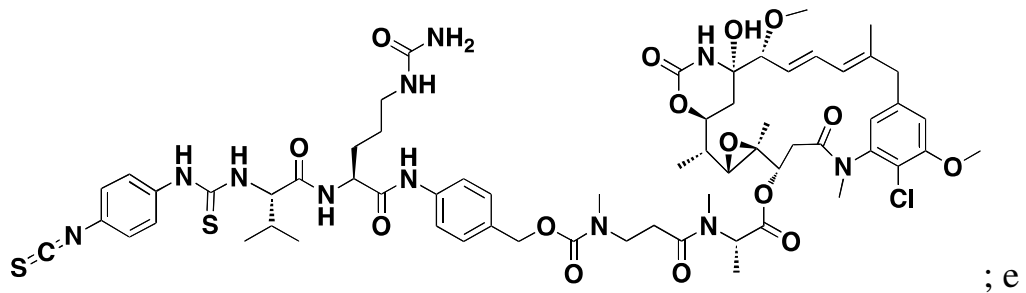
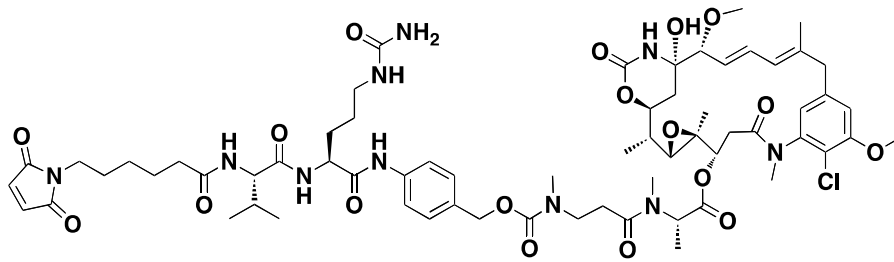
A_3 é CH_2- , $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2-$, $-CH(CH_3)CH_2-$, ou $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$;

R_4 , R_9 , R_{10} , R_{11} , e R_{12} são, cada um independentemente, hidrogênio ou C_{1-6} alquila;

R_{4a} é C_{1-6} alquila.

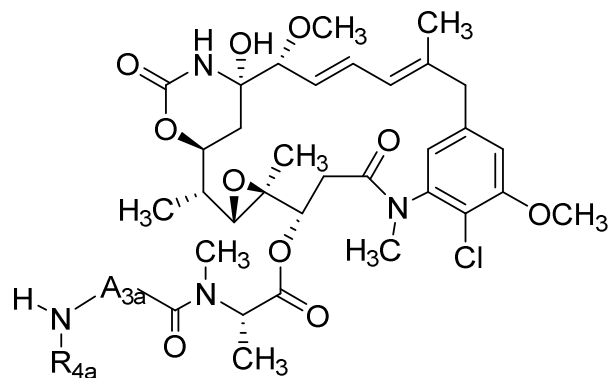
16. Composto de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o composto tem a estrutura selecionada do grupo que

consiste em



17. Composto, caracterizado pelo fato de que tem a seguinte

fórmula

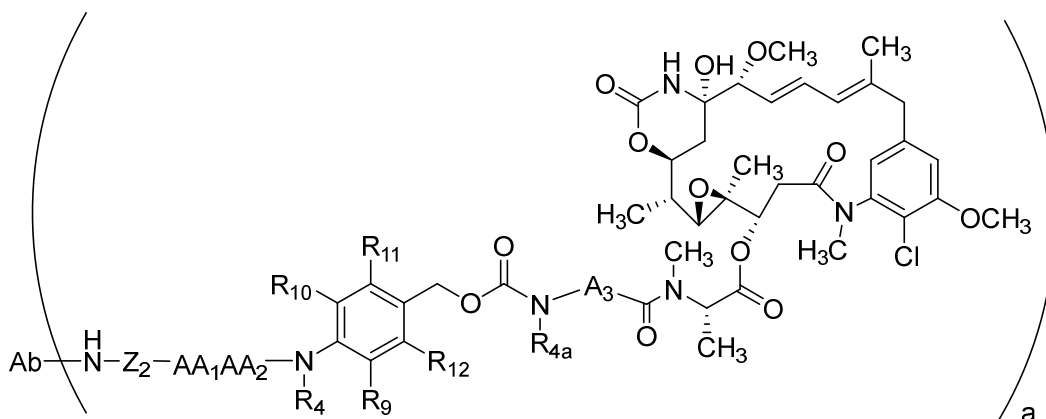


em que

A_3 é $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, ou $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$; e

R_{4a} é C_{1-6} alquila.

18. Composto, caracterizado pelo fato do composto ser da seguinte fórmula



em que

Ab é um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo;

a é um inteiro de um a dez;

Z_2 é representado pela seguinte fórmula estrutural $-Z_{2A}-Z_{2B}-Z_{2C}-Z_{2D}-$, em que Z_{2A} , Z_{2B} , Z_{2C} , e Z_{2D} são, cada um independentemente ausente, $-C(=O)-$, C_{1-6} -alquilenos, C_{6-18} -arileno, ou $-C(=S)-N(R_4)-$;

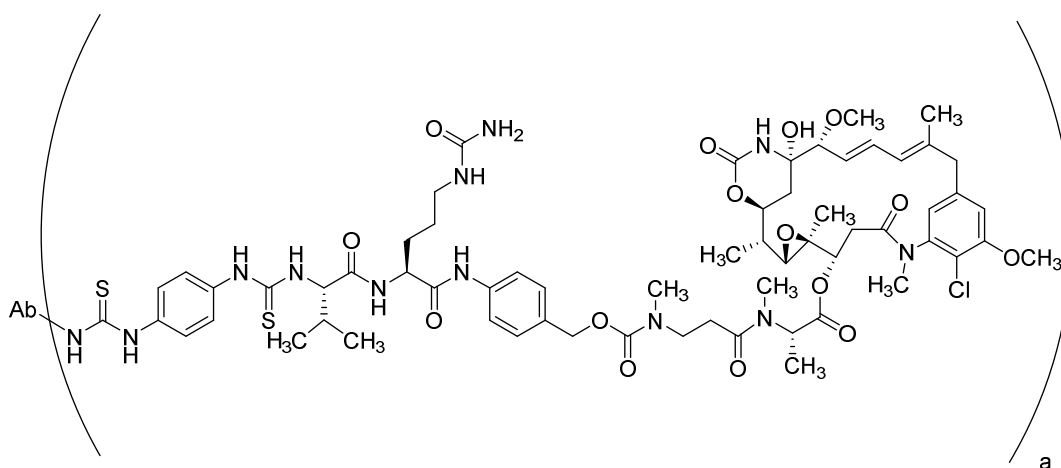
AA_1-AA_2 é um resíduo de peptídeo selecionado do grupo consistindo em valina-citrulina, citrulina-valina, lisina-fenilalanina, fenilalanina-lisina, valina-asparagina, asparagina-valina, treonina-asparagina, serina-asparagina, asparagina-serina, fenilalanina-asparagina, asparagina-fenilalanina, leucina-asparagina, asparagina-leucina, isoleucina-asparagina, asparagina-isoleucina, glicina-asparagina, asparagina-glicina, ácido glutâmico-asparagina, asparagina-ácido glutâmico, citrulina-asparagina, asparagina-citrulina, alanina-asparagina, e asparagina-alanina;

A_3 é CH_2- , $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2-$, $-CH(CH_3)CH_2-$, ou $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$;

R_4 , R_9 , R_{10} , R_{11} , e R_{12} são, cada um independentemente, hidrogênio ou C_{1-6} alquila;

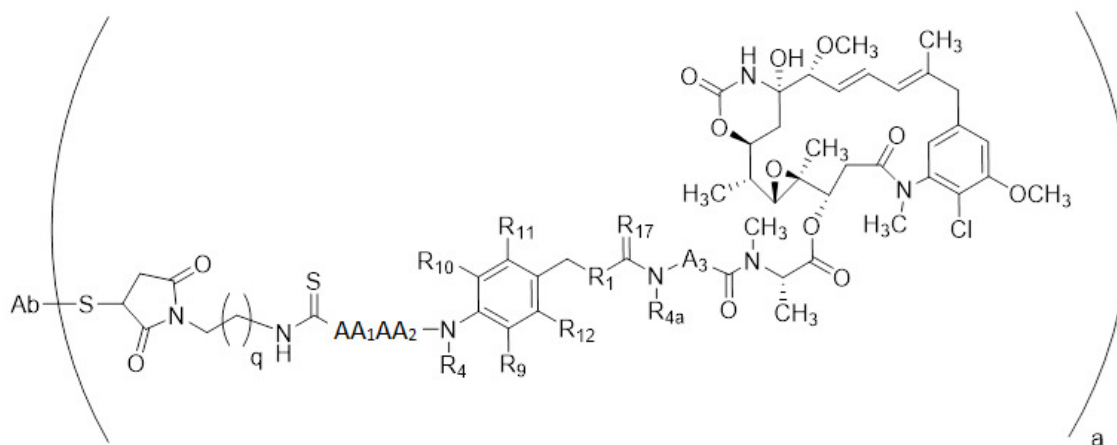
R_{4a} é C_{1-6} alquila.

19. Composto de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que é representado pela seguinte estrutura:



em que a é um inteiro de um a dez.

20. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o composto ser da seguinte fórmula



em que

Ab é um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo;

AA₁-AA₂ é um resíduo de peptídeo selecionado do grupo consistindo de valina-citrulina, citrulina-valina, lisina-fenilalanina, fenilalanina-lisina, valina-asparagina, asparagina-valina, treonina-asparagina, asparagina-treonina, serina-asparagina, asparagina-serina, fenilalanina-asparagina, asparagina-fenilalanina, leucina-asparagina, asparagina-leucina, isoleucina-asparagina, asparagina-isoleucina, glicina-asparagina, asparagina-glicina, ácido glutâmico- asparagina, asparagina-ácido glutâmico, citrulina-asparagina, asparagina-citrulina, alanina-asparagina, e asparagina-alanina;

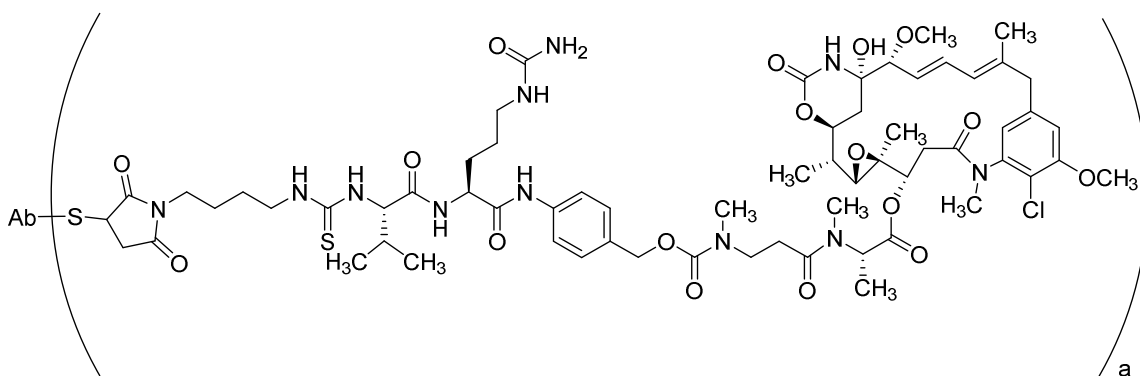
a é um inteiro de um a dez;

q é zero ou um inteiro de um a cinco;

R₄, R₉, R₁₀, R₁₁, e R₁₂ são, cada um independentemente, hidrogênio ou C₁₋₆ alquila;

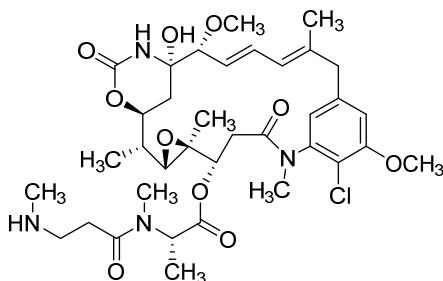
R_{4a} é C₁₋₆ alquila.

21. Composto de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que o composto é representado pela seguinte estrutura:

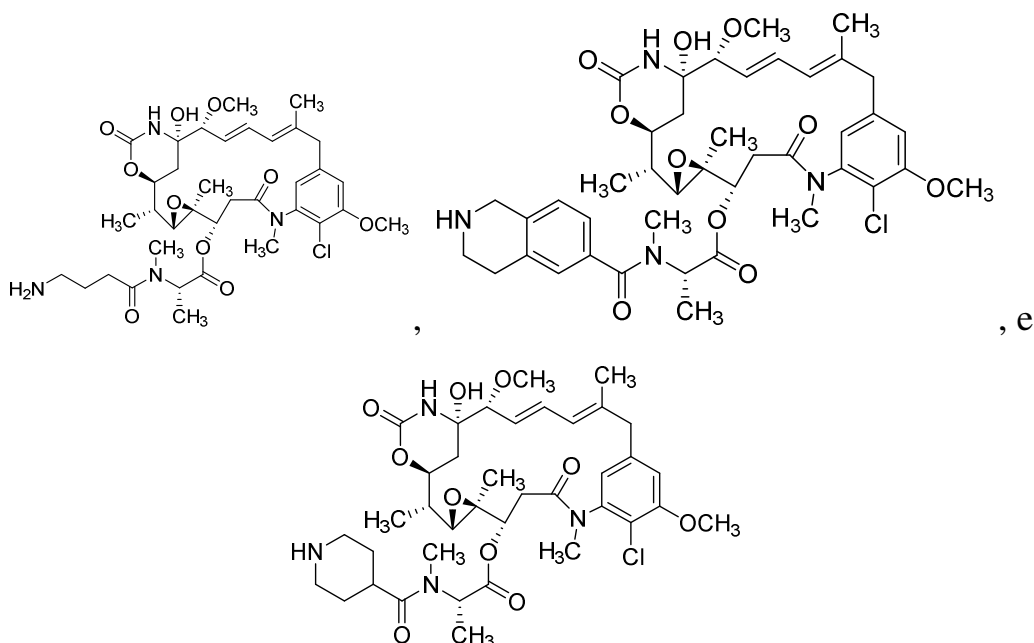


em que **a** é um inteiro de um a dez.

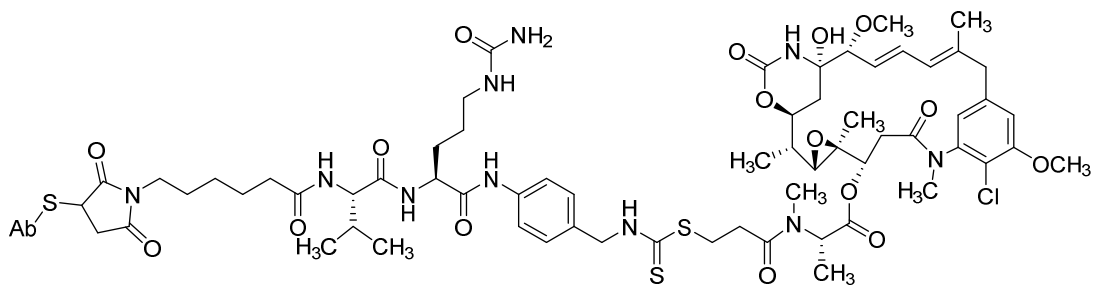
22. Composto de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de o composto ter a estrutura



23. Composto, caracterizado pelo fato de o composto ter uma estrutura selecionada do grupo que consiste em

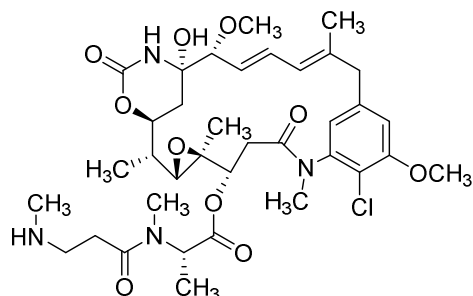


24. Composto, caracterizado pelo fato de o composto ter a seguinte estrutura

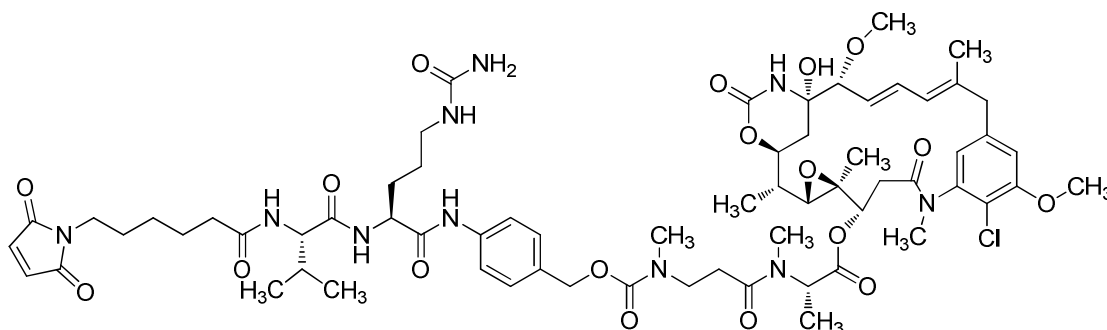


em que **Ab** é um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

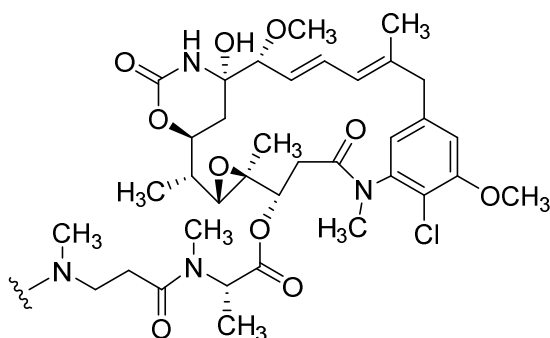
25. Composto, caracterizado pelo fato de o composto ter a seguinte estrutura



26. Composto, caracterizado pelo fato de o composto ter a seguinte estrutura



27. Conjugado droga-anticorpo, caracterizado pelo fato de compreender um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno conjugado a uma carga útil da seguinte fórmula



28. Uso do composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1, 15, 17, 18, 22 ou 24 ou da composição farmacêutica como definida na reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o composto ou composição farmacêutica é para a fabricação de um medicamento para o tratamento, prevenção e/ou melhora de câncer, glioblastoma, câncer de próstata, câncer de mama, câncer de pulmão, melanoma, leucemia mieloide

crônica, carcinoma de células escamosas, renal carcinoma celular, câncer de cólon, câncer de rim, câncer de pâncreas, câncer de fígado, câncer de ovário, câncer de pele, linfoma, leucemia, lúpus sistêmico, artrite reumatóide, esclerose múltipla, infecções virais, infecção por CMV, infecção por HIV, AIDS, hepatite, infecção por HPV, dor, distúrbios mentais, doenças autoimunes, doenças infecciosas, doenças neurodegenerativas, distúrbios ósseos, doenças cardiovasculares e/ou inflamação.

29. Uso do composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1, 15, 17, 18, 22 ou 24 ou da composição farmacêutica como definida na reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o composto ou composição farmacêutica é para a fabricação de um medicamento para o tratamento de um ou mais cânceres em um indivíduo que sofre de pelo menos um dos cânceres.

30. Uso, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o uso é para o tratamento de tumores associados a um antígeno associado a tumor selecionado do grupo que consiste em antígeno carcinoembrionário (CEA), antígeno de câncer 125 (CA-125) e alfa-fetoproteína (AFP).

31. Conjugado anticorpo-droga, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que é para o tratamento, prevenção e/ou melhora de câncer, glioblastoma, câncer de próstata, câncer de mama, câncer de pulmão, melanoma, leucemia mieloide crônica, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células renais, câncer de cólon, câncer de rim, câncer de pâncreas, câncer de fígado, câncer de ovário, câncer de pele, linfoma, leucemia, lúpus sistêmico, artrite reumatóide, esclerose múltipla, infecções virais, infecção por CMV, infecção por HIV, AIDS, hepatite, infecção por HPV, dor, transtornos mentais, doenças autoimunes, doenças infecciosas, doenças neurodegenerativas, doenças ósseas, doenças cardiovasculares e/ou inflamação.

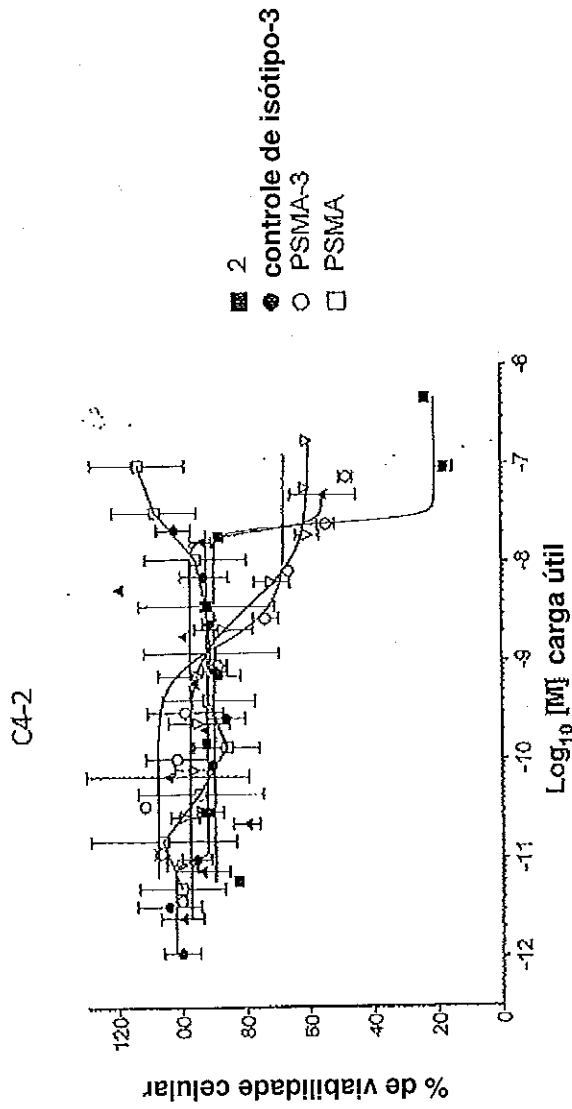


FIGURA 1A

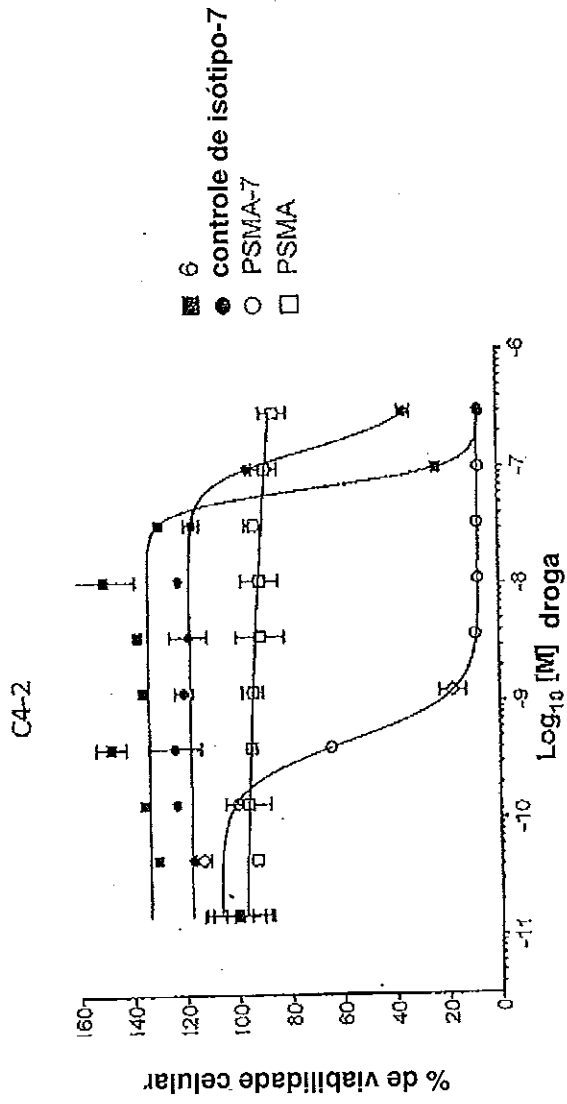


FIGURA 1B

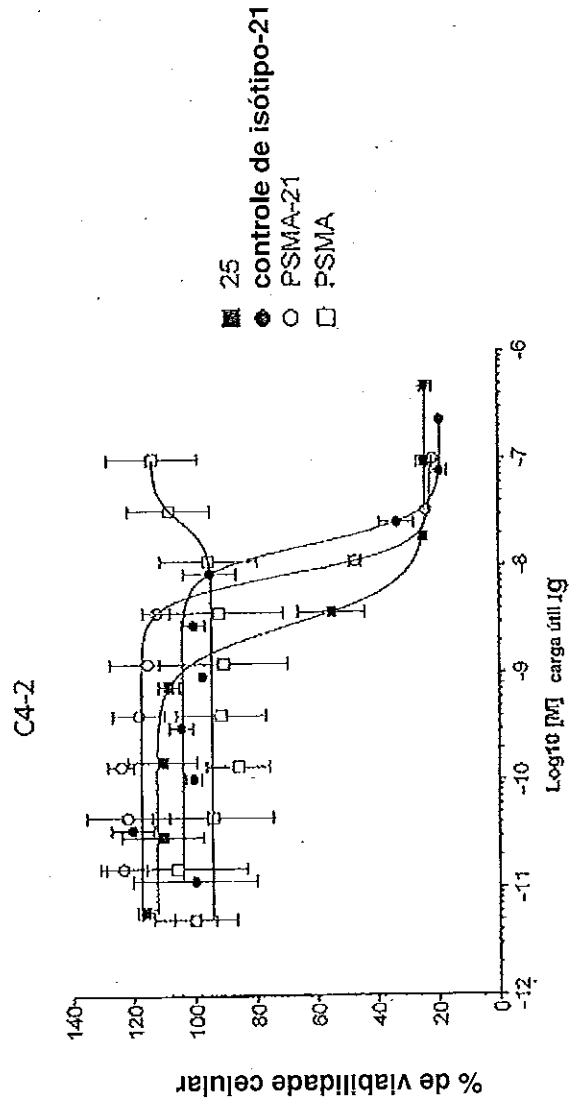


FIGURA 1C

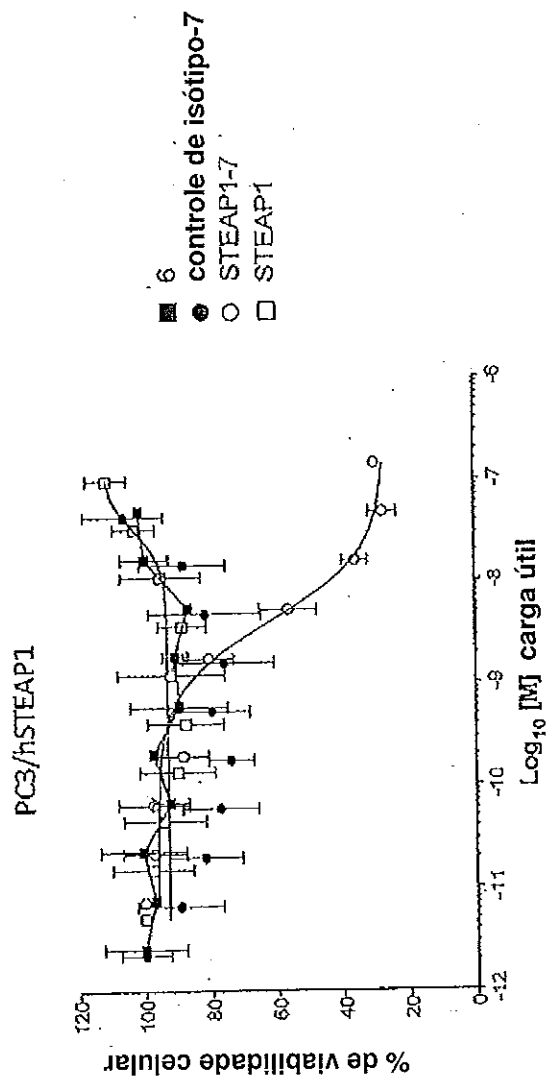


FIGURA 2

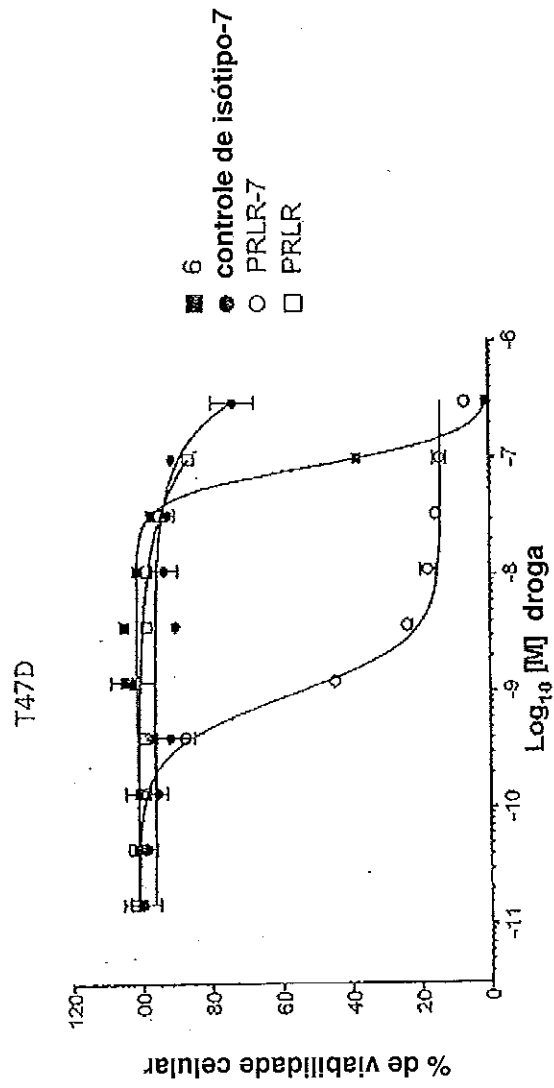


FIGURA 3

HEK293/hEGFRvIII

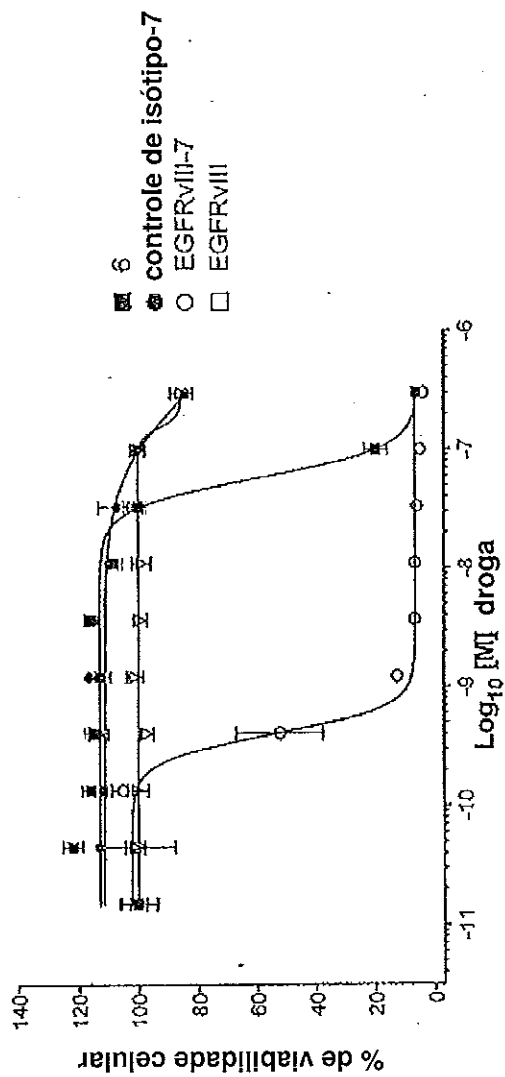


FIGURA 4

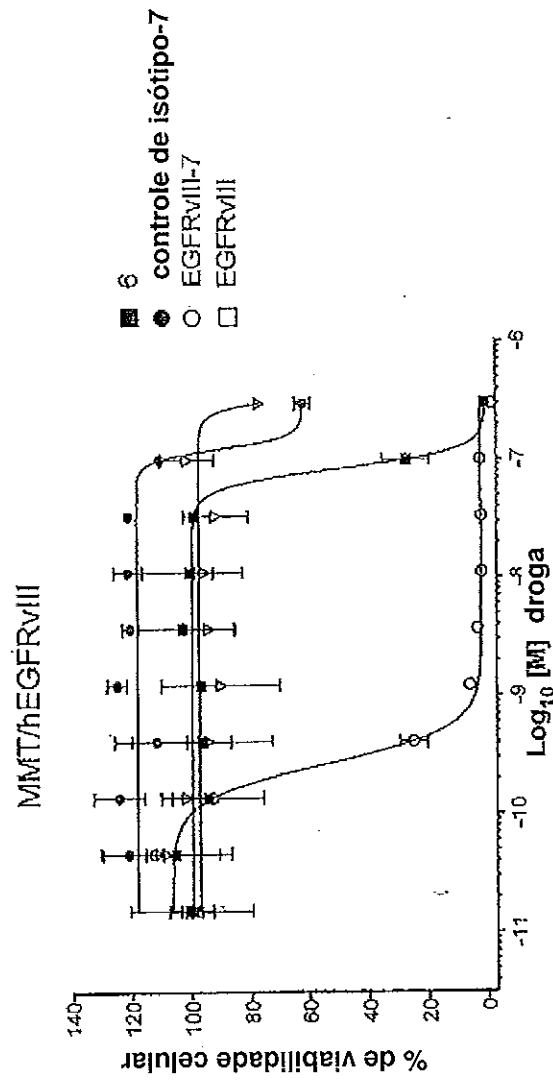


FIGURA 5

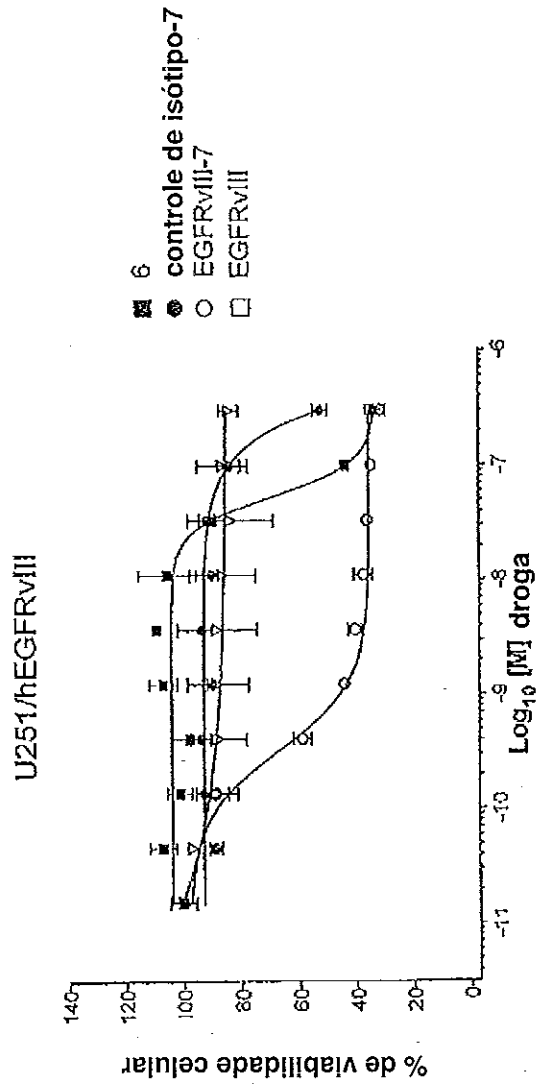


FIGURA 6

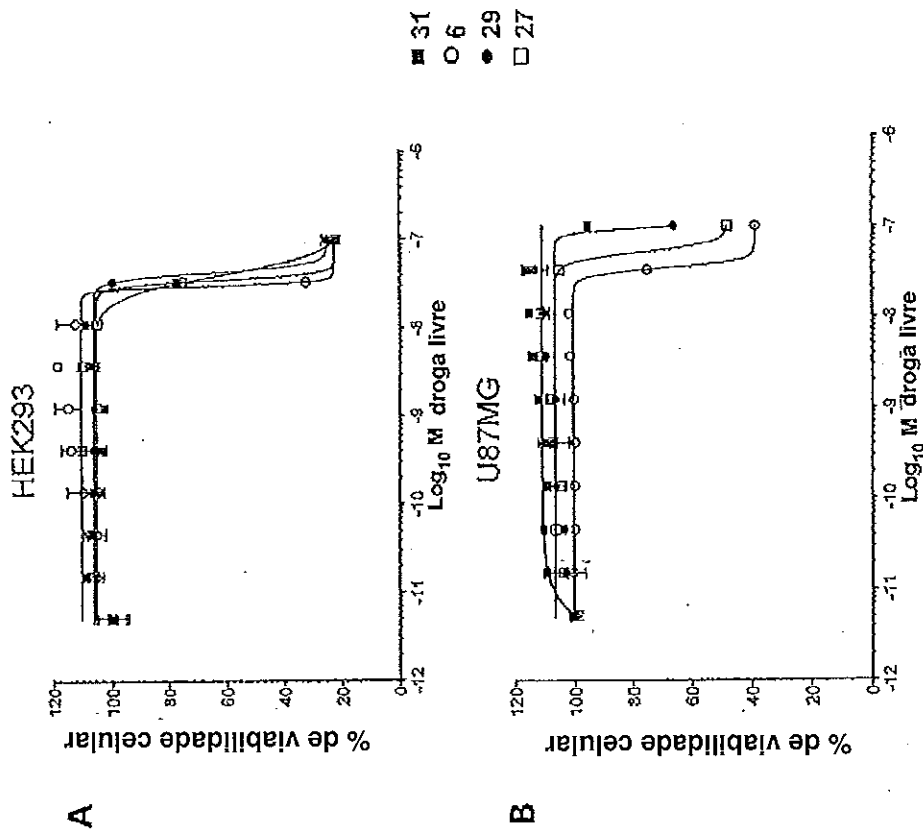


FIGURA 7

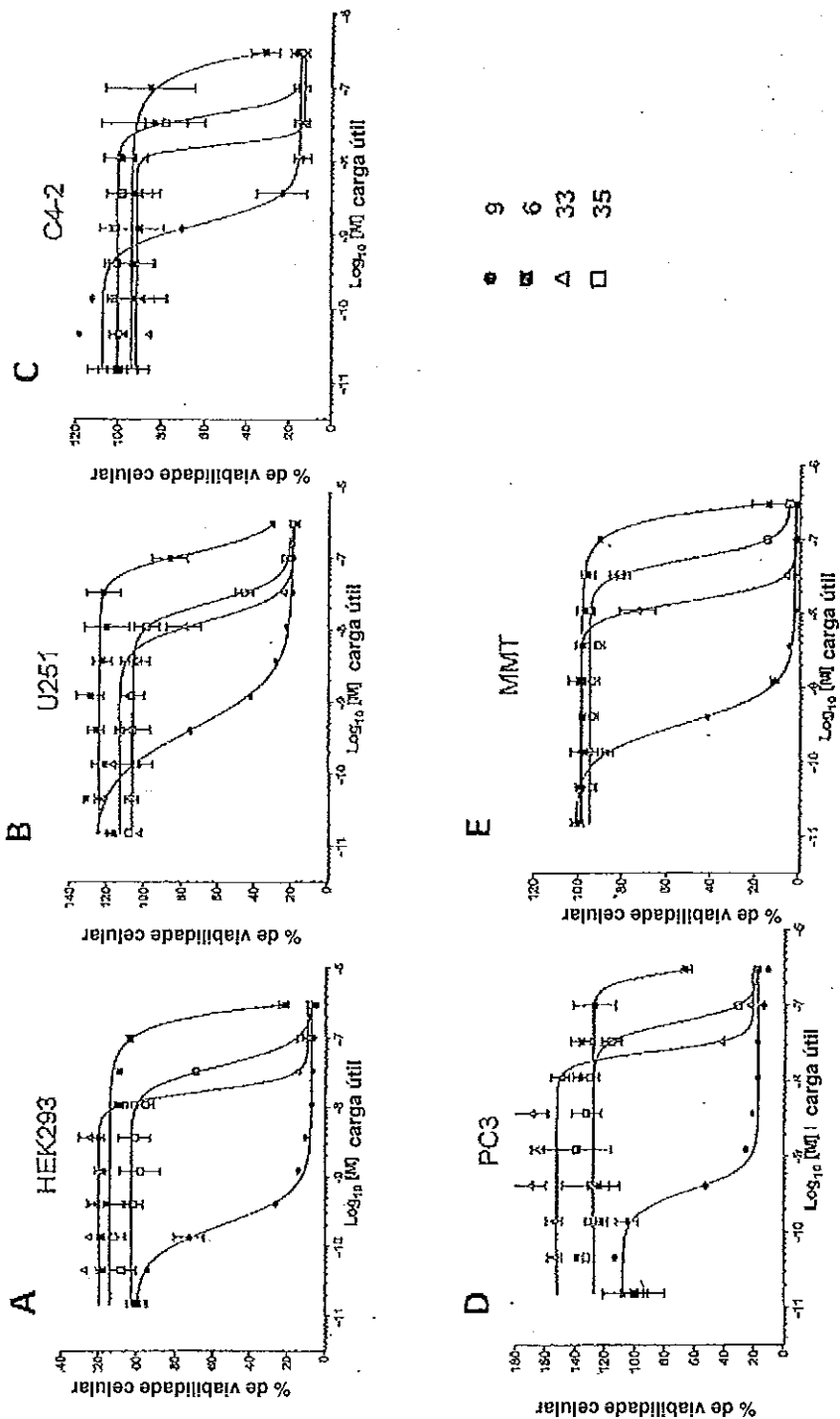


FIGURA 8