



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

(21) BR 112012002615-1 A2



(22) Data do Depósito: 02/08/2010

(43) Data da Publicação Nacional: 03/11/2020

(54) Título: COMPOSTOS ANTIPROLIFERATIVOS, CONJUGADOS, COMPOSIÇÃO DE SUBSTÂNCIA E USO DOS MESMOS

(51) Int. Cl.: A61K 47/48; C07K 5/02; C07K 5/06.

(30) Prioridade Unionista: 03/08/2009 US 61/230,932; 11/08/2009 US 61/232,883.

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

(72) Inventor(es): HENG CHENG; QIANG CONG; SANJEEV GANGWAR; QIAN ZHANG.

(86) Pedido PCT: PCT US2010044078 de 02/08/2010

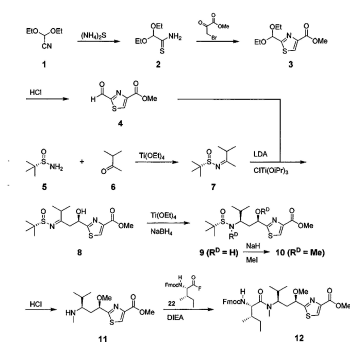
(87) Publicação PCT: WO 2011/017249 de 10/02/2011

(85) Data da Fase Nacional: 03/02/2012

(57) Resumo: COMPOSTOS ANTIPROLIFERATIVOS, CONJUGADOS DOS MESMOS, MÉTODOS PARA OS MESMOS, E USO DOS MESMOS Compostos antiproliferativos tendo uma estrutura representada pela fórmula (II), onde n, R¹, R², R³, R⁴, e R⁵ são como definidos aqui, podem ser usados para tratar tumores, opcionalmente quando conjugados com um ligante tal como um anticorpo.

Fig. 1a

Esquema 1 (parte 1 de 2)



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMPOSTOS ANTIPROLIFERATIVOS, CONJUGADOS, COMPOSIÇÃO DE SUBSTÂNCIA E USO DOS MESMOS**".

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

5 A presente invenção refere-se aos compostos estruturalmente relacionados às tubulisinas, conjugados dos mesmos com um ligante, métodos para fazer e usar tais compostos e conjugados, e composições compreendendo tais compostos e conjugados.

 As tubulisinas são citotoxinas originalmente isoladas a partir de
10 culturas das mixobactérias *Archangium gephyra* ou *Angiococcus disciformis*, com cada organismo produzindo uma mistura diferente de tubulisinas (Sasse et al. 2000; Reichenbach et al. 1998). Sua estrutura cristalina e via biossintética foram elucidadas (Steinmetz et al. 2004) e seus genes da biossíntese foram sequenciados (Hoeftle et al. 2006b). Pretubulisina, um precursor biossintético das tubulisinas, também mostrou possuir atividade significativa em
15 si (Ullrich et al. 2009). (Citações completas para os documentos citados aqui pelo primeiro autor ou inventor e ano estão listadas ao término deste relatório descritivo).

 As tubulisinas pertencem a um grupo de polipeptídeos e depsipeptídeos antimitóticos de ocorrência natural que incluem as fomopsinas, as dolastatinas, e as criptoficinas (Hamel 2002). Agentes antimitóticos diferentes de polipeptídeos ou depsipeptídeos também existem, por exemplo paclitaxel, as maitansinas, e as epotilonas. Durante a mitose, os microtúbulos de uma célula se reorganizam para formar o fuso mitótico, um processo que
20 requer arranjo e desarranjo rápidos das proteínas constituintes do microtúbulo α e β -tubulina. Os agentes antimitóticos bloqueiam este processo e impedem uma célula de sofrer mitose, embora no nível molecular o mecanismo de bloqueio exato pode diferir um agente do outro. As tubulisinas impedem o arranjo das tubulinas nos microtúbulos, levando as células afetadas a acumularam-se na fase de G₂/M e sofrerem apoptose (Khalil et al. 2006). Inver
25 samente, paclitaxel realiza o mesmo resultado final ligando aos microtúbulos e impedindo seu desarranjo.
30

As tubulisinas têm um andaime de tetrapeptidila construído de subunidades de aminoácido sendo uma proteínogênica e três não proteínogênicas: ácido N-metilpipecolínico (Mep), isoleucina (Ile), tubuvalina (Tuv), e ou tubufenilalanina (Tup, R^A igual a H na fórmula (I) abaixo) ou tubutirosina (Tut, R^A igual a OH). Cerca de uma dúzia de tubulisinas de ocorrência natural (nomeadas A, B, etc.) é conhecida, os sítios de variação estrutural entre elas sendo nos resíduos R^A , R^B e R^C como mostrado na Fórmula (I) e Tabela 1:

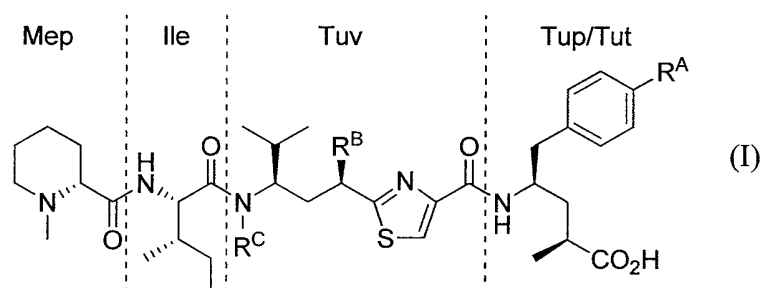


Tabela 1 - Tubulisinas de Ocorrência Natural			
Tubulisina	R^A	R^B	R^C
A	OH	$OC(=O)Me$	$CH_2OC(=O)i-Bu$
B	OH	$OC(=O)Me$	$CH_2OC(=O)n-Pr$
C	OH	$OC(=O)Me$	$CH_2OC(=O)Et$
D	H	$OC(=O)Me$	$CH_2OC(=O)i-Bu$
E	H	$OC(=O)Me$	$CH_2OC(=O)n-Pr$
F	H	$OC(=O)Me$	$CH_2OC(=O)Et$
G	OH	$OC(=O)Me$	$CH_2OC(=O)CH=CH_2$
H	H	$OC(=O)Me$	$CH_2OC(=O)Me$
I	OH	$OC(=O)Me$	$CH_2OC(=O)Me$
U	H	$OC(=O)Me$	H
V	H	OH	H
Z	OH	OH	H
Pretubulisina	H	H	Me

Kaur et al. 2006 estudaram as propriedades antiproliferativas da tubulisina A e descobriram que foi mais potente que outros agentes antimitóticos tais como paclitaxel e vinblastina e era ativa em ensaios de xenotransplante contra uma variedade de linhagens celulares de câncer. Ainda, a tubulisi-

na A induziu apoptose em células cancerosas mas não em células normais e mostrou propriedades antiangiogênicas potenciais significativas em ensaios *in vitro*. As propriedades antimitóticas das outras tubulisinas foram também avaliadas e verificou-se que geralmente se comparam geralmente favoravelmente àquelas dos agentes antimitóticos de não tubulisina (vide, por exemplo, Balasubramanian et al. 2009; Steinmetz et al. 2004; Wipf et al. 2004). Por estas razões, há interesse considerável nas tubulisinas como agentes anticâncer (vide, por exemplo, Domling et al. 2005c; Hamel 2002).

10 Numerosas publicações descrevem esforços direcionados à síntese das tubulisinas, incluindo: Balasubramanian et al. 2009; Domling et al. 2006; Hoefle et al. 2003; Neri et al. 2006; Peltier et al. 2006; Sani et al. 2007; Sasse et al. 2007; Shankar et al. 2009; Shibue et al. 2009; e Wipf et al. 2004. Outras publicações descrevem estudos da relação de estrutura-atividade (SAR), por meio da preparação e avaliação dos análogos ou derivados de tubulisina: Balasubramanian et al. 2008 e 2009; Domling 2006; Domling et al. 2005a; Ellman et al. 2009; Hoefle et al. 2001 & 2006a; Patterson et al. 2007 & 2008; Richter 2008; Vlahov et al. 2009; Wang et al. 2007; e Wipf et al. 2007 e 2010. Os estudos de SAR exploraram principalmente as variações estruturais no anel de Mep, resíduos R^B e R^C da subunidade de Tuv, e o anel aromático ou cadeia de carbono alifática da subunidade de Tup/Tut.

20 Domling et al. 2005 descrevem conjugados de tubulisinas com uma molécula do par geralmente descrita como um polímero ou uma biomolécula, mas com exemplos atuais limitados ao polietileno glicol (PEG) como a molécula do par. Outros documentos que descrevem conjugados de tubulisinas são Boyd et al. 2008 e 2010; Vlahov et al. 2008a, 2008b e 2010; Leamon et al. 2008 e 2009; Reddy et al. 2009; e Low et al. 2009. Leung et al. 2002 descrevem polipeptídeos polianiônicos que podem ser conjugados com fármacos (incluindo tubulisinas) para melhorar sua bioatividade e solubilidade em água.

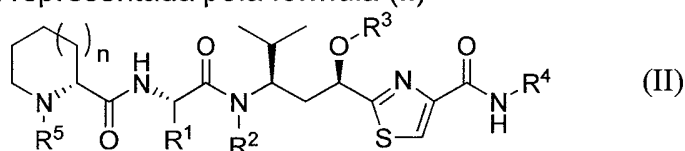
30 Davis et al. 2008 e Schluep et al. 2009 descrevem formulações com base em ciclodextrina em que as tubulisinas são covalentemente ligadas a uma ciclodextrina por meio de uma porção liganteligante de hidrazida-

dissulfeto ligada ao grupo carboxila de Tup/Tut.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção descreve novos compostos antiproliferativos que são estruturalmente relacionados às tubulinas, são citotóxicos ou citoestáticos contra muitas células cancerosas, e acredita-se que ajam por um mecanismo antimitótico. Estes compostos podem ser conjugados com ligantes tais como anticorpos para liberação visada contra células cancerosas.

Em uma modalidade, esta invenção fornece um composto tendo uma estrutura representada pela fórmula (II)

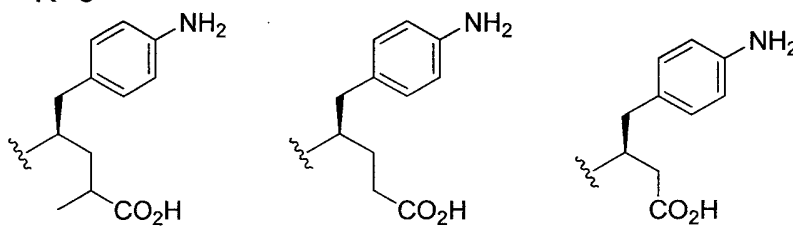


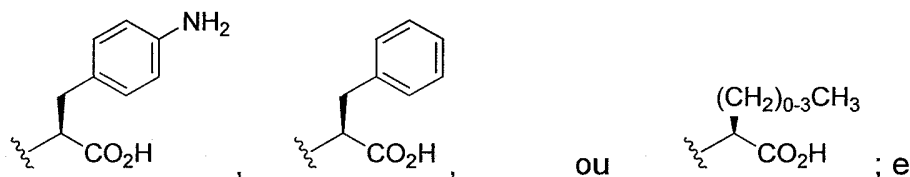
em que

n é 0, 1, ou 2;

R^1 , R^2 e R^3 são independentemente H, C_1 - C_{10} alquila insubstituída ou substituída, C_2 - C_{10} alquenila insubstituída ou substituída, C_2 - C_{10} alquínila insubstituída ou substituída, arila insubstituída ou substituída, heteroarila insubstituída ou substituída, $(CH_2)_{1-2}O(C_1$ - C_{10} alquila) insubstituída ou substituída, $(CH_2)_{1-2}O(C_2$ - C_{10} alquenila) insubstituída ou substituída, $(CH_2)_{1-2}O(C_2$ - C_{10} alquínila) insubstituída ou substituída, $(CH_2)_{1-2}OC(=O)(C_1$ - C_{10} alquila), $(CH_2)_{1-2}OC(=O)(C_2$ - C_{10} alquenila) insubstituída ou substituída, $(CH_2)_{1-2}OC(=O)(C_2$ - C_{10} alquínila) insubstituída ou substituída, $C(=O)(C_1$ - C_{10} alquila) insubstituída ou substituída, $C(=O)(C_2$ - C_{10} alquenila) insubstituída ou substituída, $C(=O)(C_2$ - C_{10} alquínila) insubstituída ou substituída, cicloalifático insubstituído ou substituído, heterocicloalifático insubstituído ou substituído, arilalquila insubstituída ou substituída, ou alquilarila insubstituída ou substituída;

R^4 é

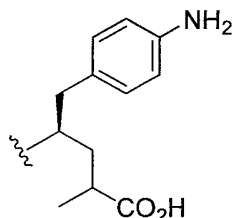




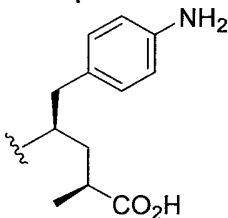
R^5 é H, C_1 - C_5 alquila, C_2 - C_5 alquenila, C_2 - C_5 alquinila, $CO(C_1$ - C_5 alquila), $CO(C_2$ - C_5 alquenila), ou $CO(C_2$ - C_5 alquinila);

ou um éster farmaceuticamente aceitável dos mesmos, uma amida farmaceuticamente aceitável dos mesmos no grupo carboxila de R^4 com o grupo α -amino de um α -aminoácido, ou um sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos.

Um R^4 preferido é



com a estereoquímica no grupo metila alfa para a carboxila sendo mais preferivelmente que correspondendo às tubulinas naturais, isto é:



Esta invenção também provê novos intermediários úteis para sintetizar compostos de acordo com a fórmula (II).

Em outra modalidade, esta invenção fornece um composto desta invenção conjugado por meio de uma porção liganteligante com um ligante (preferivelmente um anticorpo, mais preferivelmente um anticorpo monoclonal, e o mais preferivelmente um anticorpo monoclonal humano) para sua liberação seletiva para uma célula alvo tal como uma célula cancerosa.

Em outra modalidade, é fornecida uma composição de substância compreendendo um composto desta invenção e uma porção liganteligante, adequada para conjugação com um ligante.

Em outra modalidade, esta invenção fornece um método para i-

nibir a proliferação de células cancerosas em um sujeito sofrendo de câncer, compreendendo administrar ao sujeito uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto desta invenção ou um conjugado do mesmo com um ligante (particularmente um anticorpo). Em outra modalidade, é fornecido um

5 método para inibir a proliferação de células cancerosas, compreendendo contatar tais células com um composto desta invenção ou um conjugado do mesmo com um ligante (particularmente um anticorpo), sob condições suficientes para inibir o crescimento de tais células cancerosas. As células cancerosas podem ser câncer colorretal, câncer de fígado, câncer de próstata,

10 câncer de mama, melanoma, glioblastoma, câncer pulmonar, câncer pancreático, câncer ovariano, mieloma múltiplo, câncer renal, leucemia, ou células de linfoma. Onde o ligante for um anticorpo, prefere-se que o anticorpo ligue a um antígeno expresso pelas células cancerosas.

Em outra modalidade, é fornecido um método de tratar um câncer em um sujeito sofrendo de tal câncer, compreendendo administrar ao

15 sujeito uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto desta invenção ou um conjugado do mesmo com um ligante (particularmente um anticorpo). Em outra modalidade, é fornecido o uso de um composto desta invenção (ou um conjugado do mesmo com um ligante (particularmente um

20 anticorpo) para a preparação de um medicamento para o tratamento de câncer. Nestas modalidades, o câncer pode ser câncer colorretal, câncer de fígado, câncer de próstata, câncer de mama, melanoma, glioblastoma, câncer pulmonar, câncer pancreático, câncer ovariano, mieloma múltiplo, câncer renal, leucemia, ou linfoma. Onde o ligante for um anticorpo, prefere-se que

25 o anticorpo ligue a um antígeno expresso pelas células do câncer.

Em outra modalidade, é fornecido o uso de um composto desta invenção ou um conjugado do mesmo com um ligante (preferivelmente um anticorpo) para a preparação de um medicamento para tratar um câncer em um sujeito sofrendo de tal câncer.

30 BREVE DESCRIÇÃO DO(S) DESENHO(S)

As figuras 1a e 1b descrevem, em combinação, o Esquema 1 para fazer os compostos desta invenção.

As figuras 2 e 3 descrevem os Esquemas 2 e 3, respectivamente, também para fazer os compostos desta invenção.

5 A figura 4 descreve um Esquema 4 adequado para ligar um ligante de peptidila e um grupo maleimida reativo aos compostos desta invenção.

As figuras 5, 6, e 7 descrevem os Esquemas 5, 6, e 7, respectivamente, para fazer os compostos desta invenção.

10 As figuras 8a, 8b, e 8c mostram os Esquemas 8, 9, e 10, respectivamente, para fazer os intermediários úteis para preparar os compostos desta invenção.

As figuras 9 e 10 mostram os Esquemas 11 e 12, respectivamente, ilustrando como os intermediários tais como aqueles mostrados nas figuras 8a-8c podem ser elaborados nos compostos desta invenção.

15 As figuras 11a e 11b mostram os diagramas para ensaios de proliferação de ^3H timidina para um primeiro conjunto de compostos desta invenção, contra dois tipos diferentes de células cancerosas.

As figuras 12a e 12b mostram os diagramas para ensaios de proliferação de luminescência de ATP para um segundo conjunto de compostos desta invenção, contra dois tipos diferentes de células cancerosas.

20 As figuras 12c e 12d mostram os diagramas para ensaios de proliferação de ^3H timidina para o mesmo segundo conjunto de compostos e contra os mesmos dois tipos de células cancerosas.

25 A figura 13 mostra a atividade contra células cancerosas renais de conjugados dos compostos desta invenção em ensaios de proliferação de ^3H timidina.

A figura 14 mostra a atividade contra células cancerosas renais de conjugados dos compostos desta invenção em estudos de xenoenxerto.

A figura 15 mostra um Esquema 13 para fazer intermediários úteis para fazer os compostos desta invenção.

30 A figura 16 mostra um Esquema 14 para fazer os compostos desta invenção de intermediários feitos pelo Esquema 13.

As figuras 17 e 18 mostram os Esquemas 15 e 16, respectiva-

mente, para fazer compostos prontos para conjugação desta invenção.

A figura 19 mostra o Esquema 17 para fazer um intermediário útil para fazer os compostos desta invenção.

5 As figuras 20a e 20b mostram no Esquema de combinação 18 para a preparação dos compostos desta invenção do intermediário do Esquema 17.

A figura 21 mostra o Esquema 19 para fazer um intermediário usado no Esquema 18.

10 A figura 22 mostra o Esquema 20 para a síntese de um intermediário usado em fazer os compostos desta invenção.

A figura 23 mostra o Esquema 21 para fazer os compostos desta invenção do intermediário do Esquema 20.

A figura 24 mostra o Esquema 22 para fazer o ainda outro intermediário útil para fazer os compostos desta invenção.

15 A figura 25 mostra o Esquema 23 para fazer os compostos desta invenção do intermediário do Esquema 22.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

DEFINIÇÕES

20 "Anticorpo" significa anticorpos inteiros e qualquer fragmento de ligação de antígeno (isto é, "porção de ligação de antígeno") ou cadeias simples dos mesmos. Um anticorpo inteiro é uma glicoproteína compreendendo pelo menos duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interconectadas por ligações de dissulfeto. Cada cadeia pesada compreende uma região variável da cadeia pesada (V_H) e uma região constante da ca-
25 deia pesada compreendendo três domínios, CH₁, CH₂ e CH₃. Cada cadeia leve compreende uma região variável da cadeia leve (V_L ou V_K) e uma região constante da cadeia leve compreendendo um domínio simples, C_L. As regiões V_H e V_L podem ser ainda subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões de determinação de complementaridade (CDRs), inte-
30 respaçadas com regiões de estrutura mais conservadas (FRs). Cada V_H e V_L compreende três CDRs e quatro FRs, dispostas do término amino para carbóxi na seguinte ordem: FR¹, CDR¹, FR², CDR², FR³, CDR³, e FR⁴. As

regiões variáveis contêm um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes podem mediar a ligação do anticorpo com tecidos ou fatores hospedeiros, incluindo várias células do sistema imune (por exemplo, células efectoras) e o primeiro componente (Clq) do sistema de complemento clássico. Um anticorpo é dito "especificamente ligar" a um antígeno X se o anticorpo ligar ao antígeno X com uma K_D de 5×10^{-8} M ou menos, mais preferivelmente 1×10^{-8} M ou menos, mais preferivelmente 6×10^{-9} M ou menos, mais preferivelmente 3×10^{-9} M ou menos, até mesmo mais preferivelmente 2×10^{-9} M ou menos. O anticorpo pode ser quimérico, humanizado, ou, preferivelmente, humano. A região constante da cadeia pesada pode ser engenheirada para afetar o tipo ou extensão da glicosilação, para estender a meia-vida do anticorpo, para intensificar ou reduzir as interações com as células efectoras ou o sistema de complemento, ou modular alguma outra propriedade. A engenharia pode ser realizada mediante substituição, adição, ou deleção de um ou mais aminoácidos ou mediante substituição de um domínio com um domínio de outro tipo de imunoglobulina, ou uma combinação do antecedente.

"Fragmento de anticorpo" e "porção de ligação de antígeno" de um anticorpo (ou simplesmente "porção de anticorpo") significam um ou mais fragmentos de um anticorpo que retêm a habilidade para especificamente ligar a um antígeno. Foi mostrado que a função de ligação de antígeno de um anticorpo pode ser executada por fragmentos de um anticorpo completo, tais como (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente que consiste nos domínios V_L , V_H , C_L e C_{H1} ; (ii) um fragmento $F(ab')_2$, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte de dissulfeto na região de dobradiça; (iii) um fragmento Fab' sendo essencialmente um Fab com parte da região de dobradiça (vide, por exemplo, Abbas et al., *Cellular and Molecular Immunology*, 6ª Ed., Saunders Elsevier 2007); (iv) um fragmento Fd que consiste nos domínios V_H e C_{H1} ; (v) um fragmento Fv que consiste nos domínios V_L e V_H de um braço simples de um anticorpo, (vi) um fragmento dAb (Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546) que consiste em um domínio de V_H ; (vii) uma região de determinação de

complementaridade isolada (CDR); e (viii) um nanocorpo, uma região variável da cadeia pesada contendo um domínio variável simples e dois domínios constantes. Além disso, embora os dois domínios do fragmento Fv, V_L e V_H, sejam codificados por genes separados, eles podem ser unidos, usando métodos recombinantes, por um ligante sintético que os permite serem feitos como uma cadeia de proteína simples em que as regiões V_L e V_H pareiam para formar moléculas monovalentes (conhecidas como cadeia simples Fv, ou scFv); vide, por exemplo, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; e Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Tais anticorpos de cadeia simples são também abrangidos dentro do termo "porção de ligação de antígeno" de um anticorpo.

Um "anticorpo isolado" significa um anticorpo que está substancialmente livre de outros anticorpos tendo especificidades antigênicas diferentes (por exemplo, um anticorpo isolado que especificamente liga o antígeno X é substancialmente isento de anticorpos que especificamente ligam antígenos diferentes do antígeno X). Um anticorpo isolado que especificamente liga o antígeno X pode, porém, ter reatividade cruzada com outros antígenos, tais como moléculas do antígeno X de outras espécies. Em certas modalidades, um anticorpo isolado liga especificamente ao antígeno X humano e não reage cruzado com outros antígenos do antígeno X (não humano). Além disso, um anticorpo isolado pode ser substancialmente isento de outro material celular e/ou químicas.

"Anticorpo monoclonal" ou "composição de anticorpo monoclonal" significa uma preparação de moléculas de anticorpo de composição molecular simples que exibe uma especificidade de ligação simples e afinidade por um epítipo particular.

"Anticorpo humano" significa um anticorpo tendo regiões variáveis em que as regiões de estrutura e de CDR (e a região constante, se presente) são derivadas das sequências de imunoglobulina de linha germinal humana. Anticorpos humanos podem incluir modificações posteriores, incluindo modificações naturais ou sintéticas. Anticorpos humanos podem incluir resíduos de aminoácido não codificados por sequências de imunoglobulina

de linha germinal humana (por exemplo, mutações introduzidas por mutagenese aleatória ou específica *in vitro* ou através de mutação somática *in vivo*). Porém, "anticorpo humano" não inclui anticorpos em que as sequências de CDR derivadas da linha germinal de outras espécies mamíferas, tais como um camundongo, foram enxertadas sobre as sequências de estrutura humana.

"Anticorpo monoclonal humano" significa um anticorpo que exibe uma especificidade de ligação simples tendo regiões variáveis em que as regiões estrutura e de CDR são derivadas das sequências de imunoglobulina de linha germinal humana. Em uma modalidade, os anticorpos monoclonais humanos são produzidos por um hibridoma que inclui uma célula B obtida de um animal não humano transgênico, por exemplo, um camundongo transgênico, tendo um genoma compreendendo um transgene de cadeia pesada humano e um transgene de cadeia leve fundido com uma célula imortalizada.

"Alifático" significa uma porção de hidrocarboneto de cadeia reta ou ramificada, saturada ou insaturada, não aromática tendo o número especificado de átomos de carbono (por exemplo, como em "C₃ alifático", "C₁-C₅ alifático", ou "C₁ a C₅ alifático", as duas frases posteriores sendo sinônimos a uma porção alifática tendo de 1 a 5 átomos de carbono) ou, onde o número de átomos de carbono não é especificado explicitamente, de 1 a 4 átomos de carbono (2 a 4 carbonos na circunstância de porções alifáticas insaturadas).

"Alquila" significa uma porção alifática saturada, com a mesma convenção para designar o número de átomos de carbono que são aplicáveis. Por via de ilustração, porções de C₁-C₄alquila incluem, mas não são limitadas a, metila, etila, propila, isopropila, isobutila, *t*-butila, 1-butila, 2-butila, e outros.

"Alquenila" significa uma porção alifática tendo pelo menos uma ligação dupla de carbono-carbono, com a mesma convenção para designar o número de átomos de carbono que são aplicáveis. Por via de ilustração, porções de C₂-C₄alquenila incluem, mas não são limitados a, etenila (vinila),

2-propenila (alila ou prop-2-enila), cis-1-propenila, trans-1-propenila, *E* (ou *Z*) 2-butenila, 3-butenila, 1,3-butadienila (but-1,3-dienila) e outros.

5 "Alquinila" significa uma porção alifática tendo pelo menos uma ligação tripla de carbono-carbono, com a mesma convenção para designar o número de átomos de carbono que são aplicáveis. Por via de ilustração, os grupos C₂-C₄alquinila incluem etinila (acetilenila), propargila (prop-2-inila), 1-propinila, but-2-inila, e outros.

10 "Cicloalifático" significa uma porção de hidrocarboneto saturada ou insaturada, não aromática tendo de 1 a 3 anéis, cada anel tendo de 3 a 8 (preferivelmente de 3 a 6) átomos de carbono. "Cicloalquila" significa uma porção cicloalifática em que cada anel é saturado. "Cicloalquenila" significa uma porção cicloalifática em que pelo menos um anel tem pelo menos uma ligação dupla de carbono-carbono. "Cicloalquinila" significa uma porção cicloalifática em que pelo menos um anel tem pelo menos uma ligação tripla

15 de carbono-carbono. Por via de ilustração, as porções cicloalifáticas incluem, mas não são limitadas a, ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila, ciclopentenila, ciclo-hexila, ciclo-hexenila, ciclo-heptila, ciclo-octila, e adamantila. Porções cicloalifáticas preferidas são as de cicloalquila, especialmente ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila, e ciclo-hexila.

20 "Heterocicloalifático" significa uma porção cicloalifática em que, em pelo menos um anel da mesma, até três (preferivelmente 1 a 2) carbonos foram independentemente substituídos com um heteroátomo selecionado de N, O, ou S, onde N e S podem ser opcionalmente oxidados e N podem ser opcionalmente quaternizados. Similarmente, "heterocicloalquila", "heterocicloalquenila", e "heterocicloalquinila" significam uma porção de cicloalquila,

25 cicloalquenila, ou cicloalquinila, respectivamente em que pelo menos um anel da mesma foi assim modificado. Porções heterocicloalifáticas exemplares incluem aziridinila, azetidinila, 1,3-dioxanila, oxetanila, tetra-hidrofurila, pirrolidinila, piperidinila, piperazinila, tetra-hidropiranila, tetra-hidrotiopiranila,

30 tetra-hidrotiopiranil sulfona, morfolinila, tiomorfolinila, sulfóxido de tiomorfolinila, tiomorfolinil sulfona, 1,3-dioxolanila, tetra-hidro-1,1-dioxotienila, 1,4-dioxanila, tietanila, e outros.

"Alcóxi", "arilóxi", "alquiltio", e "ariltio" significam -O(alquila), O(arila), S(alquila), e S(arila), respectivamente. Exemplos são metóxi, fenóxi, metiltio, e feniltio, respectivamente.

"Halogênio" ou "halo" significam flúor, cloro, bromo ou iodo.

- 5 "Arila" significa uma porção de hidrocarboneto tendo um sistema de anel mono, bi, ou tricíclico em que cada anel tem de 3 a 7 átomos de carbono e pelo menos um anel é aromático. Os anéis no sistema de anel podem ser fundidos uns aos outros (como em naftila) ou ligados uns aos outros (como em bifenila) e podem ser fundidos ou ligados aos anéis não aromáticos (como em indanila ou ciclo-hexilfenila). Por via de ilustração ainda, as porções de arila incluem, mas não são limitadas a, fenila, naftila, tetra-
- 10 hidronaftila, indanila, bifenila, fenantrila, antracenila, e acenaftila.

- "Heteroarila" significa uma porção tendo um sistema de anel mono, bi, ou tricíclico em que cada anel tem de 3 a 7 átomos de carbono e
- 15 pelo menos um anel é um anel aromático contendo de 1 a 4 heteroátomos independentemente selecionados de N, O, ou S, onde N e S podem ser opcionalmente oxidados e N pode ser opcionalmente quaternizado. Tal pelo menos um heteroátomo contendo anel aromático pode ser fundido a outros tipos de anéis (como em benzofuranila ou tetra-hidroisoquinolila) ou direta-
- 20 mente ligado a outros tipos de anéis (como em fenilpiridila de ou 2-ciclopentilpiridila). Por via de ilustração ainda, as porções de heteroarila incluem pirrolila, furanila, tiofenila (tienila), imidazolila, pirazolila, oxazolila, isoxazolila, tiazolila, isotiazolila, triazolila, tetrazolila, piridila, N-oxopiridila, piridazinila, pirimidinila, pirazinila, quinolinila, isoquinolinila, quinazolinila, cinoli-
- 25 nila, quinozalinila, naftiridinila, benzofuranila, indolila, benzotiofenila, oxadiazolila, tiadiazolila, fenotiazolila, benzimidazolila, benzotriazolila, dibenzofuranila, carbazolila, dibenzotiofenila, acridinila, e outros.

- Onde for indicado que uma porção pode ser substituída, tal como pelo uso da frase "substituído ou insubstituído" ou "opcionalmente substituído" como em "C₁-C₅ alquila substituída ou insubstituída" ou "heteroarila
- 30 opcionalmente substituída", tal porção pode ter um ou mais substituintes independentemente selecionados, preferivelmente um a cinco em número,

mais preferivelmente um ou dois em número. Substituintes e padrões de substituição podem ser selecionados por alguém versado na técnica, levando em conta a porção à qual o substituinte está ligado, para fornecer os compostos que são quimicamente estáveis e que podem ser sintetizados por técnicas conhecidas na técnica como também pelos métodos expostos aqui.

"Arilalquila", (heterocicloalifático)alquila, "arilalquenila", "arilalquinila", "biarilalquila", e outros significam uma porção de alquila, alquenila, ou alquinila, como pode ser o caso, substituída com uma porção de arila, heterocicloalifático, biarila, etc., como pode ser o caso, com a valência aberta (insatisfeita) para a porção de alquila, alquenila, ou alquinila, por exemplo como em benzila, fenetila, N-imidazoiletila, N-morfolinoetila, e outros. Inversamente, "alquilarila", "alquenilcicloalquila", e outros significam uma porção de arila, cicloalquila, etc., como pode ser o caso, substituída com uma porção de alquila, alquenila, etc., como pode ser o caso, por exemplo como em metilfenila (tolila) ou alilciclo-hexila. "Hidroxi-alquila", "haloalquila", "alquilarila", "cianoarila", e outros significam uma porção de alquila, arila, etc., como pode ser o caso, substituída com um ou mais do substituinte identificado (hidroxila, halo, etc., como pode ser o caso).

Por via de ilustração, substituintes permissíveis incluem, mas não são limitados a, alquila (especialmente metila ou etila), alquenila (especialmente alila), alquinila, arila, heteroarila, cicloalifático, heterocicloalifático, halo (especialmente fluoro), haloalquila (especialmente trifluorometila), hidroxila, hidroxi-alquila (especialmente hidroxietila), ciano, nitro, alcóxi, O(hidroxi-alquila), O(haloalquila) (especialmente OCF_3), O(cicloalquila), O(heterocicloalquila), O(arila), alquiltio, ariltio, $=\text{O}$, $=\text{NH}$, $=\text{N}(\text{alquila})$, $=\text{NOH}$, $=\text{NO}(\text{alquila})$, $\text{C}(=\text{O})(\text{alquila})$, $\text{C}(=\text{O})\text{H}$, CO_2H , $\text{C}(=\text{O})\text{NHOH}$, $\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{alquila})$, $\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{hidroxialquila})$, $\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$, $\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{alquila})$, $\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{alquila})_2$, $\text{OC}(=\text{O})(\text{alquila})$, $\text{OC}(=\text{O})(\text{hidroxialquila})$, $\text{OC}(=\text{O})\text{O}(\text{alquila})$, $\text{OC}(=\text{O})\text{O}(\text{hidroxialquila})$, $\text{OC}(=\text{O})\text{NH}_2$, $\text{OC}(=\text{O})\text{NH}(\text{alquila})$, $\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{alquila})_2$, azido, NH_2 , $\text{NH}(\text{alquila})$, $\text{N}(\text{alquila})_2$, $\text{NH}(\text{arila})$, $\text{NH}(\text{hidroxialquila})$, $\text{NHC}(=\text{O})(\text{alquila})$, $\text{NHC}(=\text{O})\text{H}$, $\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}_2$, $\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}(\text{alquila})$, $\text{NHC}(=\text{O})\text{N}(\text{alquila})_2$, $\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $\text{OSO}_2(\text{alquila})$,

SH, S(alquila), S(arila), S(cicloalquila), S(=O)alquila, SO₂(alquila), SO₂NH₂, SO₂NH(alquila), SO₂N(alquila)₂, e outros.

- Onde a porção sendo substituída for uma porção alifática, substituintes preferidos são arila, heteroarila, cicloalifático, heterocicloalifático, halo, hidroxila, ciano, nitro, alcóxi, O(hidroخالquila), O(haloalquila), O(cicloalquila), O(heterocicloalquila), O(arila), alquiltio, ariltio, =O, =NH, =N(alquila), =NOH, =NO(alquila), CO₂H, C(=O)NHOH, C(=O)O(alquila), C(=O)O(hidroخالquila), C(=O)NH₂, C(=O)NH(alquila), C(=O)N(alquila)₂, OC(=O)(alquila), OC(=O)(hidroخالquila), OC(=O)O(alquila), OC(=O)O(hidroخالquila), OC(=O)NH₂, OC(=O)NH(alquila), OC(=O)N(alquila)₂, azido, NH₂, NH(alquila), N(alquila)₂, NH(arila), NH(hidroخالquila), NHC(=O)(alquila), NHC(=O)H, NHC(=O)NH₂, NHC(=O)NH(alquila), NHC(=O)N(alquila)₂, NHC(=NH)NH₂, OSO₂(alquila), SH, S(alquila), S(arila), S(=O)alquila, S(cicloalquila), SO₂(alquila), SO₂NH₂, SO₂NH(alquila), e SO₂N(alquila)₂. Substituintes mais preferidos são halo, hidroxila, ciano, nitro, alcóxi, O(arila), =O, =NOH, =NO(alquila), OC(=O)(alquila), OC(=O)O(alquila), OC(=O)NH₂, OC(=O)NH(alquila), OC(=O)N(alquila)₂, azido, NH₂, NH(alquila), N(alquila)₂, NH(arila), NHC(=O)(alquila), NHC(=O)H, NHC(=O)NH₂, NHC(=O)NH(alquila), NHC(=O)N(alquila)₂, e NHC(=NH)NH₂.

- Onde a porção sendo substituída for uma porção de cicloalifático, heterocicloalifático, arila, ou heteroarila, os substituintes preferidos são alquila, alquenila, alquinila, halo, haloalquila, hidroxila, hidroخالquila, ciano, nitro, alcóxi, O(hidroخالquila), O(haloalquila), O(arila), O(cicloalquila), O(heterocicloalquila), alquiltio, ariltio, C(=O)(alquila), C(=O)H, CO₂H, C(=O)NHOH, C(=O)O(alquila), C(=O)O(hidroخالquila), C(=O)NH₂, C(=O)NH(alquila), C(=O)N(alquila)₂, OC(=O)(alquila), OC(=O)(hidroخالquila), OC(=O)O(alquila), OC(=O)O(hidroخالquila), OC(=O)NH₂, OC(=O)NH(alquila), OC(=O)N(alquila)₂, azido, NH₂, NH(alquila), N(alquila)₂, NH(arila), NH(hidroخالquila), NHC(=O)(alquila), NHC(=O)H, NHC(=O)NH₂, NHC(=O)NH(alquila), NHC(=O)N(alquila)₂, NHC(=NH)NH₂, OSO₂(alquila), SH, S(alquila), S(arila), S(cicloalquila), S(=O)alquila, SO₂(alquila), SO₂NH₂,

SO₂NH(alquila), e SO₂N(alquila)₂. Substituintes mais preferidos são alquila, alquenila, halo, haloalquila, hidroxila, hidroxialquila, ciano, nitro, alcóxi, O(hidroxialquila), C(=O)(alquila), C(=O)H, CO₂H, C(=O)NHOH, C(=O)O(alquila), C(=O)O(hidroxialquila), C(=O)NH₂, C(=O)NH(alquila),

5 C(=O)N(alquila)₂, OC(=O)(alquila), OC(=O)(hidroxialquila), OC(=O)O(alquila), OC(=O)O(hidroxialquila), OC(=O)NH₂, OC(=O)NH(alquila), OC(=O)N(alquila)₂, NH₂, NH(alquila), N(alquila)₂, NH(arila), NHC(=O)(alquila), NHC(=O)H, NHC(=O)NH₂, NHC(=O)NH(alquila), NHC(=O)N(alquila)₂, e NHC(=NH)NH₂.

10 Onde uma faixa for declarada, como em "C₁-C₅ alquila" ou "5 a 10%", tal faixa inclui os pontos de extremidade da faixa, como em C₁ e C₅ em primeiro lugar e 5% e 10% na segunda circunstância.

A menos que estereoisômeros particulares sejam especificamente indicados (por exemplo, por uma ligação em negrito ou pontilhada em

15 um estereocentro relevante em uma fórmula estrutural, por representação de uma ligação dupla como tendo configuração E ou Z em uma fórmula estrutural, ou por uso da nomenclatura de designação da estereoquímica), todos os estereoisômeros são incluídos dentro do escopo da invenção, como compostos puros como também misturas dos mesmos. A menos que do contrário

20 indicado, enantiômeros individuais, diastereômeros, isômeros geométricos, e combinações e misturas dos mesmos são todos abrangidos pela presente invenção.

Aqueles versados na técnica apreciarão que os compostos podem ter formas tautoméricas (por exemplo, forma ceto e enol), forma de ressonância, e formas zwitteriônicas que são equivalentes àquelas descritas

25 nas fórmulas estruturais aqui usadas e que as fórmulas estruturais abrangem tais formas tautoméricas, de ressonância, ou zwitteriônicas.

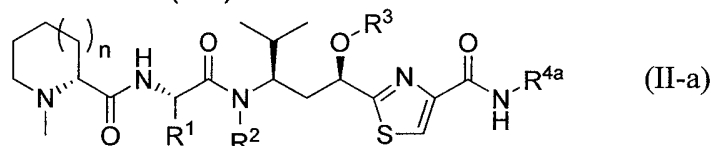
"Éster farmacêuticamente aceitável" significa um éster que se hidrolisa *in vivo* (por exemplo, no corpo humano) para produzir o composto

30 de origem ou um sal do mesmo ou tem atividade *per se* similar à do composto de origem. Ésteres adequados incluem ésteres de C₁-C₅ alquila, C₂-C₅ alquenila ou C₂-C₅ alquinila, especialmente metila, etila ou n-propila.

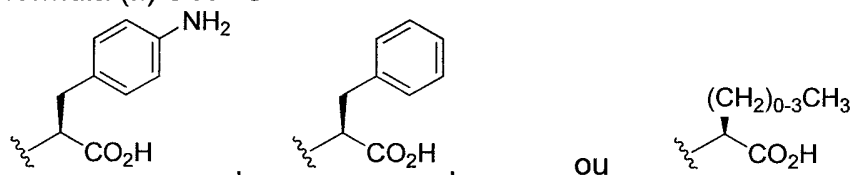
"Sal farmaceuticamente aceitável" significa um sal de um composto adequado para formulação farmacêutica. Onde um composto tem um ou mais grupos básicos, o sal pode ser um sal de adição de ácido, tal como um sulfato, bromidrato, tartarato, mesilato, maleato, citrato, fosfato, acetato, pamoato (embonato), iodidrato, nitrato, cloridrato, lactato, sulfato de metila, fumarato, benzoato, succinato, mesilato, lactobionato, suberato, tosilato, e outros. Onde um composto tiver um ou mais grupos acídicos, o sal pode ser um sal tal como um sal de cálcio, sal de potássio, sal de magnésio, sal de meglumina, sal de amônio, sal de zinco, sal de piperazina, sal de trometamina, sal de lítio, sal de colina, sal de dietilamina, sal de 4-fenilciclo-hexilamina, sal de benztatina, sal de sódio, sal de tetrametilamônio, e outros. Formas cristalinas polimórficas e solvatos são também abrangidos dentro do escopo desta invenção.

COMPOSTOS

Uma modalidade preferida dos compostos da fórmula (II) é representada pela fórmula (II-a)



em que n, R¹, R², e R³ são como anteriormente definidos em relação à fórmula (II) e R^{4a} é

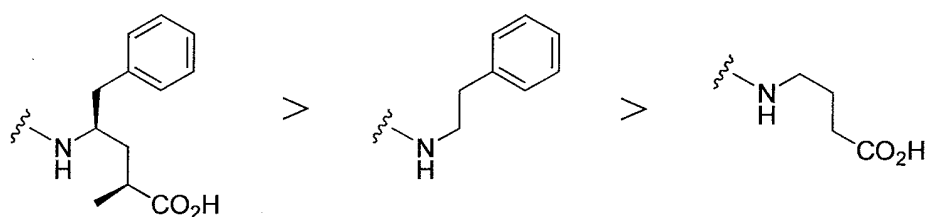


Nos compostos da fórmula (II-a), a subunidade que corresponde a Tup/Tut nas tubulinas de ocorrência natural foi reduzida em tamanho e lipofilicidade por pelo menos dois carbonos, por meio de deleção dos dois átomos de carbono alifáticos seguindo imediatamente o grupo ácido carboxílico - isto é, o grupo amino é agora α para o grupo ácido carboxílico, em vez de γ. Na circunstância em que R⁴ é 4-aminofenilalanina, o grupo amina constitui uma porção polar que ainda reduz a lipofilicidade. Estudos de SAR mostram que a lipofilicidade é um fator importante na atividade biológica das

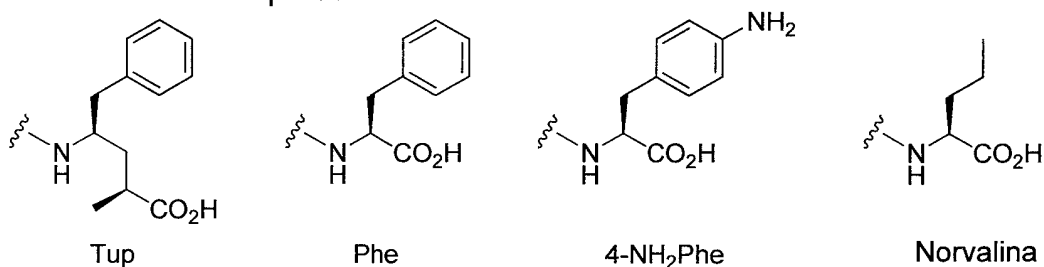
tubulisinas e seus análogos ou derivados. Steinmetz et al. 2004 e Neri et al. 2006 ambos descrevem que as tubulisinas de ocorrência natural mais lipofílicas - isto é, aquelas tendo uma subunidade Tup (R^A igual a H na fórmula I) em vez de uma subunidade Tut (R^A igual a OH na fórmula I) - possuem maior atividade biológica. Ainda, as diferenças nas atividades foram mantidas independentes do tamanho e da lipofilicidade do resíduo de 11-acilóxi (grupo RC na fórmula I) na subunidade Tuv (Steinmetz et al. 2004). Estes resultados indicam que uma subunidade Tup/Tut lipofílica é um elemento de SAR particularmente importante.

As observações acima são parcialmente confirmadas em dois estudos através de Balasubramanian et al. No primeiro (Balasubramanian et al. 2008), análogos dimetilados no carbono alfa para o grupo carboxila na subunidade Tup foram comparados aos análogos do contrário idênticos desmetilados na mesma posição. Os análogos dimetilados tiveram maior atividade antiproliferativa - embora as IC_{50} s de inibição da tubulina *in vitro* fossem comparáveis - como poderia ser esperado com base em sua lipofilicidade relativa. Porém, esta tendência não foi seguida no segundo estudo (Balasubramanian et al. 2009) em que três análogos (um α -carbono desmetilado, um monometilado e um dimetilado) foram comparados. Nesse respeito, o análogo mais ativo foi o desmetilado enquanto o monometilado - isto é, com a subunidade Tup natural - foi sem dúvida o menos ativo. Porém, o análogo posterior teve modificações adicionais em outro lugar na molécula tornando-o essencialmente inativo, tornando obscuro que conclusões de SAR, se houver, podem ser deduzidas.

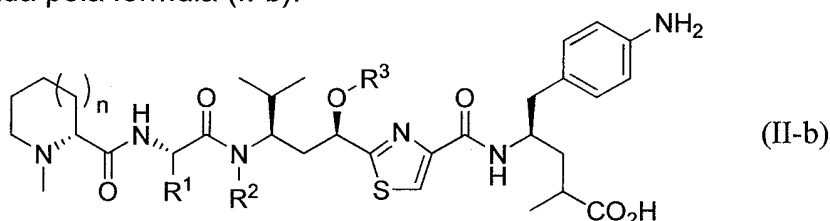
Patterson et al. 2007 e Ellman et al. 2009 compararam as citotoxicidades da tubulisina D e análogos em apenas o grupo fenetila ou o γ -carbóxi foi retido na subunidade Tup. O análogo retido de fenetila foi 3,6 a 13,6 vezes menos ativo que a tubulisina D contra três linhagens celulares de câncer mas quando o grupo γ -carboxila menos lipofílico foi retido, houve uma perda de atividade até maior, de 25,7 a 62,5 vezes menos ativo. Isto é, a ordem da atividade era:

T_l Tubulisina D

Os documentos acima sugerem, individualmente e em combinação, que a lipofilicidade no locus de Tup seja especialmente importante para a atividade biológica das tubulinas. Entretanto, a técnica anterior sugere que a substituição da subunidade Tup com uma fenilalanina (Phe), 4-aminofenilalanina (4-NH₂Phe), norvalina ou outra subunidade de R⁴ de acordo com a fórmula (II-a) seja indesejável, como cada conduziria à perda de pelo menos dois carbonos alifáticos e uma redução consequente na lipofilicidade no locus de Tup/Tut.



Outra modalidade preferida dos compostos da fórmula (II) é re-
10 apresentada pela fórmula (II-b):



em que n , R^1 , R^2 , e R^3 são como anteriormente definidos em respeito pela fórmula (II). Embora fórmulas químicas possam ser encontradas na literatura abrangendo um grupo $-NH_2$ na posição 4 do anel aromático de Tup (Domling 2005a e 2005b), não houve nenhuma descrição sobre como um composto tendo uma tal característica poderia ser feito.

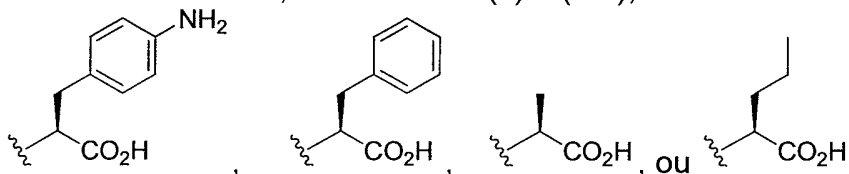
Nas fórmulas (II), (II-a), e (II-b), R¹ preferivelmente é H, C₁-C₅ alquila, C₂-C₅ alquenila, ou C₂-C₅ alquenila, e é mais preferivelmente um resíduo de isoleucila sendo:



Nas fórmulas (II), (II-a), e (II-b), R^2 preferivelmente é H, C_1 - C_5 alquila, C_2 - C_5 alquenila, $CH_2O(C_1$ - C_5 alquila), $CH_2O(C_2$ - C_5 alquenila), $CH_2O(C=O)(C_1$ - C_5 alquila), ou $CH_2OC(=O)(C_2$ - C_5 alquenila); e mais preferivelmente é H, Me, Et, n-Pr, CH_2OMe , CH_2OEt , $CH_2O(n$ -Pr), $CH_2OC(=O)i$ -Bu, $CH_2OC(=O)n$ -Pr, $CH_2OC(=O)CH=CH_2$, ou $CH_2OC(=O)Me$, com Me, n-Pr, CH_2OMe , $CH_2OC(=O)i$ -Bu, e $CH_2O(n$ -Pr) sendo especialmente preferidos.

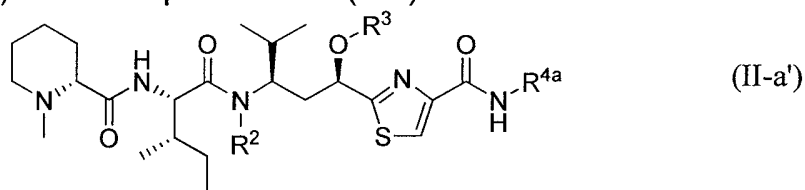
Nas fórmulas (II), (II-a), e (II-b), R^3 preferivelmente é H, C_1 - C_5 alquila, C_2 - C_5 alquenila, $C(=O)C_1$ - C_5 alquila, ou $C(=O)C_2$ - C_5 alquenila; e mais preferivelmente é H, Me, Et, ou $C(=O)Me$.

10 Preferivelmente, nas fórmulas (II) e (II-a), R^4 e R^{4a} são:



Nas fórmulas (II), (II-a), e (II-b), n preferivelmente é 1 e, na circunstância da fórmula (II), R^5 preferivelmente é metila; isto é, o anel na subunidade de Mep preferivelmente é uma N-metila piperidinil ona.

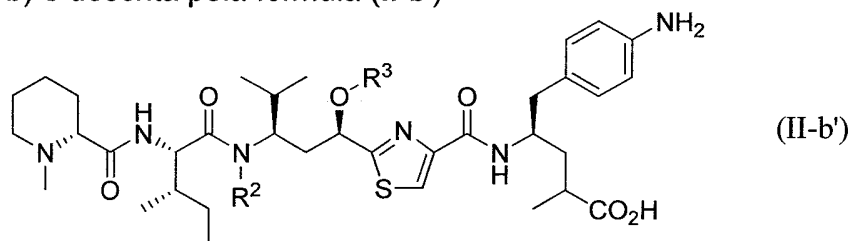
15 Uma modalidade preferida dos compostos de acordo com a fórmula (II-a) é descrita pela fórmula (II-a')



onde R^{4a} é como definido acima em relação à fórmula (II-a), R^2 é H, C_1 - C_5 alquila, C_2 - C_5 alquenila, $CH_2O(C_1$ - C_5 alquila), $CH_2O(C_2$ - C_5 alquenila), $CH_2O(C=O)(C_1$ - C_5 alquila), ou $CH_2OC(=O)(C_2$ - C_5 alquenila); e R^3 é H, C_1 - C_5 alquila, C_2 - C_5 alquenila, $C(=O)C_1$ - C_5 alquila, ou $C(=O)C_2$ - C_5 alquenila.

20 Preferivelmente, R^2 é H, Me, Et, n-Pr, CH_2OMe , CH_2OEt , $CH_2OC(=O)i$ -Bu, $CH_2OC(=O)n$ -Pr, $CH_2OC(=O)CH=CH_2$, ou $CH_2OC(=O)Me$; mais preferivelmente Me, n-Pr, CH_2OMe , $CH_2OC(=O)i$ -Bu, ou $CH_2O(n$ -Pr). Preferivelmente, R^3 é H, Me, Et, ou $C(=O)Me$.

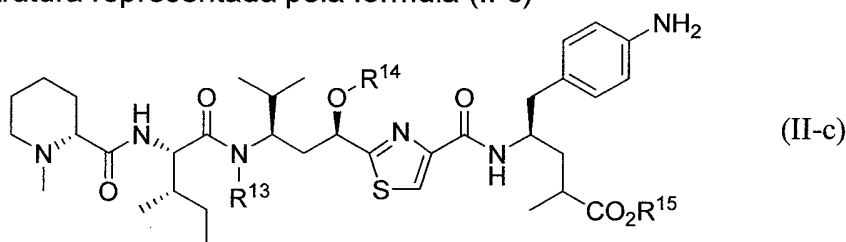
Uma modalidade preferida dos compostos de acordo com a fórmula (II-b) é descrita pela fórmula (II-b')



onde R^2 é H, C_1 - C_5 alquila, C_2 - C_5 alquenila, $CH_2O(C_1$ - C_5 alquila), $CH_2O(C_2$ - C_5 alquenila), $CH_2O(C=O)(C_1$ - C_5 alquila), ou $CH_2OC(=O)(C_2$ - C_5 alquenila); e R^3 é H, C_1 - C_5 alquila, C_2 - C_5 alquenila, $C(=O)C_1$ - C_5 alquila, ou $C(=O)C_2$ - C_5 alquenila. Preferivelmente, R^2 é H, Me, Et, n-Pr, CH_2OMe , CH_2OEt , $CH_2OC(=O)i$ -Bu, $CH_2OC(=O)n$ -Pr, $CH_2OC(=O)CH=CH_2$, ou $CH_2OC(=O)Me$ e R^3 é H, Me, Et, ou $C(=O)Me$.

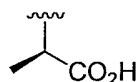
Onde um grupo carboxila em R^4 for estereificado, preferivelmente o éster é um éster de C_1 - C_5 alquila, tal como um éster de Me, Et, ou Pr. Alternativamente, o grupo carboxila pode ser amidado com amônia ou uma alquil amina.

Em outra modalidade, esta invenção fornece um composto tendo uma estrutura representada pela fórmula (II-c)



onde R^{13} é Me, n-Pr, CH_2OMe , ou $CH_2OC(=O)CH_2CH(Me)_2$; R^{14} é Me ou $C(=O)Me$; e R^{15} é H ou C_1 - C_5 alquila (preferivelmente H, Me, ou Et).

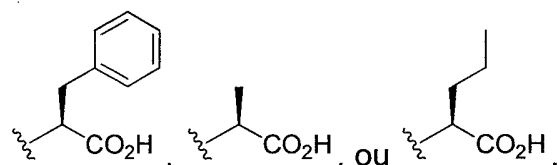
Nas fórmulas (II-b), (II-b'), e (II-c), a estereoquímica na metila alfa para a carboxila preferivelmente é a correspondendo às tubulinas de ocorrência natural, isto é:



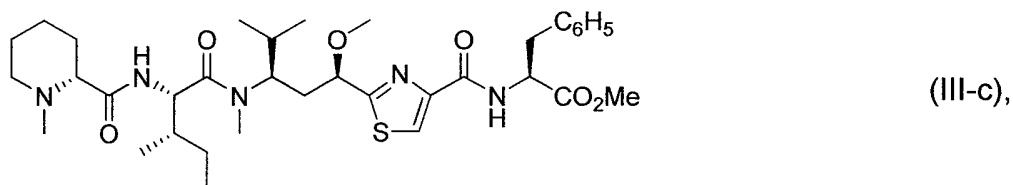
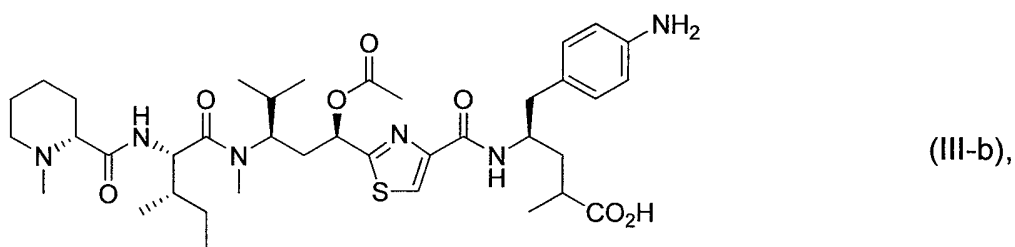
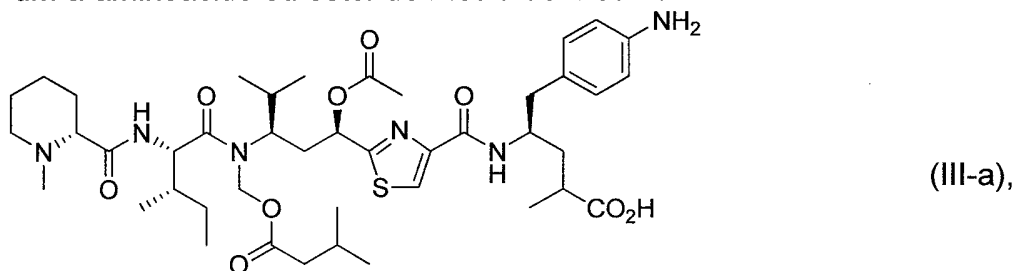
Em uma modalidade preferida, um composto desta invenção é na forma de uma amida do grupo carboxila em R^4 (ou R^{4a} , como pode ser o caso) com o grupo α -amina de um α -aminoácido. O α -aminoácido pode ser

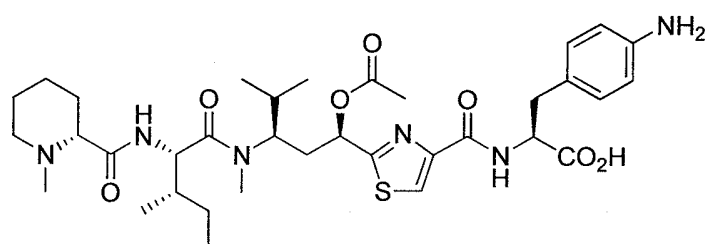
selecionado do grupo que consiste em um aminoácido proteinogênico, 4-aminofenilalanina, norvalina, norleucina, e citrulina. Preferivelmente, o α -aminoácido é selecionado do grupo que consiste em alanina, norvalina, glicina, lisina, arginina, citrulina, norleucina, 4-aminofenilalanina, e fenilalanina.

- 5 Também preferivelmente, a configuração absoluta do α -aminoácido é a proteinogênica, isto é, L. Nesta modalidade preferida, R^4 (ou R^{4a}) preferivelmente é:

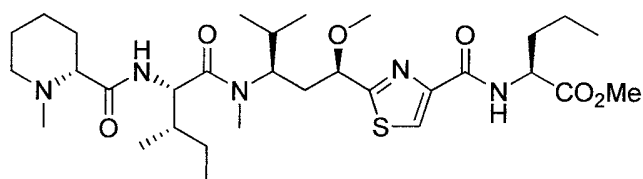


- Exemplos específicos dos compostos desta invenção de acordo com a fórmula (II) incluem compostos (III-a) a (III-y). Alguns dos compostos
10 são descritos como um éster farmacologicamente aceitável ou uma amida farmacologicamente aceitável do grupo carboxila de R^4 com o grupo α -amina de um α -aminoácido ou éster de metila do mesmo.

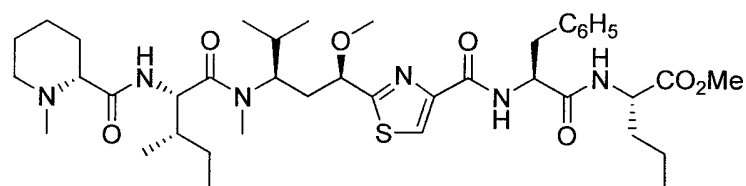




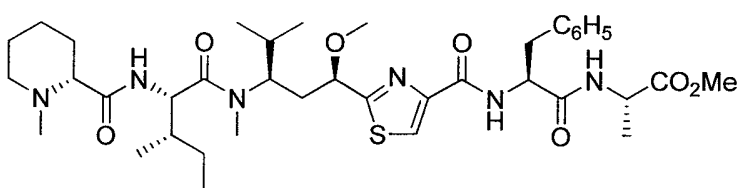
(III-d),



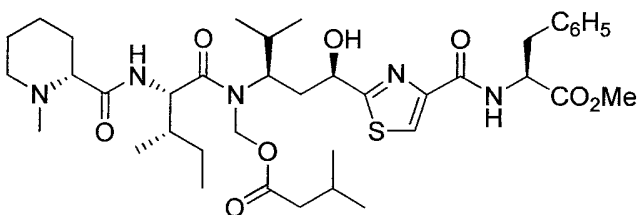
(III-e),



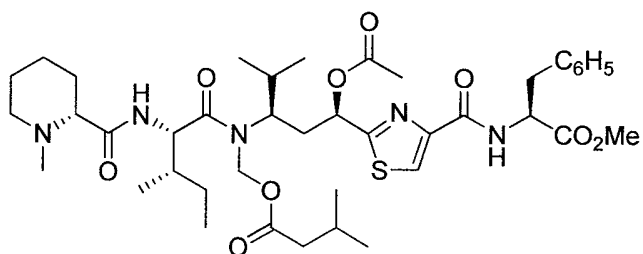
(III-f),



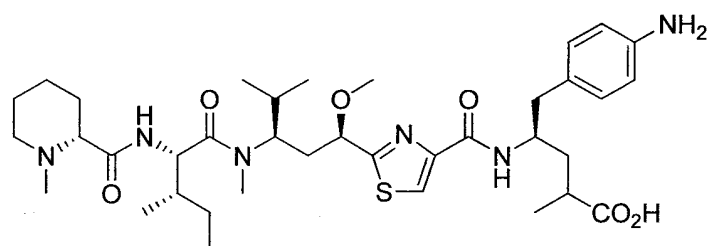
(III-g),



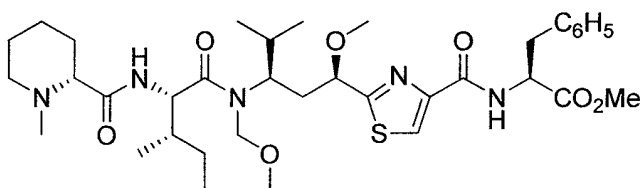
(III-h),



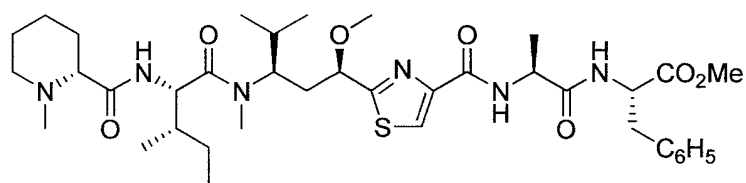
(III-i),



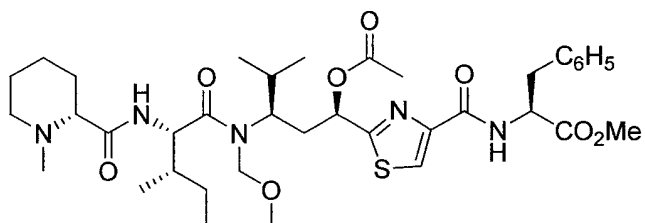
(III-j),



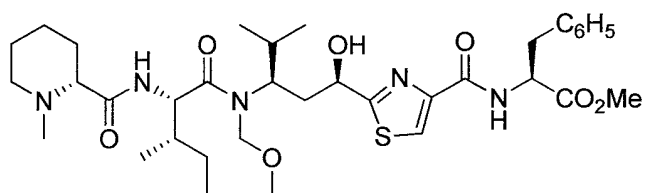
(III-k),



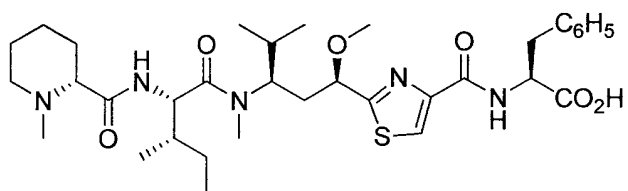
(III-l),



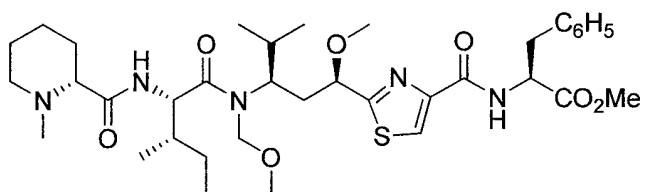
(III-m),



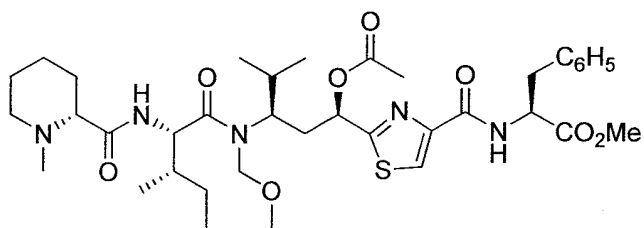
(III-n),



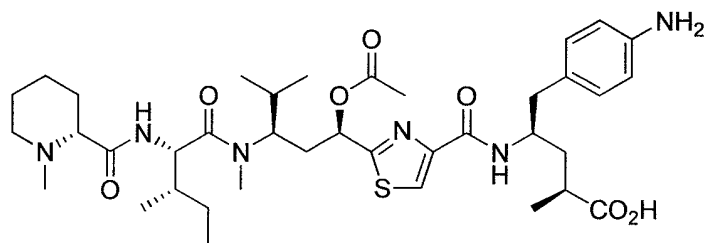
(III-o),



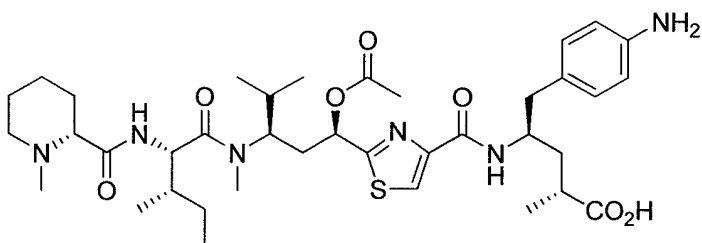
(III-p),



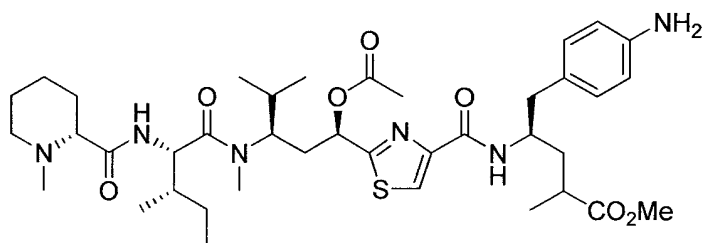
(III-q),



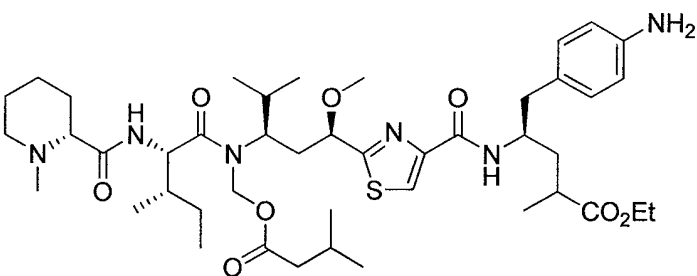
(III-r),



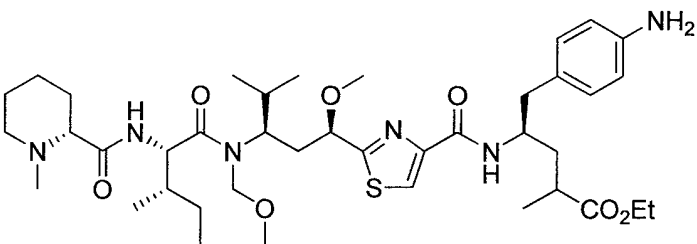
(III-s),



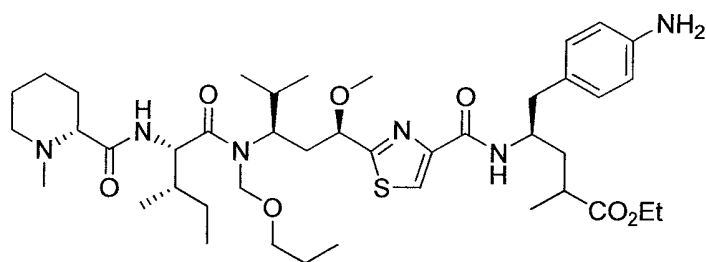
(III-t),



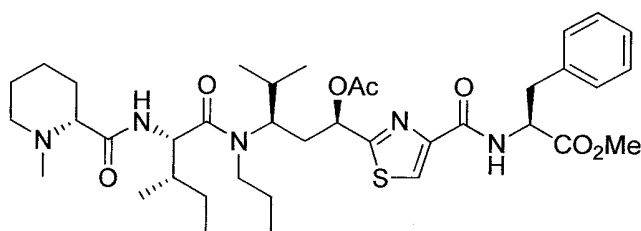
(III-u),



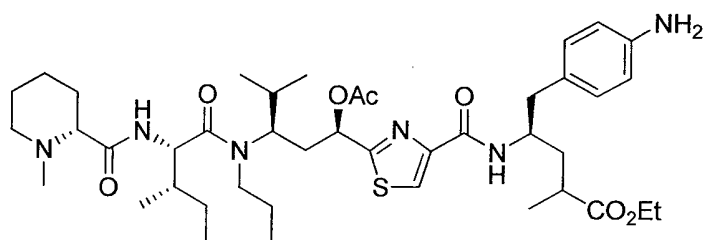
(III-v),



(III-w),



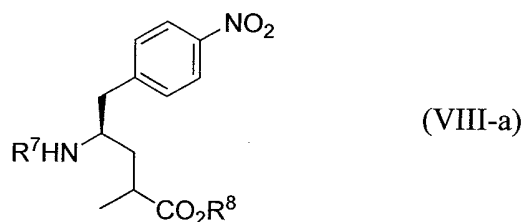
(III-x), e



(III-y).

Esta invenção também fornece intermediários novos que podem ser utilizados para a síntese dos compostos desta invenção. Compostos de acordo com a fórmula (VIII-a) podem ser usados para a fabricação de compostos de acordo com a fórmula (II) ou (II-b), como ensinado nas figuras e

5 exemplos aqui.



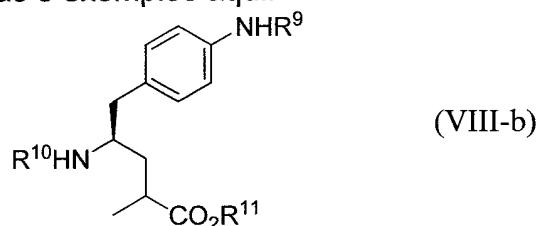
(VIII-a)

Na fórmula (VIII-a), R^7 é H ou um grupo de proteção de amina e R^8 é H, C_1 - C_{10} alquila, C_2 - C_{10} alquenila, C_2 - C_{10} alquinila, arila, cicloalifático, alquilcicloalifático, arilalquila, ou alquilarila. Preferivelmente, R^7 é H, Boc (*t*-butoxicarbonila), Troc (2,2,2-tricloroetóxi carbonila), Bpoc ((1-metil-1-(4-bifenil)etoxicarbonila)), Cbz (benzilóxi carbonila), Alloc (aliloxicarbonila), metil

10 amina, ou Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonila). Preferivelmente, R^8 é H ou C_1 -

C₅ alquila (especialmente Me).

Outro intermediário novo útil para a síntese dos compostos desta invenção tem uma estrutura de acordo com a fórmula (VIII-b). O uso dos compostos da fórmula (VIII-b) para fazer os compostos desta invenção é ensinado nas figuras e exemplos aqui.

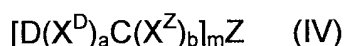


Na fórmula (VIII-b), R⁹ e R¹⁰ são independentemente H ou um grupo de proteção de amina e R¹¹ é H, C₁-C₁₀ alquila, C₂-C₁₀ alquenila, C₂-C₁₀ alquinila, arila, cicloalifático, alquilcicloalifático, arilalquila, ou alquilarila. Preferivelmente, R⁹ e R¹⁰ são independentemente selecionados de H, Boc, Troc, Bpoc, Cbz, Aloc, metilamina, e Fmoc. Preferivelmente, R¹¹ é H ou C₁-C₅ alquila (especialmente Me). Preferivelmente, onde R⁹ e R¹⁰ forem, cada um, um grupo de proteção de amina, eles são grupos de proteção de amina diferentes.

Grupos de proteção de amina adequados adicionais para os compostos da fórmula (VIII-a) e (VIII-b) são descritos no Greene e Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3ª edição, págs. 464-653 (John Wiley & Sons, Nova Iorque, 1999), a descrição desta é incorporada aqui por referência.

CONJUGADOS

Em outro aspecto, é fornecido um conjugado compreendendo composto citotóxico de acordo com esta invenção e um ligante, representado pela fórmula (IV)



onde Z é ligante; D é um composto citotóxico de acordo com esta invenção; e (X^D)_aC(X^Z)_b são coletivamente referidos como uma "porção liganteligante" ou "ligante" porque eles ligam Z e D. Dentro do ligante, C é um grupo clivável projetado para ser clivado no sítio da ação biológica intencionada do composto D; X^D e X^Z são referidos como porções espaçadoras

(ou "espaçador") porque elas espaçam de D e C e C e Z, respectivamente; subscritos a e b são independentemente 0 ou 1 (isto é, a presença de X^D e/ou X^Z são opcionais); e o subscrito m é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 (preferivelmente 1, 2, 3, ou 4). D, X^D , C, X^Z e Z são completamente definidos mais
5 abaixo.

Ligante Z - por exemplo um anticorpo - serve uma função de visamento. Ligando a um tecido ou célula alvo onde seu antígeno ou receptor fica localizado, o ligante Z direciona o conjugado lá. Preferivelmente, o tecido ou célula alvo é um tecido ou célula de câncer e o antígeno ou receptor é um
10 antígeno associado ao tumor sendo um antígeno sendo expresso exclusivamente por células cancerosas ou sobre-expresso por células cancerosas, comparadas às células não cancerosas. Clivagem do grupo C com o tecido ou célula alvo libera o composto D para exercer seu efeito citotóxico localmente. Em algumas circunstâncias, o conjugado é interiorizado em uma cé-
15 lula alvo por endocitose e a clivagem acontece dentro da célula alvo. Desta maneira, a liberação precisa do composto D é alcançada no sítio de ação intencionado, reduzindo a dosagem necessária. Também, o composto D é normalmente biologicamente inativo (ou significativamente menos ativo) em seu estado conjugado, assim reduzindo a toxicidade indesejada contra o
20 tecido ou célula não alvo. Como os fármacos anticancerígenos são frequentemente altamente tóxicos às células em geral, esta é uma consideração importante.

Como refletido pelo sobrescrito m, cada molécula de ligante Z pode conjugar com mais de um composto D, dependendo do número de sítios D tem disponíveis para conjugação e das condições experimentais empregadas. Aqueles versados na técnica apreciarão que, embora cada molécula individual do ligante Z seja conjugada com um número inteiro de compostos D, uma preparação do conjugado pode analisar uma razão de número não inteiro de compostos D para ligante Z, refletindo uma média estatística.
30 ca.

Ligante Z e Conjugação do Mesmo

Preferivelmente, o ligante Z é um anticorpo. Para conveniência e

brevidade e não limitação, o debate subsequente detalhado aqui sobre a conjugação do ligante Z é escrito no contexto de ser um anticorpo, mas aqueles versados na técnica entenderão que outros tipos de ligante Z podem ser conjugados, *mutatis mutandis*. Por exemplo, conjugados com ácido fólico como o ligante podem visar células tendo o receptor de folato em suas superfícies (Vlahov et al. 2008a, 2008b e 2010; Leamon et al. 2009). Pela mesma razão, o debate detalhado abaixo é escrito primariamente em termos de uma razão de 1:1 de anticorpo Z para composto D.

Preferivelmente, o ligante Z é um anticorpo contra um antígeno associado ao tumor, permitindo um conjugado compreendendo um tal ligante Z seletivamente visar as células cancerosas. Exemplos de tais antígenos incluem: mesotelina, antígeno da membrana específica de próstata (PSMA), CD19, CD22, CD30, CD70, B7H4 (também conhecido como O8E), proteína tirosina cinase 7 (PTK7), RG1, CTLA-4, e CD44. O anticorpo pode ser animal (por exemplo, murino), quimérico, humanizado, ou, preferivelmente, humano. O anticorpo preferivelmente é monoclonal, especialmente um anticorpo humano monoclonal. A preparação dos anticorpos monoclonais humanos contra alguns dos antígenos de acima mencionados é descrita em Korman et al., US 2009/0074660 A1 (B7H4); Rao-Naik et al., US 2009/0142349 A1 A2 (CD19); King et al., WO 2008/070569 A2 (CD22); Keler et al., US 7.387.776 B2 (2008) (CD30); Terrett et al., US 2009/0028872 A1 (CD70); Korman et al., US 6.984.720 B1 (2006) (CTLA-4); Korman et al., US 2009/0217401 A1 (PD-1); Huang et al., US 2008/0279868 A1 (PSMA); Lu et al., US 2010/0034826 A1 (PTK7); Harkins et al., US 7.335.748 B2 (2008) (RG1); Terrett et al., WO 2009/045957 A1 (mesotelina); e Xu et al., US 2010/0092484 A1 (CD44); as descrições destas são aqui incorporadas por referência.

O ligante Z pode também ser um fragmento de anticorpo ou anticorpo mimético, tal como um aficorpo, um anticorpo de domínio (dAb), um nanocorpo, um unicorpo, um DARPin, um anticalina, um versacorpo, uma duocalina, uma lipocalina, ou um avímero.

Qualquer um de vários grupos reativos diferentes sobre ligante Z

pode ser um sítio de conjugação, incluindo grupos ϵ -amino nos resíduos de lisina, porções de carboidrato pendentes, grupos ácido carboxílico, grupos dissulfeto, e grupos tiol. Cada tipo de grupo reativo representa um dilema, tendo algumas vantagens e algumas desvantagens. Para revisões sobre grupos reativos de anticorpo adequados para conjugação, vide, por exemplo, Garnett, *Adv. Drug Delivery Rev.* 53 (2001), 171-216 e Dubowchik e Walker, *Pharmacology & Therapeutics* 83 (1999), 67-123, as descrições destas são aqui incorporadas por referência.

Em uma modalidade, o ligante Z é conjugado por meio de um grupo ϵ -amino de lisina. A maioria dos anticorpos tem múltiplos grupos ϵ -amino de lisina, que podem ser conjugados por meio de ligações de amida, uréia, tiouréia, ou carbamato usando técnicas conhecidas na técnica, incluindo modificação com um agente heterobifuncional (como também descrito mais abaixo). Porém, é difícil de controlar que e quanto os grupos ϵ -amino reagem, levando à variabilidade potencial de batelada-para-batelada nas preparações do conjugado. Também, a conjugação pode causar neutralização de um grupo ϵ -amino protonado importante para manter a conformação nativa do anticorpo ou pode acontecer em uma lisina próxima ou no sítio de ligação do antígeno, ambas sendo uma ocorrência desejável.

Em outra modalidade, o ligante Z pode ser conjugado por meio de uma cadeia lateral de carboidrato, uma vez que muitos anticorpos são glicosilados. A cadeia lateral de carboidrato pode ser oxidada com periodato para gerar grupos aldeído, que por sua vez podem ser reagidos com aminas para formar um grupo imina, tal como em uma semicarbazona, oxima, ou hidrazona. Se desejado, o grupo imina pode ser convertido em um grupo amina mais estável através de redução com cianoboroidreto de sódio. Para descrições adicionais sobre conjugação por meio de cadeias laterais de carboidrato, vide, por exemplo, Rodwell et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83, 2632-2636 (1986); a descrição desta é aqui incorporada por referência. Como com os grupos ϵ -amino de lisina, há preocupações que consideram a reproducibilidade da localização do(s) sítio(s) de conjugação e a estequiometria.

Em ainda outra modalidade, o ligante Z pode ser conjugado por meio de um grupo ácido carboxílico. Em uma modalidade, um grupo ácido carboxílico terminal é funcionalizado para gerar uma carboidrazida, que é depois reagida com uma porção de conjugação carregando aldeído. Vide

5 Fisch et al., *Bioconjugate Chemistry* 1992, 3, 147-153.

Em ainda outra modalidade, o anticorpo Z pode ser conjugado por meio de um grupo dissulfeto que liga um resíduo de cisteína no anticorpo Z e um enxofre na outra porção do conjugado. Alguns anticorpos carecem de grupos tiol livres (sulfidrina), mas têm grupos dissulfeto, por exemplo na

10 região da dobradiça. Em tal caso, os grupos tiol livres podem ser gerados mediante redução dos grupos dissulfeto nativos. Os grupos tiol assim gerados podem ser depois usados para conjugação. Vide, por exemplo, Packard et al., *Biochemistry* 1986, 25, 3548-3552; King et al., *Cancer Res.* 54, 6176-6185 (1994); e Doronina et al., *Nature Biotechnol.* 21(7), 778-784 (2003); as

15 descrições destas são aqui incorporadas por referência. Novamente, há preocupações com relação à localização do sítio de conjugação e à estequiometria e ao possível rompimento de conformação nativa do anticorpo.

Vários métodos são conhecidos introduzir grupos tiol livres em anticorpos sem romper as ligações de dissulfeto nativas, cujos métodos podem ser praticados com um ligante Z desta invenção. Dependendo do método empregado, pode ser possível introduzir um número previsível de sulfidrilas livres em localizações predeterminadas. Em uma abordagem, os anticorpos mutados são preparados em que uma cisteína é substituída por outro aminoácido. Vide, por exemplo, Eigenbrot et al., US 2007/0092940 A1; Chilkoti et al., *Bioconjugate Chem.* 1994, 5, 504-507; Urnovitz et al., US 4.698.420 (1987); Stimmel et al., *J. Biol. Chem.*, 275 (39), 30445-30450 (2000); Bam et al., US 7.311.902 B2 (2007); Kuan et al., *J. Biol. Chem.*, 269 (10), 7610-7618 (1994); Poon et al., *J. Biol. Chem.*, 270 (15), 8571-8577 (1995). Em outra abordagem, uma cisteína extra é acrescentada ao término

25 C. Vide, por exemplo Cumber et al., *J. Immunol.*, 149, 120-126 (1992); King et al., *Cancer Res.*, 54, 6176-6185 (1994); Li et al., *Bioconjugate Chem.*, 13, 985-995 (2002); Yang et al., *Protein Engineering*, 16, 761-770 (2003); e

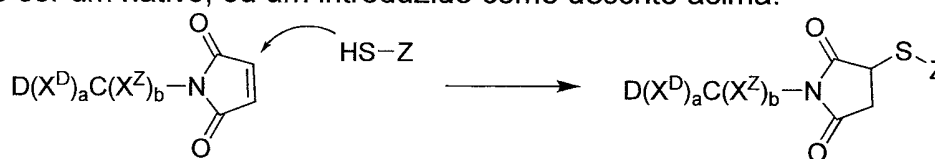
30

Olafson et al., *Protein Engineering Design & Selection*, 17, 21-27 (2004). Um método preferido para introduzir cisteínas livres é aquele ensinado por Liu et al., WO 2009/026274 A1 em que uma cisteína que carrega sequência de aminoácido é acrescentada ao término C da cadeia pesada de um anticorpo.

- 5 Este método introduz um número conhecido de resíduos de cisteína (um por cadeia pesada) em uma localização conhecida remota do sítio de ligação de antígeno. As descrições dos documentos citados neste parágrafo são todas incorporadas aqui por referência.

10 Em ainda outra modalidade, os grupos ϵ -amino de lisina podem ser modificados com reagentes bifuncionais tais como 2-iminotiolano ou N-succinimidil-3-(2-piridilditio)-propionato (SPDP), convertendo um grupo ϵ -amino em um grupo tiol ou dissulfeto - criando um substituto de cisteína, como seja. Porém, este método sofre das mesmas limitações de localização de conjugação e de estequiometria associadas aos grupos amino apropriados.

20 Em ainda outra modalidade preferida, o ligante Z é conjugado por meio do produto de adição nucleofílico de um grupo tiol com uma porção aceitante. Uma porção aceitante preferida é um grupo maleimida cuja reação com um grupo tiol do anticorpo é geralmente ilustrada abaixo. O grupo tiol pode ser um nativo, ou um introduzido como descrito acima.



Ligante - $(X^D)_aC(X^Z)_b$ -

Como observado acima, a porção liganteligante de um conjugado desta invenção compreende até três elementos: um grupo clivável C e espaçadores opcionais X^Z e X^D .

- 25 Grupo clivável C é um grupo clivável sob condições fisiológicas, preferivelmente é selecionado de modo que é relativamente estável enquanto o conjugado estiver na circulação geral no plasma sanguíneo, mas é clivado facilmente uma vez o conjugado alcança seu sítio da ação intencional, isto é, próximo, sobre ou dentro da célula alvo. Preferivelmente, o conju-

gado é interiorizado por meio de endocitose por uma célula alvo sob ligação do anticorpo Z a um antígeno exibido na superfície da célula alvo. Subsequentemente, a clivagem do grupo C ocorre em um corpo vesicular da célula alvo (um endossoma prematuro, um endossoma tardio, ou, especialmente, um lisossoma).

Em uma modalidade, o grupo C é um grupo sensível ao pH. O pH no plasma sanguíneo é ligeiramente acima de neutro, enquanto o pH dentro de um lisossoma é ácido, cerca de 5. Desse modo, um grupo C cuja clivagem é ácido catalisado clivará a uma taxa de várias ordens de magnitude mais rápido dentro de um lisossoma que na taxa do plasma sanguíneo. Exemplos de grupos sensíveis a ácido adequados incluem amidas de cisaconitila e hidrazonas, como descrito em Shen et al., US 4.631.190 (1986); Shen et al., US 5.144.011 (1992); Shen et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102, 1048-1054 (1981) e Yang et al., *Proc. Natl Acad. Sci (USA)*, 85, 1189-1193 (1988); as descrições destas são aqui incorporadas por referência.

Em outra modalidade, o grupo C é um dissulfeto. Dissulfetos podem ser clivados por um mecanismo de permuta de tiol-dissulfeto, a uma taxa dependente da concentração de tiol do ambiente. Como a concentração intracelular de glutathione e outros tióis é mais alta que sua concentração em soro, a taxa de clivagem de um dissulfeto será intracelularmente mais alta. Ainda, a taxa de permuta de tiol-dissulfeto pode ser modulada por ajuste das características estéricas e eletrônicas do dissulfeto (por exemplo, um dissulfeto de alquila-arila versus um dissulfeto de alquila-alquila; substituição no anel de arila, etc.), permitindo o projeto das ligações de dissulfeto que tem estabilidade intensificada em soro ou uma taxa de clivagem particular. Para descrições adicionais relativas aos grupos cliváveis de dissulfeto nos conjugados, vide, por exemplo, Thorpe et al., *Cancer Res.* 48, 6396-6403 (1988); Santi et al., US 2005/0287155 A1; Ng et al., US 6.989.452 B2 (2006); Ng et al., WO 2002/096910 A1; Boyd et al., US 7.691.962 B2; e Sufi et al., WO 2008/083312 A2; as descrições destas são aqui incorporadas por referência.

Um grupo preferido C compreende uma ligação de peptídeo que

é clivada, preferencialmente por uma protease, no sítio intencionado de ação, em vez de por uma protease no soro. Tipicamente, o grupo C compreende de 1 a 20 aminoácidos, preferivelmente de 1 a 6 aminoácidos, mais preferivelmente de 1 a 3 aminoácidos. O(s) aminoácido(s) pode(m) ser aminoácido(s) natural(is) e/ou antinatural(is). Aminoácidos naturais são aqueles codificados pelo código genético, como também aminoácidos derivados do mesmo, por exemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, citrulina, e O-fosfoserina. O termo aminoácido também inclui análogos e miméticos de aminoácido. Análogos são compostos tendo a mesma estrutura de $H_2N(R)CHCO_2H$ geral de um aminoácido natural, exceto que o grupo R não é encontrado entre os aminoácidos naturais. Exemplos de análogos incluem homoserina, norleucina, metionina-sulfóxido, e sulfônio de metila de metionina. Um mimético de aminoácido é um composto tendo uma estrutura diferente da estrutura química geral de um α -aminoácido, mas funciona de uma maneira similar a um. O termo "aminoácido antinatural" é intencionado representar a forma estereoquímica "D", os aminoácidos naturais sendo da forma "L".

Preferivelmente, o grupo C contém uma sequência de aminoácido que é uma sequência de reconhecimento de clivagem para uma protease. Muitas sequências de reconhecimento de clivagem são conhecidas na técnica. Vide, por exemplo, Matayoshi et al. *Science* 247: 954 (1990); Dunn et. al. *Meth. Enzymol.* 241: 254 (1994); Seidah et. al. *Meth. Enzymol.* 244: 175 (1994); Thornberry, *Meth. Enzymol.* 244: 615 (1994); Weber et. al. *Meth. Enzymol.* 244: 595 (1994); Smith et. al., *Meth. Enzymol.* 244: 412 (1994); e Bouvier et. al. *Meth. Enzymol.* 248: 614 (1995); as descrições destas são aqui incorporadas por referência.

Para conjugados que não são intencionados ser interiorizados por uma célula, um grupo C pode ser selecionado de modo que seja clivado por uma protease presente na matriz extracelular na redondeza do tecido alvo, por exemplo, uma protease liberada por células morrendo próximas ou uma protease associada ao tumor. Proteases associadas ao tumor extracelulares exemplares são metaloproteases de matriz (MMP), timet oligopepti-

dase (TOP) e CD10.

Para conjugados que são projetados ser interiorizados por uma célula, o grupo C preferivelmente compreende uma sequência de aminoácido selecionada para clivagem por uma protease endossomal ou lisossomal, especialmente a última. Exemplos não limitativos de tais proteases incluem catepsinas B, C, D, H, L e S, especialmente catepsina B. Catepsina B cliva os peptídeos preferencialmente em uma sequência AA^2-AA^1 onde AA^1 é um aminoácido ligação de hidrogênio básico ou forte (tal como lisina, arginina, ou citrulina) e AA^2 é um aminoácido hidrofóbico (tal como fenilalanina, valina, alanina, leucina, ou isoleucina), por exemplo Val-Cit (onde Cit denota citrulina) ou Val-Lys. (Aqui, as sequências de aminoácido são escritas na direção de N para C, como em $H_2N-AA_2AA^1-CO_2H$, a menos que do contrário claramente indicado pelo contexto.). Para informação adicional com relação aos grupos cliváveis de catepsina, vide Dubowchik et al., *Biorg. Med. Chem. Lett.* 8, 3341-3346 (1998); Dubowchik et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8, 3347-3352 (1998); e Dubowchik et al., *Bioconjugate Chem.* 13, 855-869 (2002); as descrições destes são incorporadas por referência. Outra enzima que pode ser utilizada para clivar ligantes de peptídila é legumaina, uma cisteína protease lisossomal que preferencialmente cliva em Ala-Ala-Asn.

Em uma modalidade, o grupo C é um peptídeo compreendendo a sequência de dois aminoácidos AA^2-AA^1 em que AA^1 é lisina, arginina, ou citrulina e AA^2 é fenilalanina, valina, alanina, leucina ou isoleucina. Em outra modalidade, C consiste em uma sequência de um a cinco aminoácidos, selecionados do grupo que consiste em Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Cit-Cit, Val-Lys, Ala-Ala-Asn, Lys, Cit, Ser, e Glu.

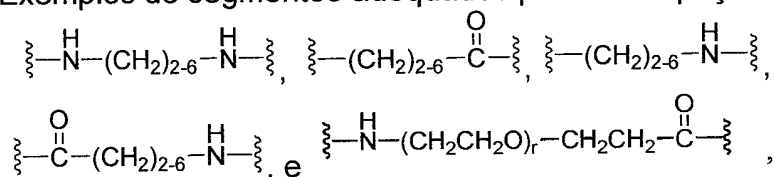
A preparação e projeto dos grupos cliváveis C consistindo em um aminoácido simples são descritos em Chen et al., US 2010/0113476 A1, a descrição desta é aqui incorporada por referência.

Grupo C pode também ser um fotoclivável, por exemplo um éter de nitrobenzila sendo clivado sob exposição à luz.

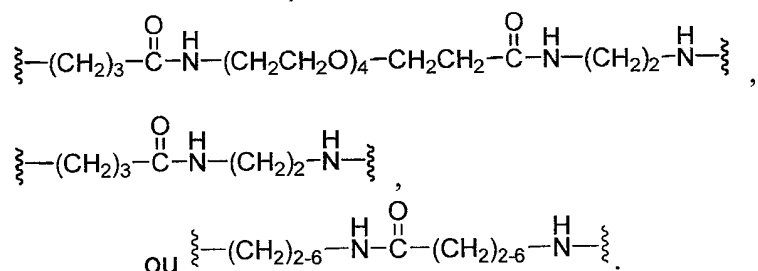
Grupo C pode ser diretamente ligado ao anticorpo Z ou composto D; isto é, espaçador X^Z e X^D , como pode ser o caso, pode estar ausente.

- Por exemplo, se o grupo C for um dissulfeto, um dos dois enxofres pode ser um resíduo de cisteína ou seu substituto no anticorpo Z. Ou, o grupo C pode ser uma hidrazona ligada a um aldeído em uma cadeia lateral de carboidrato do anticorpo. Ou, o grupo C pode ser uma ligação de peptídeo formada com um grupo ϵ -amino de lisina do anticorpo Z. Em uma modalidade preferida, o composto D está diretamente ligado ao grupo C por meio de uma ligação de peptídica a um grupo carboxila ou amina no composto D.

- Quando presente, o espaçador X^Z fornece separação espacial entre o grupo C e o anticorpo Z, para que o primeiro não estericamente interfira com a ligação do antígeno pelo segundo ou o primeiro estericamente interfira com a clivagem do segundo. Ainda, o espaçador X^Z pode ser usado para conferir propriedades de solubilidade aumentada ou agregação diminuída aos conjugados. Um espaçador X^Z pode compreender um ou mais segmentos modulares, que podem ser montados em qualquer número de combinações. Exemplos de segmentos adequados para um espaçador X^Z são:



onde o sobrescrito r é 1 a 24, preferivelmente 2 a 4. Estes segmentos podem ser combinados para fazer os espaçadores X^Z , tais como:

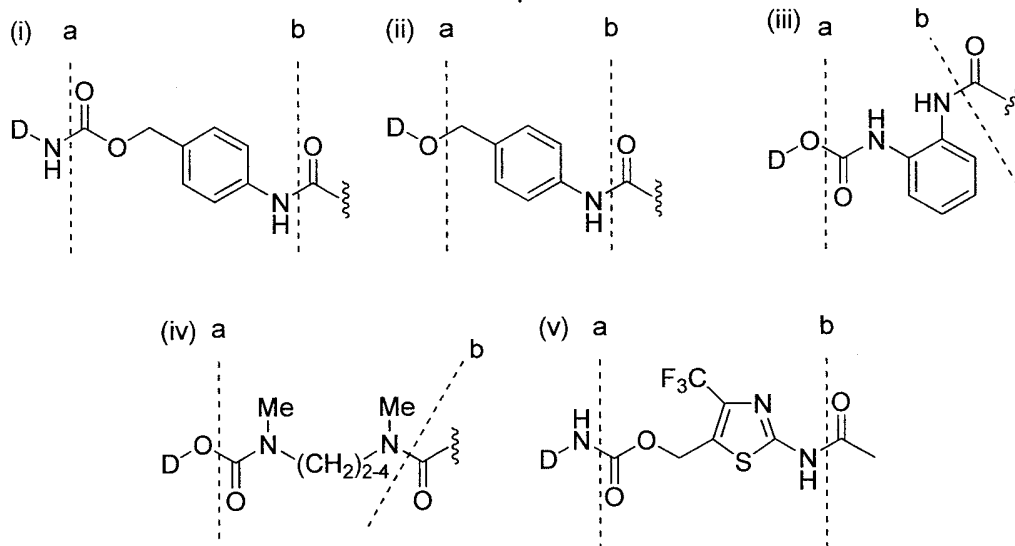


- O espaçador X^D , se presente, fornece separação espacial entre o grupo C e o composto D, para que o primeiro não estérica ou eletronicamente interfira com a clivagem do segundo. O espaçador X^D também pode servir para introduzir massa molecular adicional e funcionalidade química em um conjugado. Geralmente, a massa adicional e funcionalidade afetarão a meia-vida em soro e outras propriedades do conjugado. Desse modo, por meio de seleção judiciosa dos grupos espaçadores, a meia-vida em soro de

um conjugado pode ser modulada. O espaçador X^D também pode ser montado de segmentos modulares, como descrito acima no contexto de espaçador X^Z .

- 5 Ou o espaçador X^Z ou X^D , ou ambos, pode compreender uma porção autoimolante. Uma porção autoimolante é uma porção que (1) está ligada ao grupo C e ou o anticorpo Z ou a citotoxina D e (2) tem uma estrutura de modo que a clivagem do grupo C inicia uma sequência de reação que resulta no próprio desligamento da porção autoimolante do anticorpo Z ou citotoxina D, como pode ser o caso. Em outras palavras, a reação em um
- 10 sítio distal do anticorpo Z ou citotoxina D (clivagem do grupo C) causa a ligação de X^Z -Z ou de X^D -D para romper também. A presença de uma porção autoimolante é desejável no caso do espaçador X^D porque, se, após a clivagem do conjugado, o espaçador X^D ou uma porção do mesmo permanecer preso à citotoxina D, a atividade biológica do primeiro pode ser prejudicada.
- 15 O uso de uma porção autoimolante é especialmente desejável onde o grupo clivável C for um polipeptídeo.

Porções autoimolantes exemplares (i)-(v) ligadas a um grupo hidroxila ou amino em uma molécula do par D são mostradas abaixo:



- 20 A porção autoimolante é a estrutura entre as linhas pontilhadas a e b, com características estruturais adjacentes mostradas para fornecer o contexto. Porções autoimolantes (i) e (v) são ligadas a um composto $D-NH_2$ (isto é, o composto D é conjugado por meio de um grupo amino), enquanto

as porções autoimolantes (ii), (iii), e (iv) são ligadas a um composto D-OH (isto é, o composto D é conjugado por meio de um grupo hidroxila ou carboxila). Clivagem da ligação de amida na linha pontilhada b libera o nitrogênio da amida como um nitrogênio da amina, iniciando uma sequência de reação

5 que resulta na clivagem da ligação na linha pontilhada a e a liberação consequente de D-OH ou D-NH₂, como pode ser o caso. Para descrições adicionais com relação às porções autoimolantes, vide Carl et al., J. Med. Chem., 24 (3), 479-480 (1981); Carl et al., WO 81/01145 (1981); Dubowchik et al., *Pharmacology & Therapeutics*, 83, 67-123 (1999); Firestone et al., US

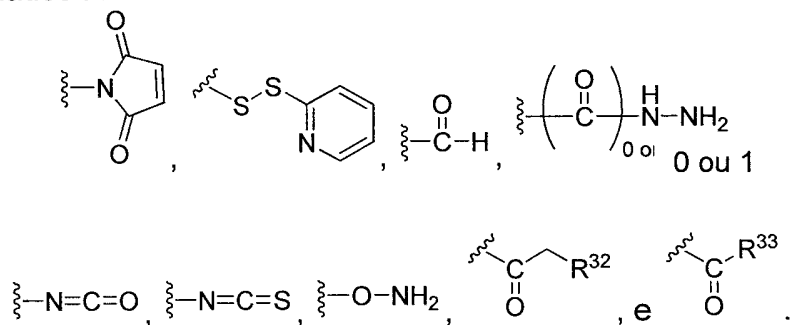
10 6.214.345 B1 (2001); Toki et al., *J. Org. Chem.* 67, 1866-1872 (2002); Doronina et al., *Nature Biotechnology* 21 (7), 778-784 (2003) (errata, pág. 941); Boyd et al., US 7.691.962 B2; Boyd et al., US 2008/0279868 A1; Sufi et al., WO 2008/083312 A2; Feng, US 7.375.078 B2; e Senter et al., US 2003/0096743 A1; as descrições destas são incorporadas por referência.

15 *Composto D - Composições Ligantes*

Os conjugados desta invenção preferivelmente são preparados primeiro unindo um composto D e o ligante (X^D)_aC(X^Z)_b para formar uma composição de fármaco-ligante representada pela fórmula (V-a):



20 onde R³¹ é um grupo funcional adequado para reagir com um grupo funcional no anticorpo Z para formar o conjugado. Exemplos de grupos adequados R³¹ incluem:

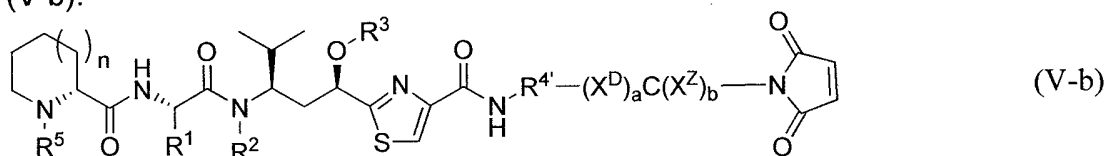


onde R³² é Cl, Br, F, mesilato, ou tosilato e R³³ é Cl, Br, I, F, OH, O-N-succinimida, O-(4-nitrofenila), O-pentafluorofenila, ou O-tetrafluorofenila. Química geralmente utilizável para a preparação das porções adequadas D (X^D)_aC(X^Z)_b-R³¹ é descrita em Ng et al., US 7.087.600 B2

25

(2006); Ng et al., US 6.989.452 B2 (2006); Ng et al., US 7.129.261 B2 (2006); Ng et al., WO 02/096910 A1; Boyd et al., US 7.691.962 B2; Chen et al., US 2006/0004081 A1; Gangwar et al., US 2006/0247295 A1; Boyd et al., US 2008/0279868 A1; Gangwar et al., US 2008/0281102 A1; Gangwar et al.,
 5 US 2008/0293800 A1; Sufi et al., WO 2008/083312 A2; e Chen et al., US 2010/0113476 A1; as descrições destas são aqui incorporadas por referência.

Em uma modalidade preferida, R^{31} é um grupo maleimida e a molécula do composto citotóxico-ligante pode ser representada pela fórmula
 10 (V-b):

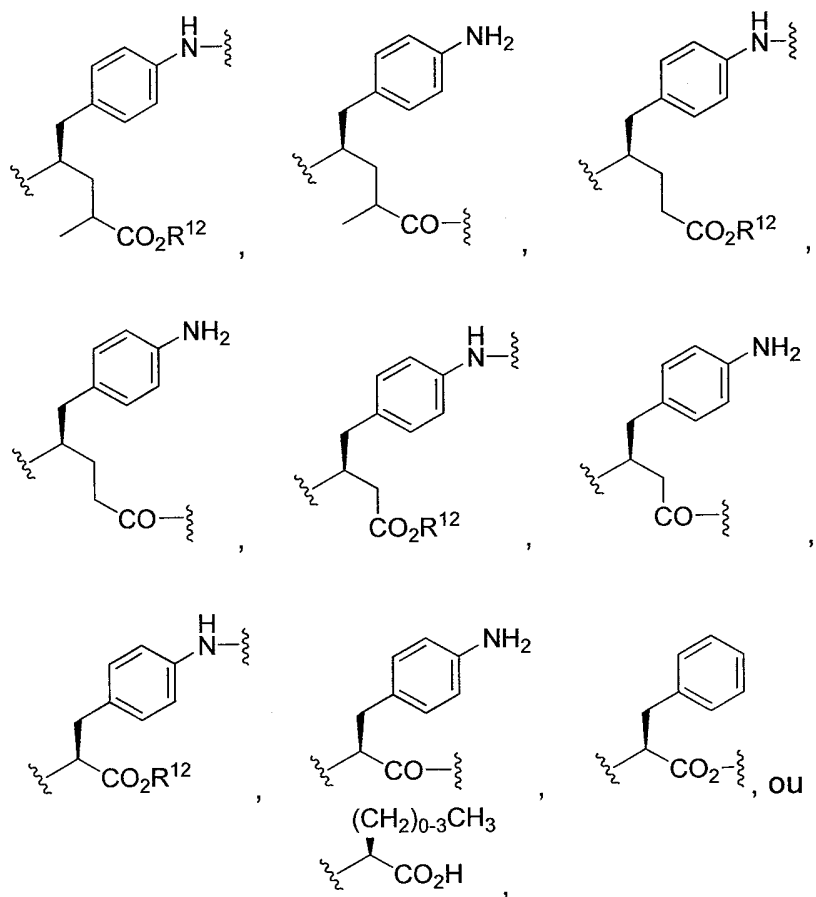


em que

n é 0, 1, ou 2;

R^1 , R^2 e R^3 são independentemente H, C_1 - C_{10} alquila insubstituída ou substituída, C_2 - C_{10} alquenila insubstituída ou substituída, C_2 - C_{10} alquinila insubstituída ou substituída, arila insubstituída ou substituída, heteroarila insubstituída ou substituída, $(CH_2)_{1-2}O(C_1$ - C_{10} alquila) insubstituída ou substituída, $(CH_2)_{1-2}O(C_2$ - C_{10} alquenila) insubstituída ou substituída, $(CH_2)_{1-2}O(C_2$ - C_{10} alquinila) insubstituída ou substituída, $(CH_2)_{1-2}OC(=O)(C_1$ - C_{10} alquila), $(CH_2)_{1-2}OC(=O)(C_2$ - C_{10} alquenila) insubstituída ou substituída, $(CH_2)_{1-2}OC(=O)(C_2$ - C_{10} alquinila) insubstituída ou substituída, $C(=O)(C_1$ - C_{10} alquila) insubstituída ou substituída, $C(=O)(C_2$ - C_{10} alquenila) insubstituída ou substituída, $C(=O)(C_2$ - C_{10} alquinila) insubstituída ou substituída, heterocicloalifático insubstituído ou substituído, arilalquila insubstituída ou substituída, cicloalifático insubstituído ou substituído, ou alquilarila insubstituída ou substituída;

25 R^4 é



la; e

R^5 é H, C_1 - C_5 alquila, C_2 - C_5 alquenila, C_2 - C_5 alquinila, $CO(C_1$ - C_5 alquila), $CO(C_2$ - C_5 alquenila), ou $CO(C_2$ - C_5 alquinila);

5 X^D e X^Z são grupos espaçadores;

C é um grupo clivável; e

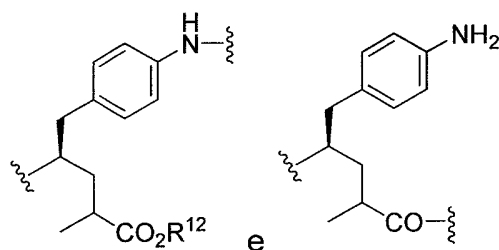
a e b são independentemente 0 ou 1;

em que o grupo R^{4i} é ligado por meio de um grupo carboxila ou amina a qualquer grupo X^D no evento de a ser 1 ou ao grupo C no evento de

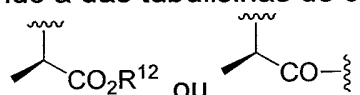
10 a ser 0.

Preferivelmente, a ligação entre o grupo carboxila ou amina em R^{4i} e o grupo X^D ou C, como pode ser o caso, é por meio de uma ligação de amida.

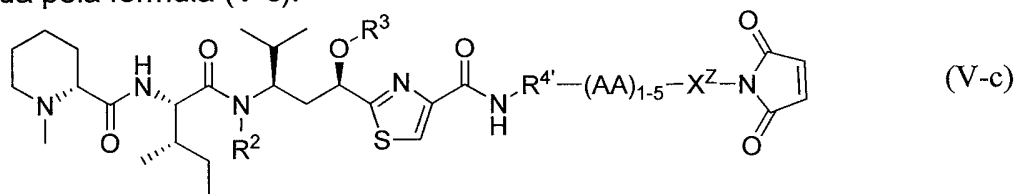
Nas estruturas



a estereoquímica no grupo metila alfa para o grupo carboxila preferivelmente corresponde à das tubulisininas de ocorrência natural, isto é:

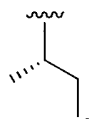


Preferivelmente, na fórmula (V-b) n é 1, R^1 é um resíduo de isoleucila, a é 0, b é 1, e C compreende um a cinco aminoácidos (preferivelmente um a dois), e $R^{4'}$ está ligado a C por uma ligação de peptidila sendo enzimaticamente clivável, e R^5 é Me. Esta modalidade preferida é representada pela fórmula (V-c):



onde R^2 , R^3 , e $R^{4'}$ são como definidos com relação à fórmula (V-b), cada AA independentemente é um aminoácido natural, e X^Z é $CH_2CH_2NHC(=O)(CH_2)_{2-5}$ ou $C(=O)(CH_2)_{2-5}$. Aminoácidos preferidos AA são lisina, citrulina, alanina, valina, glicina, e fenilalanina.

Na fórmula (V-b), R^1 preferivelmente é H, C_1-C_5 alquila, C_2-C_5 alquenila, ou C_2-C_5 alquenila, e é mais preferivelmente um resíduo de isoleucila, isto é:

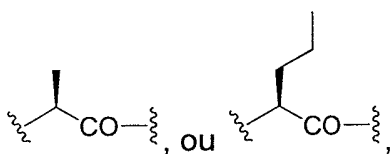
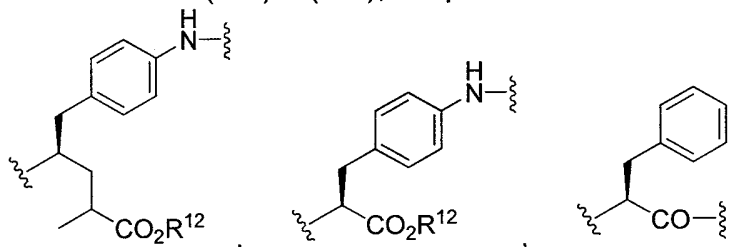


Nas fórmulas (V-b) e (V-c), R^2 preferivelmente é H, C_1-C_5 alquila, C_2-C_5 alquenila, $CH_2O(C_1-C_5$ alquila), $CH_2O(C_2-C_5$ alquenila), $CH_2O(C=O)(C_1-C_5$ alquila), ou $CH_2OC(=O)(C_2-C_5$ alquenila); e mais preferivelmente é H, Me, Et, CH_2OMe , CH_2OEt , $CH_2OC(=O)i-Bu$, $CH_2OC(=O)n-Pr$, $CH_2OC(=O)CH=CH_2$, ou $CH_2OC(=O)Me$.

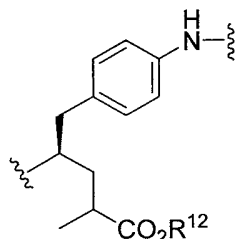
Nas fórmulas (V-b) e (V-c), R^3 preferivelmente é H, C_1-C_5 alquila,

C₂-C₅ alquenila, C(=O)C₁-C₅ alquila, ou C(=O)C₂-C₅ alquenila; e mais preferivelmente é H, Me, Et, ou C(=O)Me.

Nas fórmulas (V-b) e (V-c), R⁴ⁱ preferivelmente é



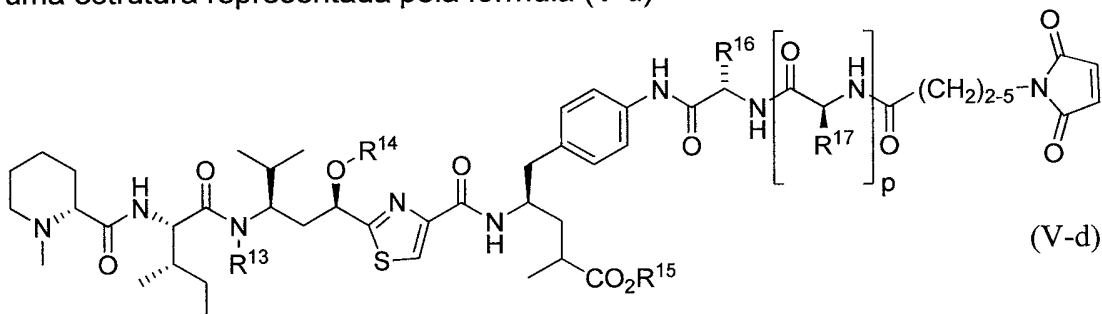
com R⁴ⁱ igualando a



5 e R¹² igualando a H, Me, ou Et sendo especialmente preferidos.

Na fórmula (V-b), n preferivelmente é 1 e R⁵ preferivelmente é metila; isto é, o anel na subunidade de Mep preferivelmente é uma N-metila piperidinil ona.

10 Em outra modalidade, esta invenção fornece um composto tendo uma estrutura representada pela fórmula (V-d)



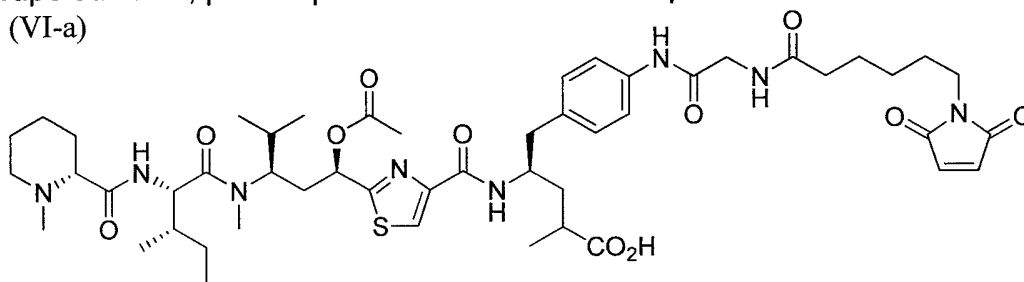
onde R¹³ é Me, n-Pr, CH₂OMe, ou CH₂OC(=O)CH₂CH(Me)₂; R¹⁴ é Me ou C(=O)Me; e R¹⁵ é H ou C₁-C₅ alquila (preferivelmente H, Me, ou Et); R¹⁶ é um grupo de cadeia lateral de lisina ((CH₂)₄NH₂) ou citrulina

$((\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}_2)$; R^{17} é um grupo de cadeia lateral de valina ($\text{C}(\text{Me})_2$) ou alanina (I); e p é 0 ou 1.

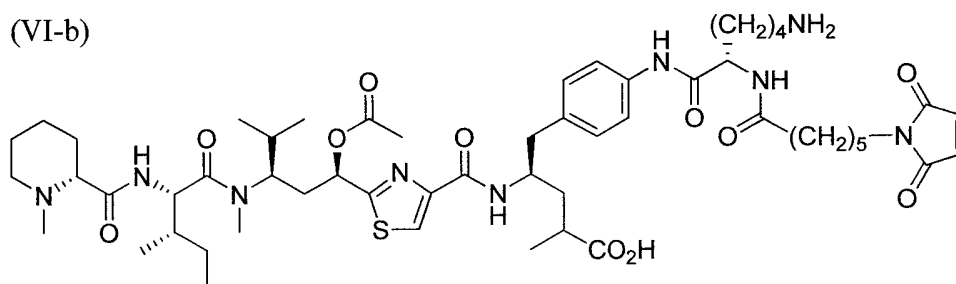
Exemplos de construtos específicos do composto citotóxico-ligante desta invenção são mostrados abaixo nas fórmulas (VI-a) a (VI-t).

- 5 Composto-ligante (VI-n) é especialmente preferido. Eles têm um grupo maleimida e estão prontos para conjugação com um anticorpo por meio de um grupo sulfidril, por um procedimento tal como aquele descrito abaixo.

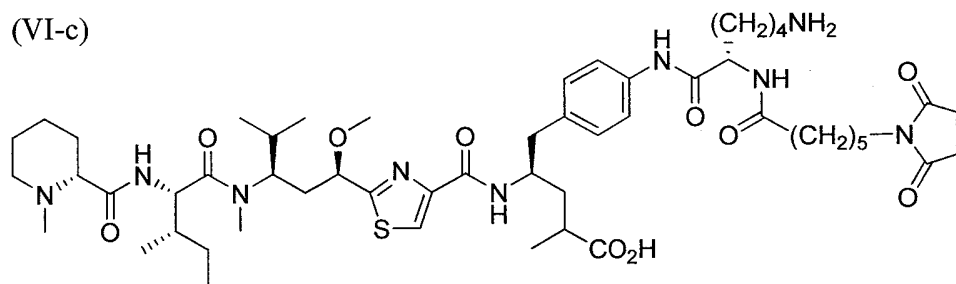
(VI-a)



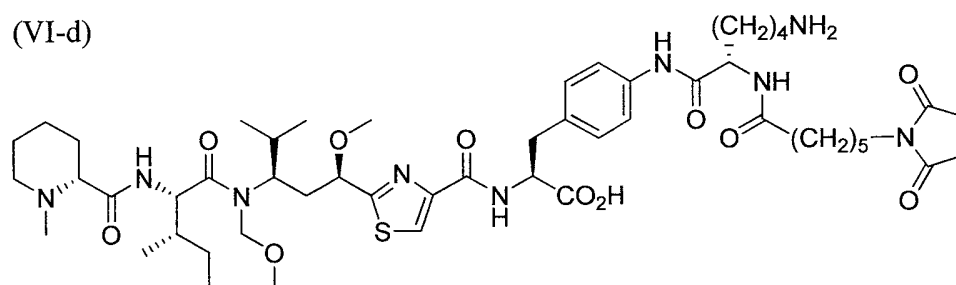
(VI-b)



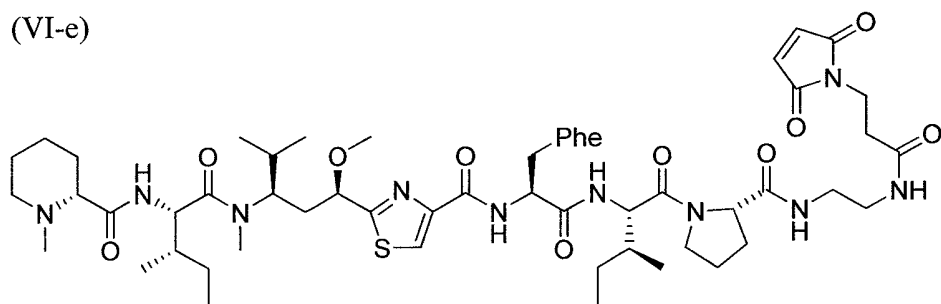
(VI-c)



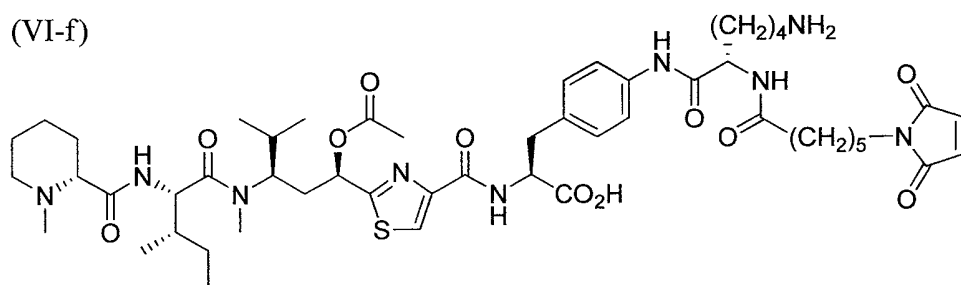
(VI-d)



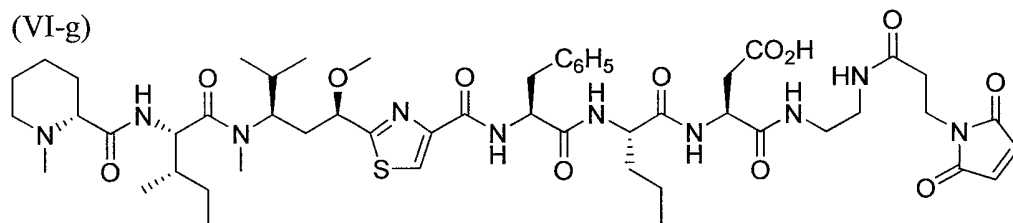
(VI-e)



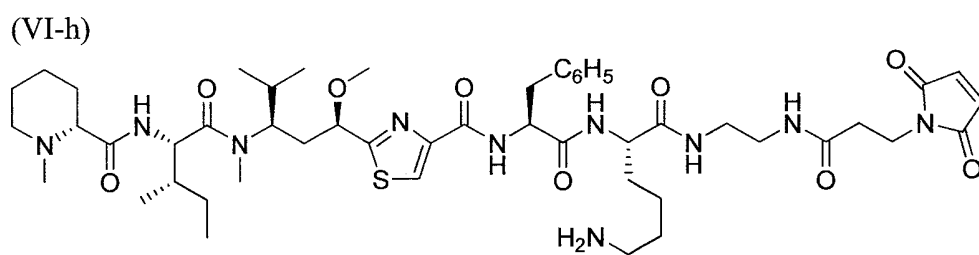
(VI-f)



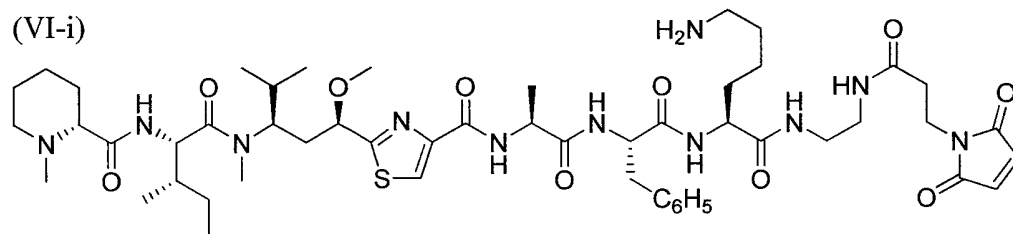
(VI-g)



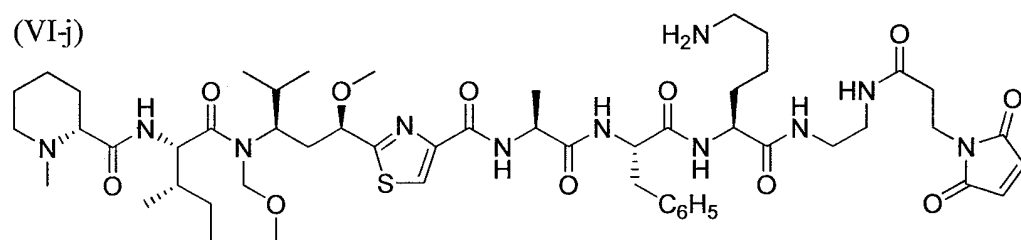
(VI-h)



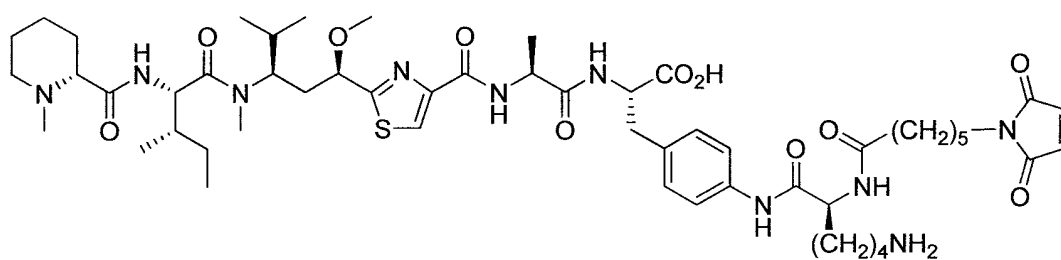
(VI-i)



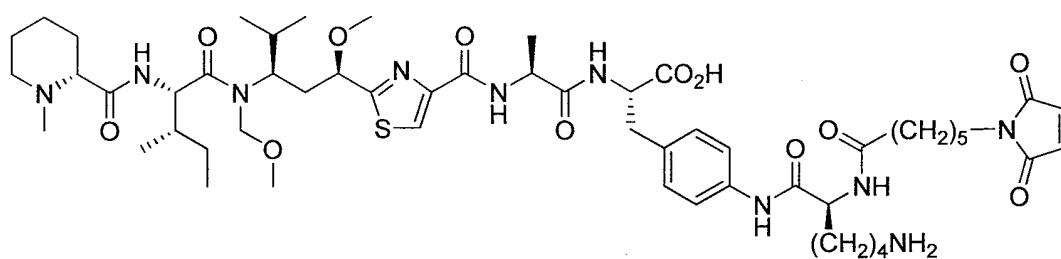
(VI-j)



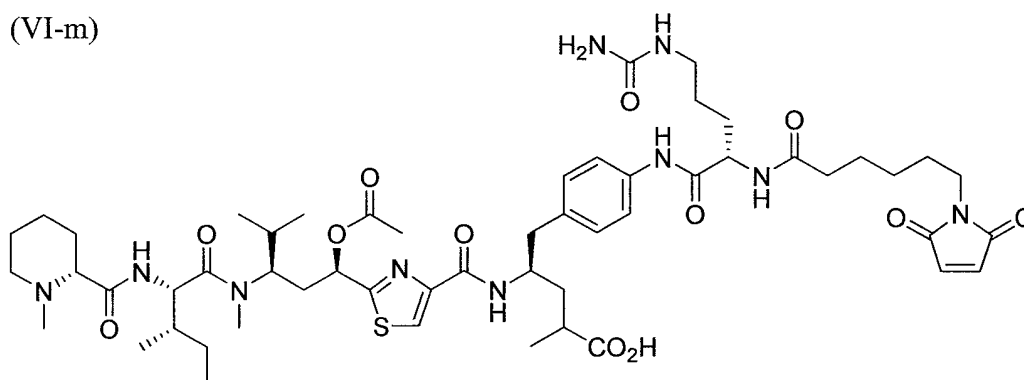
(VI-k)



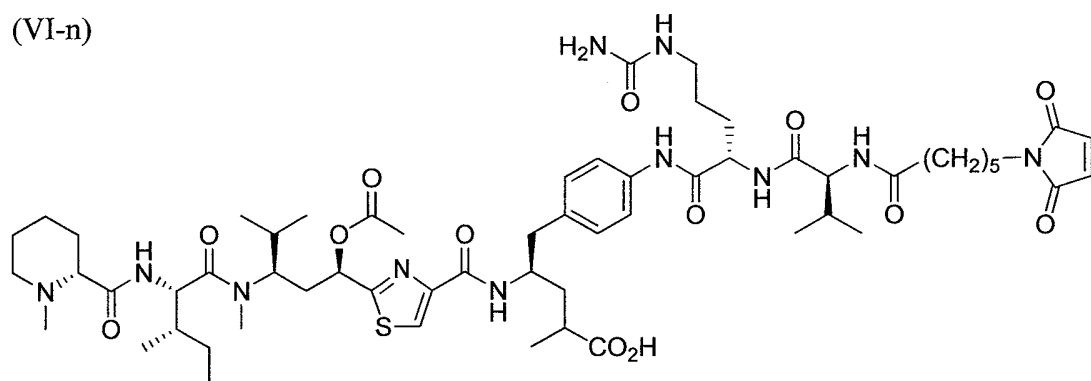
(VI-l)



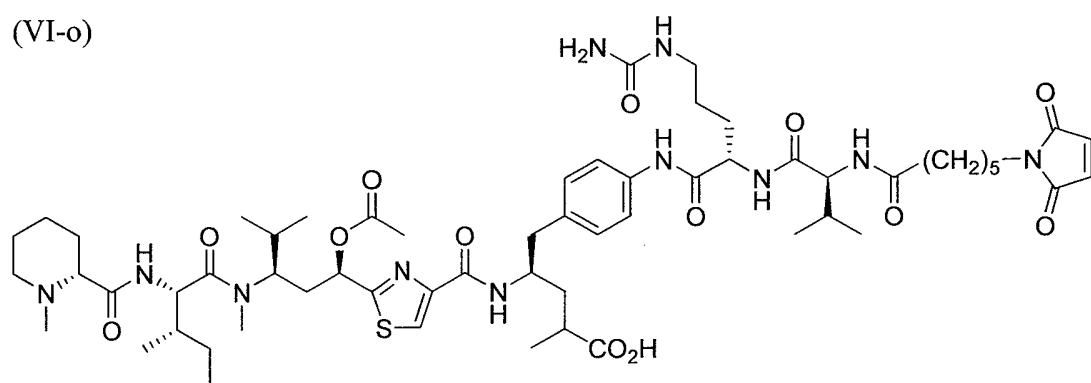
(VI-m)



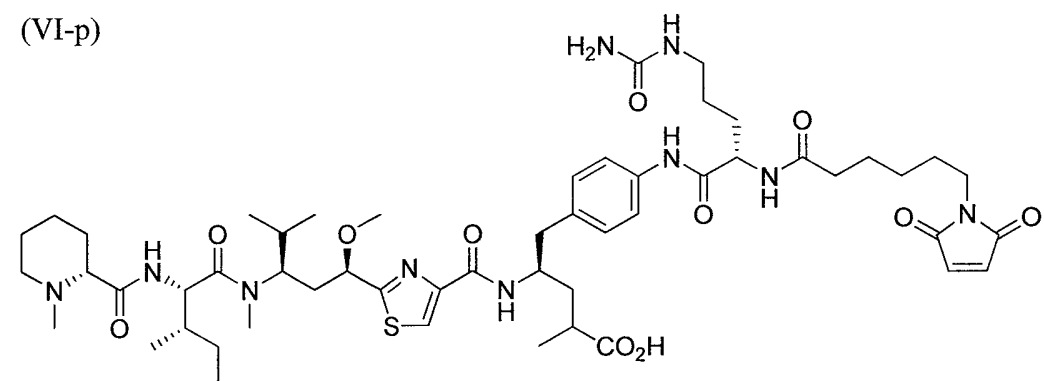
(VI-n)



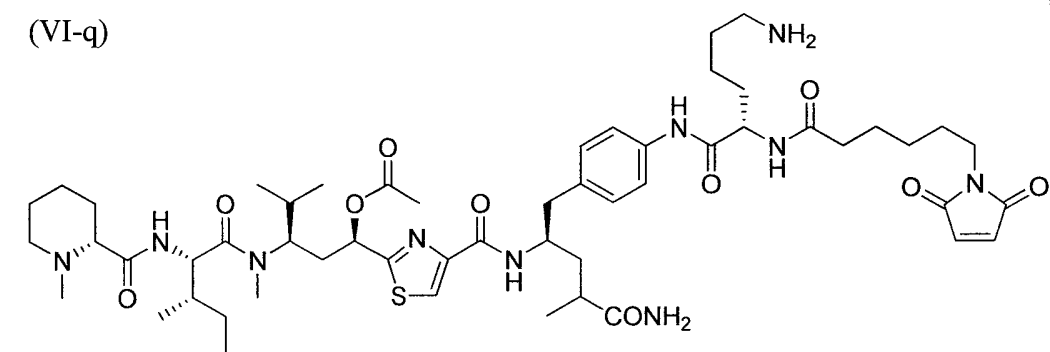
(VI-o)



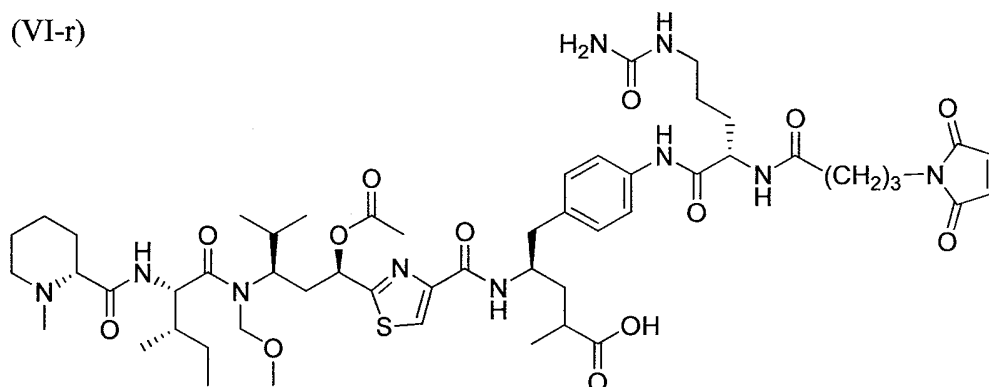
(VI-p)



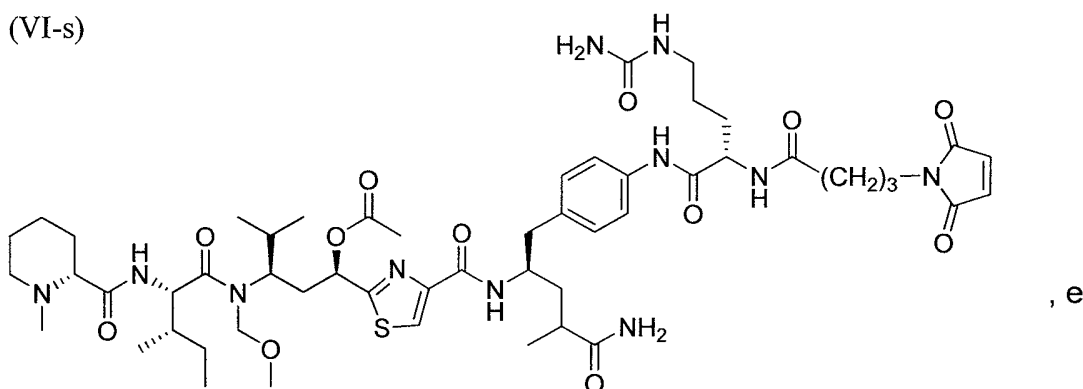
(VI-q)



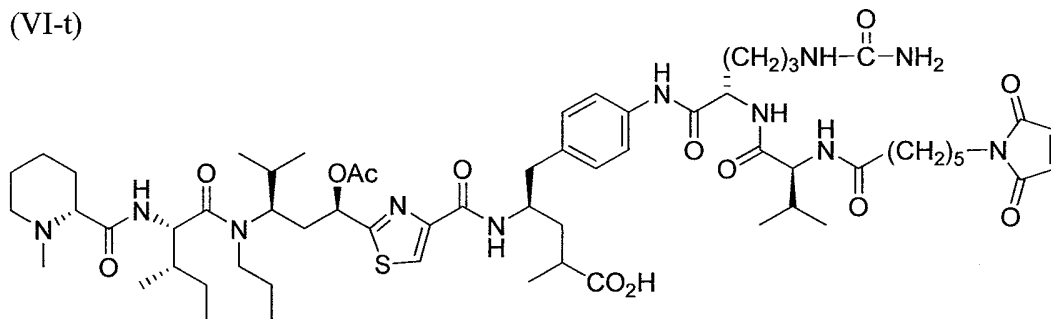
(VI-r)



(VI-s)



(VI-t)



Preparação dos Conjugados

O seguinte é um procedimento ilustrativo, com base na introdução de grupos tiol livres em um anticorpo por meio de reação dos grupos ϵ -amino de lisina com 2-iminotiolano, seguido por reação com uma porção de fármaco-ligante contendo maleimida tal como descrito acima. Inicialmente, o anticorpo é tem o tampão trocado para 0,1 M de tampão de fosfato (pH 8,0) contendo 50 mM de NaCl e 2 mM de ácido dietileno triamina pentaacético (DTPA) e concentrado para 5-10 mg/ml. Tiolação é alcançada através de adição de 2-imino tiolano ao anticorpo. A quantidade de 2-iminotiolano a ser adicionada pode ser determinada por um experimento preliminar e varia de

anticorpo para anticorpo. No experimento preliminar, uma titulação de quantidades crescentes de 2-iminotiolano é acrescentada ao anticorpo, e seguindo incubação com o anticorpo para 1 h em RT (temperatura ambiente, cerca de 25°C), o anticorpo é dessalgado em 50 mM de tampão de HEPES pH 6,0 usando uma coluna SEPHADEX™ G-25 e o número de grupos tiol introduzidos determinado rapidamente por reação com ditiodipiridina (DTDP). Reação dos grupos tiol com DTDP resulta na liberação de tiopiridina, que pode ser monitorada espectroscopicamente a 324 nm. Amostras em uma concentração de proteína de 0,5-1,0 mg/ml são tipicamente usadas. A absorbância a 280 nm pode ser usada para determinar a concentração de proteína com precisão nas amostras, e depois uma alíquota de cada amostra (0,9 ml) é incubada com 0,1 ml de DTDP (5 mM de solução de matéria-prima em etanol) por 10 min em RT. As amostras em branco de tampão são sozinhas mais DTDP também incubadas. Após 10 min, a absorbância a 324 nm é medida e o número de grupos tiol é quantificado usando um coeficiente de extinção para tiopiridina de 19.800 M⁻¹.

Tipicamente um nível de tiolação de cerca de três grupos tiol por anticorpo é desejável. Por exemplo, com alguns anticorpos isto pode ser alcançado adicionando um excesso molar 15 vezes de 2-iminotiolano seguido por incubação em RT por 1 h. O anticorpo é depois incubado com 2-iminotiolano na razão molar desejada e depois dessalgado em tampão de conjugação (50 mM, pH 6,0, tampão de HEPES contendo 5 mM de glicina e 2 mM de DTPA). O material tiolado é mantido em gelo enquanto o número de tióis introduzidos é quantificado como descrito acima.

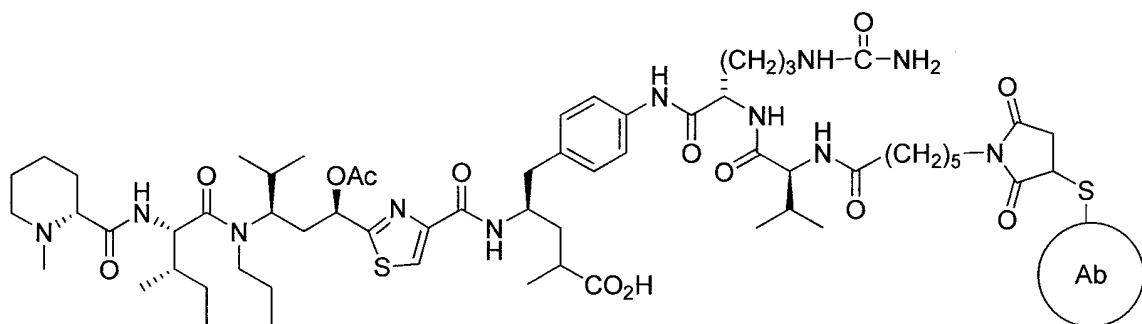
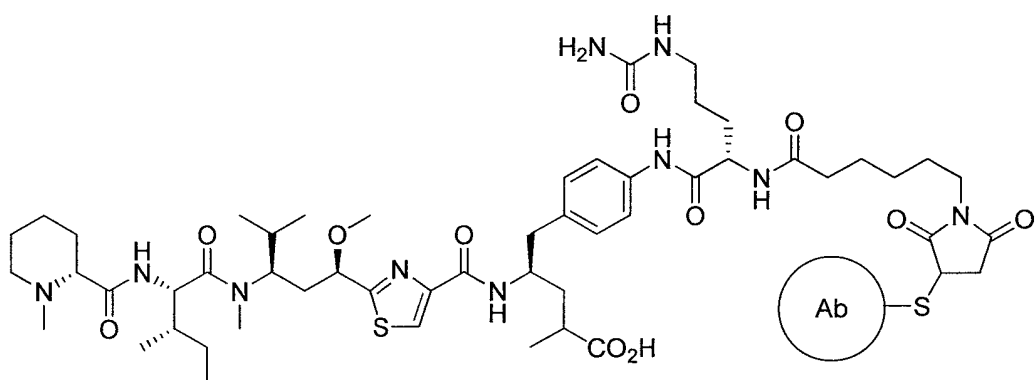
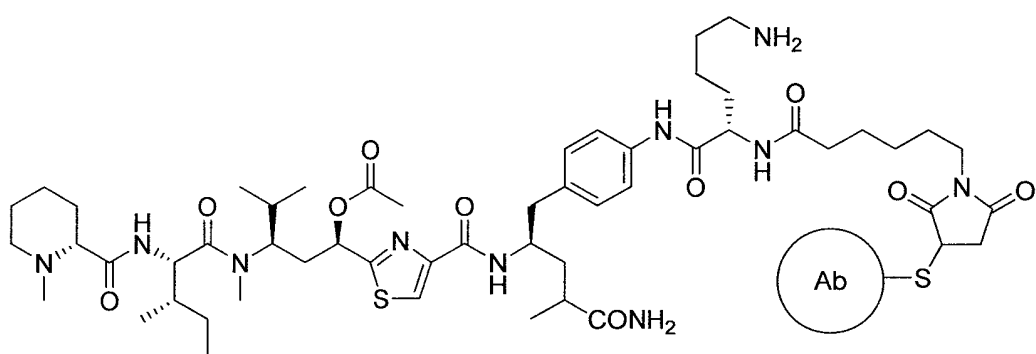
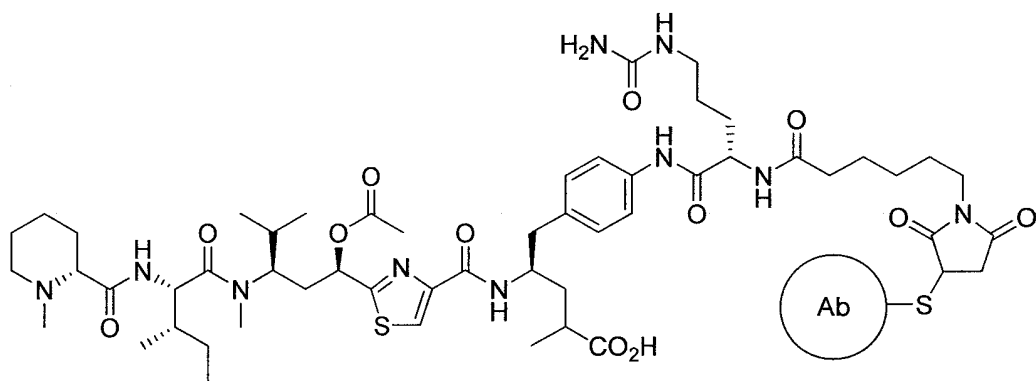
Após verificação do número de tióis introduzidos, a porção de fármaco-ligante é adicionada em um excesso molar de 3 vezes por tiol. A reação de conjugação é permitida prosseguir em tampão de conjugação também contendo uma concentração final de 5% de dimetilsulfóxido (DMSO), ou solvente alternativo similar. Comumente, a solução de matéria-prima de fármaco-ligante é dissolvida em 100% de DMSO. A solução de matéria-prima é acrescentada diretamente ao anticorpo tiolado tendo bastante DMSO adicionado para trazer a concentração final para 10%, ou pré-diluído em

tampão de conjugação contendo uma concentração final de 10% de DMSO, seguido por adição para um volume igual de anticorpo tiolado.

A mistura de reação de conjugação é incubada em RT por 2 h com agitação. Seguindo incubação, a mistura de reação de conjugação é centrifugada e filtrada através de um filtro de 0,2 µm. Purificação do conjugado pode ser alcançada através de cromatografia usando vários métodos. Em um método, o conjugado é purificado usando cromatografia por exclusão de tamanho em uma coluna SEPHACRYL™ S200 pré-equilibrada com 50 mM de tampão de HEPES pH 7,2 contendo 5 mM de glicina e 50 mM de NaCl. Cromatografia é realizada a uma taxa de fluxo linear de 28 cm/h. As frações contendo conjugado são colhidas, agrupadas e concentradas. Em um método alternativo, a purificação pode ser alcançada por meio de cromatografia de permuta iônica. Condições variam de anticorpo para anticorpo e devem ser otimizadas em cada caso. Por exemplo, mistura de reação do conjugado de anticorpo-fármaco é aplicada a uma coluna SP-SEPHAROSE™ pré-equilibrada em 50 mM de HEPES pH 5,5 contendo 5 mM de glicina. O conjugado de anticorpo é eluído usando um gradiente de 0-1 M de NaCl em tampão de equilíbrio em pH 5,5. As frações relevantes contendo o conjugado são agrupadas e submetidas à diálise contra o tampão da formulação (50 mM de tampão de HEPES pH 7,2 contendo 5 mM de glicina e 100 mM de NaCl).

Aqueles versados na técnica entenderão que as condições acima descritas e metodologia são exemplares e não limitativas e que outras abordagens para conjugação são conhecidas na técnica e utilizáveis na presente invenção.

Usando as técnicas anteriores, os compostos desta invenção são conjugados usando os anticorpos 2A10, um anticorpo anti-PSMA (Huang et al., US 2009/0297438); 2H5, um anticorpo anti-CD70 (Terrett et al., US 2009/0028872); 1F4, um anticorpo anti-CD70 (Coccia et al., WO 2008/074004); ou 6A4, um anticorpo antimesotelina (Terrett et al., WO 2009/045957). Os conjugados resultantes podem ser descritos pelas fórmulas seguintes onde Ab representa um anticorpo. Aqueles versados na técnica



COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

Em outro aspecto, a descrição presente fornece uma composi-

ção farmacêutica compreendendo um composto da descrição presente formulado junto com um excipiente farmacêuticamente aceitável. Pode opcionalmente conter um ou mais ingredientes farmacêuticamente ativos adicionais, tais como um anticorpo ou outro fármaco. As composições farmacêuticas podem ser administradas em uma terapia de combinação com outro agente terapêutico, especialmente outro agente anticâncer.

A composição farmacêutica pode compreender um ou mais excipientes. Excipientes que podem ser usados incluem veículos, agentes ativos de superfície, agentes espessantes ou emulsificantes, aglutinantes sólidos, auxiliares de dispersão ou suspensão, solubilizantes, corantes, agentes aromatizantes, revestimentos, agentes desintegrantes, lubrificantes, adoçantes, conservantes, agentes isotônicos, e combinações dos mesmos. A seleção e uso de excipientes adequados são ensinados em Gennaro, ed., *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 2003), a descrição desta é aqui incorporada por referência.

Preferivelmente, uma composição farmacêutica é adequada para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, parenteral, espinhal ou epidérmica (por exemplo, por injeção ou infusão). Dependendo da rota de administração, o composto ativo pode ser revestido em um material para protegê-lo da ação dos ácidos e outras condições naturais que podem inativá-lo. A frase "administração parenteral" significa modos de administração diferentes de administração enteral e tópica, usualmente através de injeção, e incluem, sem limitação, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, injeção subaraquinoide, intraespinhal, epidural e intraesternal e infusão. Alternativamente, a composição farmacêutica pode ser administrada por meio de uma rota não parenteral, tal como uma rota tópica, epidérmica ou mucosa de administração, por exemplo, intranasal, oral, vaginal, retal, sublingual ou topicamente.

Composições farmacêuticas podem ser na forma de soluções aquosas ou dispersões estéreis. Elas podem também ser formuladas em

uma microemulsão, lipossoma, ou outra estrutura ordenada adequada para alcançar concentração de fármaco alta.

A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinado com um material de veículo para produzir uma forma de dosagem simples varia-
5 rá, dependendo do sujeito sendo tratado e do modo particular de administração e geralmente será aquela quantidade da composição que produz um efeito terapêutico. Geralmente, fora cem por cento, esta quantidade variará de cerca de 0,01 por cento a cerca de noventa nove por cento de ingrediente ativo, preferivelmente de cerca de 0,1 por cento a cerca de 70 por cento, o
10 mais preferivelmente de cerca de 1 por cento a cerca de 30 por cento de ingrediente ativo em combinação com um veículo farmacêuticamente aceitável.

Os regimes de dosagem são ajustados para fornecer uma resposta terapêutica. Por exemplo, um bolo simples pode ser administrado, várias doses divididas podem ser administradas com o passar do tempo, ou a
15 dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada como indicado pelas exigências da situação. É especialmente vantajoso formular as composições parenterais em forma de unidade de dosagem para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. "Forma de unidade de dosagem"
20 refere-se às unidades fisicamente distintas adaptadas como dosagens unitárias para os sujeitos a ser tratados; cada unidade contendo uma quantidade predeterminada de composto ativo calculada para produzir a resposta terapêutica desejada, em associação com o veículo farmacêutico requerido.

A dosagem varia de cerca de 0,0001 a 100 mg/kg, e mais usualmente 0,01 a 5 mg/kg, do peso do corpo do hospedeiro. Por exemplo dosagens podem ser 0,3 mg/kg do peso do corpo, 1 mg/kg do peso do corpo, 3 mg/kg do peso do corpo, 5 mg/kg do peso do corpo ou 10 mg/kg do peso do corpo ou dentro da faixa de 1-10 mg/kg. Regimes de tratamento exemplares são administração uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas,
30 uma vez a cada três semanas, uma vez a cada quatro semanas, uma vez por mês, uma vez a cada 3 meses, ou uma vez a cada três a 6 meses. Regimes de dosagem preferidos incluem 1 mg/kg do peso do corpo ou 3 mg/kg

do peso do corpo por meio de administração intravenosa, usando um dos programas de doseamento seguintes: (i) a cada quatro semanas para seis dosagens, depois a cada três meses; (ii) a cada três semanas; (iii) 3 mg/kg do peso do corpo uma vez seguido por 1 mg/kg do peso do corpo a cada três semanas. Em alguns métodos, a dosagem é ajustada para alcançar uma concentração de anticorpo no plasma de cerca de 1-1000 µg/ml e em alguns métodos cerca de 25-300 µg/ml.

Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" de um composto da invenção preferivelmente resulta em uma diminuição na severidade dos sintomas da doença, um aumento na frequência e duração dos períodos sem sintomas da doença, ou uma prevenção do prejuízo ou inaptidão devido à aflição da doença. Por exemplo, para o tratamento de sujeitos portando tumor, uma "quantidade terapeuticamente eficaz" preferivelmente inibe o crescimento do tumor em pelo menos cerca de 20%, mais preferivelmente em pelo menos cerca de 40%, até mesmo mais preferivelmente em pelo menos cerca de 60%, e ainda mais preferivelmente em pelo menos cerca de 80% com relação aos sujeitos sem tratar. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto terapêutico pode diminuir o tamanho do tumor, ou do contrário melhorar os sintomas em um sujeito, que é tipicamente um ser humano mas pode ser outro mamífero.

A composição farmacêutica pode ser uma formulação de liberação controlada ou contínua, incluindo implantes, emplastros transdérmicos, e sistemas de liberação microencapsulada. Polímeros biodegradáveis, biocompatíveis podem ser usados, tais como etileno-acetato de vinila, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, e ácido polilático. Vide, por exemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1978.

Composições terapêuticas podem ser administradas por meio de dispositivos médicos tais como (1) dispositivos de injeção hipodérmica sem agulha (por exemplo, US 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; e 4.596.556); (2) bombas de microinfusão (US 4.487.603); (3) dispositivos transdérmicos (US 4.486.194); (4) aparelhos de

infusão (US 4.447.233 e 4.447.224); e (5) dispositivos osmóticos (US 4.439.196 e 4.475.196); as descrições destas são aqui incorporadas por referência.

Em certas modalidades, a composição farmacêutica pode ser formulada para assegurar distribuição apropriada *in vivo*. Por exemplo, para assegurar que os compostos terapêuticos da invenção cruzem a barreira hematoencefálica, eles podem ser formulados em lipossomas, que podem adicionalmente compreender porções de visamento para intensificar o transporte seletivo para as células ou órgãos específicos. Vide, por exemplo US 4.522.811; 5.374.548; 5.416.016; e 5.399.331; V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685; Umezawa et al., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038; Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180; Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134; Schreier et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090; Keinanen e Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; e Killion e Fidler (1994) *Immunometods* 4:273.

USOS

Compostos desta invenção ou seus conjugados podem ser usados para tratar doenças tais como, mas não limitadas a, doenças hiperproliferativas, incluindo: cânceres da cabeça e pescoço incluindo tumores da cabeça, pescoço, cavidade nasal, seios paranasais, nasofaringe, cavidade oral, orofaringe, laringe, hipofaringe, glândulas salivais, e paragangliomas; cânceres do fígado e árvore biliar, particularmente carcinoma hepatocelular; cânceres intestinais, particularmente câncer colorretal; câncer ovariano; câncer pulmonar de célula pequena e célula não pequena (SCLC e NSCLC); sarcomas de câncer de mama, tais como fibrossarcoma, histiocitoma fibroso maligno, rabdomiossarcoma embrionário, leiomisossarcoma, neurofibrossarcoma, osteossarcoma, sarcoma sinovial, lipossarcoma, e sarcoma da parte macia alveolar; leucemias tais como leucemia promielocítica aguda (APL), leucemia mielogenosa aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda (ALL), e leucemia mielogenosa crônica (CML); neoplasmas dos sistemas nervosos centrais, particularmente câncer de cérebro; mieloma múltiplo (MM), linfomas

tais como linfoma de Hodgkin, linfoma de linfoplasmacitoide, linfoma folicular, linfoma de tecido linfoide associado à mucosa, linfoma de célula do manto, linfoma de célula grande de linhagem B, linfoma de Burkitt, e linfoma de célula grande anaplástica de células T. Clinicamente, a prática dos métodos e uso das composições descritas aqui resultará em uma redução no tamanho ou número do crescimento canceroso e/ou uma redução nos sintomas associados (onde aplicável). Patologicamente, a prática do método e uso das composições descritas aqui produzirá uma resposta patologicamente relevante, tal como: inibição da proliferação de células cancerosas, redução no tamanho do câncer ou tumor, prevenção de mais metástase, e inibição de angiogênese tumoral. O método de tratar tais doenças compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma combinação inventiva a um sujeito. O método pode ser repetido conforme necessário. Especialmente, o câncer pode ser câncer colorretal, câncer de fígado, câncer de próstata, câncer de mama, melanoma, glioblastoma, câncer pulmonar, câncer pancreático, câncer ovariano, mieloma múltiplo, câncer renal, leucemia (especialmente ALL, APL, ou AML), ou linfoma.

Compostos desta invenção ou seus conjugados podem ser administrados em combinação com outros agentes anticancerígenos ou citotóxicos, incluindo anticorpos, agentes de alquilação, inibidores de angiogênese, antimetabólitos, clivador de DNA, reticuladores de DNA, intercaladores de DNA, aglutinantes do sulco secundário de DNA, enediinas, inibidores da proteína de choque térmico 90, inibidores da histona desacetilase, imunomoduladores, estabilizantes dos microtúbulos, análogos de nucleosídeo (purina ou pirimidina), inibidores de exportação nuclear, inibidores de proteassoma, inibidores da topoisomerase (I ou II), inibidores da tirosina cinase, e inibidores da serina/treonina cinase. Agentes anticancerígenos específicos ou citotóxicos incluem β -lapacona, ansamitocina P3, auristatina, bicalutamida, bleomicina, bortezomib, bussulfano, calistatina A, camptotecina, capecitabina, CC-1065, cisplatina, criptoficinas, daunorrubicina, disorazol, docetaxel, doxorubicina, duocarmicina, dinemicina A, epotilonas, etoposide, floxuridina, floxuridina, fludarabina, fluoruracila, gefitinib, geldanamicina, 17-

alilamino-17-demetóxi-geldanamicina (17-AAG), 17-(2-dimetilaminoetil)amino-17-demetóxi-geldanamicina (17-DMAG), gencitabina, hidroxiureia, imatinib, interferonas, interleucinas, irinotecan, maitansina, metotrexato, mitomicina C, oxaliplatina, paclitaxel, ácido hidroxâmico de suberoilanolida (SAHA), tiotepa, topotecan, tricostatina A, vinblastina, vincristina, vindesina, lenalidomida (REVLIMID®), bevacizumab (AVASTIN®), trastuzumab (HERCEPTIN®), e cetuximab (ERBITUX®).

EXEMPLOS

A prática desta invenção pode ser ainda entendida em referência aos exemplos seguintes, que são fornecidos por via de ilustração e não de limitação.

Exemplo 1 - Esquema 1

Esquema 1 (figuras 1a e 1b) descreve um método para fazer os compostos desta invenção.

Tiomida 2. 2,2-Dietoxiacetonitrila 1 (25 g, 193 mmols) foi misturada com $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ (40 ml, 265 mmols, 45% em solução aq.) em 300 ml de metanol (MeOH) em temperatura ambiente (RT). Após manter a mistura de reação durante a noite, foi concentrada sob vácuo e o resíduo foi absorvido em acetato de etila (EtOAc). A solução de EtOAc foi lavada com solução de NaHCO_3 saturada depois salmoura e secada em Na_2SO_4 anidro. O EtOAc foi evaporado para dar tiomida 2 (26 g, 159 mmols, 82%) como um sólido branco. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,01 (s, 1H), 3,67 (m, 4H), 1,22 (t, J = 7,2 Hz, 6H).

2-(dietoximetil)tiazol-4-carboxilato de metila 3. 100 g de peneiras moleculares (3A) foram acrescentados a uma mistura de reação de tiomida 2 (25 g, 153 mmols) e bromopiruvato de metila (20 ml, 163 mmols) em 300 ml de MeOH. Após a mistura ter sido refluxada por 1,5 h, foi esfriada e filtrada através de CELITE™. O filtrado foi concentrado e passado por uma coluna (diclorometano (DCM):EtOAc, 8:1) para dar para carboxilato de tiazol 3 (34,5 g, 140 mmols, 91%) como um sólido que foi usado para a próxima etapa sem outra purificação.

2-formiltiazol-4-carboxilato de metila 4. Tiazol-4-carboxilato 3 (30

g, 122 mmols) foi dissolvido em 300 ml de acetona aos quais foi adicionado HCl aquoso (21 ml, 2M). Após manter a mistura de reação em RT durante a noite, a mistura de reação foi aquecida e mantida a 60°C por 2 h. A mistura de reação foi depois esfriada e evaporada sob vácuo para dar um resíduo
 5 que foi absorvido em 200 ml de DCM. Solução de DCM foi depois lavada com solução de NaHCO₃ saturada e depois salmoura e secada em Na₂SO₄ anidro. Solução de DCM foi filtrada e concentrada sob vácuo para dar a solução concentrada que foi triturada através de éter para dar 2-formiltiazol-4-carboxilato de metila 4 (14 g, 82 mmols, 54% para duas etapas) como um
 10 sólido branco. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 133-8-p110,16 (d, J = 1,3 Hz, 1H), 8,53 (d, J = 1,3 Hz, 1H), 4,01 (s, 3H).

Sulfinimina 7. (S)-2-Metilpropano-2-sulfinamida 5 (7,3 ml, 68 mmols) foi dissolvida em 100 ml de tetra-hidrofurano (THF) aos quais foram adicionados Ti(OEt)₄ (27 ml, 130 mmols) e 3-metil-2-butanona 6 (8g, 41
 15 mmols) em RT. A mistura de reação foi refluxada durante a noite e depois esfriada e acrescentada a uma solução de salmoura. A mistura resultante foi filtrada e o bolo foi lavado com EtOAc. A fase orgânica foi concentrada para dar um resíduo que foi submetido à cromatografia de coluna de sílica-gel (DCM:EtOAc, 4:1) para dar sulfinimina 7 (9,5 g, 37 mmols, 75%) como um
 20 óleo. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 2,53 (m, 1H), 2,29 (s, 3H), 1,22 (s, 9H), 1,12 (d, J = 4,2 Hz, 3H), 1,10 (d, J = 4,2 Hz, 3H). MS (ES+) m/z, calculada: m+1, 190,12, encontrada, 190.

Composto 8. Di-isopropil amida de lítio ("LDA", 60 ml, 108 mmols, 1,8M) foi acrescentada a 200 mL de éter a 78°C seguido pela adição
 25 de sulfinimina 7 (18,9g, 100 mmols) em 200 ml de éter e a mistura de reação resultante foi agitada por 40 min. ClTi(OiPr)₃ (203 mmols, 48,4 ml) foi acrescentado à mistura de reação e a solução foi agitada por 60 min. Uma solução de 2-formiltiazol-4-carboxilato de metila 4 (12,5 g, 72,6mmols) em 180 ml de THF foi adicionada lentamente à mistura de reação. Após mais 2 h a
 30 78°C, uma mistura de ácido acético e THF (1/5 v/v, 4,9 ml) foi adicionada. A mistura foi aquecida para 5°C por 1 h e depois vertida em solução de salmoura. O produto desejado foi depois extraído da solução de salmoura com

éter e solução de EtOAc. A fase orgânica foi depois secada em MgSO_4 anidro, filtrada e evaporada. O resíduo foi passado por 2 colunas (DCM:EtOAc e hexano:EtOAc) para dar o composto 8 (19,6 g, 54 mmols, 75%) como um óleo. MS (ES+) m/z, calculada: m+1, 361,12, encontrada, 361.

5 Composto 9. Uma solução do composto 8 (19 g, 52,7 mmols) em 200 ml de THF foi esfriada para 78°C após $\text{Ti}(\text{OEt})_4$ (21,7 ml, 105 mmols) ter sido lentamente adicionado. Após 60 min, quando a solução ficou clara, NaBH_4 (31 mmols, 1,17g) foi adicionado, após 2 h (tempo de reação mais longo causou redução do éster) 10 ml de MeOH foram adicionados. A mistura foi
10 depois aquecida para 0°C, vertida em 1 ml de HOAc em muito gelo. A mistura foi filtrada e o bolo foi lavado com EtOAc. Após separação, a fase orgânica foi secada com Na_2SO_4 e evaporada. O resíduo final foi passado através de uma coluna (DCM:EtOAc, 1:4) para dar o composto 9 (19 g, 52 mmols, 99%) como um óleo. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8,1 (s, 1H), 5,54 (d, J = 6,7 Hz, 1H), 5,16 (m, 1H), 3,92 (s, 3H), 3,42 ((m, 1H), 3,32 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 2,25 (m, 1H), 1,88 (m, 1H), 1,68 (m, 1H), 1,26 (s, 9H), 0,91 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 0,87 (d, J = 6,7 Hz, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 177,9, 162,1, 146,6, 127,7, 67,9, 58,6, 56,4, 52,5, 40,8, 33,9, 23,1, 19,8, 17,4. MS (ES+) m/z, calculada: m+1, 363,13, encontrada, 363.

20 Composto dimetilado 10. Hidreto de sódio (9,69 mmols, 60%, 387 mg) foi acrescentado a uma solução do composto 9 em 6 ml de N,N-dimetilformamida (DMF) a 5°C seguido por iodeto de metila (607 μL , 9,7 mmols) após 60 minutos. Após agitar a mistura de reação por 3 h, a mistura foi vertida em solução de NH_4Cl saturada esfriada em gelo. Éter etílico foi
25 adicionado e a camada orgânica foi lavada com salmoura, secada em MgSO_4 anidro e concentrada para dar um resíduo. O resíduo foi passado através de uma coluna (hexano:EtOAc 1:4) para dar o composto dimetilado 10 (314 mg, 0,805 mmol, 33%) como um líquido. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8,17 (s, 1H), 4,87 (dd, J = 11,0 Hz, J = 2,5 Hz, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,50 (s, 3H), 3,40 (m, 1H), 2,58 (s, 3H), 1,99 (m, 1H), 1,83 (m, 2H), 1,25 (s, 9H), 0,98 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 0,95 (d, J = 6,7 Hz, 3H) MS (ES+) m/z, calculada: m+1, 391,16, encontrada, 391.

Monometil amina 11. HCl aquoso (4N, em dioxano, 0,5 ml) foi acrescentado a uma solução do composto dimetilado 10 (370 mg, 0,95 mmol) em 5 ml de MeOH. Após agitar a mistura de reação por 60 min, foi evaporada sob vácuo para dar para monometil amina 11 (362 mg) como seu sal de HCl que foi usado para a próxima etapa sem outra purificação. MS (ES+) m/z, calculada: m+1, 287,14, encontrada, 287.

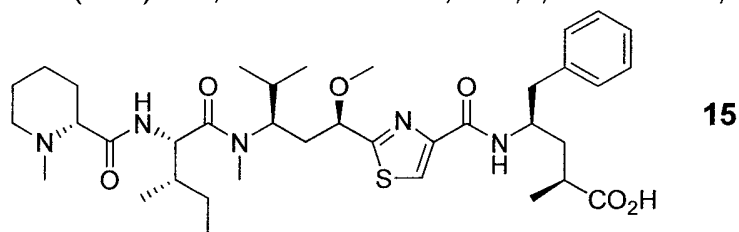
Amida 12. Monometil amina 11 (362 mg, 1,12 mmol), composto de Fmoc 22 (preparado por Wipf et al. 2007; 1,2 g, 3,38 mmols) e N,N-diisopropiletilamina (DIEA, 976 μ L, 5,6 mmols) foram misturados em 5 ml de DMF em RT. Após agitar por 24 h, a mistura foi concentrada e o resíduo foi dissolvido em EtOAc. A fase orgânica foi lavada com NaHCO₃, salmoura, secada em MgSO₄ anidro e concentrada para dar um resíduo. O resíduo foi passado através de uma coluna (hexano:EtOAc:MeOH 7:3:0,6) para dar amida 12 (466 mg, 0,75 mmol, 67%) como um óleo. (ES+) m/z, calculada: m+1, 622,2, encontrada, 622.

Composto 13. Amida 12 (466 mg, 0,75 mmol) foi dissolvida em 8 ml de DCM contendo 5% de piperidina em RT. Após 1 h, a mistura foi evaporada sob vácuo e o resíduo foi passado através de uma coluna para dar um óleo (150 mg) que foi depois misturado com ácido (D)-*n*-metil pipecolínico 23 ("D-Mep", preparado por Peltier et al., 2006; 50 mg, 0,35 mmol), hexafluorofosfato de *N,N,N',N'*-tetrametil-O-(7-azabenzotriazol-1-*i*)urônio ("HATU", 126 mg, 0,33 mmol), DIEA (152 μ L, 0,84 mmol) em 2 ml de DCM. Após agitar por 2,5 h, o solvente foi evaporado para dar um resíduo que foi dissolvido em EtOAc. A fase orgânica foi depois lavada com NaHCO₃ saturado, salmoura, secada em MgSO₄ anidro e concentrada para dar um resíduo. O resíduo foi passado através de uma coluna (DCM:MeOH 0-10%) para dar o composto 13 (99 mg, 0,188 mmol, 25%) como um óleo. MS (ES+) m/z, calculada: m+1, 525,3, encontrada, 525.

Ácido 14. Composto 13 (99 mg, 0,18 mmol) foi dissolvido em uma mistura de 3 ml de MeOH e água (3:1 v:v) aos quais foi adicionado NaOH (370 μ L, 0,37 mmol, 1M). Após agitar por duas horas, a mistura de reação foi neutralizada e concentrada para dar um resíduo. O resíduo foi pas-

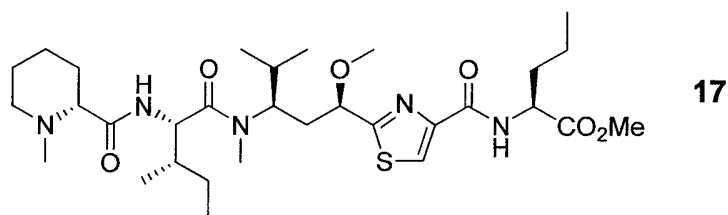
sado em uma coluna de C-18 (água (1% de ácido trifluoroacético ("TFA")): acetonitrila (ACN) (1% de TFA), 0-100%) para dar o ácido 14 (78 mg, 0,125 mmol, 69%) como um sal de TFA. MS (ES+) m/z, calculada: m+1, 511,29, encontrada, 511.

- 5 Composto 15. DIEA (24 μ L, 137 μ mol) foi acrescentada a uma solução do ácido 14 (9 mg, 14,4 μ mol, sal de TFA) e HATU (6 mg, 15 μ mol) em DMF (0,5 ml) em RT. Por fim o ácido 14 foi ativado (monitorado por HPLC), tubufenilalanina (preparada por Peltier et al. 2006; 6,5 mg, 27 μ mol, sal de HCl) foi adicionada. Após agitar por 20 min, a mistura de reação foi passada em uma coluna de C-18 (água (1% de TFA):ACN (1%TFA), 0-100%) para dar o composto 15 (2,5 mg, 3 μ mol, 21%) como um sal de TFA branco. MS (ES+) m/z, calculada: m+1, 700,4, encontrada, 700.



- Composto 16. DIEA (20 μ L, 0,11 mmol) foi acrescentada a uma solução do ácido 14 (12 mg, 0,019 mmol, sal de TFA), éster de metila de fenilalanina (5,3 mg, 0,024 mmol, como sal de HCl) e HATU (11,4 mg, 0,03 mmol) em 0,5 ml de DMF. Após 30 min, a mistura de reação foi passada em uma coluna de C-18 (água (1% de TFA):ACN (1%TFA) 0-100%) para dar o composto 16 (4,2 mg, 0,005 mmol, 26%) como um sal de TFA branco. MS (ES+) m/z, calculada: m+1, 672,89, encontrada, 672,5, Composto 16 é também referido como composto (III-c) mais acima.

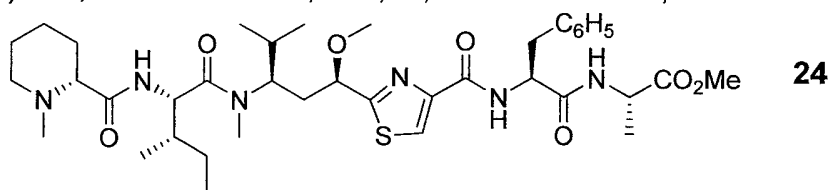
- Composto 17. DIEA (7 μ L, 0,04 mmol) foi acrescentada a uma solução do ácido 14 (5 mg, 0,008 mmol), éster de metila de norvalina ("NVaM", 2 mg, 0,012 mmol) e HATU (4,5 mg, 0,012 mmol) em DMF. Após agitar a mistura de reação por 30 min, a mistura bruta foi passada em uma coluna de C-18 (água (1% de TFA):ACN (1%TFA) 0-100%) para dar o composto 17 (1,3 mg, 0,0017 mmol, 21%) como um sal de TFA branco. MS (ES+) m/z, calculada: m+1, 624,85, encontrada, 624,5. Composto 17 é também referido como o composto (III-e) mais acima.

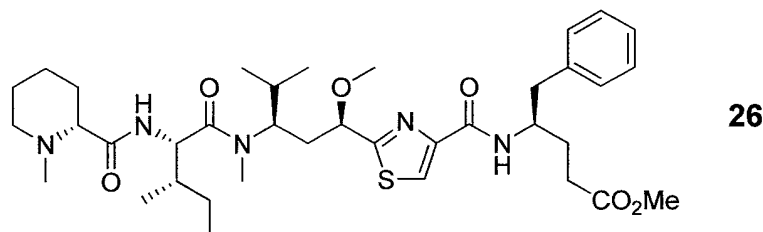
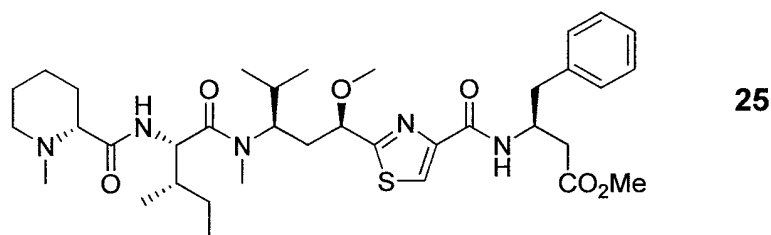


ÁCIDO 18. NaOH aquoso (75 μ L, 0,75 mmol, 10M) foi acrescentado a uma solução do composto 16 (168 mg, 0,25 mmol) em uma mistura de MeOH e THF. Após agitar durante a noite, a mistura foi neutralizada e liofilizada à secura. O sólido foi usado para a próxima etapa sem outra purificação. MS (ES+) m/z, calculada: m+1, 658,36, encontrada, 658,4. Ácido 18 é também referido como composto (III-o) mais acima.

Norvalil amida 19. DIEA (5, μ L, 0,03 mmol) foi acrescentada a uma solução do ácido 18 (5 mg, 0,006 mmol), HATU (3,5 mg, 0,009 mmol) e NVaM (1,5 mg, 0,009 mmol) em DMF. Após agitar por 30 min, a mistura de reação foi passada em uma coluna de C-18 (água (1% de TFA):ACN (1%TFA) 0-100%) para dar para norvalil amida 19 (2,2, 0,0025 mmol, 40%) como um sal de TFA branco. MS (ES+) m/z, calculada: m+1, 772,02, encontrada, 771,5. Norvalil amida 19 é também referida como composto (III-f) mais acima.

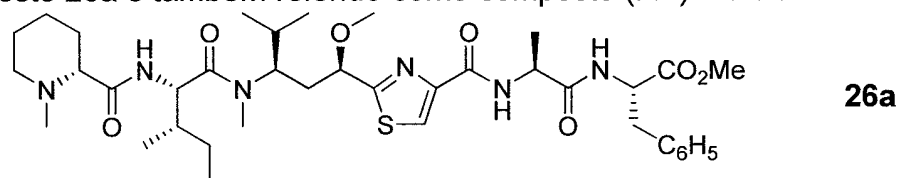
Compostos 24, 25, e 26. Estes três compostos do ácido 14 ou 18 foram sintetizados usando procedimentos análogos aos descritos acima. Os produtos foram todos purificados por uma coluna de C-18 (água (1% de TFA):ACN (1%TFA) 0-100%). Os rendimentos variaram de 25-50%. Composto 24: MS (ES+) m/z, calculada: m+1, 743,4, encontrada 743. Composto 25: MS (ES+) m/z, calculada: m+1, 686,39, encontrada 686,5. Composto 26: MS (ES+) m/z, calculada: m+1, 700,40, encontrada 700,5.





Composto 24 é também referido como composto (III-g) mais acima.

Composto 26a. Composto 14 foi acoplado com Ala-Phe-OMe seguindo o mesmo procedimento como descrito para o composto 16. O produto foi purificado por uma coluna de C-18 (água (1% de TFA):ACN (1% de TFA), 0-100%). MS (ES+) m/z, calculada: m+1, 743, encontrada 743,4. Composto 26a é também referido como composto (III-l) mais acima.



Exemplo 2 - Esquema 2

Este exemplo descreve a síntese dos compostos mostrados no Esquema 2 (figura 2).

Composto 28. Éster de metila de fenilalanina (10 mg, 46,5 μ mols) e HATU (14,7 mg, 38,6 μ mols) foram acrescentados a uma solução do composto 27 (preparado por Peltier et al., 2006; 10 mg, 15,5 μ mols, sal de formiato) em 0,5 ml de DMF seguido por DIEA em RT. Após agitar durante 30 minutos, DMSO (2 ml) foi adicionado e a mistura de reação foi submetida diretamente a uma coluna de C-18 (água (5 mM de formiato de amônio, pH 7,2):ACN 0-100%), para dar o composto 28 (3,2 mg, 25%) como um sólido branco (sal de formiato). MS (ES+) m/z, calculada: m+1, 758,41, encontrada 758,4. Composto 28 é também referido como composto (III-h) mais acima.

Composto 29. Anidrido acético (30 µl, 290 µmols) foi acrescentado a uma solução do composto 28 (3,2 mg, 3 µmols, sal de formiato) em 0,5 ml de piridina a 0°C. Após agitar por 24 h, o solvente foi evaporado da mistura de reação e o resíduo foi passado através de uma coluna de sílica regular (DCM:MeOH 0-10%) para dar o composto 29 (2,0 mg, 83%) como um óleo. MS (ES+) m/z, calculada: m+1, 800,42, encontrada 800,4. Composto 29 é também referido como composto (III-i) mais acima.

O-Acetila, N,O-acetal 29a. Composto 29 (2 mg, 2,4 µmols) foi dissolvido em 0,5 ml de MeOH ao qual foi adicionado uma gota de 4N de HCl em dioxano. Após agitar a mistura de reação durante a noite em RT, a mistura foi concentrada e o resíduo foi dissolvido em DMSO que foi depois passado por uma coluna de C-18 (água (20 mM de formiato de amônio, pH 6,1): ACN (0-100%)) para dar O-acetila, N,O-acetal 29a (1,38 mg, 75%) como um sólido branco (sal de formiato) após liofilização. MS (ES+) m/z, calculada: m+1, 730, encontrada 730,4. O-Acetila, N,O-acetal 29a é também referida como composto (III-m) mais acima.

N,O-Acetal 29b. Composto 28 (5 mg, 6 µmols) foi dissolvido em MeOH ao qual foi adicionado 1 gota de 4N de HCl em dioxano. Após agitar a mistura de reação por 24 h, a solução foi concentrada e usada para próxima reação de etapa sem outra purificação. MS (ES+) m/z, calculada: m+1, 687, encontrada 688,4. N,O-Acetal 29b é também referido como composto (III-n) mais acima.

O-metila, N,O-acetal 29c. N,O-Acetal 29b (cerca de 5 mg, 7,2 µmols) foi dissolvido em DMF ao qual foram adicionados dimetilsulfato (3 µl, 37 µmols) e NaH (2 mg, 50 µmols, 60% em óleo mineral) a 0°C. Após a 1 h, a mistura foi absorvida em DMSO e passada por uma coluna de C-18 (água (20 mM de formiato de amônio, pH 6,1): ACN (0-100%)) para dar O-metila, N,O-acetal 29c como um semissólido (0,31 mg, 5%; mistura contendo um composto não identificado de mesmo MW). MS (ES+) m/z, calculada: m+1, 702, encontrada 702,4. O-metila, N,O-acetal 29c é também referido como composto (III-k) mais acima.

Exemplo 3 - Esquema 3

Esquema 3 (figura 3) mostra um procedimento para fazer os compostos de acordo com a fórmula (II-b).

Álcool 30. TFA (171 ml) foi acrescentado a uma solução de (S)-*terc*-butil-1-hidróxi-3-(4-nitrofenil)propan-2-ilcarbamato 20 (Erlanson et al., US 7.214.487 B2; 13,9 g, 46,9 mmols) em DCM (272 ml) a 0°C. A mistura de reação foi aquecida para RT e a reação foi permitida prosseguir durante 25 minutos. A solução foi concentrada para fornecer 9,2 g de (S)-2-amino-3-(4-nitrofenil)propan-1-ol bruto como um sólido branco. A uma solução deste produto bruto e carbonato de sódio (12,4 g, 117,3 mmols) em THF (87 ml) e água (87 ml) foi adicionada *N*-carbetoxiftalimida ("CEPT", 12,3 g, 56,3 mmols). Após a mistura de reação ter sido agitada em RT por 4 h, EtOAc (150 ml) foi adicionado. A fase aquosa foi extraída com EtOAc. As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura, secadas em Na₂SO₄ anidro, filtradas e concentradas sob vácuo para dar um resíduo bruto que foi purificado por cromatografia rápida eluindo a partir de sílica-gel com um gradiente de 0-100% de EtOAc em hexanos para dar 12,3 g de álcool 30, MS: (+) *m/z* 327,0 (*M*+1).

Triflato 31. A uma solução de álcool 30 (1 g, 3,06 mmols) em DCM anidro (18 ml) foi adicionada piridina (0,274 ml, 3,36 mmols) a 78°C. Após a mistura de reação ter sido agitada a 78°C por 5 min, anidrido trifluorometanossulfônico (0,568 ml, 3,36 mmols) foi adicionado. A mistura de reação foi agitada a 78°C por 45 min, e depois em RT por 45 min. Após o precipitado ter sido separado por filtração, o filtrado foi purificado por cromatografia rápida eluindo a partir de sílica-gel com DCM para render 0,84 g de triflato 31. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,10 (2H, d, *J* = 8,8 Hz), 7,81 (2H, m), 7,74 (2H, m), 7,36 (2H, *J* = 8,8 Hz), 5,13 (1H, t, *J* = 10,0 Hz), 4,99 (1H, m), 4,80 (1H, dd, *J* = 4,8, 5,6 Hz), 3,52 (1H, dd, *J* = 3,2, 11,2 Hz), e 3,27 (1H, dd, *J* = 5,6, 8,8 Hz).

DIÉSTER 32, Metilmalonato de dietila (0,71 ml, 4,12 mmols) foi acrescentado a gotas a uma suspensão de hidreto de sódio (0,161 g, 60% de dispersão em óleo mineral, 4,03 mmols) em THF anidro (4,7 ml) a 0°C. A mistura de reação foi agitada a 0°C por 10 min, e depois em RT por 10 min.

- A solução resultante foi adicionada lentamente a uma solução de triflato 31 (0,84 g, 1,83 mmol), em THF anidro (9,4 ml) a 0°C. Após a mistura de reação ter sido agitada a 0°C durante a noite, solução aquosa de NH₄Cl saturado (20 ml) foi adicionada. A solução aquosa foi extraída com EtOAc, e as
- 5 camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura, secadas em MgSO₄, filtradas, e concentradas sob vácuo para dar um resíduo. O produto bruto foi purificado por cromatografia rápida eluindo a partir de sílica-gel com um gradiente de 0-50% de EtOAc em hexanos para fornecer 0,57 g de diéster 32, MS: (+) m/z 483,3 (M+1).
- 10 Monoéster 33. Uma solução de diéster 32 em 6 N de HCl (10 ml) e ácido acético (10 ml) foi aquecida para 145°C durante 2 dias. A solução orgânica foi concentrada para fornecer 0,41 g do sal de cloridrato do ácido (R)-4-amino-2-metil-5-(4-nitrofenil)pentanoico bruto como um sólido branco.
- 2,2-Dimetoxipropano ("DMP", 4 ml, 32,6 mmols) foi acrescenta-
- 15 do a uma solução do sal de cloridrato do produto bruto e HCl concentrado (1 ml) em MeOH anidro (20 ml). A mistura de reação foi aquecida a 60°C durante a noite. A solução orgânica foi concentrada para fornecer 0,43 g do sal de cloridrato do 4-amino-2-metil-5-(4-nitrofenil)pentanoato (R)-metila bruto como um sólido branco.
- 20 Trietilamina (0,44 ml, 3,1 mmols) foi acrescentada a uma solução do sal de cloridrato do 4-amino-2-metil-5-(4-nitrofenil)pentanoato de (R)-metila bruto e dicarbonato de di-*terc*-butila (0,369 g, 1,69 mmol) em ACN (10 ml) em RT. Após a mistura de reação ter sido agitada em RT por 4 h, o solvente foi evaporado. Água (20 ml) foi adicionada, e a solução aquosa foi ex-
- 25 traída com EtOAc. As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura, secadas em Na₂SO₄, filtradas, e concentradas. O produto bruto foi purificado por cromatografia rápida eluindo a partir de sílica-gel com um gradiente de 0-30% de EtOAc em hexanos para fornecer 0,31 g de monoéster 33 como um óleo incolor. MS: (+) m/z 267,3 (M-99).
- 30 Ácido carboxílico 34. Uma solução de monoéster 33 (0,31 g, 0,846 mmol) em 6 N de HCl foi aquecida a 130°C por 1,5 h. A solução orgânica foi concentrada para fornecer 0,244 g de ácido carboxílico 34 como um

sólido branco. MS: (+) m/z 253,1 (M+1).

Nitro ácido 35. Composto 34a (80,4 mg, 0,149 mmol, preparado por Patterson et al. 2008) foi acrescentado a uma solução a 0,2 M de pentafluorofenol (41,1 mg, 0,224 mmol) e *N,N'*-di-isopropilcarbodi-imida ("DIC", 0,0255 ml, 0,164 mmol) em DCM (0,76 ml) a 0°C. A mistura de reação foi aquecida para RT e agitada em RT durante a noite. O solvente foi evaporado. EtOAc (18 ml) foi adicionado e o produto bruto foi filtrado, com enxágue do vaso de reação com EtOAc. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida e o material bruto foi usado sem outra purificação. DMF (0,6 ml) foi acrescentado ao produto bruto, seguido por ácido carboxílico 34 (0,129 g, 0,448 mmol) e DIEA (0,13 ml, 0,745 mmol). A mistura de reação foi agitada em RT durante a noite e o solvente foi evaporado. O produto bruto foi purificado por cromatografia rápida eluindo a partir de sílica-gel com um gradiente de 10-20% de MeOH em DCM contendo 1% de NH₄OH para fornecer 0,11 g de nitro ácido 35 como um sólido branco. MS: (+) m/z 773,4 (M+1).

Aminoácido 36. Uma solução de nitro ácido 35 (0,11 g, 0,142 mmol) e paládio em carbono (10%, 15 mg) em MeOH (5 ml) foi agitada sob uma atmosfera de hidrogênio por 4 h. O catalisador foi separado por filtração, e o filtrado foi concentrado para fornecer 91 mg de aminoácido 36 como um sólido branco. MS: (+) m/z 743,5 (M+1). Aminoácido 36 é também referido como composto (III-b) mais acima.

Metil éster 36a. HCl (1 gota, 37%) foi acrescentado a uma solução de aminoácido 36 (1,9 mg, 2,5 mmols) e 2,2-dimetoxipropano ("DMP", 0,05 ml, 0,41 mol) em MeOH (0,5 ml). A mistura de reação foi agitada em RT por 2 h e depois concentrada. O produto bruto foi purificado por HPLC preparativa para fornecer 1,7 mg de éster de metila 36a como um sólido branco. MS: (+) m/z 757,5 (M+1). Éster 36a é também descrito neste relatório descritivo pela fórmula (III-t).

Exemplo 4 - Esquema 4

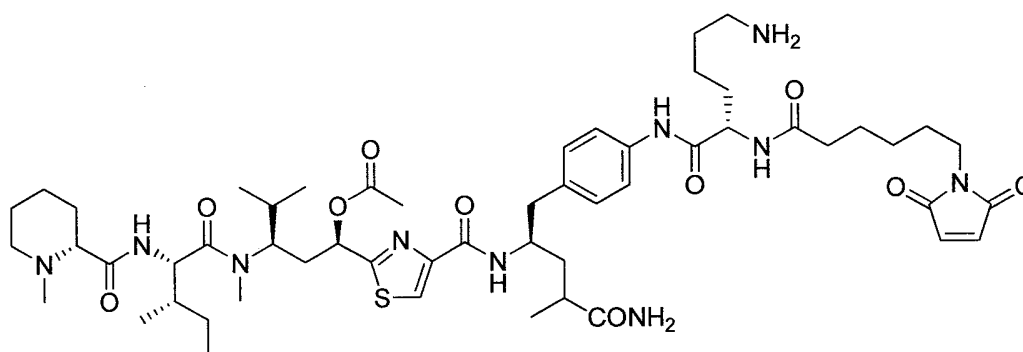
Esquema 4 (figura 4) mostra um método para prender os ligantes de peptidila e os grupos funcionais reativos aos compostos desta invenção, prontos para conjugação.

Composto 37. Uma solução de DIEA, Fmoc-Lys(Boc)-OH (17,3 mg, 0,037 mmol), e HATU (12,8 mg, 0,0336 mmol) em DMF (0,3 ml) foi agitada em RT por 5 min. O pH da solução foi mantido entre 8 e 9. Depois uma solução de aminoácido 36 (25 mg, 0,0336 mmol) em DMF (2 ml) e DIEA foi
5 acrescentada à mistura de reação, mantendo o pH entre 8 e 9. Após agitar em RT por 15 min, a solução de NH_4Cl saturada (5 ml) foi adicionada para extinguir a reação. A solução aquosa foi extraída com EtOAc, e as camadas orgânicas combinadas foram secadas, filtradas, e concentradas. O produto bruto foi purificado por cromatografia rápida eluindo a partir de sílica-gel com
10 um gradiente de 0-20% MeOH em DCM para fornecer 36,1 mg do composto 37, MS: (+) m/z 1193,6 (M+1).

Composto 38. Piperidina foi acrescentada a uma solução do composto 37 (36,1 mg, 0,0302 mmol) em DMF (2 ml), mantendo o pH entre 9 e 10. Após agitar em RT por 20 min, a solução orgânica foi concentrada
15 para fornecer 29,3 mg do composto de α -amino livre bruto.

DIEA foi acrescentada a uma solução de ácido 6-maleimidoexanoico (7,0 mg, 0,0332 mmol) e HATU (11,5 mg, 0,0302 mmol) em DMF (0,3 ml) mantendo o pH entre 8 e 9. A mistura de reação foi agitada em RT por 5 min. Depois DIEA e o composto de amino livre bruto em DMF
20 (2 ml) foi adicionado, mantendo o pH entre 8 e 9. Após a mistura de reação ter sido agitada em RT por 15 min, o produto bruto foi purificado por HPLC preparativa para fornecer 9,1 mg do composto 38 como um sólido branco. MS: (+) m/z 1164,6 (M+1).

Composto 39. TFA (1,5 ml) foi acrescentado a uma solução do
25 composto 38 (9,1 mg, 0,0078 mmol) em DCM (1,5 ml). Após a mistura de reação ter sido agitada em RT por 15 min, o produto bruto foi purificado por HPLC preparativa para fornecer 5,0 mg do sal de TFA do composto 39 desejado como um sólido branco. MS: (+) m/z 1064,8 (M+1). A estrutura de base livre do composto 39 é também mostrado mais acima, como o composto (VI-
30 b). Alguma amida do composto 39 foi também isolada como um subproduto em sua preparação. MS: (+) m/z 1063,6 (M+1). A amida é também descrita neste relatório descritivo pela fórmula (VI-q).



Amida do composto 39

Exemplo 5 - Esquema 5

Esquema 5 (figura 5) mostra um procedimento alternativo para fazer os compostos de acordo com a fórmula (II-b).

Amino éster 42. 4,0 N de HCl em 1,4-dioxano (6,7 ml) foram acrescentados a uma solução do composto 41 (preparado por Patterson et al. 2008; 1 g, 2,66 mmols) em etanol (17 ml). A mistura de reação foi agitada em RT por 2 h, e depois concentrada para fornecer 0,82 g de amino éster 42 como um sólido branco. MS: (+) m/z 273,3 (M+1).

Éster de azido 43. Cloreto de oxalila (1,71 ml, 19,95 mmols) e DMF (0,33 ml, 4,26 mmols) foram acrescentados a uma solução de isoleucina de azido (Lundquist et al., Org. Lett. 2001, 3, 781; 0,669 g, 4,26 mmols) em hexanos (176 ml). A mistura de reação foi agitada em RT por 1 h, filtrada, e concentrada para fornecer o cloreto de ácido. O cloreto de ácido e DI-EA (2,32 ml, 13,3 mmols) foram acrescentados a uma solução de amino éster 42 (0,82 g, 2,66 mmols) em DCM (26,7 ml) a 0°C. A mistura de reação foi permitida aquecer para RT e agitada em RT durante a noite. Salmoura foi adicionada para extinguir a reação, e a solução aquosa foi extraída com EtOAc. As camadas orgânicas combinadas foram secadas em Na₂SO₄, filtradas, e concentradas sob vácuo. O produto bruto foi purificado por cromatografia rápida eluindo a partir de sílica-gel com um gradiente de 0-50% de EtOAc em hexanos para fornecer 0,86 g do éster de azido 43 como um sólido branco. MS: (+) m/z 412,3 (M+1).

Composto de trietilsilila 44. 2,6-Lutidina (1,22 ml, 10,45 mmols) e trifluorometanossulfonato de trietilsilila (1,14 ml, 5,02 mmols) foram acrescentados a uma solução de éster de azido 43 (0,86 g, 2,09 mmols) em DCM

(11 ml) a 0°C. A mistura de reação foi permitida aquecer para RT por 1 h, e depois agitada em RT por uma hora adicional. Salmoura foi adicionada para extinguir a reação, e a solução aquosa foi extraída com EtOAc. As camadas orgânicas combinadas foram secadas, filtradas, e concentradas. O produto
5 bruto foi purificado por cromatografia rápida de sílica-gel eluindo com um gradiente de 0-30% EtOAc em hexanos para fornecer 1,1 g do composto de trietilsilila 44. MS: (+) m/z 526,4 (M+1).

Composto de N-metila 45. Uma solução do composto de trietilsilila 44 (1,04 g, 1,98 mmol) em THF (6,5 ml) foi esfriada para 45°C, e hexametil-
10 tildissilazida de potássio (0,5 M em tolueno, 4,75 ml, 2,37 mmols) foi adicionada. A mistura resultante foi agitada por 20 min a 45°C. Iodeto de metila (0,37 ml, 5,94 mmols) foi adicionado, e a mistura de reação foi permitida aquecer para RT por 4 h em cujo tempo a reação foi extinta com etanol (10 ml). O produto bruto foi diluído com EtOAc e lavado com salmoura, e a ca-
15 mada aquosa foi extraída com EtOAc. As camadas orgânicas combinadas foram secadas em Na₂SO₄ anidro, filtradas, e concentradas sob vácuo. O produto bruto foi purificado por cromatografia rápida eluindo a partir de sílica-gel com um gradiente de 0-30% de EtOAc em hexanos para fornecer 0,91 g do composto de N-metila 45, MS: (+) m/z 540,4 (M+1).

20 Composto 46. Uma solução do composto de N-metila 45 (1,0 g, 1,85 mmol) em AcOH desoxigenado/H₂O/THF (65 ml, 3:1:1, v/v/v) foi agitada em RT por 36 h. Tolueno (250 ml) foi adicionado e a solução foi concentrada. O produto bruto foi purificado por cromatografia rápida eluindo a partir de sílica-gel com um gradiente de 0-100% de EtOAc em hexanos para fornecer
25 0,46 g do composto 46 como óleo. MS: (+) m/z 426,3 (M+1).

Éter de metila 47. Hexametildissilazida de potássio ("KHMDs", 0,5 M em tolueno, 2,54 ml, 1,27 mmol) foi acrescentado a uma solução do composto 46 (0,45 g, 1,06 mmol) em THF (5 ml) a 78°C. A mistura de reação foi agitada por 20 min a 78°C. Iodeto de metila (0,2 ml, 3,18 mmols) foi adi-
30 cionado, e a mistura de reação foi permitida aquecer para 20°C por 2 h em cujo tempo a reação foi extinta com solução de NH₄Cl saturada. A solução aquosa foi extraída com EtOAc. As camadas orgânicas combinadas foram

secadas em Na_2SO_4 anidro, filtradas, e concentradas sob vácuo. O produto bruto foi purificado por cromatografia rápida eluindo a partir de sílica-gel com um gradiente de 0-50% de EtOAc em hexanos para fornecer 0,41 g do composto 47 como óleo incolor. MS: (+) m/z 440,3 (M+1).

5 Composto 48. A uma solução de D-Mep (0,45 g, 3,14 mmols) em EtOAc (10 ml) foi adicionado pentafluorofenol (0,64 g, 3,47 mmols) e N,N'-díciclo-hexilcarbodi-imida ("DCC", 0,72 g, 3,47 mmols). Após a mistura de reação ter sido agitada em RT durante noite, o precipitado foi filtrado, e lavado com EtOAc. Ao filtrado resultante foram adicionados o composto 47 (0,46
10 g, 1,05 mmol) e paládio em carbono (10 % p, 0,36 g). A mistura de reação foi agitada sob uma atmosfera de hidrogênio durante a noite. O catalisador foi separado por filtração, e depois o filtrado foi concentrado sob vácuo. O produto bruto foi purificado por cromatografia rápida eluindo a partir de sílica-gel com um gradiente de 0-5% MeOH em EtOAc para fornecer 0,43 g do composto 48 como óleo incolor. MS: (+) m/z 539,4 (M+1).

Ácido carboxílico 49. A uma solução do composto 48 (0,43 g, 0,80 mmol) em 1,4-dioxano desoxigenado (8 ml) foi adicionada solução aquosa de hidróxido de lítio desoxigenado (0,6 M, 4 ml) em RT. A mistura de reação foi agitada em RT por 2 h, e depois concentrada sob vácuo. O produto
20 bruto foi purificado por cromatografia rápida eluindo a partir de sílica-gel com um gradiente de 10-30% de MeOH em DCM contendo 1% de NH_4OH para fornecer 0,3 g de ácido carboxílico 49 como um sólido branco. MS: (+) m/z 511,4 (M+1).

Nitro ácido 50. Ácido carboxílico 49 (80 mg, 0,157 mmol) foi acrescentado a uma solução de 0,2 M de pentafluorofenol (43,3 mg, 0,235 mmol) e DIC (0,0269 ml, 0,173 mmol) em DCM (0,8 ml) a 0°C. A mistura de reação foi aquecida para RT, e agitada em tal temperatura durante a noite. O solvente foi evaporado. Acetato de etila (18 ml) foi adicionado, e o produto bruto foi filtrado, com enxágue de EtOAc do vaso de reação. O filtrado foi
30 concentrado sob pressão reduzida, e o material bruto foi usado sem outra purificação. DMF (0,6 ml) foi acrescentado ao produto bruto, seguido por ácido carboxílico 34 (0,136 g, 0,47 mmol), e DIEA (0,137 ml, 0,785 mmol). A

mistura de reação foi agitada em RT durante a noite, e o solvente foi depois evaporado sob vácuo. O produto bruto foi purificado através de cromatografia rápida, eluindo a partir de sílica-gel com um gradiente de 10-20% de MeOH em DCM contendo 1% de NH_4OH para fornecer 0,1 g de nitro ácido 50 como um sólido branco. MS: (+) m/z 745,4 (M+1).

Aminoácido 51. Uma mistura de nitro ácido 50 (0,1 g, 0,134 mmol) e paládio em carbono (10%, 14 mg) em MeOH (5 ml) foi agitada sob uma atmosfera de hidrogênio por 4 h. O catalisador foi separado por filtração, e o filtrado foi concentrado sob vácuo para fornecer 87,3 mg de aminoácido 51 como um sólido branco. MS: (+) m/z 715,5 (M+1). Aminoácido 51 é também referido como composto (III-j) mais acima.

Exemplo 6 - Esquema 6

Esquema 6 (figura 6) mostra ainda outro procedimento para fazer os compostos de acordo com a fórmula (II-b).

Composto de hidroxinitro 52. Composto 27 (Esquema 2) (16,4 mg, 0,0275 mmol), foi acrescentado a uma solução de 0,2 M de pentafluorofenol (7,6 mg, 0,0413 mmol) e DIC (0,0094 ml, 0,0606 mmol) em DCM (0,2 ml) a 0°C. A mistura de reação foi aquecida para RT, e agitada em RT durante a noite. O solvente foi evaporado. EtOAc (3 ml) foi adicionado e o produto bruto foi filtrado, com enxágue do vaso de reação com EtOAc. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida, e o material bruto foi usado sem outra purificação. DMF (0,1 ml) foi acrescentado ao produto bruto, seguido por ácido carboxílico 34 (Esquema 3) (20,8 mg, 0,083 mmol), e *N,N*-diisopropiletilamina (0,024 ml, 0,138 mmol). A mistura de reação foi agitada em RT durante a noite, e o solvente foi depois evaporado. O produto bruto foi purificado por cromatografia rápida eluindo a partir de sílica-gel com um gradiente de 0-10% de MeOH em DCM para fornecer 14,9 mg do composto de hidroxinitro 52 como um sólido branco. MS: (+) m/z 831,5 (M+1).

Composto de acetil nitro 53. Uma solução de 0,1 M do composto de hidroxinitro 52 (14,9 mg, 0,018 mmol) em piridina (0,23 ml) foi esfriada para 0°C, e anidrido acético (0,054 ml, 0,57 mmol) foi adicionado. A mistura de reação foi permitida aquecer para RT por 2 h, e agitada em RT por 24 h.

A mistura de reação foi esfriada para 0°C, e a mistura 1:1 de 1,4-dioxano e água foi adicionada. A mistura de reação foi permitida aquecer para RT, seguido agitando nesta temperatura por 12 h. O solvente foi evaporado, e o resíduo foi purificado por HPLC preparativa para fornecer 2,2 mg do composto acetil nitro 53 como um sólido branco. MS: (+) m/z 873,2 (M+1).

Composto de Acetil amino 54. Uma mistura do acetil nitro 53 (2,2 mg, 0,0025 mmol) e paládio em carbono (10%, 1 mg) em metanol (0,2 ml) foi agitada sob uma atmosfera de hidrogênio por 4 h. O catalisador foi separado por filtração, e o filtrado foi concentrado. O produto bruto foi purificado por HPLC preparativa para fornecer 0,1 mg do composto de acetil nitro 54 como um sólido branco. MS: (+) m/z 843,2 (M+1). Composto de acetil amino 54 é também referido como composto (III-a) mais acima.

Exemplo 7 - Esquema 7

Esquema 7 (figura 7) mostra ainda outro procedimento para fazer os compostos desta invenção.

Composto 55. Composto 34a (Esquema 3) (70 mg, 0,13 mmol) foi acrescentado a uma solução de 0,2 M de pentafluorofenol (35,9 mg, 0,195 mmol) e DIC (0,0223 ml, 0,143 mmol) em DCM (0,66 ml) a 0°C. A mistura de reação foi aquecida para RT e agitada em RT durante a noite. O solvente foi evaporado. EtOAc (16 ml) foi adicionado e o produto bruto foi filtrado, com enxágue do vaso de reação com EtOAc. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida, e o material bruto foi usado sem outra purificação. DMF (0,5 ml) foi acrescentado ao produto bruto, seguido por p-nitrofenilalanina (82,0 mg, 0,39 mmol) e DIEA (0,114 ml, 0,65 mmol). A mistura de reação foi agitada em RT durante a noite, e o solvente foi depois evaporado. O produto bruto foi purificado por cromatografia rápida eluindo a partir de sílica-gel com um gradiente de 10-20% MeOH em DCM contendo 1% de NH₄OH para fornecer 65,2 mg do composto 55 como um sólido branco. MS: (+) m/z 731,0 (M+1).

Composto 56. Uma mistura do composto 55 (65,2 mg, 0,089 mmol) e paládio em carbono (10%, 9,4 mg) em MeOH (3 ml) foi agitada sob uma atmosfera de hidrogênio por 4 h. O catalisador foi separado por filtra-

ção, e o filtrado foi concentrado para fornecer 33,8 mg do composto 56 como um sólido branco. MS: (+) m/z 701,2 (M+1). Composto 56 é também referido como composto (III-d) mais acima.

Exemplo 8 - Esquema 8

5 Esquema 8 (figura 8a) mostra um método para fazer um composto de acordo com a fórmula (VIII-b), útil como um intermediário para fazer os compostos desta invenção.

 Éster de Boc 58. A uma solução de amino éster 57 (Chem-Impex, 5 g, 19,18 mmols) e dicarbonato de di-*tert*-butila ("(Boc)₂O", Aldrich, 10 4,6 g, 21,10 mmols) em DMF (Acros, anidro, 50 ml), trietilamina ("TEA", Aldrich, 8,36 ml, 60 mmols) foi adicionada. A mistura de reação foi agitada por 0,5 h. Análise de HPLC mostrou que a reação foi completada. A mistura de reação foi diluída com EtOAc (500 ml) e a camada orgânica foi lavada com água (200 ml) e depois salmoura (200 ml), secada em MgSO₄ anidro e con-
15 centrada. O produto bruto foi purificado em 120 g de coluna de CombiFlash com 0-5% de MeOH em DCM para render éster de Boc 58 como sólido branco (5,6 g, 81%). ¹H RMN (DMSO) δ 8,18 (d, 2 H), 7,47 (d, 2 H), 7,38 (d, 1H), 4,23 (m, 1 H), 3,60 (s, 3 H), 3,15 (m, 1 H), 2,95 (m, 1 H), 1,23 (s, 9 H).

 Alqueno 59. A uma solução de éster de Boc 58 (230 mg, 0,68
20 mmol) em DCM (Acros, anidro, 2 ml) esfriada para -78°C em gelo-acetona seca, DIBAL (Aldrich, 1 M em DCM, 1 ml) foi adicionado lentamente. A mistura de reação foi agitada e aquecida para 20°C por 3 h. (1-Etoxicarboniletiliden)-trifenilfosforano (Aldrich, 492 mg, 1,36 mmol) foi adicionado. A mistura de reação foi agitada a 20°C por 1 h. A mistura de reação
25 foi diluída com EtOAc (100 ml) e os orgânicos resultantes foram lavados com água (50 ml) e depois salmoura (50 ml), secados em MgSO₄ anidro e concentrados. O produto bruto foi purificado em 10 g de coluna de COMBIFLA-SH™ com 0-50% de EtOAc em hexano para render alqueno 59 como sólido branco (151 mg, 59%). ¹H RMN (DMSO) δ 8,18 (d, 2 H), 7,47 (d, 2 H), 7,22
30 (d, 1H), 6,51 (d, 1 H), 4,48 (m, 1 H), 4,11 (q, 2 H), 2,80-2,94 (m, 2 H), 1,62 (s, 3 H), 1,23 (s, 9 H), 1,16 (t, 3 H).

 Aril amina 60. Uma solução de alqueno 59 (148 mg, 0,39 mmol)

em EtOH (Acros, anidro, 3 ml) e Pd em carvão (Aldrich, 10%, 50 mg) foi agitada sob H₂ durante a noite. A mistura de reação foi diluída com DCM (10 ml) e filtrada através de CELITE™. O filtrado foi concentrado e o produto bruto foi purificado em 4 g de coluna de COMBIFLASH™ com 0-20% de MeOH em DCM para render aril amina 60 como um sólido branco (102 mg, 75%). ¹H RMN (DMSO) δ 7,18 (d, 2 H), 7,11 (s, 2 H), 6,71 (d, 1 H), 3,98 (q, 2 H), 3,51 (m, 1 H), 2,57 (m, 2 H), 2,41 (m, 1 H), 1,63 (m, 1 H), 1,37 (m, 1 H), 1,29 (s, 9 H), 1,09 (t, 3 H), 0,99 (d, 3 H), MS (ES+) m/z, calculada: m+1, 351,2, encontrada 351,2.

10 *Exemplo 9 - Esquema 9*

Esquema 9 (figura 8b) mostra outro método para fazer um composto de acordo com a fórmula (VIII-b), útil como um intermediário para fazer os compostos desta invenção.

15 Aminoácido 61. Uma mistura de ácido carboxílico 24 (Esquema 3, figura 3) (4,4 mg, 0,0025 mmol) e paládio em carbono (10%, 1 mg) em MeOH (0,5 ml) foi agitada sob uma atmosfera de hidrogênio durante a noite. O catalisador foi separado por filtração, e o filtrado foi concentrado para fornecer 3,5 mg de aminoácido 61 como um sólido branco. MS: (+) m/z 223,3 (M+1).

Exemplo 10 - Esquemas 10, 11, e 12

20 Esquema 10 (figura 8c) mostra outro método para fazer um composto de acordo com a fórmula (VIII-b), útil como um intermediário para fazer os compostos desta invenção.

25 Composto 62. Uma mistura de monoéster 33 (Esquema 3, figura 3) (0,34 g, 0,93 mmol) e paládio em carbono (10%, 50 mg) em metanol (20 ml) foi agitada sob uma atmosfera de hidrogênio durante a noite. O catalisador foi separado por filtração, e o filtrado foi concentrado para fornecer 0,29 g do composto 62 como um sólido branco. MS: (+) m/z 237,3 (sem Boc).

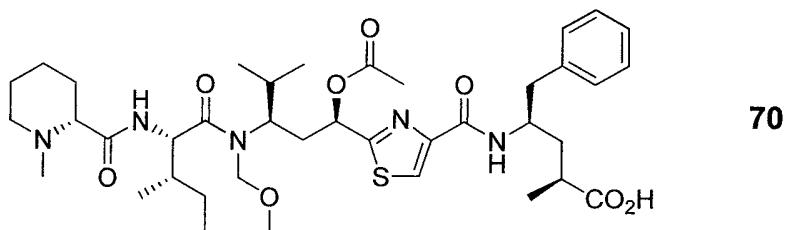
30 Esquema 11 (figura 9) ilustra como os compostos de acordo com a fórmula (VIII-b) podem ser usados para fazer os compostos desta invenção. Éster de Boc 62 é convertido em éster de Bpoc 62a protegendo primeiro o grupo amina aromático com um grupo Fmoc, tratamento com TFA para remover o grupo Boc do grupo amina alifática, tratamento com éster de α,α-

dimetil-p-fenilbenzil fenila de ácido carbônico (8Cl) para instalar um grupo Bpoc lá, e remoção do grupo Fmoc com piperidina. Éster de Bpoc 62a é acoplado com ácido carboxílico 63 com HATU para render um éster intermediário que é depois hidrolisado com LiOH para produzir o composto 64. Hidrogenação para remover o grupo proteção de Cbz do composto 64, seguido por acoplamento mediado por HATU com ácido 6-maleimidoexanoico e remoção do grupo Bpoc com ácido acético rende o aminoácido 65. Outro acoplamento mediado por HATU com o composto 34a (Esquema 3, figura 3) rende o composto 66. Remoção do grupo de proteção de Boc com TFA fornece o composto 67, pronto para conjugação.

Ainda outro modo de utilizar os compostos da fórmula (VIII-b) é mostrado no Esquema 12 (figura 10). A partir do composto 34a, acoplamento mediado por HATU com o composto 68 fornece éster de Boc 69. Remoção do grupo Boc com TFA e hidrólise do éster com LiOH fornece o aminoácido 36 que pode ser elaborado como mostrado no Esquema 4 (figura 4) para preparar uma composição adequada para conjugação.

Exemplo 11 - Composto 70

Composto 70. Tubulisina D (feita por Peltier et al. 2006; 2 mg, 2,4 umols) foi dissolvida em MeOH a 0 °C. A esta solução foi adicionada uma gota de HCl (0,1 M). Após agitar a mistura de reação por durante a noite em RT a solução foi evaporada sob vácuo para dar um resíduo que foi passado através de uma coluna curta (DCM:MeOH 0-10%) para dar o composto 70 (1,3 mg, 1,6 umol, 67%) como um óleo. MS (ES+) m/z, calculada: m+1, 772,42, encontrada, 772.



Aqueles versados na técnica apreciarão que a metodologia geral dos Esquemas pode ser adaptada para fazer os compostos desta invenção diferente daqueles especificamente descritos acima. Por exemplo, o composto 14 (mesmo que o composto 49) pode ser usado para fazer numerosos

outros compostos desta invenção acoplando-o com outras substituições à subunidade de Tup. Como outro exemplo, alterando os reagentes usados com o composto 9 (Esquema 1), os compostos 44 e 46 (Esquema 5), variações nos grupos R^2 e R^3 na fórmula (II) além daquelas especificamente exemplificadas podem ser sintetizadas.

Exemplo 12 - Preparação de um Conjugado

Este exemplo descreve a preparação de um conjugado de construção de citotoxina-ligante (VI-b) e anticorpo monoclonal anti-CD70 2H5 (Terrett et al., US 2009/0028872 A1; Coccia et al., WO 2008/074004 A2). É representativo do procedimento usado na preparação de outros conjugados.

Anticorpo anti-CD70 2H5 a ~5 mg/ml em 20 mM de fosfato de sódio, 50 mM de NaCl, 100 μ M de DTPA, pH 7,5, foi tiolado com um excesso molar de 13 vezes de 2-iminotiolano. A reação de tiolação foi permitida prosseguir por 1 h em RT com mistura contínua.

Seguindo tiolação, o tampão do anticorpo foi trocado por tampão de conjugação (50 mM de HEPES, 5 mM de glicina, 2 mM de DTPA, pH 6,0) por meio de uma coluna de PD10 (Sephadex G-25). A concentração do anticorpo tiolado foi determinada a 280 nm. A concentração de tiol foi medida usando um ensaio de ditiodipiridina.

5 mM de uma matéria-prima de construto (VI-b) em DMSO foram adicionados em um excesso molar de 3 vezes por tiol de anticorpo e misturado para 90 min em RT. Conjugação seguinte, 100 mM N-etilmaleimida em DMSO foi adicionado em um 10 vezes excesso molar de tiol por anticorpo para extinguir qualquer grupo tiol não reagido. Esta reação de extinção foi feita por uma hora em RT com mistura contínua.

O conjugado de anticorpo anti-CD70/fármaco foi filtrado a 0,2 μ m antes de a purificação cromatográfica de permuta de cátions. A coluna de Permuta de Cations de Alto Desempenho SP SEPHAROSE™ (CEX) foi regenerada com 5 volumes de coluna (CVs) de 50 mM de HEPES, 5 mM de glicina, 1M de NaCl, pH 6,0. Seguindo a regeneração, a coluna foi equilibrada com 3 CVs de tampão de equilíbrio (50 mM de HEPES, 5 mM de glicina, pH 6,0). O conjugado foi carregado e a coluna foi lavada uma vez com o tampão

de equilíbrio. O conjugado foi eluído com 50 mM de HEPES, 5 mM de glicina, 200 mM de NaCl, pH 6,0. O eluato foi colhido em frações. A coluna foi depois regenerada com 50 mM de HEPES, 5 mM de glicina, 1M de NaCl, pH 6,0 para remover os agregados de proteína e qualquer (VI-b) não reagido.

5 As frações contendo o conjugado de anticorpo monomérico foram agrupadas. Razões de concentração e substituição do conjugado de anticorpo monomérico foram determinadas medindo a absorbância a 280 e 252 nm.

O fundo geral de eluato purificado teve o tampão trocado em 30 mg/ml de sacarose, 10 mg/ml de glicina, pH 6,0, através de diálise. Dextrana
10 40 foi acrescentada à amostra a 10 mg/ml de pós-diálise. A razão de concentração e substituição (SR) foi determinada medindo a absorbância a 280 e 252 nm. A SR foi 2,2 mols de citotoxina por mol de anticorpo.

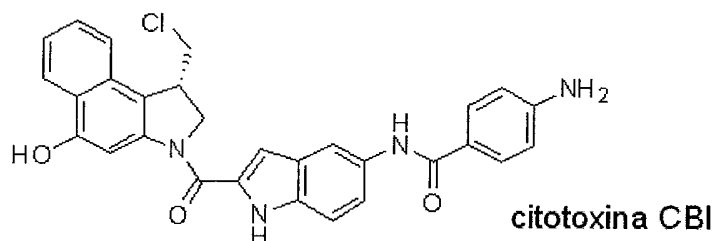
Exemplo 13 - Ensaios de Proliferação

Este exemplo geralmente descreve os procedimentos usados
15 para ensaiar a atividade antiproliferativa dos compostos desta invenção ou seus conjugados. Linhagens de células tumorais humanas foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, EUA, e cultivadas de acordo com a instrução da ATCC. As células foram semeadas a $1,0 \times 10^3$ ou $1,0 \times 10^4$ células/poço em placas de 96 po-
20 ços por 3 h para ensaios de ATP ou ensaios de ^3H timidina, respectivamente. Diluições seriais 1:3 dos compostos livres (não conjugados) ou seus conjugados foram acrescentados aos poços. As placas foram deixadas incubar por 24 a 72 h. As placas de ^3H timidina foram pulsadas com 1,0 μCi de ^3H -timidina por poço pelas últimas 24 horas do período de incubação total, co-
25 lhidas, e prosseguidas lendo com um Contador de Cintilação Top Count (Packard Instruments, Meriden, CT). Os níveis de ATP nas placas de ATP foram medidos usando o kit de Viabilidade Celular Luminescente CELLTITER-GLO® seguindo o manual do fabricante e lido em um luminômetro GLOMAX® (20/20 (ambos de Promega, Madison, WI, EUA). Os valores de
30 EC_{50} - a concentração na qual um agente inibe ou reduz a proliferação celular em 50% - foram determinados usando o software PRISM™, versão 4.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Exemplo 14 - Atividade *In vitro* da Citotoxina

Usando o ensaio de luminescência de ^3H timidina ou de ATP, ou ambas, as atividades dos compostos desta invenção são ensaiadas contra as linhagens celulares de câncer seguintes: HCT-15 (câncer colorretal, resistente a multifármacos (MDR)); Hep3B (câncer de fígado); LNCaP (câncer de prósta-
 5 ta, receptor de androgênio positivo (AR^+)); MDA-MB-231 (câncer de mama, receptor de estrogênio, receptor de progesterona, e Her^2 negativo (negativo triplo)); A2058 (melanoma); U-87 MG (glioblastoma); NCI-H460 (NSCLC); A549 (NSCLC); HPAC (câncer pancreático, primário); PC3 (câncer de prósta-
 10 ta, AR^-); BT474 (câncer de mama, Her^2 altamente positivo (Her^2hi)); SKOV3 (câncer ovariano, Her^2hi); 786-O (câncer renal); UO-31 (câncer renal, MDR); NCI-H740 (SCLC); DMS53 (SCLC); SK-BR3 (câncer de mama, Her^2hi); ZR-75 (câncer de mama, receptor de estrogênio positivo); OVCAR3 (câncer ova-
 riano); HL-60 (APL); OVCAR⁸/Adr (câncer ovariano, MDR); CEM-C1 (ALL);
 15 Nomo-1 (AML); RPMI-8226 (MM); Raji (linfoma); SW-480 (câncer colorretal, metastático); SW-620 (câncer colorretal); e H226 (câncer pulmonar). (Nem todos os compostos foram ensaiados contra todas as linhagens celulares).

Os compostos a seguir foram usados como citotoxinas de referência ou de comparação: doxorrubicina (Dox), Citotoxina CBI (um agente de alquilação de sulco secundário do DNA da classe de ciclopro-
 20 pa[c]benz[e]indol-4-ona), tubulisina D (Tub D, Tabela 1), e o éster de metila de MMAF ("MMAF", um composto relacionado à auristatina; vide Sutherland et al., *J. Biol. Chem.* 2006, 281 (15), 10540-10547).



As figuras 11a e 11b mostram diagramas ilustrativos para ensai-
 25 os de proliferação de ^3H timidina para os compostos desta invenção, contra células de HL-60 e 786-O, respectivamente, com Citotoxina CBI e tubulisina D como compostos comparativos, com um período de incubação de 48 h.

As figuras 12a e 12b mostram diagramas ilustrativos para ensaios de proliferação de luminescência de ATP para um segundo conjunto de compostos desta invenção, contra células HL-60 e 786-O, respectivamente, com um período de incubação de 72 h. As figuras 12c e 12d mostram os diagramas para ensaios de proliferação de ^3H timidina para o mesmo conjunto de compostos, novamente contra células HL-60 e 786-O, respectivamente, com um período de incubação de 72h. Em cada circunstância, doxorubicina foi usada como um composto comparativo.

Tabela 2 provê os dados para os ensaios de proliferação usando o método de ^3H timidina, com um período de incubação de 72 h.

Tabela 2 (Parte 1) - Ensaios de Proliferação de ^3H Timidina							
Composto	Linhagem celular e EC_{50} (nM)						
	HCT-15	Hep3B	LNCaP	MDA-MB-231	A2058	U-87 MG	NCI-H460
Dox	149	44	130	133	—	106	101
CBI	0,040	0,020	0,051	0,019	—	0,14	0,042
Tub D	0,062	0,022	0,36	0,091	—	0,014	0,032
MMAF	1,3	0,11	1,7	0,29	—	0,12	0,37
15	67	1,6	27	1,3	1,6	0,42	2,0
16	284	>100	>100	>100	>100	>100	>100
17	392	>100	>100	84	>100	12	>100
19	1067	52	>100	—	0,13	>100	>100
24	704	32	76	33	0,12	18	>100
25	280	305	930	236	409	271	306
26	31	18	>3000	15	25	5,2	18
26a	>100	36	80	>100	>100	71	>100
28	223	24	64	>100	0,96	>100	>100
29	0,18	0,041	0,54	0,13	0,40	0,064	0,21
29c	2,4	3,0	5,2	4,8	5,6	0,51	15
36	64	39	342	>100	60	15	52
51	101	4,2	41	8,7	0,40	0,75	7,2
54	0,44	0,30	16	1,6	0,64	0,11	0,31
56	2477	>100	>100	>100	>100	>100	>100

Tabela 2 (Parte 2) - Ensaios de Proliferação de ^3H Timidina

[illegible]

Tabela 2 (Parte 3) - Ensaios de Proliferação de ^3H Timidina

[illegible]

Tabela 2 (Parte 4) - Ensaios de Proliferação de ^3H Timidina						
Composto	Linhagem celular e EC ₅₀ (nM)					
	CEM-C1	Nomo-1	RPMI-8226	Raji		
Dox	144	105	68	61		
CBI	0,11	0,016	0,12	0,013		
Tub D	0,018	0,042	0,037	0,013		
MMAF	0,17	0,27	0,24	0,12		
15	0,93	2,3	3,3	0,47		
16	11	1,8	22	28		
17	43	6,8	47	53		
19	22	1,3	23	32		
24	13	1,1	17	11		
25	225	116	396	231		
26	22	0,36	7,7	7,0		
26a	10	2,0	22	20		
28	10	0,20	8,7	13		
29	0,019	0,0075	0,034	0,024		
29c	45	0,43	16	8,5		
36	44	124	48	15		
51	2,0	3,5	2,2	1,5		
54	0,38	0,77	0,36	0,20		
56	>100	>100	>100	>100		

Tabela 3 provê os dados para os ensaios de proliferação de luminescência de ATP, com um período de incubação de 48, 72, ou 96 h, como observado.

Tabela 3 (Parte 1) - Ensaios de Proliferação de Luminescência de ATP (Período de Incubação como Observado)							
Composto	Linhagem celular e EC ₅₀ (nM)						
	HCT-15 (48 h)	Hep3B (48 h)	MDA-MB- 231 (48 h)	A2058 (48 h)	NCI- H460 (48 h)	A549 (48 h)	PC3 (48 h)
Dox	—	443	—	—	—	149	1082
CBI	—	2,6	—	—	—	3,0	12
Tub D	—	0,0012	—	—	—	0,020	0,039
MMAF	—	0,053	—	—	—	0,33	0,43
15	40	6,3	5,6	3,5	6,7	—	>100
16	157	26	28	30	69	—	>100
17	443	>100	65	30	69	—	>100
19	—	18	—	—	—	—	~33
24	—	10	—	—	—	—	13
25	—	246	—	—	—	111	155
26	113	100	120	93	—	—	>3000
26a	—	—	—	—	—	—	—
28	—	17	—	—	—	—	5,8
29	—	1,6	—	—	—	3,9	3,4
29c	200	75	52	32	—	—	66
36	—	86	—	—	—	1,9	78
51	—	3,8	—	—	—	—	16
54	—	1,5	—	—	—	3,0	3,1
56	>3000	>100	>100	>100	>100	—	>100

Tabela 3 (Parte 2) - Ensaios de Proliferação de Luminescência de ATP (Período de Incubação como Observado)							
Composto	Linhagem celular e EC ₅₀ (nM)						
	BT474 (48 h)	SKOV3 (48 h)	786-O (48 h)	UO-31 (48 h)	DMS53 (48 h)	SK-BR3 (48 h)	ZR-75 (48 h)
Dox	—	674	360	908	—	—	—
CBI	—	3,0	1,6	4,2	—	—	—
Tub D	—	0,029	0,022	0,099	—	—	—
MMAF	—	0,19	0,71	2,6	—	—	—
15	3,5	4,2	—	—	32	3,9	13
16	19	18	—	—	50	6,6	11
17	23	58	—	>100	~80	24	24
19	8,8	—	—	>100	—	3,9	20
24	4,6	—	—	13	—	8,9	8,4
25	166	—	—	759	366	>3000	1003
26	19	—	—	240	—	253	208
26a	—	—	—	—	—	—	—
28	12	—	—	5,8	—	7,8	16
29	1,5	—	—	2,7	5,3	3,6	15
29c	492	—	—	26	—	278	136
36	~120	—	—	8,8	~ 300	>300	>300
51	11	—	—	>100	—	13	19
54	4,8	—	—	—	7,9	6,2	9,6
56	>100	>100	—	—	>100	>100	>100
84a	—	—	6,12	—	—	—	—
84b	—	—	4,10	—	—	—	—
109	—	—	1,03	—	—	—	—

Tabela 3 (Parte 3) - Ensaios de Proliferação de Luminescência de ATP (Período de Incubação como Observado)							
Composto	Linhagem celular e EC ₅₀ (nM)						
	OVCAR3 (48 h)	HL-60 (48 h)	CEM- C1 (48 h)	Nomo-1 (48 h)	RPMI- 8226 (48 h)	HCT- 15 (72 h)	LNCaP (72 h)
Dox	632	—	—	—	—	600	592
CBI	4,1	—	—	—	—	3,4	3,3
Tub D	0,085	—	—	—	—	0,014	0,093
MMAF	0,17	—	—	—	—	0,075	0,98
15	>100	—	—	—	—	—	—
16	>100	—	—	—	—	—	—
17	>100	—	—	—	—	—	—
19	25	—	—	—	—	245	—
24	29	—	—	—	—	188	—
25	>3000	224	—	83	—	366	—
26	—	—	61	3,9	45	—	412
26a	—	—	—	—	—	—	—
28	14	—	—	—	—	132	—
29	>100	0,59	—	0,24	—	4,5	—
29c	—	—	20	2,9	70	—	255
36	>300	114	—	34	—	96	>300
36a		0,048	—	—	—	—	—
51	5,5	—	—	—	—	93	—
54	>100	2,5	—	3,1	—	2,6	11
56	>100	—	—	—	—	—	—
84a	8,19	10-28	—	—	—	138	—
84b	4,91	16-27	—	—	—	22,8	—
109		0,019	—	—	—	—	—
112		0,05- .09	—	—	—	—	—

Tabela 3 (Parte 4) - Ensaios de Proliferação de Luminescência de ATP (Período de Incubação como Observado)							
Composto	Linhagem celular e EC ₅₀ (nM)						
	MDA-MB- 231 (72 h)	A2058 (72 h)	U-87 MG (72 h)	NCI-H460 (72 h)	A549 (72 h)	HPAC (72 h)	BT474 (72 h)
Dox	518	101	324	92	—	215	388
CBI	3,1	0,20	3,3	0,64	—	6,0	5,5
Tub D	0,047	0,0064	0,0054	0,0076	—	—	0,021
MMAF	0,33	0,039	0,052	0,13	—	0,067	0,024
15	—	—	8,6	—	—	—	—
16	—	—	>100	—	—	—	—
17	—	—	22	—	—	—	—
19	32	26	>100	43	—	0,33	—
24	13	14	18	23	—	1,1	—
25	202	212	357	177	—	97	—
26	—	—	94	90	—	279	—
26a	—	—	—	—	—	—	—
28	16	20	18	35	—	5,9	—
29	5,1	2,9	4,9	3,0	—	4,9	—
29c	—	—	136	6,0	—	4,6	—
36	9,6	43	37	16	—	2,9	—
51	—	5,5	7,6	14	—	4,5	—
54	5,6	1,4	1,6	1,6	—	0,96	—
56	—	—	>100	—	—	—	—

Tabela 3 (Parte 5) - Ensaios de Proliferação de Luminescência de ATP (Período de Incubação como Observado)							
Composto	Linhagem celular (EC ₅₀ , nM)						
	SKOV3 (72 h)	786-O (72 h)	H740 (72 h)	DMS53 (72 h)	SK-BR3 (72 h)	ZR-75 (72 h)	OVCAR3 (72 h)
Dox	—	—	—	755	441	236	—
CBI	—	—	2,2	3,8	3,1	2,2	—
Tub D	—	—	0,022	0,069	0,025	0,034	—
MMAF	—	—	—	4,5	0,16	0,25	—
(III-q)	—	103,6	—	—	—	—	—
15	—	9,4	—	—	—	—	—
16	—	36	—	—	—	—	—
17	—	73	—	—	—	—	—
19	15	40	—	87	—	—	—
24	13	36	—	>100	—	—	—
25	109	306	—	—	—	—	—
26	38	126	—	193	—	—	49
26a	—	—	—	—	—	—	—
28	11	29	—	58	—	—	—
29	1,3	2,8	—	—	—	—	—
29c	17	34	—	17	—	—	99
36	45	183	—	—	—	—	—
36a	—	0,434	—	—	—	—	—
51	10	19	—	46	—	—	—
54	1,3	2,6	—	—	—	—	—
56	—	>100	—	—	—	—	—
109	—	—	—	—	—	—	0,202
112	—	0,67	—	—	—	—	0,049
133	—	4,17	—	—	—	—	—
134	—	9,89	—	—	—	—	—
135	—	12,94	—	—	—	—	—

Tabela 3 (Parte 6) - Ensaios de Proliferação de Luminescência de ATP (Período de Incubação como Observado)							
Composto	Linhagem celular e EC ₅₀ (nM)						
	HL-60 (72 h)	CEM- C1 (72 h)	Nomo-1 (72 h)	RPMI- 8226 (72 h)	Raji (72 h)	SW480 (96 h)	SW- 620 (96 h)
Dox	147	161	338	345	301	215	145
CBI	0,76	0,55	0,37	4,1	2,1	0,92	0,33
Tub D	0,0096	0,0030	0,013	0,0051	0,0048	0,020	0,0058
MMAF	0,12	0,11	0,14	0,068	0,084	0,17	0,057
(III-q)	14,27	—	—	—	—	—	—
15	2,7	2,6	2,7	2,6	2,5	5,6	3,7
16	2,8	2,5	3,1	15	3,0	48	29
17	7,4	26	3,9	15	27	92	65
19	7,7	11	5,2	9,6	9,2	52	14
24	6,4	8,7	4,0	8,4	7,9	42	10
25	—	176	—	235	209	261	193
26	27	—	—	—	46	67	48
26a	—	—	—	—	—	—	—
28	2,9	11	0,82	10	15	36	21
29	—	0,85	—	1,0	2,1	2,7	1,5
29c	8,6	—	—	—	36	41	8,4
36	—	40	—	62	24	81	45
51	—	4,8	7,4	5,2	5,0	13	6,4
54	—	1,2	—	1,6	1,2	1,6	1,1
56	>100	>100	>100	5,7	24	>100	28

Adicionalmente os valores de EC₅₀ seguintes foram medidos para os compostos seguintes contra a linhagem celular de H226, usando o ensaio de ATP e período de incubação de 72 h: composto 36a (0,307 nM);
5 composto 109 (1,609 nM); e composto 112 (0,67-1,16 nM). Os valores de EC₅₀ seguintes foram medidos para os compostos seguintes contra a linha-

gem celular de OVACAR⁸/Adr, usando o ensaio de ATP e período de incubação de 48 h: composto 36a (17,05 nM); composto 84a (>300 nM); composto 84b (47,2 nM); composto 109 (24,9 nM); e composto 112 (12 nM).

Exemplo 15 - Atividade In vitro Conjugado

5 A figura 13 mostra a atividade dos conjugados desta invenção em ensaios de proliferação de ³H timidina, medidos contra células cancerosas renais 786-O que são positivos de CD70. O período de incubação foi 72 h. Os valores de EC₅₀ extraídos das curvas da figura 13 são dados na Tabela 4, ao longo dos dados de outros experimentos. Linhagem celular LNCap é
 10 uma linhagem celular de câncer de próstata que expressa o antígeno de membrana específico para próstata (PSMA); H226 é uma linhagem celular de câncer pulmonar que expressa mesotelina. Os anticorpos usados para conjugação forma 2A10, um anticorpo de anti-PSMA (Huang et al., US 2009/0297438); 2H5, um anticorpo de anti-CD70 (Terrett et al., US
 15 2009/0028872); 1F4, um anticorpo de anti-CD70 (Coccia et al., WO 2008/074004); e 6A4, um anticorpo de antimesotelina (Terrett et al., WO 2009/045957). Como controles, Compound J of Sufi et al., WO 2008/083312 ("Cpd. J", um agente de ligação/alquilação do sulco secundário do DNA) foi usado como um par de conjugação e toxina de difteria ("DTX") foi usada co-
 20 mo um controle não específico não conjugado.

Tabela 4 - Atividade *In vitro* de Conjugados

Conjugado ou Composto de Teste		Linhagem celular	EC ₅₀ (nM)
Designação	Descrição		
2A10-Comp. J	Conjugado de 2A10 e Comp. J	786-O	116,7
DTX	Controle não específico não conjugado	786-O	104,4
2H5-Comp. J	Conjugado de 2H5 e Comp. J	786-O	0,08592
1F4-Comp. J	Conjugado de 1F4 e Comp. J	786-O	0,09951
2H5-(VI-a)	Conjugado de 2H5 e Composto (VI-a)	786-O	0,1151 a 0,0749
2A10-(VI-a)	Conjugado de 2A10 e Composto (VI-a)	786-O	>> 100
2H5-(VI-b)	Conjugado de 2H5 e Composto (VI-b)	786-O	0,06554
2A10-(VI-b)	Conjugado de 2A10 e Composto (VI-b)	786-O	>> 100

Tabela 4 - Atividade <i>In vitro</i> de Conjugados			
Conjugado ou Composto de Teste		Linhagem celular	EC ₅₀ (nM)
Designação	Descrição		
2H5-(VI-n)	Conjugado de 2H5 e Composto (VI-n)	786-O	0,4384
2H5-(VI-m)	Conjugado de 2H5 e Composto (VI-m)	786-O	0,5899
2H5-(VI-q)	Conjugado de 2H5 e Composto (VI-q)	786-O	inativo
2H5-(VI-p)	Conjugado de 2H5 e Composto (VI-p)	786-O	inativo
2H5-(VI-t)	Conjugado de 2H5 e Composto (VI-t)	786-O	0,310
6A4-(VI-t)	Conjugado de 6A4 e Composto (VI-t)	H226	0,360
2A10-(VI-t)	Conjugado de 2A10 e Composto (VI-t)	LNCap	0,570

Os dados mostram que um anticorpo CD70-específico é necessário para um conjugado poder eficazmente liberar uma citotoxina para as células 786-O CD70-positivas: conjugados de anticorpo 2A10, que é específico para um antígeno diferente (PSMA), têm atividade baixa ou nenhuma.

- 5 Inversamente, todos os conjugados de um anticorpo anti-CD70 eram ativos. Os conjugados dos Compostos (VI-a) e (VI-b) foram comparáveis em atividade aos conjugados dos Compostos J, um par de conjugação bem conhecido e um de cujos conjugados está sofrendo experimentações clínicas. É notável que os conjugados dos Compostos (VI-a) e (VI-b) exibem toxicidade
- 10 não específica muito pequena: comparar as atividades de 2A10-(VI-a) e 2A10-(VI-b) contra as de 2A10-CBI.

Exemplo 16 - Atividade In vivo do Conjugado

- Células 786-O CD70-positivas de câncer renal humano (Cat. CRL-1932 originalmente adquiridas da ATCC) foram cultivadas *in vitro* pelas
- 15 instruções de ATCC. As células foram colhidas, e 2,5 milhões de células por 200 µl de DPBS/MATRIGEL™ (1:1) foram implantadas subcutaneamente na região do flanco de camundongos CB17.SCID. Tumores foram medidos semanalmente em 3 dimensões com um Calibrador Digital Eletrônico de Fowler (Modelo 62379-531; Fred V. Fowler Co., Newton, MA, EUA) e os dados
- 20 foram eletronicamente registrados usando software StudyDirector de Studylog Inc. (São Francisco Sul, CA, EUA). Os animais foram verificados diariamente para alterações posturais, de treino, e respiratórias, como também

letargia. Os animais foram também semanalmente pesados e eutanizados se perda de peso tiver sido $\geq 20\%$. Quando os tumores alcançavam um tamanho médio de 194 mm^3 , os grupos de 6 camundongos cada foram tratados com uma dose intraperitoneal simples (IP) de um conjugado de teste (por exemplo, 2H5-(VI-b)) e um controle de isótipo (2A10-(VI-b)) a $0,3 \mu\text{mol/kg}$ do peso do corpo. Volumes do tumor (LWH/2) e peso dos camundongos foram registrados ao longo do curso de cada estudo que foi permitido prosseguir para cerca de 2 meses pós doseamento inicial. Uma planilha eletrônica macro do Excel foi usada para calcular a média, SD, e valores medianos dos tamanhos de tumor. Os dados foram representados em gráfico usando software Prism versão 4.0.

Os resultados de estudo de xenoenxerto estão mostrados na figura 14, onde marcações de legenda têm o mesmo significado que no Exemplo anterior e na figura 13. Os dados demonstram a atividade *in vivo* dos conjugados dos compostos desta invenção contra células 786-O CD70⁺. Ambos os conjugados dos compostos (VI-a) e (VI-b) com anticorpo anti-CD70 2H5 causaram uma redução no tamanho médio do tumor para menos que porção no curso do estudo, enquanto, quando o controle de veículo ou um conjugado com o anticorpo anti-PSMA 2A10 foi administrado, o volume médio do tumor mais que dobrou.

Exemplo 17 - Esquema 13

Esquema 13 (figura 15) mostra um método para fazer 4-nitrotubufenilalaninas enantiomericamente puras (4-NO₂Tup) 82a e 82b que são úteis para fazer os compostos desta invenção.

Composto 80. Dicarbonato de di-*terc*-butila (90,5 mg, 0,42 mmol) foi acrescentado a uma mistura do composto 34 do Esquema 3 (0,1 g, 0,35 mmol) em 0,7 M de NaOH aq. (1 ml). A mistura de reação foi agitada em RT por 3 h, e depois acidificada para pH 3 com 0,5 N de HCl. Após a solução aquosa ter sido extraída com EtOAc três vezes, as camadas orgânicas combinadas foram secadas, filtradas, e concentradas. O produto bruto foi purificado por cromatografia rápida eluindo a partir de sílica-gel com um gradiente de 0-20% de metanol em DCM para fornecer 0,117 g do composto 80 como

um sólido branco. MS: (+) m/z 253,1 (M+1 sem Boc).

Ésteres de (-)-mentol 81a e 81b. DCC (87,8 mg, 0,43 mmol) foi acrescentado a uma solução do composto 80, (-)-mentol (66,6 mg, 0,43 mmol), e 4-(dimetilamino) piridina ("DMAP", 10,4 mg, 0,085 mmol) em DCM (1,5 ml) em RT. Após a mistura de reação ter sido agitada em RT por 3 h, o precipitado foi separado por filtração. O filtrado foi depois concentrado. O produto bruto foi purificado por cromatografia rápida eluindo a partir de sílica-gel com um gradiente de 0-20% de EtOAc em hexanos para fornecer 55,7 mg de éster 81a como um sólido branco, e 55,7 mg de éster 81b como um sólido branco. MS para éster 81a: (+) m/z 391,2 (M+1 sem Boc); MS para éster 81b: (+) m/z 391,2 (M+1 sem Boc).

4-NO₂Tup 82a e 82b. Uma solução de éster 81a em 6N de HCl (40 mg, 0,082 mmol) foi aquecida para 130°C por 1,5 h. A mistura de reação foi concentrada para fornecer 23,5 mg de 4-NO₂Tup 82a como um sólido branco. ¹H RMN (D₂O, 400 MHz): δ 8,04 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 7,33 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 3,50 (m, 1H), 3,03 (dd, 1H, J = 6,8, 14,4 Hz), 2,89 (dd, 1H, J = 7,6 Hz, 14,4 Hz), 2,45-2,39 (m, 1H), 1,92-1,84 (m, 1H), 1,62-1,55 (m, 1H), e 0,98 (d, 3H, J = 7,2 Hz); MS: (+) m/z 253,1 (M+1). 4-NO₂Tup 82b foi obtido pelo mesmo procedimento na mesma escala como um sólido branco (23,5 mg). ¹H RMN (D₂O, 400 MHz): δ 8,03 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 7,33 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 3,50 (m, 1H), 2,93 (dd, 2H, J = 2,0, 7,6 Hz), 2,54-2,48 (m, 1H), 1,86-1,78 (m, 1H), 1,60-1,53 (m, 1H), e 0,98 (d, 3H, J = 6,8 Hz); MS: (+) m/z 253,1 (M+1).

Exemplo 18 - Esquema 14

Esquema 14 (figura 16) descreve a conversão de 4-NO₂Tup 82a e 82b nos compostos desta invenção.

Nitro ácido 83a. Composto 34a do Esquema 3 (10 mg, 0,019 mmol) foi acrescentado a uma solução de 0,2 M de pentafluorofenol (5,1 mg, 0,028 mmol) e N,N'-di-isopropil carbodi-imida ("DIC", 0,0032 ml, 0,021 mmol) em DCM (0,2 ml) 0°C. A mistura de reação foi aquecida para RT e agitada em tal temperatura durante a noite. O solvente foi evaporado. EtOAc (1,8 ml) foi adicionado, e o produto bruto foi filtrado, com enxágue do vaso de reação com EtOAc. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida, e o pentafluoro-

fenil bruto foi usado sem outra purificação. DMF (0,2 ml) foi acrescentado ao éster bruto, seguido por 4-NO₂Tup 82a (10,7 mg, 0,037 mmol), e DIEA (0,013 ml, 0,074 mmol). A mistura de reação foi agitada em RT durante a noite, e o solvente foi depois evaporado. O produto bruto foi purificado por

5 cromatografia rápida eluindo a partir de sílica-gel com um gradiente de 0-20% de MeOH contendo 1% de NH₄OH em DCM para fornecer 12,9 mg de nitro ácido 83a como um sólido branco. MS: (+) m/z 773,4 (M+1).

Rota alternativa para nitro ácido 83a: DIEA foi acrescentada a uma solução do composto 34a (10 mg, 0,019 mmol), e HATU (7,8 mg, 0,020

10 mmol) em DMF (0,3 ml), mantendo o pH a 8 9. A mistura de reação foi agitada em RT por 5 min. Depois DIEA e nitro amina 82a (5,4 mg, 0,019 mmol) em DMF (1 ml) foi adicionado, mantendo o pH a 8 9. Após a mistura de reação ter sido agitada em RT por 15 min, o produto bruto foi purificado por HPLC preparativa para fornecer 13,4 mg de nitro ácido 83a como um sólido

15 branco.

Nitro ácido 83b foi preparado pela mesma rota alternativa, na mesma escala e foi obtido como um sólido branco (13,4 mg). MS: (+) m/z 773,4 (M+1).

Amina 84a. Uma mistura de nitro ácido 83a (7,5 mg, 0,0097

20 mmol) e paládio em carbono (10%, 1,1 mg) em MeOH (0,37 ml) foi agitada sob uma atmosfera de hidrogênio por 4 h. O catalisador foi separado por filtração, e o filtrado foi concentrado. O produto bruto foi purificado por HPLC preparativa para fornecer 6,2 mg de amina 84a como um sólido branco. ¹H RMN (CD₃OD, 400 MHz): δ 8,06 (s, 1H), 7,36 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 7,17 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 5,70 (dd, 1H, J = 2,8, 10,8 Hz), 4,71 (d, 1H, J = 7,2 Hz), 4,44-4,35 (m, 2H), 3,74 (d, 1H, J = 9,6 Hz), 3,49-3,45 (m, 1H), 3,36-3,35 (m, 1H), 3,30-3,25 (m, 1H), 3,13 (s, 3H), 3,14-3,04 (m, 1H), 2,93 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 2,74 (s, 3H), 2,48-2,28 (m, 3H), 2,15 (s, 3H), 2,19-2,03 (m, 2H), 1,95-1,86 (m, 4H), 1,80-1,71 (m, 2H), 1,71-1,57 (m, 3H), 1,24-1,13 (m, 1H), 1,16

25 (d, 3H, J = 7,2 Hz), 1,04 (d, 3H, J = 6,4 Hz), 1,02 (d, 3H, J = 6,8 Hz), 0,94 (t, 3H, J = 7,2 Hz), e 0,84 (d, 3H, J = 6,8 Hz); MS: (+) m/z 743,4 (M+1).

30

Nitro ácido 83b foi hidrogenado com amina 84b usando o mes-

mo procedimento, em uma escala de 8 mg. Amina 84b foi obtida como um sólido branco (6,7 mg). ^1H RMN (CD_3OD , 400 MHz): δ 8,06 (s, 1H), 7,35 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz), 7,16 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz), 5,70 (dd, 1H, $J = 2,8, 11,2$ Hz), 4,72 (d, 1H, $J = 7,2$ Hz), 4,49-4,32 (m, 2H), 3,75 (d, 1H, $J = 10,0$ Hz), 3,49-3,45 (m, 1H), 3,36-3,35 (m, 1H), 3,33-3,31 (m, 1H), 3,12 (s, 3H), 3,12-3,04 (m, 1H), 2,91 (d, 2H, $J = 7,6$ Hz), 2,74 (s, 3H), 2,57-2,52 (m, 1H), 2,45-2,37 (m, 1H), 2,33-2,28 (m, 1H), 2,15 (s, 3H), 2,19-2,13 (m, 1H), 2,03-1,88 (m, 5H), 1,81-1,57 (m, 5H), 1,24-1,13 (m, 1H), 1,17 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz), 1,04 (d, 3H, $J = 6,4$ Hz), 1,02 (d, 3H, $J = 7,2$ Hz), 0,94 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz), e 0,84 (d, 3H, $J = 6,4$ Hz); MS: (+) m/z 743,4 ($M+1$).

Compostos 84a e 84b são também descritos neste relatório descritivo pelas fórmulas (III-r) e (III-s), respectivamente.

Exemplo 19 - Esquema 15

Esquema 15 (figura 17) descreve a síntese dos compostos prontos para conjugação desta invenção tendo um ligante de aminoácido simples (citrulina).

Composto 85. Uma mistura do composto 62 do Esquema 10 (0,22 g, 0,654 mmol), citrulina Fmoc-protégida (0,39 g, 0,981 mmol), e cloridrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodi-imida ("EDCI", 0,188 g, 0,981 mmol) em DMF (4 ml) foi agitada em RT durante a noite. A reação foi extinta por adição de NH_4Cl saturado, e a solução aquosa foi extraída com EtOAc. As camadas orgânicas combinadas foram secadas, filtradas, e concentradas. O produto bruto foi purificado através de cromatografia rápida, eluindo a partir de sílica-gel com um gradiente de 0-100% de MeOH em DCM para fornecer 0,42 g do composto 85 como um sólido branco. MS: (+) m/z 716,4 ($M+1$).

Composto 86. Piperidina foi acrescentada a uma solução do composto 85 (0,248 g, 0,346 mmol) em DMF, mantendo o pH em 9-10. A mistura de reação foi agitada em RT por 20 min, e depois concentrada para fornecer 0,17 g do composto 86, MS: (+) m/z 494,4 ($M+1$).

Composto 87. LiOH (26,6 mg, 1,11 mmol) em água (3 ml) foi acrescentado a uma solução do composto 86 (0,17 g, 0,346 mmol) em THF (2

ml). Após a mistura de reação ter sido agitada em RT por 2 h, o solvente foi parcialmente removido. A solução aquosa foi acidificada para pH 2-3 com HCl e concentrada. O resíduo foi redissolvido em DMF (2 ml), e 6-maleimidoexanoato de *N*-succinimidila (0,16 g, 0,519 mmol) e DIEA (0,091 ml, 0,519 mmol) foram adicionados. Após a mistura de reação ter sido agitada em RT por 10 min, o produto bruto foi purificado por HPLC preparativa para fornecer 0,198 g de composto 87 como um sólido branco. MS: (+) m/z 673,4 ($M+1$).

Composto 88. TFA (0,5 ml) foi acrescentado a uma solução do composto 87 (12,5 mg, 0,019 mmol) em DCM (0,5 ml) em temperatura ambiente. A mistura de reação foi agitada em RT por 5 min, e depois concentrada para fornecer 12,8 mg do composto 88 como um sólido branco. MS: (+) m/z 573,4 ($M+1$).

Composto 89. DIEA foi acrescentada a uma solução do composto 34a do Esquema 3 (5 mg, 0,0093 mmol) e HATU (3,9 mg, 0,010 mmol) em DMF (0,3 ml), mantendo o pH em 8-9. A mistura de reação foi agitada em RT por 5 min. Depois DIEA e o composto 88 (12,8 mg, 0,019 mmol) em DMF (1 ml) foram adicionados, mantendo o pH em 8-9. Após a mistura de reação ter sido agitada em RT por 15 min, o produto bruto foi purificado por HPLC preparativa para fornecer 8,6 mg do composto 89 como um sólido branco. MS: (+) m/z 1093,8 ($M+1$). Composto 89 é também descrito neste relatório descritivo pela fórmula (VI-m).

Composto 90, DIEA foi acrescentado a uma solução do composto 49 do Esquema 5 (5 mg, 0,0098 mmol) e HATU (4,1 mg, 0,011 mmol) em DMF (0,3 ml), mantendo o pH em 8-9. A mistura de reação foi agitada em RT por 5 min. Depois DIEA e o composto 88 (13,5 mg, 0,0196 mmol) em DMF (1 ml) foram adicionados, mantendo o pH 8-9. Após a mistura de reação ter sido agitada em RT por 15 min, o produto bruto foi purificado por HPLC preparativa para fornecer 8,9 mg do composto 90 como um sólido branco. MS: (+) m/z 1065,6 ($M+1$). Composto 90 é também descrito neste relatório descritivo pela fórmula (VI-p).

Exemplo 20 - Esquema 16

Esquema 16 (figura 18) descreve a preparação de compostos prontos para conjugação desta invenção, tendo um ligante de dipeptídeo (citrulina-valina).

Composto 91. DIEA foi acrescentada a uma solução de valina
5 Fmoc-protégida (62,3 mg, 0,184 mmol) e HATU (63,6 mg, 0,167 mmol) em DMF (0,5 ml), mantendo o pH em 8-9. A mistura de reação foi agitada em RT por 5 min. Depois DIEA e o composto 86 do Esquema 15 (82,5 mg, 0,167 mmol) em DMF (1 ml) foram adicionados, mantendo o pH em 8-9. Após a mistura de reação ter sido agitada em RT por 15 min, a reação foi extinta por
10 adição de 0,05% de TFA aq.. A solução aquosa foi extraída com EtOAc e as camadas orgânicas combinadas foram secadas, filtradas e concentradas. O produto bruto foi purificado por cromatografia rápida eluindo a partir de sílica-gel com um gradiente de 0-20% de MeOH em DCM para fornecer 0,13 g do composto 91 como um sólido branco. MS: (+) m/z 815,5 (M+1).

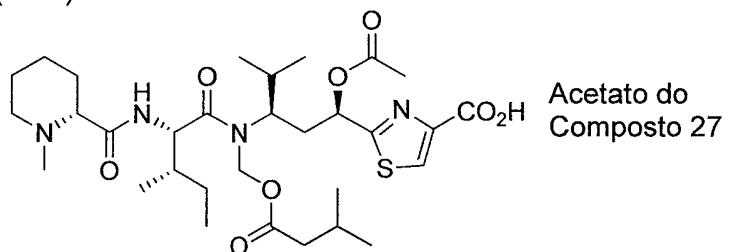
15 Composto 92. Piperidina foi acrescentada a uma solução do composto 91 (0,144 g, 0,177 mmol) em DMF, mantendo o pH em 9-10. A mistura de reação foi agitada em RT por 20 min e depois concentrada. O resíduo foi dissolvido em THF (2,5 ml) e LiOH (16,3 mg, 0,681 mmol) em água (1,3 ml) foi adicionado. Após a mistura de reação ter sido agitada em
20 RT por 2 h, o solvente foi parcialmente removido. A solução aquosa foi acidificada para pH 2-3 com HCl e depois concentrada. O resíduo foi redissolvido em DMF (2,5 ml), e depois 6-maleimido-hexanoato de *N*-succinimida (0,105 g, 0,341 mmol) e DIEA (0,060 ml, 0,341 mmol) foi adicionado. Após a mistura de reação ter sido agitada em RT por 10 min, o produto bruto foi purificado
25 por HPLC preparativa para fornecer 0,116 g do composto 92 como um sólido branco. MS: (+) m/z 772,5 (M+1).

Composto 93. TFA (0,6 ml) foi acrescentado a uma solução do composto 92 (14,4 mg, 0,019 mmol) em DCM (1 ml) em RT. A mistura de reação foi agitada em RT por 5 min e depois concentrada para fornecer 14,7
30 mg do composto 93 como um sólido branco. ^1H RMN (CD_3OD , 400 MHz): δ 7,58 (dd, 2H, $J = 1,6, 8,4$ Hz), 7,21 (dd, 2H, $J = 2,8, 8,8$ Hz), 6,79 (s, 2H), 4,48 (m, 1H), 4,13 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz), 3,57-3,46 (m, 3H), 3,33-3,32 (m, 1H),

3,22-3,09 (m, 2H), 2,91-2,80 (m, 1H), 2,27 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz), 2,09-1,85 (m, 3H), 1,81-1,54 (m, 8H), 1,35-1,29 (m, 3H), 1,19 (d, 1,5 H, $J = 6,8$ Hz), 1,18 (d, 1,5 H, $J = 7,2$ Hz), 0,98 (d, 3H, $J = 2,4$ Hz), 0,96 (d, 3H, $J = 2,8$ Hz); MS: (+) m/z 672,4 ($M+1$).

5 Composto 94. DIEA foi acrescentado a uma solução do composto 34a do Esquema 3 (11 mg, 0,0204 mmol) e HATU (7,8 mg, 0,0204 mmol) em DMF (0,3 ml), mantendo o pH em 8-9. A mistura de reação foi agitada em RT por 5 min. Depois DIEA e o composto 93 (14,7 mg, 0,019 mmol) em DMF (1 ml) foram adicionados, mantendo o pH em 8-9. Após a mistura de
10 reação ter sido agitada em RT por 15 min, o produto bruto foi purificado por HPLC preparativa para fornecer 18,9 mg do composto 94 como um sólido branco. MS: (+) m/z 1192,6 ($M+1$). Composto 94 é também descrito neste relatório descritivo pela fórmula (VI-n).

Acetato do composto 27. Anidrido acético (0,248 ml) foi acrescentado a uma solução do composto 27 do Esquema 2 (Peltier et al., 2006;,
15 0,13 g, 0,218 mmol) em piridina (2,6 ml) a 0°C. A mistura de reação foi depois agitada em RT durante a noite. Após a mistura de reação ter sido esfriada para 0°C, uma solução de água e 1,4-dioxano (12 ml, v/v 1:1) foi adicionada. A mistura de reação foi agitada em RT durante a noite e depois concentrada. O produto bruto foi purificado por cromatografia rápida eluindo a
20 partir de sílica-gel com um gradiente de 10-20% de MeOH em DCM para fornecer 0,114 g do acetato do composto 27 como um sólido branco. MS: (+) m/z 639,4 ($M+1$).



Composto 95. DIEA foi acrescentada a uma solução do acetato
25 do composto 27 (3,8 mg, 0,0059 mmol), e HATU (2,5 mg, 0,0065 mmol) em DMF (0,3 ml), mantendo o pH em 8-9. A mistura de reação foi agitada em RT por 5 min. Depois DIEA e o composto 93 (5,6 mg, 0,0071 mmol) em DMF (1 ml) foram adicionados, mantendo o pH em 8-9. Após a mistura de reação

ter sido agitada em RT por 15 min, o produto bruto foi purificado por HPLC preparativa para fornecer 6,5 mg do composto 95 como um sólido branco. MS: (+) m/z 1292,7 ($M+1$). Composto 95 é também descrito neste relatório descritivo pela fórmula (VI-o).

5 *Exemplo 21 - Esquema 17*

Este exemplo descreve a síntese do ácido 108, um intermediário útil para a preparação dos compostos desta invenção, com referência ao Esquema 17 (figura 19).

10 Éster de metila 100, HCl em dioxano (8,3 ml, 4M, 33,2 mmols) foi acrescentado a uma solução do composto 9 do Esquema 1 (8 g, 22,1 mmols) em MeOH (10 ml). A mistura de reação foi agitada em RT. Após 20 min, a solução foi evaporada sob vácuo para dar para éster de metila 100 como um óleo (6,5 g) que foi usado para a próxima etapa de reação sem outra purificação.

15 Propil amina 101. Propanal (700 μ l, 7,36 mmols) e $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (2,8 g, 13,2 mmols) foram acrescentados a uma solução de éster de metila 100 (1,96 g, 6,6 mmols) em DCM (10 ml). A mistura de reação foi agitada a 5°C. Após 1 h, a mistura foi absorvida em EtOAc e lavada duas vezes com 7% de solução de K_2CO_3 e depois salmoura. A camada de EtOAc foi secada
20 em Na_2SO_4 anidro e depois evaporada sob vácuo para render um resíduo que foi passado através de uma coluna (MeOH:DCM. 0-10%) para dar propil amina 101 (1,12 g, 60%) como um óleo. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8,17 (s, 1H), 5,43 (t, $J = 4,6$ Hz, 1H), 3,93 (s, 3H), 3,07 2,87 (m, 2H), 2,82 2,70 (m, 1H), 2,54 (s, 1H), 2,45 2,26 (m, 2H), 2,16 2,02 (m, 1H), 1,73 (m, 2H), 1,05
25 0,94 (m, 9H). MS m/z $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ ($M+1$)⁺ calculada 301,2, encontrada 301.

30 Composto 102. Hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-ilóxi)tripirrolidinofosfônio ("PyBop", 1,28 g, 2,47 mmols), HOBt (0,33 g, 2,47 mmols), isoleucina Boc-protégida (430 μ l, 2,47 mmols) foram acrescentados a uma solução de propil amina 101 (570 mg, 1,9 mmol) em DCM (5 ml). A
mistura de reação foi agitada em RT. Após 20 min, EtOAc (200mL) foi adicionado e a camada orgânica foi lavada com 10% de ácido cítrico (duas vezes), NaHCO_3 sat., e salmoura. A camada de EtOAc foi secada em Na_2SO_4

anidro e depois evaporada sob vácuo para render um resíduo que foi passado através de uma coluna para dar o composto 102 (0,55 g) como um óleo. MS m/z $C_{25}H_{44}N_3O_6S$ (M+1)⁺ calculada 514,3, encontrada 514,3.

Éster de azido 104. Cloreto de ácido 103 (2 mmols., Lundquist et al. 2001; vide também acima na preparação do éster de azido 43 do Esquema 5) em DCM (3 ml) foi acrescentado a uma solução do composto 102 (0,55 g, 1,1 mmol) em DCM (10 ml) e DIEA (871 µl, 5 mmols). A mistura de reação foi agitada a 5°C. Após agitar por 10 min, a mistura foi evaporada sob vácuo para dar um resíduo que foi passado através de uma coluna para dar para éster de azido 104 (300 mg) como um óleo. MS m/z $C_{31}H_{53}N_6O_7S$ (M+1)⁺ calculada 653,4, encontrada 653.

Composto 106. Uma solução de éster de pentafluorofenila 105 (2,1 mmols, Peltier et al. 2006) em 1 ml de EtOAc foi acrescentada a uma solução de éster de azido 104 (300 mg, 0,46 mmol) e Pd/C (10%, 50 mg) em EtOAc (5 mL). O frasco de reação foi enchido com H₂ usando um balão e agitado durante a noite em RT. Após agitar durante a noite, a mistura de reação foi filtrada, concentrada sob vácuo e depois passada por uma coluna (MeOH:DCM, 0-10%) para dar o composto 106 (170 mg) como um óleo. MS m/z $C_{38}H_{66}N_5O_8S$ (M+1)⁺ calculada 752,5, encontrada 752,5.

Composto 107. NaOH (120 µL, 1,2 mmol, 10M) foi acrescentado a uma solução do composto 106 (170 mg, 0,22 mmol) em MeOH (10mL) em RT. Após agitar por 2 h, a mistura de reação foi acidificada para pH 2 com HCl concentrado. A mistura de reação foi depois evaporada sob vácuo e passada por uma coluna de fase reversa (ACN:H₂O, 0-100% com 0,1% de TFA). Após liofilização, o composto 107 (63 mg) foi obtido como um pó branco. Perfil de HPLC indicou ser uma mistura de rotâmeros. MS m/z $C_{26}H_{45}N_4O_5S$ (M+1)⁺ calculada 525,3, encontrada 525.

Ácido 108. Anidrido acético (60 µL, 0,64 mmol) foi acrescentado a uma solução do composto 107 (63 mg, 0,12 mmol) em piridina (1 ml) a 5°C. A temperatura foi elevada gradualmente para RT. Após deixar a reação prosseguir durante a noite, água (100 µL) foi adicionada. Após outras 5 h, os orgânicos voláteis foram removidos sob vácuo para dar um resíduo que foi passado

através de uma coluna de fase reversa (ACN:H₂O, 0-100% com 0,1% de TFA) para dar ácido 108 (42 mg) como um óleo. ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 8,35 (s, 1H), 5,71 (dd, *J* = 11,4, 1,4 Hz, 1H), 4,63 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 3,97 (t, *J* = 16,4 Hz, 1H), 3,65 3,42 (m, 2H), 3,21 3,05 (m, 2H), 2,87 (s, 3H), 2,34 2,14 (m, 4H), 2,13 (s, 3H), 2,03 1,46 (m, 10H), 1,29 1,06 (m, 1H), 1,04 0,85 (m, 15H). MS *m/z* C₂₈H₄₇N₄O₅S (M+1)⁺ calculada 567,3, encontrada 567.

Exemplo 22 - Esquemas 18 e 19

Esquema 18 (figuras 20a e 20b) mostra a síntese dos compostos desta invenção usando o ácido 108, preparado no exemplo precedente.

Procedimento geral para acoplamento mediado por HATU. HATU (excesso de 1,2x) e DIEA (excesso de 4x) foi adicionado em uma solução do ácido 108 em DMF a 5°C. Após agitar a mistura de reação por 10 min, a amina correspondente foi adicionada. A mistura de reação foi agitada por mais 10 min antes de diluir a mesma com DMSO e 0,1% de solução de TFA. A mistura resultante foi passada através de uma coluna de fase reversa (ACN:H₂O, 0-100% com 0,1% de TFA). As frações colhidas foram analisadas e as frações desejadas foram liofilizadas para dar o produto correspondente.

Composto 109. Obtido do acoplamento de ácido 108 e éster de fenilalaninametila. MS *m/z* C₃₈H₅₈N₅O₇S (M+1)⁺ calculada 728,4, encontrada 728,4. Composto 109 é também descrito mais acima como estrutura (III-x).

Composto 111. Obtido do acoplamento de ácido 108 e composto 110 (preparação descrita abaixo). MS *m/z* C₄₂H₆₃N₆O₉S (M+1)⁺ calculada 827,4, encontrada 827,5.

Composto 112. A uma solução do composto 111 (5 mg, 6 μmols) em 2 ml de MeOH foi adicionado Pd/C (10%, 10 mg). O frasco de reação foi enchido com H₂ usando um balão e agitado por 2 h em RT. A mistura de reação foi depois filtrada, concentrada sob vácuo e passada por uma coluna de fase reversa (ACN:H₂O, 0-100% com 0,1% de TFA) para dar o composto 112 (2,1 mg) como uma potência branca. MS *m/z* C₄₂H₆₇N₆O₇S (M+1)⁺ calculada 799,5, encontrada 799,5. Composto 112 é também descrito mais acima como estrutura (III-y).

Composto 114. Obtido do acoplamento de ácido 108 e composto

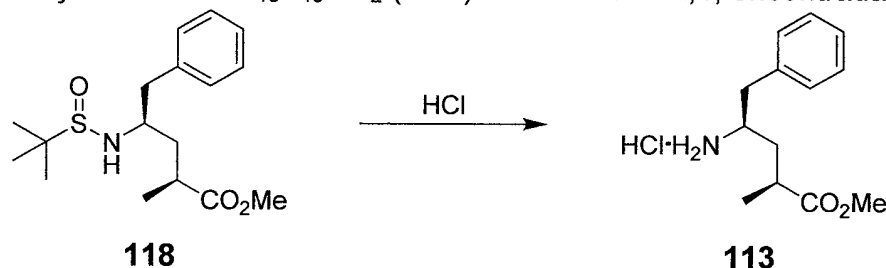
113 (preparação descrita abaixo). MS m/z $C_{41}H_{64}N_5O_7S$ $(M+1)^+$ calculada 770,4, encontrada 770.

Composto 116. Obtido do acoplamento de ácido 108 e composto 115 (preparação descrita abaixo). MS m/z $C_{61}H_{95}N_{11}O_{13}S$ $(M+2)^+$ calculada 610,9, encontrada 611. Composto 116 é também descrito mais acima como estrutura (VI-t).

Composto 117. Obtido do acoplamento de ácido 108 e éster de metila de lisina alfa-N-acetila. MS m/z $C_{37}H_{63}N_6O_8S$ $(M+1)^+$ calculada 751,4, encontrada 751,5.

Composto 110. Alqueno 59 do Esquema 8 (como éster de etila em vez de éster de metila, 1 g, 2,6 mmols) foi dissolvido em DCM (10 ml) contendo 5% de TFA e a mistura de reação foi agitada a 5°C. Após 40 min, a mistura foi secada sob vácuo para dar o composto 110 (0,3 g, 100%) como um semissólido. ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ 8,22 8,17 (m, 2H), 7,50 (dd, J = 9,0, 2,2 Hz, 2H), 6,58 (d, J = 10,0 Hz, 1H), 4,45 (td, J = 9,8, 5,3 Hz, 1H), 4,19 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 3,35 3,28 (m, 1H), 3,06 (dd, J = 13,2, 9,6 Hz, 1H), 1,55 (d, J = 0,9 Hz, 3H), 1,27 (t, J = 7,1 Hz, 3H).

Composto 113. HCl (2,5 ml, 10 mmols, 4 M) foi acrescentado a uma solução do composto 118 (2 g, 5,5 mmols, Peltier et al. 2006) em MeOH (10 ml) e a mistura de reação foi agitada em RT. Após 20 min, a mistura de reação foi secada sob vácuo para dar o composto 113 (2 g, 100%) como um semissólido. Produto bruto foi usado para a próxima reação da etapa sem outra purificação. MS m/z $C_{13}H_{19}NO_2$ $(M+1)^+$ calculada 222,1, encontrada 222.



Esquema 19 (figura 21) mostra a síntese do composto 115, usado na síntese do composto 116, acima.

Composto 120, DIEA (697 μ l, 12 mmols) e éster de t-butila de valina 543 (627 mg, 3 mmols) foram adicionados em uma solução a 10 ml de

DCM de ácido 6-maleimidoexanoico ("6-MHA", 622 mg, 3 mmols) e HATU (1,14 g, 3 mmols). Após 20 min, EtOAc (200 ml) foi adicionado. A fase orgânica foi lavada com 10% de ácido cítrico, solução de NaHCO_3 sat., e salmoura, depois secada com Na_2SO_4 anidro e o solvente foi removido por evaporação. O resíduo resultante foi passado através de uma coluna (Hexano:EtOAc, 0-80%) para dar o composto 120 (900 mg) como um óleo. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 6,66 (s, 2H), 5,94 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 4,44 (dd, $J = 8,7, 4,5$ Hz, 1H), 3,49 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H), 2,31 2,06 (m, 3H), 1,73 1,54 (m, 4H), 1,45 (s, 9H), 1,37 1,25 (m, 2H). MS m/z $\text{C}_{19}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_5$ ($M+1$) $^+$ calculada 367,2, encontrada 367.

Composto 121. Composto 120 (1g, 2,73 mmols) foi dissolvido em 20 ml de DCM com 3 ml de TFA em RT. Após 1 h, a mistura foi secada por evaporação para dar o composto 121 (1g) como um óleo que foi usado sem outra purificação. MS m/z $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_5$ ($M+1$) $^+$ calculada 311,2, encontrada 311.

Composto 123. DIEA (920 μl , 5,28 mmols) e o composto 122 (500 mg, 1,32 mmol; vide Esquema 22 e Exemplo 25 mais abaixo) foram adicionados a uma solução de 10 ml de citrulina Fmoc-protégida (524 mg, 1,32 mmol) e HATU (601 mg, 1,58 mmol). Após 20 min, 200 ml de EtOAc foram adicionados. A fase orgânica foi lavada com 10% de ácido cítrico, solução de NaHCO_3 sat., e salmoura. Foi depois secada com Na_2SO_4 anidro e o EtOAc foi evaporado. O resíduo resultante foi passado através de uma coluna (MeOH:DCM; 0-10%) para dar um sólido. Este sólido foi dissolvido em DMF (5 ml) com 5% de piperidina. Após 1h, a solução foi evaporada e o resíduo foi passado através de uma coluna de fase reversa (ACN: H_2O ; 0-100% com 0,1% de TFA) para dar o composto 123 (212 mg). MS m/z $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{N}_5\text{O}_6$ ($M+1$) $^+$ calculada 536,3, encontrada 536,4.

Composto 124, DIEA (404 μl , 2,4 mmols) e composto 560 (321 mg, 0,6 mmol) foram adicionados em uma solução a 5 ml de DMF do composto 550 (180 mg, 0,58 mmol) e HATU (220 mg, 0,58 mmol). Após 20 min, 200 ml de EtOAc foram adicionados. A fase orgânica foi lavada com 10% de ácido cítrico, solução de NaHCO_3 sat., e salmoura. Foi depois secada com

Na₂SO₄ anidro e o EtOAc e evaporada. O resíduo resultante foi passado através de uma coluna (MeOH:DCM; 0-20%) para dar o composto 124 (240 mg) como um óleo. MS *m/z* C₄₂H₆₆N₇O₁₀ (M+1)⁺ calculada 828,5, encontrada 828,5.

5 Composto 115, Composto 124 (240 mg, 0,29 mmol) foi dissolvido em uns 5 ml solução de TFA e DCM (1:1). Após as 3 h a mistura foi secada por evaporação e o composto 115 resultante foi usado sem outra purificação. De RMN, uma mistura de dois (5:1) foram obtidos isômeros. O isômero principal é relatado: ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 8,27 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,58 (dd, *J* = 8,5, 1,9 Hz, 2H), 7,21 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 6,79 (s, 2H), 4,48 (dd, *J* = 13,3, 8,1 Hz, 1H), 4,14 (dd, *J* = 7,5, 4,9 Hz, 1H), 3,62 3,38 (m, 3H), 3,25 2,97 (m, 3H), 2,96 2,78 (m, 2H), 2,70 2,40 (m, 1H), 2,32 2,21 (m, 2H), 2,11 1,92 (m, 2H), 1,94 1,83 (m, 1H), 1,82 1,70 (m, 1H), 1,70 1,49 (m, 7H), 1,19 (d, *J* = 7,0 Hz, 3H), 0,97 (dd, *J* = 6,8, 2,8 Hz, 6H). MS *m/z* C₃₃H₅₀N₇O₈ (M+1)⁺ calculada 672,4, encontrada 672.

Exemplo 23 - Esquema 20

Esquema 20 (figura 22) mostra a síntese do composto 131, um intermediário usado para fazer os compostos desta invenção.

20 Composto 125. Composto 9 do Esquema 1 (3 g, 8,29 mmols) foi dissolvido em THF (20mL) e dimetilsulfato (1,2 ml, 12,4 mmols). A esta solução foi adicionado NaH (552 mg, 13,8 mmols) a 5°C em porções por 1,5 h. A mistura de reação foi depois vertida em solução de NH₄Cl sat. EtOAc foi acrescentada à mistura de reação e a fase orgânica foi lavada com salmoura e secada e evaporada sob vácuo para dar um resíduo. O resíduo resultante 25 foi passado através de uma coluna (Hexano:EtOAc, 0-100%) para dar o composto 125 (1,2 g) como um óleo. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,12 (s, 1H), 4,95 (dd, *J* = 10,0, 3,3 Hz, 1H), 3,89 (s, 3H), 3,50 (s, 3H), 3,45 3,40 (m, 2H), 1,93 1,79 (m, 2H), 1,74 1,65 (m, 1H), 1,20 (s, 9H), 0,84 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H), 0,80 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H). MS *m/z* C₁₆H₂₉N₂O₄S₂ (M+1)⁺ calculada 377,1, 30 encontrada 377,2.

Composto 126. HCl em dioxano (1 ml, 4 mmols) foi acrescentado a uma solução do composto 125 (0,7 g, 1,86 mmol) em MeOH (10 ml). A

mistura de reação foi agitada em RT. Após 20 min, os voláteis foram evaporados sob vácuo para dar o composto 126 (0,8 g) como um óleo que foi usado para a próxima etapa de reação sem outra purificação. MS m/z $C_{12}H_{21}N_2O_3S$ (M+1)⁺ calculada 273,1, encontrada 273.

5 Composto 127. A uma solução do composto 126 (616 mg, 2 mmols) em DCM (10 ml) e DIEA (1,8 ml, 10 mmols) a 5°C, foi adicionado o composto 103 (Esquema 17, 6 mmols) em 5 ml de DCM. A mistura de reação foi agitada por 3 h em RT. Após 3 h, a mistura de reação foi vertida em solução de NaHCO₃ sat. e EtOAc. A fase orgânica foi lavada com salmoura,
10 secada, e evaporada. O resíduo resultante foi passado através de uma coluna (Hexano:EtOAc, 0-50%) para dar o composto 127 (594 mg, 72%) como um semióleo. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,18 (s, 1H), 6,47 (d, J = 9,9 Hz, 1H), 4,60 4,52 (m, 1H), 4,23 4,13 (m, 1H), 3,96 3,95 (m, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,44 (s, 3H), 2,21 2,08 (m, 1H), 1,94 1,84 (m, 2H), 1,84 1,71 (m, 1H), 1,52
15 1,38 (m, 1H), 1,35 1,20 (m, 1H), 1,07 (d, J = 6,9 Hz, 3H), 0,95 0,85 (m, 9H). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 176,00, 168,63, 161,92, 146,90, 128,24, 78,81, 70,34, 58,97, 52,72, 50,76, 40,48, 38,62, 32,24, 24,32, 19,13, 18,13, 16,25, 11,82. MS m/z $C_{18}H_{30}N_5O_4S$ (M+1)⁺ calculada 412,2, encontrada 412,3.

Composto 129. Hexametildissilazida de potássio ("KHMDs",
20 0,19 mmol, 0,375 ml de solução de tolueno) foi adicionada em uma solução de THF (0,5 ml) do composto 127 (50 mg, 0,12 mmol) a 43°C. Após 20 min, o composto 128 (0,36 mmol, 137 uL, Abe et al. 1997) foi adicionado. Após 2 h, 100 µl de MeOH foi adicionado e a mistura de reação foi vertida em solução de NH₄Cl sat. EtOAc foi depois adicionado. Após separação das cama-
25 das, a fase orgânica foi lavada com salmoura, secada com Na₂SO₄ anidro e o solvente removido por evaporação. O resíduo resultante foi passado através de uma coluna (Hexano:EtOAc, 0-50%) para dar o composto 129 (51 mg) como um semissólido. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,16 (s, 1H), 5,70 (s, 1H), 5,43 (d, J = 12,4 Hz, 1H), 5,32 (d, J = 12,3 Hz, 1H), 4,39 (d, J = 10,6
30 Hz, 1H), 3,92 (d, J = 11,7 Hz, 3H), 3,53 3,44 (m, 1H), 3,37 (d, J = 10,5 Hz, 3H), 2,41 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 2,37 2,11 (m, 4H), 1,92 - 1,68 (m, 2H), 1,37 1,21 (m, 1H), 1,12 - 0,85 (m, 18H). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 175,24,

172,79, 171,21, 161,90, 147,09, 128,25, 78,44, 68,69, 63,35, 58,71, 52,48, 43,23, 38,63, 34,91, 31,01, 25,73, 25,25, 22,58, 22,56, 22,48, 20,45, 19,62, 16,14, 10,65. MS m/z $C_{24}H_{40}N_5O_6S$ (M+1)⁺ calculada 526,3, encontrada 424,3 (rompimento do N,O acetal).

5 Composto 130. Compostos 129 (200 mg, 0,38 mmol) e 105 (Pel-
tier et al. 2006; 4 mmols) foram misturados em 5 ml de EtOAc com Pd/C
(150 mg, 10%) em RT. O frasco de reação foi evacuado e reenchido com H₂
usando um balão. Após agitar durante a noite em RT, a mistura foi filtrada e
o solvente evaporado. Após cromatografia de coluna (SiO₂, MeOH:DCM, 0-
10 10%), o composto 130 (97 mg) foi obtido como um sólido. MS m/z
 $C_{31}H_{53}N_4O_7S$ (M+1)⁺ calculada 625,4, encontrada 625,5.

Composto 131. Hidróxido de tribuilestanho (181 mg, 0,59 mmol)
foi acrescentado a uma solução do composto 130 (97 mg, 0,16 mmol) em 10
ml de 1,2-dicloroetano. Após 22 h a 67°C, a mistura foi evaporada e passada
15 por uma coluna de fase reversa (ACN: (20 mM de NH₄(HCO₃) tampão, pH
7), 5-100%) para dar o composto 131 (34 mg) como um sólido. MS m/z
 $C_{30}H_{51}N_4O_7S$ (M+1)⁺ calculada 611,3, encontrada 510 (rompimento no N,O
acetal).

Exemplo 24 - Esquema 21

20 Esquema 21 (figura 23) mostra a síntese dos compostos desta
invenção usando o composto 131 como um precursor.

Composto 132. Composto 60 (Esquema 8, 200 mg, 0,57 mmol)
foi dissolvido em 2 ml de DCM com 20% de TFA em RT. Após 1h, os voláteis
foram evaporados para dar o composto 132 (200 mg) como um sólido ama-
25 relado que foi usado sem outra purificação.

Composto 133. DIEA (43 µl, 0,2 mmol) foi acrescentado a uma
solução de DMF (1 ml) do composto 131 (30 mg, 0,049 mmol) e HATU (22,3
mg, 0,059 mmol) a 43°C. Após 10 min, o composto 132 (15 mg, 0,06 mmol)
foi adicionado. A mistura foi depois elevada para RT. A mistura final foi pas-
30 sada através de uma coluna de fase reversa (ACN:(20 mM de NH₄(HCO₃)
tampão, pH 7), 5-100%) para dar o composto 133 (20 mg) como um pó
branco. MS m/z $C_{44}H_{73}N_6O_8S$ (M+1)⁺ calculada 843,5, encontrada 843,5.

Composto 133 é também descrito mais acima como estrutura (III-u).

Composto 134. Composto 133 (2 mg, 2,4 μ mol) foi dissolvido em 0,5 ml de metanol e o pH da solução foi ajustado em 1 com 1M de HCl. Após agitar durante a noite, os voláteis foram evaporados e o resíduo foi
 5 passado através de uma coluna de fase reversa (ACN:(20 mM $\text{NH}_4(\text{HCO}_3)$ tampão, pH 7), 5-100%) para dar o composto 134 (0,7 mg) como um pó branco. MS m/z $\text{C}_{40}\text{H}_{65}\text{N}_6\text{O}_7\text{S}$ ($M+1$)⁺ calculada 773,5, encontrada 773,5. Composto 134 é também descrito mais acima como a estrutura (III-v).

Composto 135. Composto 133 (2 mg, 2,4 μ mol) foi dissolvido
 10 em 0,5 ml de n-propanol e o pH da solução foi ajustado em 1 com 1M de HCl. Após agitar durante a noite, a mistura foi evaporada e o resíduo foi passado através de uma coluna de fase reversa (ACN:(20 mM $\text{NH}_4(\text{HCO}_3)$ tampão, pH 7), 5-100%) para dar o composto 135 (0,4 mg) como um pó branco. MS m/z $\text{C}_{42}\text{H}_{69}\text{N}_6\text{O}_7\text{S}$ ($M+1$)⁺ calculada 802,5, encontrada 801,5. Composto
 15 135 é também descrito mais acima como estrutura (III-w).

Exemplo 25 - Esquema 22

Esquema 22 (figura 24) mostra um método para fazer o composto 142, útil como um intermediário para fazer os compostos desta invenção.

Composto 136. NaOH (800 μ L, 10M, 8 mmol) foi acrescentado
 20 a uma solução de 20 ml de THF e MeOH (1:1) com o composto 59 do Esquema 8 (1,65 g, 4,37 mmol). Após agitar durante a noite, o pH da solução foi ajustado para 1 com 3N de HCl a 5°C. Após evaporação dos solventes, 200 ml de EtOAc foram adicionados. Após separação, a fase orgânica foi lavada com salmoura, secada com Na_2SO_4 anidro e o EtOAc evaporada. O
 25 resíduo foi passado através de uma coluna (MeOH:DCM; 0-10%) para dar o composto 136 (1,2 g) como um óleo. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8,21 8,12 (m, 2H), 7,41 7,32 (m, 2H), 6,62 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 4,82 4,57 (m, 2H), 3,15 3,02 (m, 1H), 2,90 (dd, J = 13,3, 7,2 Hz, 1H), 1,71 (d, J = 1,2 Hz, 3H), 1,41 (s, 9H).

30 Composto 137. DMF-di-*t*-Butilacetal (1 ml, 4 mmol) foi acrescentado a uma solução de 6 ml de tolueno do composto 136 (128 mg, 0,36 mmol) a 133°C. Após 10 min, a mistura de reação foi esfriada e o solvente

evaporado. O resíduo foi passado através de uma coluna (Hexano:EtOAc; 0-30%) para dar o composto 137 (133 mg) como um óleo. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8,19 8,10 (m, 2H), 7,39 7,30 (m, 2H), 6,39 (dd, $J = 9,1, 1,5$ Hz, 1H), 4,63 (d, $J = 39,1$ Hz, 2H), 3,03 (dd, $J = 13,2, 6,2$ Hz, 1H), 2,90 (dd, $J = 13,3, 7,0$ Hz, 1H), 1,67 (d, $J = 1,5$ Hz, 3H), 1,47 (s, 9H), 1,39 (s, 9H).

Composto 122. Composto 137 (540 mg, 1,22 mmol), Pd/C (136 mg, 10%) e 3N de HCl (0,3 ml) foram acrescentados a uma mistura de DCM e MeOH (30 mL:5 ml). O frasco foi enchido com H_2 usando um balão. Após agitar durante a noite em RT, a mistura foi filtrada e concentrada para dar o composto 122 (550 mg) como um semissólido. MS m/z $\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_4$ ($M+1$) $^+$ calculada 379,3, encontrada 223 (perda de Boc).

Composto 138. Composto 136 (100 mg, 0,28 mmol) e Pd/C (20 mg, 10%) foram misturados em uma mistura de 5 ml de MeOH e DCM (1:1 v:v) sob um balão de hidrogênio em RT. Após agitar durante a noite, a mistura foi filtrada e os solventes evaporados sob vácuo para dar o composto 138 (95 mg) como óleo que foi usado para a próxima etapa de reação sem outra purificação. MS m/z $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_4$ ($M+1$) $^+$ calculada 323,2, encontrada 223.

Composto 139. Composto 138 (10 mg, 0,03 mmol), cloreto de terc-butildimetilsilila ("TBDMSCl", 4,5 mg, 0,03 mmol) e imidazol (4 mg, 0,06 mmol) foram misturados em 1 ml de DMF em RT. Citrulina Fmoc-protégida (24 mg, 0,06 mmol), oxalato de N,N' -disuccinimidila ("DSO", 8 mg, 0,06 mmol) e DIEA (20 μL , 0,12 mmol) foram misturados em mais 1 ml de DMF em RT. Após 1 h, as duas soluções foram misturadas e a mistura foi mantida em RT. Após agitar durante a noite, EtOAc foi adicionado e a solução foi lavada com 10% de ácido cítrico aq. e salmoura. A fase orgânica foi depois secada com Na_2SO_4 anidro e evaporada sob vácuo. O resíduo resultante foi passado através de uma coluna (MeOH:DCM, 0-10%) para dar o composto 139 (7 mg) como um óleo. MS m/z $\text{C}_{38}\text{H}_{48}\text{N}_5\text{O}_8$ ($M+1$) $^+$ calculada 702, encontrada 702.

Composto 141. Composto 139 (10 mg, 0,014 mmol) foi dissolvido em 1 ml de DMF com 5% de piperidina. Após 20 min, o solvente foi evaporado sob vácuo e o resíduo foi misturado com N -succinimidil-4-

maleimidobutirato 140 (5,6 mg, 0,028 mmol) e DIEA (5 μ L, 0,028 mmol) em 1 ml de DMF. Após 10 min, os solventes foram removidos da mistura de reação sob vácuo e passados em uma coluna (MeOH:DCM, 0-20%) para dar o composto 141 (6 mg) como um sólido. MS m/z $C_{31}H_{45}N_6O_9$ (M+1)⁺ calculada 645, encontrada 645.

Composto 142. Composto 141 (6 mg, 0,01 mmol) foi dissolvido em 1 ml de DCM com 10% de TFA. Após 10 min, o solvente foi evaporado sob vácuo para dar o composto 142 (6 mg), usado para a próxima etapa de reação sem outra purificação.

Exemplo 26 - Esquema 23

Esquema 23 (figura 25) mostra a elaboração do composto 142, feita pelo Esquema 22, em um composto desta invenção.

Composto 145, HCl (30 μ mmols) em 150 μ l de MeOH foi acrescentado a uma solução do composto 27 do Esquema 2 (5 mg, 8,3 μ mmols) em 0,7 ml de MeOH a 5°C. A temperatura foi permitida subir gradualmente para RT. Após agitar durante a noite, a mistura foi evaporada e dissolvida em 0,7 de piridina. A esta solução, foi adicionado Ac₂O (28 μ l, 296 μ mmols) a 5°C. A temperatura foi permitida subir gradualmente para RT e após agitar durante a noite 50 μ l H₂O foi adicionado. Após 3 h, os voláteis foram evaporados e o resíduo resultante foi evaporado para dar o composto 145 (4,7 mg) como um semissólido. MS m/z $C_{27}H_{45}N_4O_7S$ (M+1)⁺ calculada 569,3, encontrada 569.

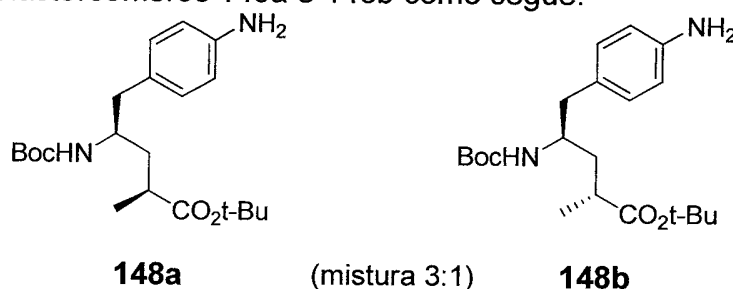
Composto 146. DIEA (6 μ l, 34 μ mols) e o composto 142 (5,5 mg, 8,3 μ mols) foram acrescentados a 0,5 ml de solução de DMF do composto 530 (4,7 mg, 8,3 μ mmols) e HATU (3,2 mg, 8,4 μ mols) a 5°C. Após 20 min, a mistura resultante foi passada através de uma coluna de fase reversa (ACN:(20 mM NH₄(HCO₃) tampão, pH 7), 5-100%) para dar o composto 146 (4,5 mg) como um sólido branco. MS m/z $C_{53}H_{79}N_{10}O_{13}S$ (M+1)⁺ calculada 1095,5, encontrada 1095,5. Composto 146 é também descrito mais acima como estrutura (VI-r).

Composto 147. DIEA (1,4 μ L, 8 μ mols) e uma gota de solução de NH₄Cl saturado foram adicionados em uma solução de 0,5 ml de DMF do

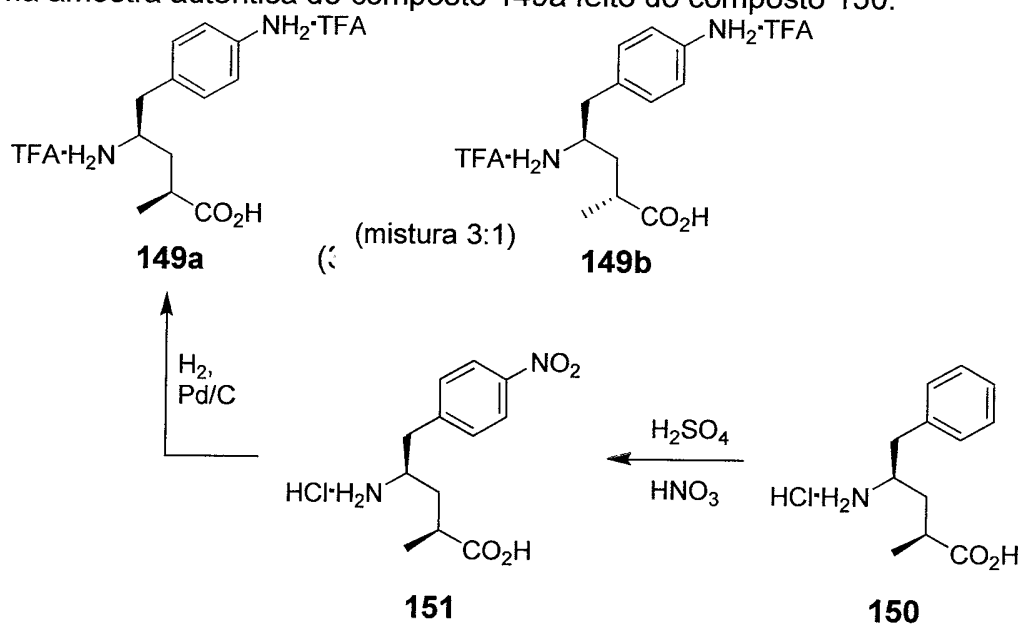
composto 146 (2 mg, 1,8 μmol) e HATU (1,6 mg, 4,6 μmol s). Após 10 min, a mistura foi passada através de uma coluna de fase reversa (ACN:(20 mM $\text{NH}_4(\text{HCO}_3)$ tampão, pH 7), 5-100%) para dar o composto 147 (0,5 mg) como um semissólido. MS m/z $\text{C}_{53}\text{H}_{80}\text{N}_{11}\text{O}_{12}\text{S}$ ($M+1$)⁺ calculada 1094,6, encontrada 1094. O composto 147 é também descrito mais acima como estrutura (VI-s).

Exemplo 27 - Diastereômeros de 4-aminotubufenilalanina

Composto 122 (Exemplo 25 acima) foi determinado ser uma mistura 3:1 de diastereômeros 148a e 148b como segue.



Composto 122 (10 mg, 0,026 mmol) foi dissolvido em uma mistura de 2mL de TFA e DCM (1:1) em RT. Após 3 h, os solventes foram evaporados e o resíduo foi passado através de uma coluna de fase reversa (ACN:H₂O; 0-100% com 0,1% de TFA) para dar uma mistura de 3:1 dos compostos 149a e 149b. O isômero principal nesta mistura foi estrutura designada 149a comparando o espectro de RMN da mistura com o RMN de uma amostra autêntica do composto 149a feito do composto 150.



HNO_3 concentrado (10 μl) foi acrescentado a uma solução de

200 μ l de H_2SO_4 concentrada de tubufenilalanina 150 (Peltier et al. 2006; 6 mg, 0,025 mmol) a 5°C. Após 20 min, a solução foi vertida em 2 ml de solução esfriada a 7% de K_2CO_3 . 10 ml de EtOAc foram depois adicionados. Após separação, a fase orgânica foi secada por evaporação e o resíduo foi

5 passado através de uma coluna de fase reversa (ACN: H_2O ; 0-100% com 0,1% de TFA) para dar o composto de nitro 151 (5 mg). ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ 8,27 8,21 (m, 2H), 7,56 7,49 (m, 2H), 3,69 3,58 (m, 1H), 3,07 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 2,73 2,61 (m, 1H), 2,04 1,91 (m, 1H), 1,64 (ddd, J = 14,7, 8,2, 4,9 Hz, 1H), 1,20 (d, J = 7,1 Hz, 3H). MS m/z $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4$ ($M+1$) $^+$ calculada

10 253,1, encontrada 253.

Composto de nitro 151 depois convertido no composto 149a como segue: composto de nitro 151 (5 mg, 0,01 mmol) foi misturado com Pd/C (10 mg, 10%) em 5 ml de MeOH em RT. O frasco foi enchido com H_2 usando um balão. Após 1 h, a mistura foi filtrada e evaporada para dar o composto

15 149a (4,5 mg). ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ 7,08 7,03 (m, 2H), 6,83 6,79 (m, 2H), 3,51 3,41 (m, 1H), 2,84 2,78 (m, 2H), 2,68 2,58 (m, 1H), 2,04 1,92 (m, 1H), 1,60 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 1,18 (d, J = 7,0 Hz, 3H). MS m/z $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2$ ($M+1$) $^+$ calculada 223,1, encontrada 223. Este espectro de RMN foi a base para atribuir as estruturas do componente principal das misturas

20 148a/148b e 149a/149b.

Uma amostra do composto 122 foi passada através de uma coluna de fase reversa (ACN: H_2O ; 0-100% com 0,1% de TFA) e as frações foram colhidas com o isômero secundário e liofilizadas. O produto resultante foi depois tratado com TFA e DCM para remover o grupo Boc. Após 1 h, os

25 solventes foram evaporados para dar um produto que foi atribuído ser o composto 149b após comparar seu espectro de RMN com o do composto 149a. Composto 149b: ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD) 7,36 7,23 (m, 2H), 7,22 7,09 (m, 2H), 3,59 3,40 (m, 1H), 3,04 2,84 (m, 2H), 2,61 2,45 (m, 1H) 2,07 1,87 (m, 1H), 1,73 1,58 (m, 1H), 1,21 1,09 (d, J = 7,2 Hz, 3H).

30 Os compostos 148a, 148b, 149a, e 149b podem ser usados para preparar os compostos desta invenção tendo uma subunidade de 4-aminotubufenilalanina onde a estereoquímica do grupo alfa-metila é definida,

utilizando as abordagens sintéticas exemplificadas acima, mutatis mutandis. Compostos 82a e 82b (Exemplo 17) podem também ser postos para uso similar.

5 A descrição detalhada anterior da invenção inclui passagens que estão principal ou exclusivamente relacionadas às partes ou aspectos particulares da invenção. É para ser entendido que isso é para clareza e conveniência, que uma característica particular pode ser relevante em mais que apenas a passagem sendo descrita, e que a descrição aqui inclui todas as combinações apropriadas de informação encontradas nas diferentes passagens. Similarmente, embora as várias figuras e descrições aqui se refiram às
10 modalidades específicas da invenção, é para ser entendido que onde uma característica específica é descrita no contexto de uma figura ou modalidade particular, tal característica pode também ser usada, na proporção apropriada, no contexto de outra figura ou modalidade, em combinação com outra
15 característica, ou na invenção em geral.

Ainda, embora a presente invenção tenha sido particularmente descrita em termos de certas modalidades preferidas, a invenção não é limitada a tais modalidades preferidas. Bastante, o escopo da invenção é definido pelas reivindicações em anexo.

20 REFERÊNCIAS

Citações totais para as seguintes referências citadas de maneira abreviada pelo primeiro autor (ou inventor) e data mais recente neste relatório descritivo são fornecidas abaixo. Cada uma destas referências é incorporada aqui por referência para todos os propósitos.

- 25 Abe et al., WO 97/21712 (1997).
Boyd et al., US 2008/0279868 A1 (2008).
Boyd et al., US 7,691,962 B2 (2010).
Balasubramanian et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 2996-2999.
Balasubramanian et al., *J. Med. Chem.* **2009**, 52 (2), 238-240.
30 Davis et al., US 2008/0176958 A1 (2008).
Domling, DE 10 2004 030 227 A1 (2006).
Domling et al., US 2005/0239713 A1 (2005) [2005a].

- Domling et al., US 2005/0249740 A1 (2005) [2005b].
Domling et al., *Mol. Diversity* **2005**, 9, 141-147 [2005c].
Domling et al., *Ang. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 7235-7239.
Ellman et al., WO 2009/012958 A2 (2009).
- 5 Hamel et al., *Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents* **2002**, 2, 19-53.
Hoefle et al., DE 100 08 089 A1 (2001).
Hoefle et al., *Pure Appl. Chem.* **2003**, 75 (2-3), 167-178.
Hoefle et al., US 2006/0128754 A1 (2006) [2006a].
Hoefle et al., US 2006/0217360 A1 (2006) [2006b].
- 10 Kaur et al., *Biochem. J.* **2006**, 396, 235-242.
Khalil et al., *ChemBioChem* **2006**, 7, 678-683.
Leamon et al., *Cancer Res.* **2008**, 68 (23), 9839-9844.
Leamon et al., WO 2009/002993 A1 (2009).
Leung et al., US 2002/0169125 A1 (2002).
- 15 Low et al., WO 2009/026177 A1 (2009).
Lundquist et al., *Org. Lett.* **2001**, 3, 781-783.
Neri et al., *ChemMedChem* **2006**, 1, 175-180.
Patterson et al., *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 9534-9541.
Patterson et al., *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 4362-4369.
- 20 Peltier et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 16018-16019.
Reddy et al., *Mol. Pharmaceutics* **2009**, 6 (5), 1518-1525.
Reichenbach et al. WO 98/13375 A1 (1998).
Richter, WO 2008/138561 A1 (2008).
Sani et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 3526-3529.
- 25 Sasse et al., *J. Antibiotics* **2000**, 53 (9), 879-885.
Sasse et al., *Nature Chem. Biol.* **2007**, 3 (2), 87-89.
Schluep et al., *Clin. Cancer Res.* **2009**, 15 (1), 181-189.
Shankar et al., *SYNLETT* **2009**, 8, 1341-1345.
Shibue et al., *Tetrahedron Lett.* **2009** 50, 3845-3848.
- 30 Steinmetz et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 4888-4892.
Ullrich et al., *Angew. Chemie Int. Ed.* **2009**, 48, 4422-4425.
Vlahov et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18 (16), 4558-4561 [2008a].

Vlahov et al., US 2008/0248052 A1 (2008) [2008b].

Vlahov et al., WO 2009/055562 A1 (2009).

Vlahov et al., US 2010/0048490 A1 (2010).

Wang et al., *Chem. Biol. Drug. Des* **2007**, 70, 75-86.

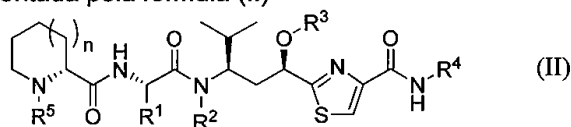
5 Wipf et al., *Org. Lett.* **2004**, 6 (22), 4057-4060.

Wipf et al., *Org. Lett.* **2007**, 9 (8), 1605-1607.

Wipf et al., US 2010/0047841 A1 (2010).

REIVINDICAÇÕES

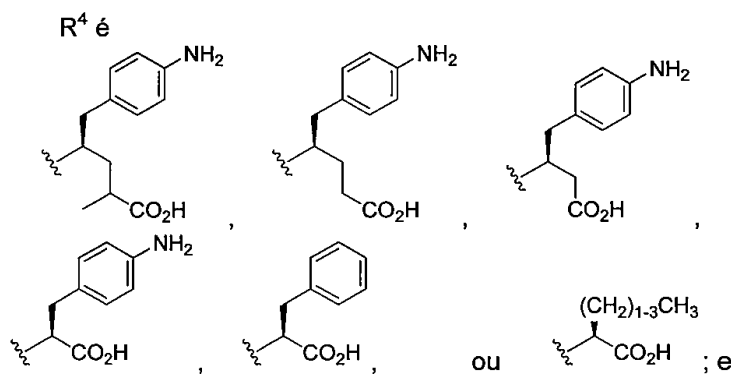
1. Composto, caracterizado pelo fato de que apresenta uma estrutura representada pela fórmula (II)



em que

5 n é 0, 1, ou 2;

R^1 , R^2 e R^3 são independentemente H, C_1 - C_{10} alquila insubstituída ou substituída, C_2 - C_{10} alquenila insubstituída ou substituída, C_2 - C_{10} alquinila insubstituída ou substituída, arila insubstituída ou substituída, heteroarila insubstituída ou substituída, $(CH_2)_{1-2}O(C_1$ - C_{10} alquila) insubstituída ou substituída, $(CH_2)_{1-2}O(C_2$ - C_{10} alquenila) insubstituída ou substituída, $(CH_2)_{1-2}O(C_2$ - C_{10} alquinila) insubstituída ou substituída, $(CH_2)_{1-2}OC(=O)(C_1$ - C_{10} alquila), $(CH_2)_{1-2}OC(=O)(C_2$ - C_{10} alquenila) insubstituída ou substituída, $(CH_2)_{1-2}OC(=O)(C_2$ - C_{10} alquinila) insubstituída ou substituída, $C(=O)(C_1$ - C_{10} alquila) insubstituída ou substituída, $C(=O)(C_2$ - C_{10} alquenila) insubstituída ou substituída, $C(=O)(C_2$ - C_{10} alquinila) insubstituída ou substituída, cicloalifático insubstituído ou substituído, heterocicloalifático insubstituído ou substituído, arilalquila insubstituída ou substituída, ou alquilarila insubstituída ou substituída;

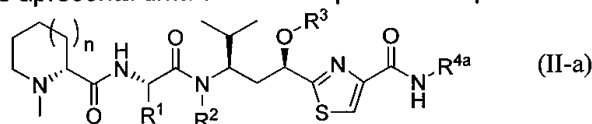


20 R^5 é H, C_1 - C_5 alquila, C_2 - C_5 alquenila, C_2 - C_5 alquinila, $CO(C_1$ - C_5 alquila), $CO(C_2$ - C_5 alquenila), ou $CO(C_2$ - C_5 alquinila);

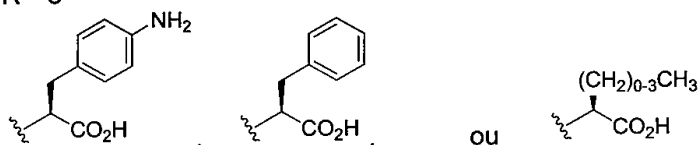
ou um éster farmacologicamente aceitável dos mesmos, uma a-

mida farmacêuticamente aceitável dos mesmos no grupo carboxila de R^4 com o grupo α -amino de um α -amino ácido, ou um sal farmacêuticamente aceitável dos mesmos.

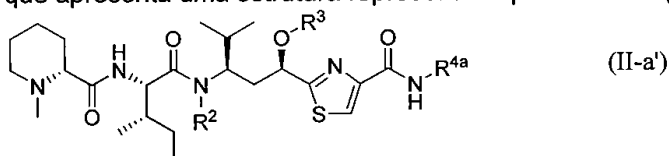
2. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que apresenta uma estrutura representada pela fórmula (II-a)



em que R^{4a} é



3. Composto de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que apresenta uma estrutura representada pela fórmula (II-a'):

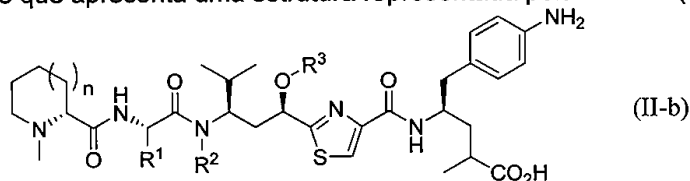


em que

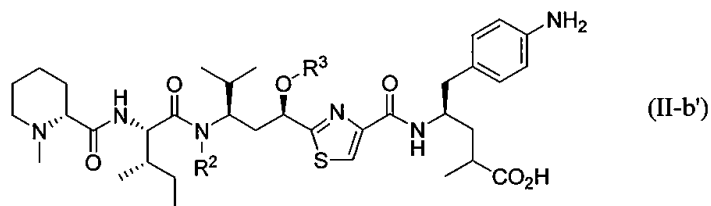
- 10 R^2 é H, C_1 - C_5 alquila, C_2 - C_5 alquenila, CH_2O (C_1 - C_5 alquila), CH_2O (C_2 - C_5 alquenila), CH_2O ($C=O$)(C_1 - C_5 alquila), ou $CH_2OC(=O)$ (C_2 - C_5 alquenila); e

R^3 é H, C_1 - C_5 alquila, C_2 - C_5 alquenila, $C(=O)C_1$ - C_5 alquila, ou $C(=O)C_2$ - C_5 alquenila.

- 15 4. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que apresenta uma estrutura representada pela fórmula (II-b):



5. Composto de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que apresenta uma estrutura representada pela fórmula (II-b'):



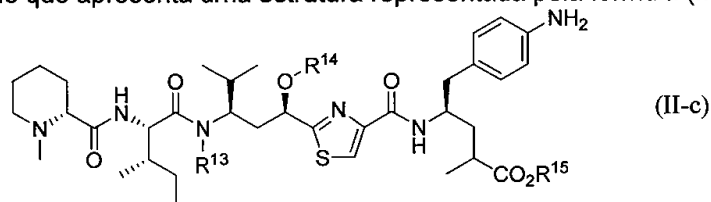
em que

R^2 é H, C_1-C_5 alquila, C_2-C_5 alquenila, $CH_2O(C_1-C_5$ alquila), $CH_2O(C_2-C_5$ alquenila), $CH_2O(C=O)(C_1-C_5$ alquila), ou $CH_2OC(=O)(C_2-C_5$ alquenila); e

- 5 R^3 é H, C_1-C_5 alquila, C_2-C_5 alquenila, $C(=O)C_1-C_5$ alquila, ou $C(=O)C_2-C_5$ alquenila.

6. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que apresenta uma estrutura de acordo com a fórmula (III-a), (III-b), (III-c), (III-d), (III-e), (III-f), (III-g), (III-h), (III-i), (III-j), (III-k), (III-l), (III-m), (III-n),
10 (III-o), (III-p), (III-q), (III-r), (III-s), (III-t), (III-u), (III-v), (III-w), ou (III-y).

7. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que apresenta uma estrutura representada pela fórmula (II-c)



onde

- R^{13} é Me, n-Pr, CH_2OMe , ou $CH_2OC(=O)CH_2CH(Me)_2$; R^{14} é Me
15 ou $C(=O)Me$; e R^{15} é H ou C_1-C_5 alquila.

8. Conjugado, caracterizado pelo fato de que compreende um composto como definido na reivindicação 1 conjugado com um anticorpo.

9. Conjugado, caracterizado pelo fato de que apresenta uma estrutura representada pela fórmula (IV):

20 $[D(X^D)_a C(X^Z)_b]_m Z$ (IV)

em que

D é um composto de acordo com a reivindicação 1;

Z é um anticorpo;

X^D e X^Z são grupos espaçadores;

C é um grupo clivável no sítio da ação biológica intencionada de

D;

cada um de a e b é independentemente 0 ou 1; e

5 m é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10.

10. Composição de substância, caracterizada pelo fato de que apresenta uma estrutura representada pela fórmula (V-a)



em que

10 R^{31} é um grupo funcional adequado para reagir com um grupo funcional em um anticorpo;

D é um composto de acordo com a reivindicação 1;

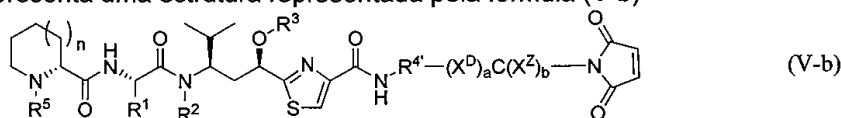
X^D e X^Z são grupos espaçadores;

C é um grupo clivável no sítio da ação biológica intencionada de

15 D; e

cada um de a e b é independentemente 0 ou 1.

11. Composição de substância, caracterizada pelo fato de que apresenta uma estrutura representada pela fórmula (V-b)



em que

20 n é 0, 1, ou 2;

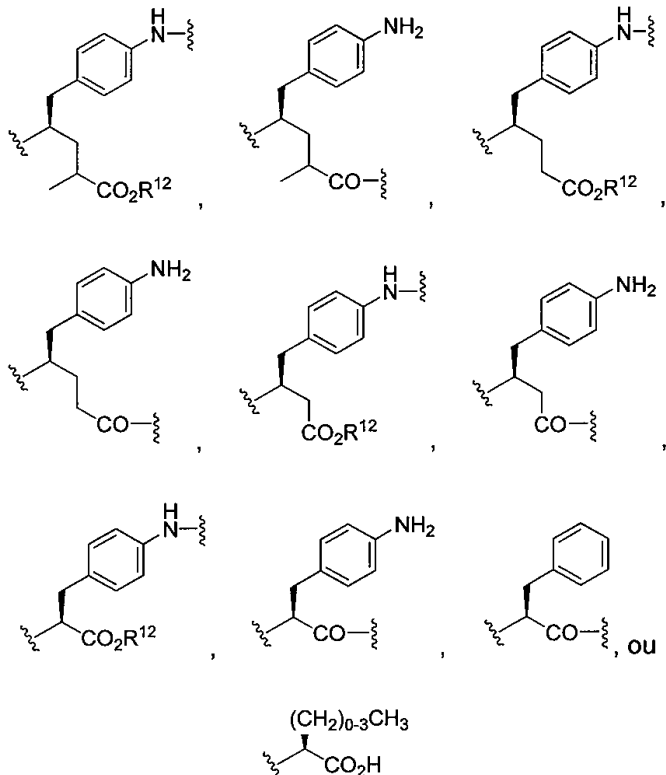
R¹, R² e R³ são independentemente H, C₁-C₁₀ alquila insubstituída ou substituída, C₂-C₁₀ alquenila insubstituída ou substituída, C₂-C₁₀ alquinila insubstituída ou substituída, arila insubstituída ou substituída, heteroarila insubstituída ou substituída, (CH₂)₁₋₂O(C₁-C₁₀ alquila) insubstituída ou substituída, (CH₂)₁₋₂O(C₂-C₁₀ alquenila) insubstituída ou substituída, (CH₂)₁₋₂O(C₂-C₁₀ alquinila) insubstituída ou substituída, (CH₂)₁₋₂OC(=O)(C₁-C₁₀ alquila), (CH₂)₁₋₂OC(=O)(C₂-C₁₀ alquenila) insubstituída ou substituída, (CH₂)₁₋₂OC(=O)(C₂-C₁₀ alquinila) insubstituída ou substituída, C(=O)(C₁-C₁₀ alquila) insubstituída ou substituída, C(=O)(C₂-C₁₀ alquenila) insubstituída ou substituída, C(=O)(C₂-C₁₀ alquinila) insubstituída ou substituída, cicloalifático in-

25

30

substituído ou substituído, heterocicloalifático insubstituído ou substituído, arilalquila insubstituída ou substituída, ou alquilarila insubstituída ou substituída;

R^{4i} é



5 em que

R^{12} é H, C_1 - C_5 alquila, C_2 - C_5 alquenila, ou C_2 - C_5 alquinila; e

R^5 é H, C_1 - C_5 alquila, C_2 - C_5 alquenila, C_2 - C_5 alquinila, $CO(C_1$ - C_5 alquila), $CO(C_2$ - C_5 alquenila), ou $CO(C_2$ - C_5 alquinila);

X^D e X^Z são grupos espaçadores;

10 C é um grupo clivável; e

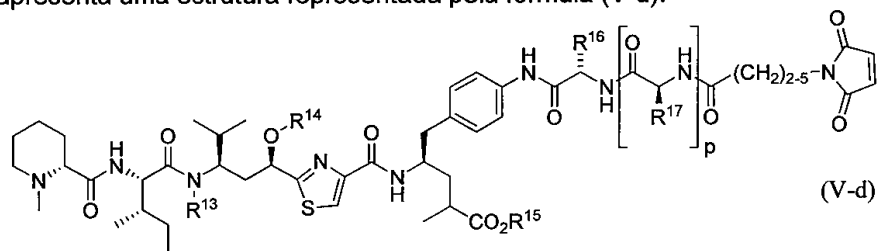
a e b são independentemente 0 ou 1;

em que

o grupo R^{4i} é ligado no mesmo por meio de um grupo carboxila ou amina em qualquer grupo X^D no evento de a ser 1 ou ao grupo C no e-

15 vento de a ser 0.

12. Composição de substância, caracterizada pelo fato de que apresenta uma estrutura representada pela fórmula (V-d):

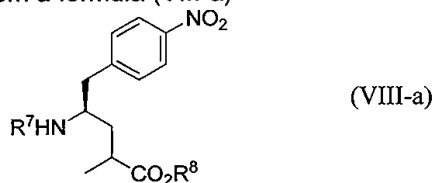


onde

R^{13} é Me, n-Pr, CH_2OMe , ou $CH_2OC(=O)CH_2CH(Me)_2$; R^{14} é Me ou $C(=O)Me$; R^{15} é H ou C_1-C_5 alquila; R^{16} é $(CH_2)_4NH_2$ ou $(CH_2)_3NHC(=O)NH_2$; R^{17} é $C(Me)_2$ ou Me; e p é 0 ou 1.

13. Uso de um composto como definido na reivindicação 1, ou de um conjugado como definido na reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que é na preparação de um medicamento para tratar câncer em um sujeito sofrendo de tal doença.

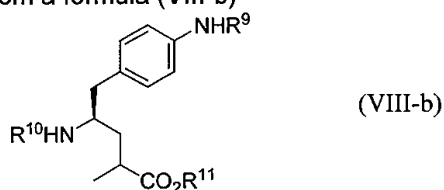
14. Composto, caracterizado pelo fato de que apresenta uma estrutura de acordo com a fórmula (VIII-a)



em que

R^7 é H ou um grupo proteção de amina e R^8 é H, C_1-C_{10} alquila, C_2-C_{10} alquenila, C_2-C_{10} alquinila, arila, cicloalifático, alquilcicloalifático, arilalquila, ou alquilarila.

15. Composto, caracterizado pelo fato de que apresenta uma estrutura de acordo com a fórmula (VIII-b)

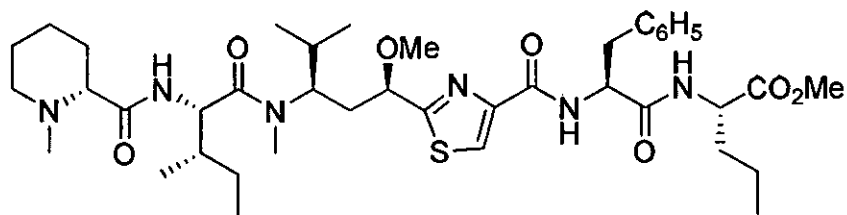
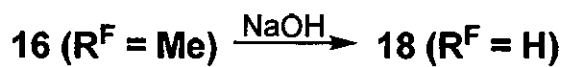
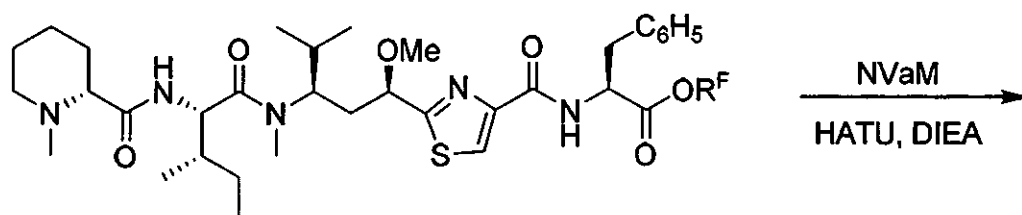
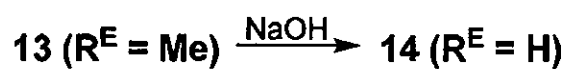
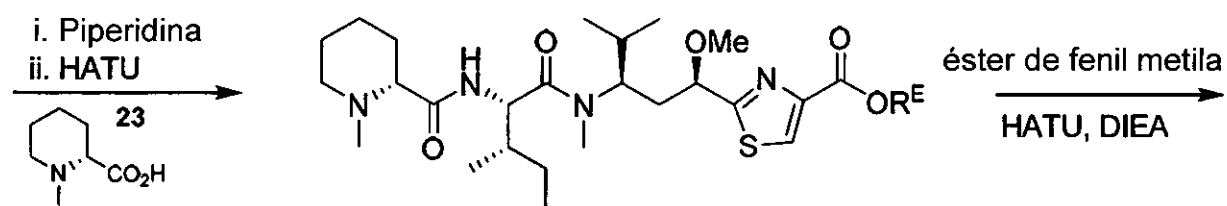


em que

R^9 e R^{10} são independentemente H ou um grupo de proteção de amina e R^{11} é H, C_1 - C_{10} alquila, C_2 - C_{10} alquenila, C_2 - C_{10} alquinila, arila, cicloalifático, alquilcicloalifático, arilalquila, ou alquilarila.

Fig. 1b

Esquema 1 (parte 2 de 2)



19

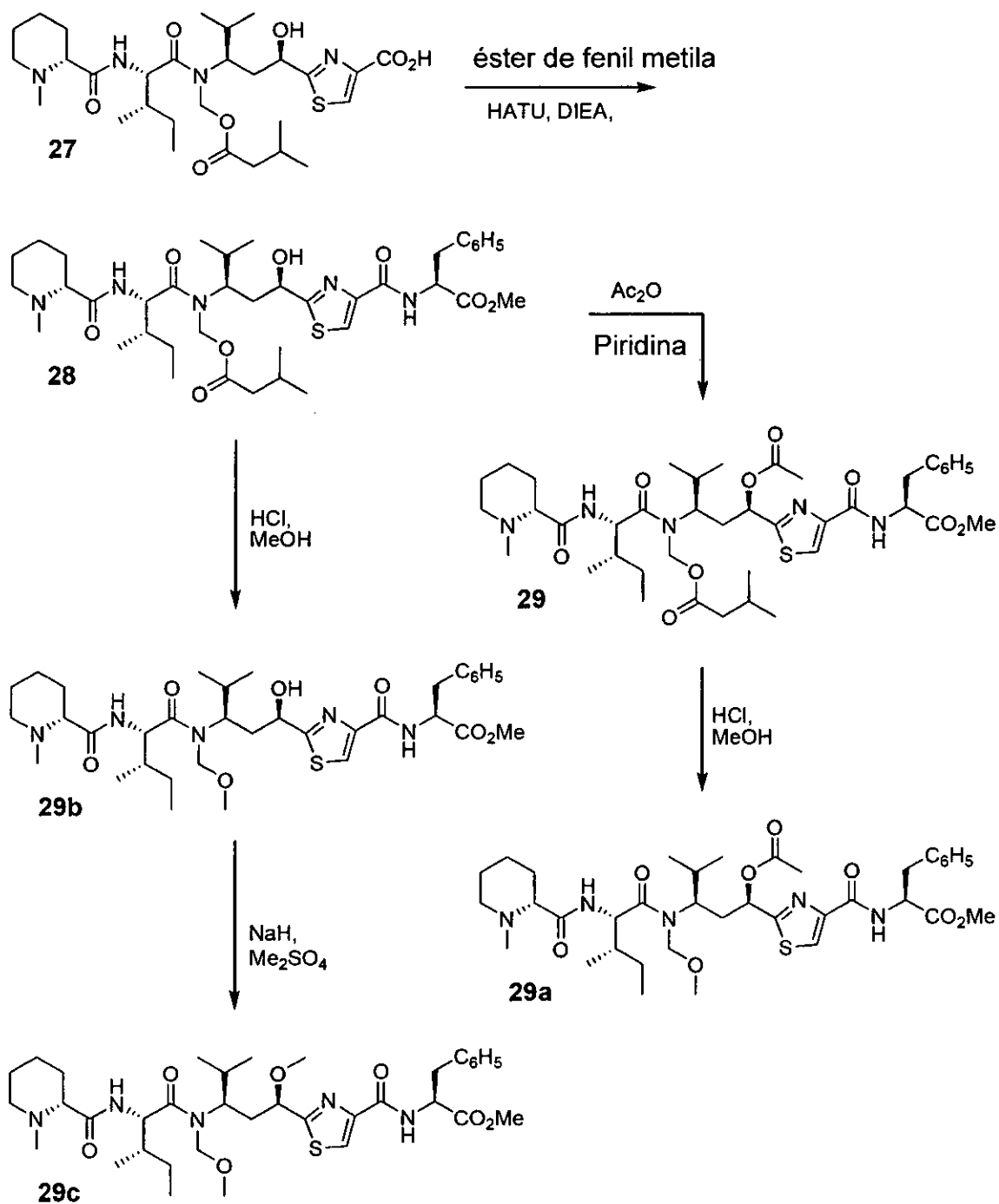
Fig. 2Esquema 2

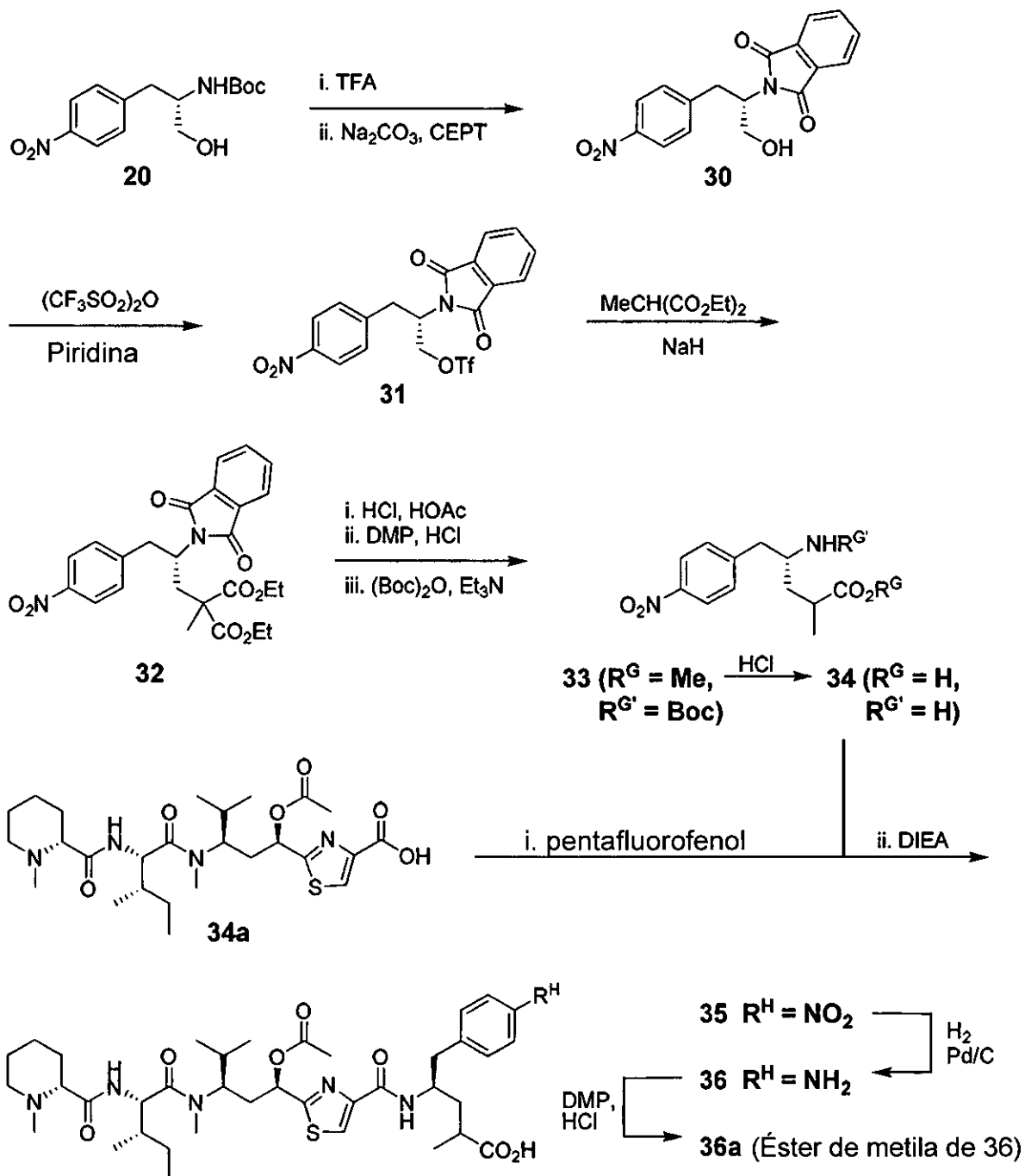
Fig. 3Esquema 3

Fig. 4

Esquema 4

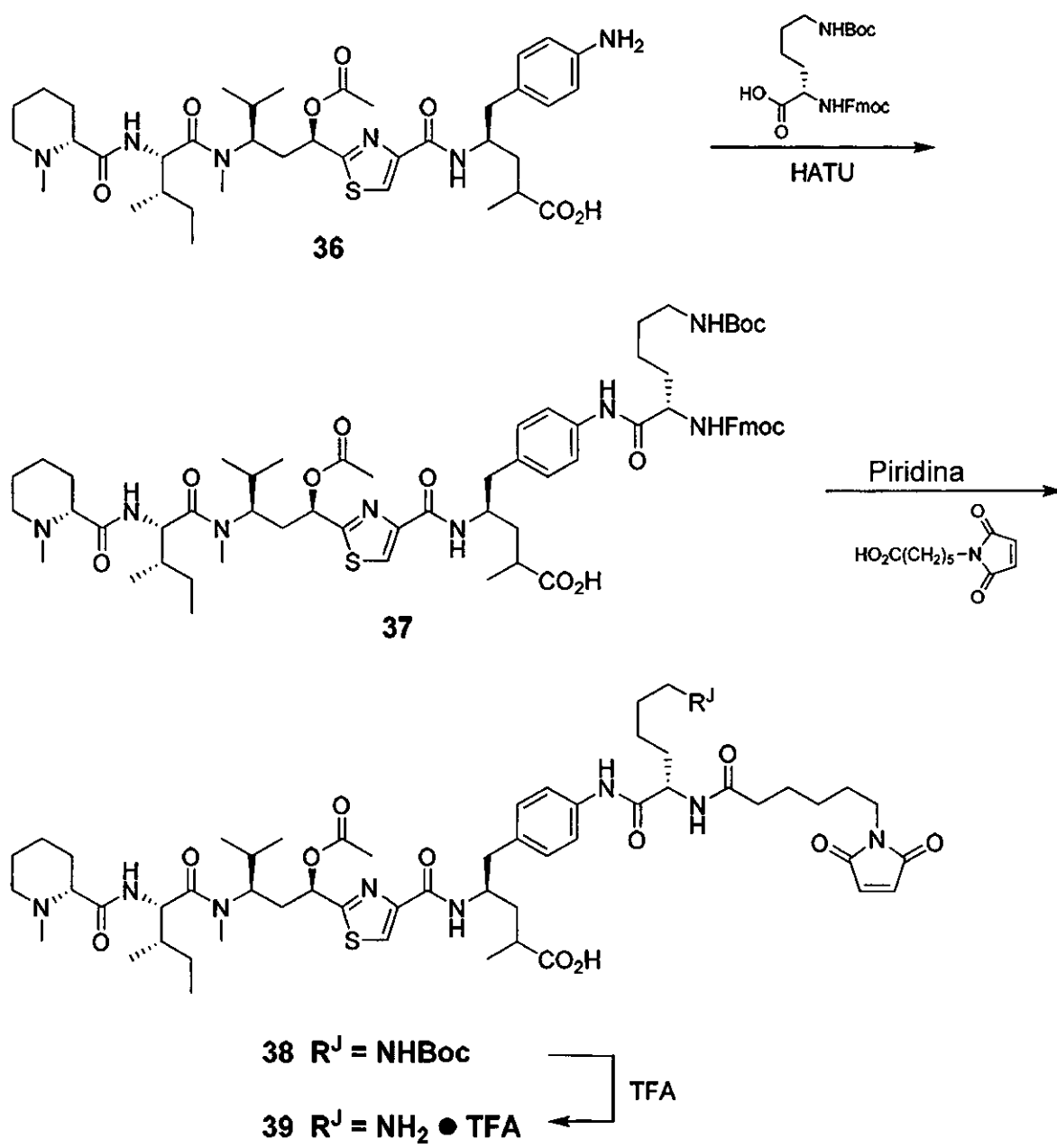


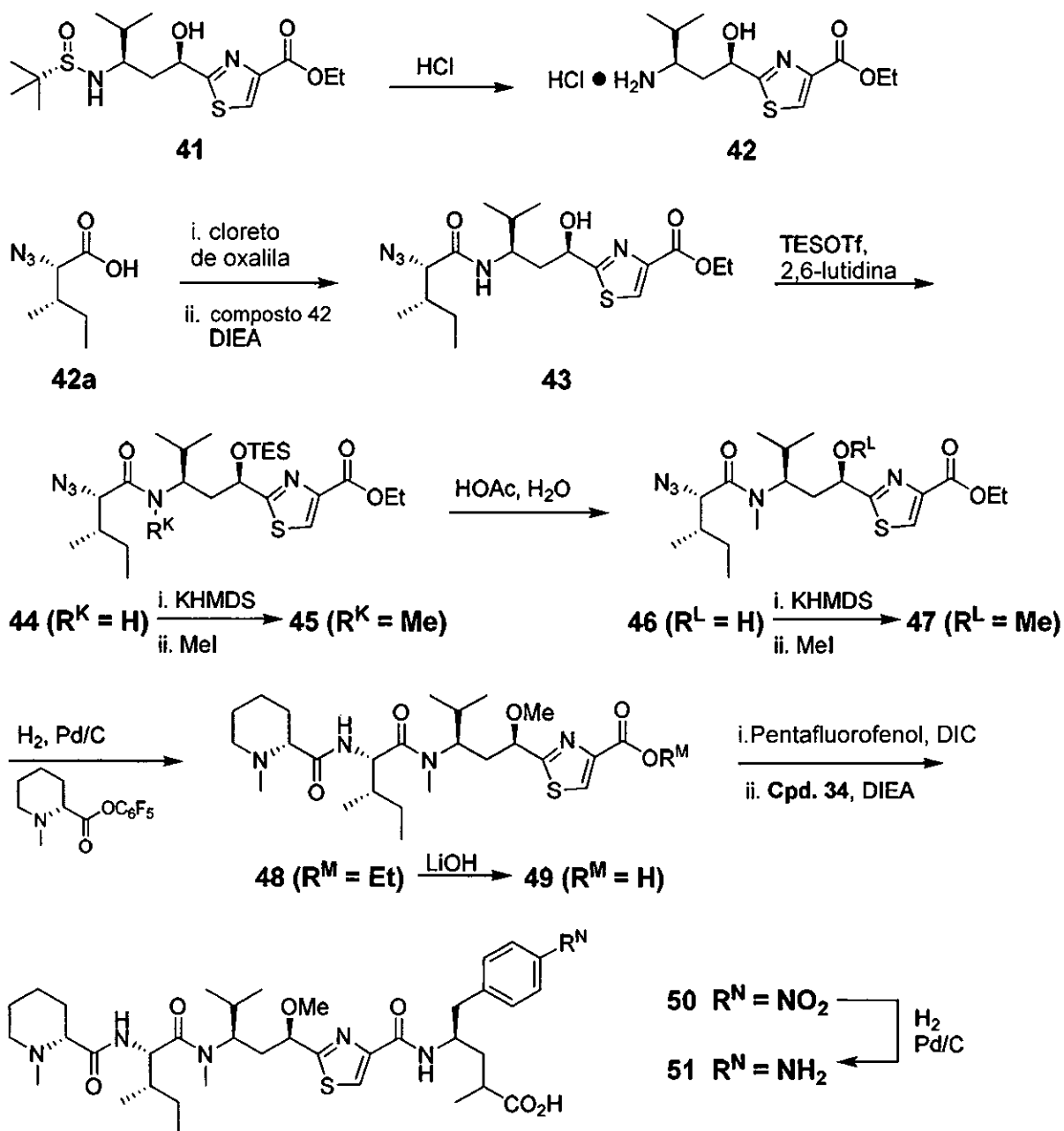
Fig. 5Esquema 5

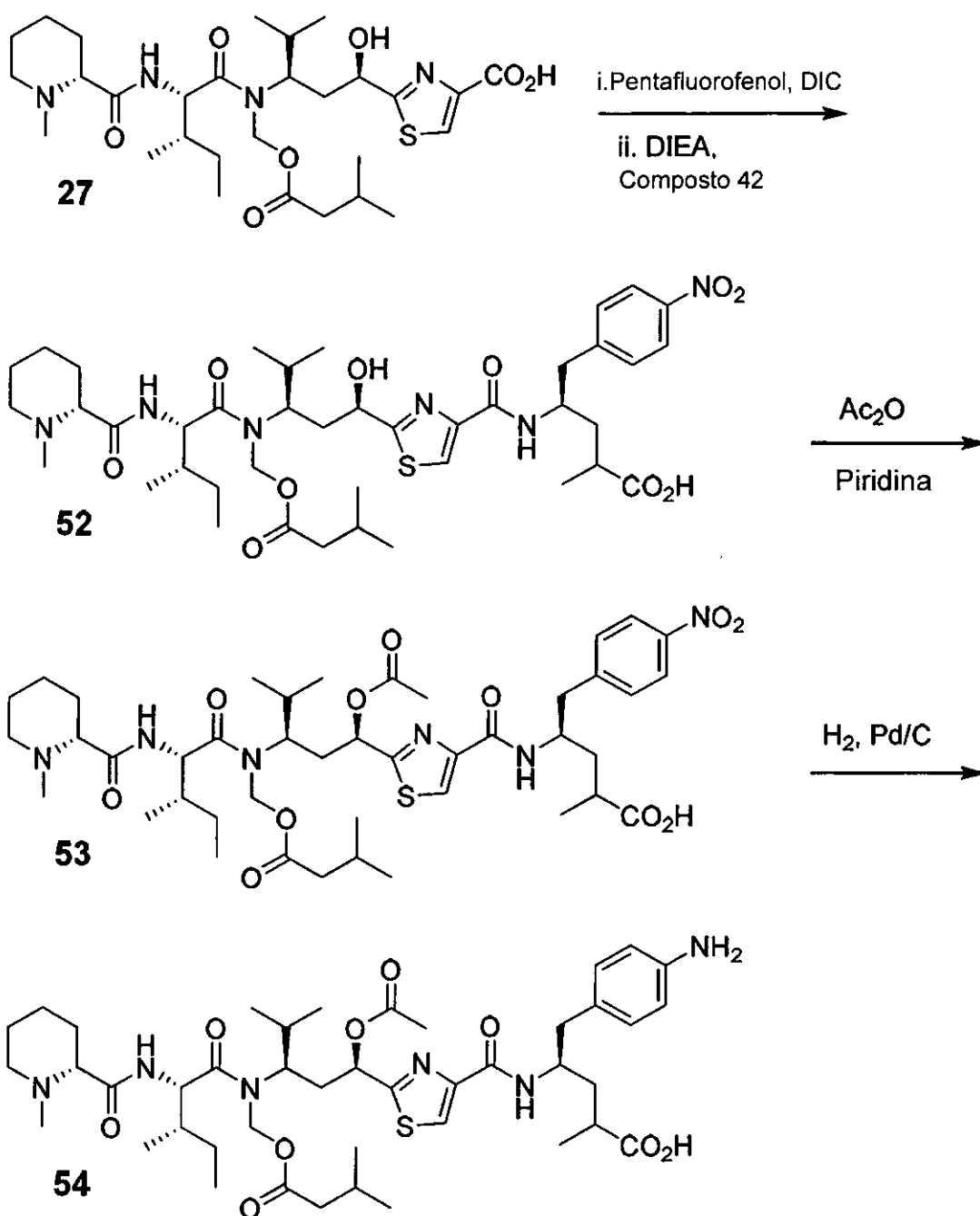
Fig. 6Esquema 6

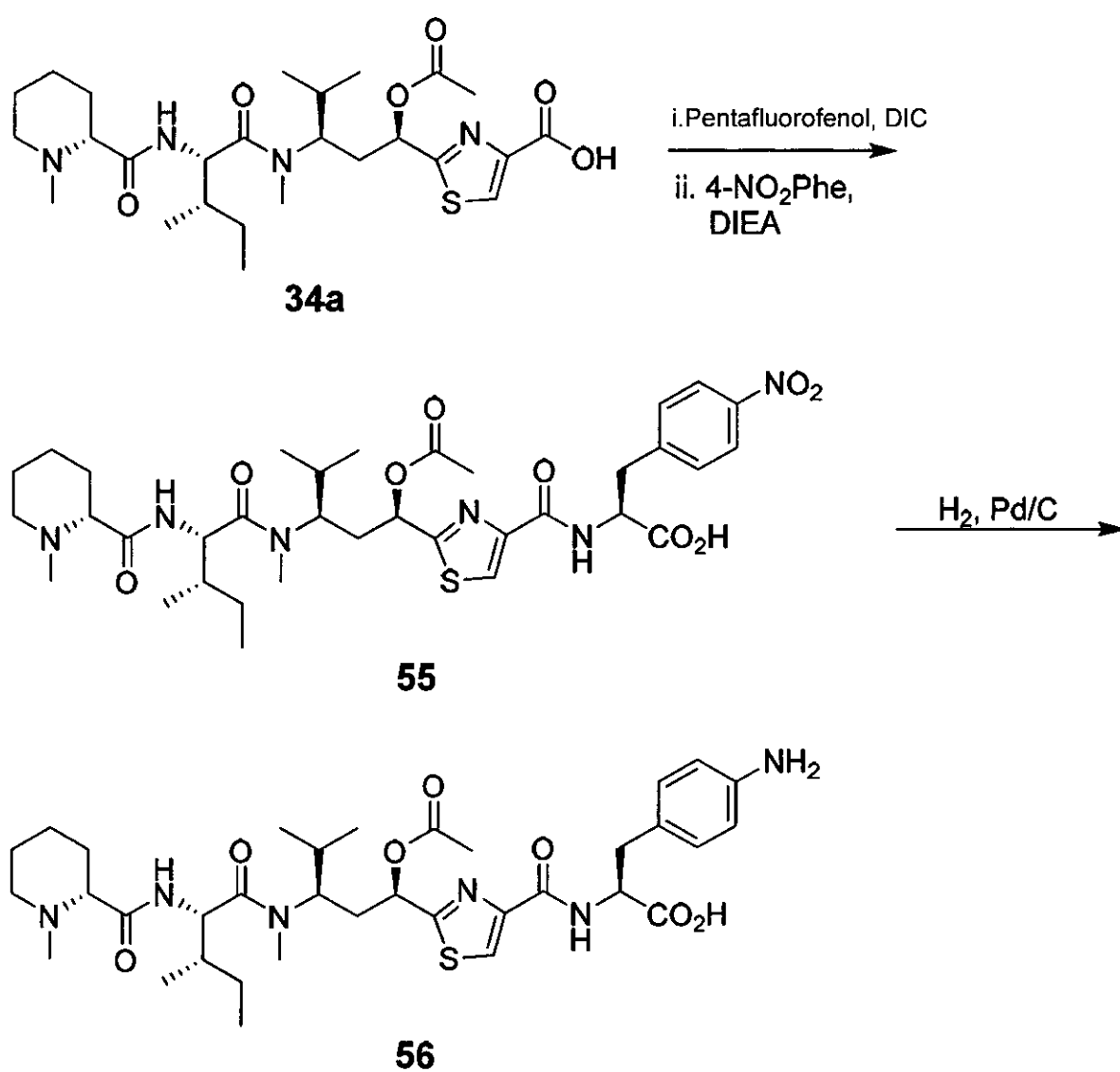
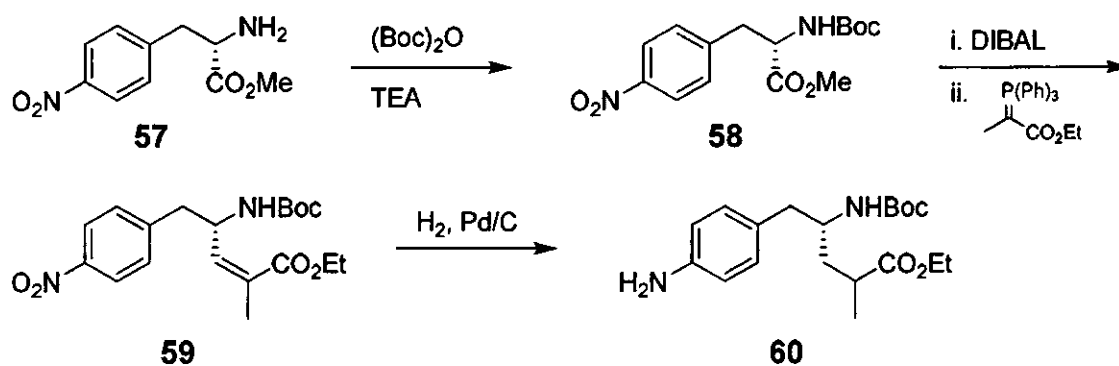
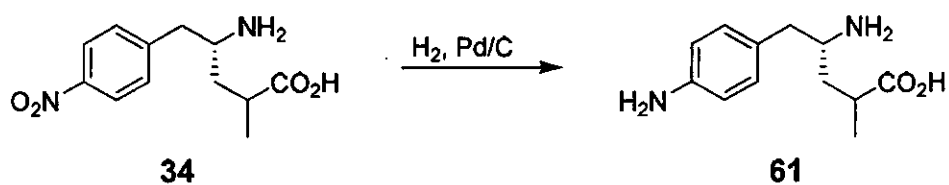
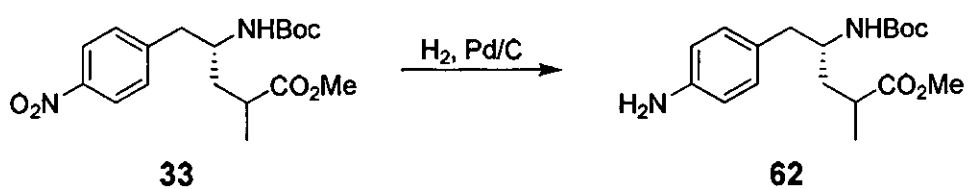
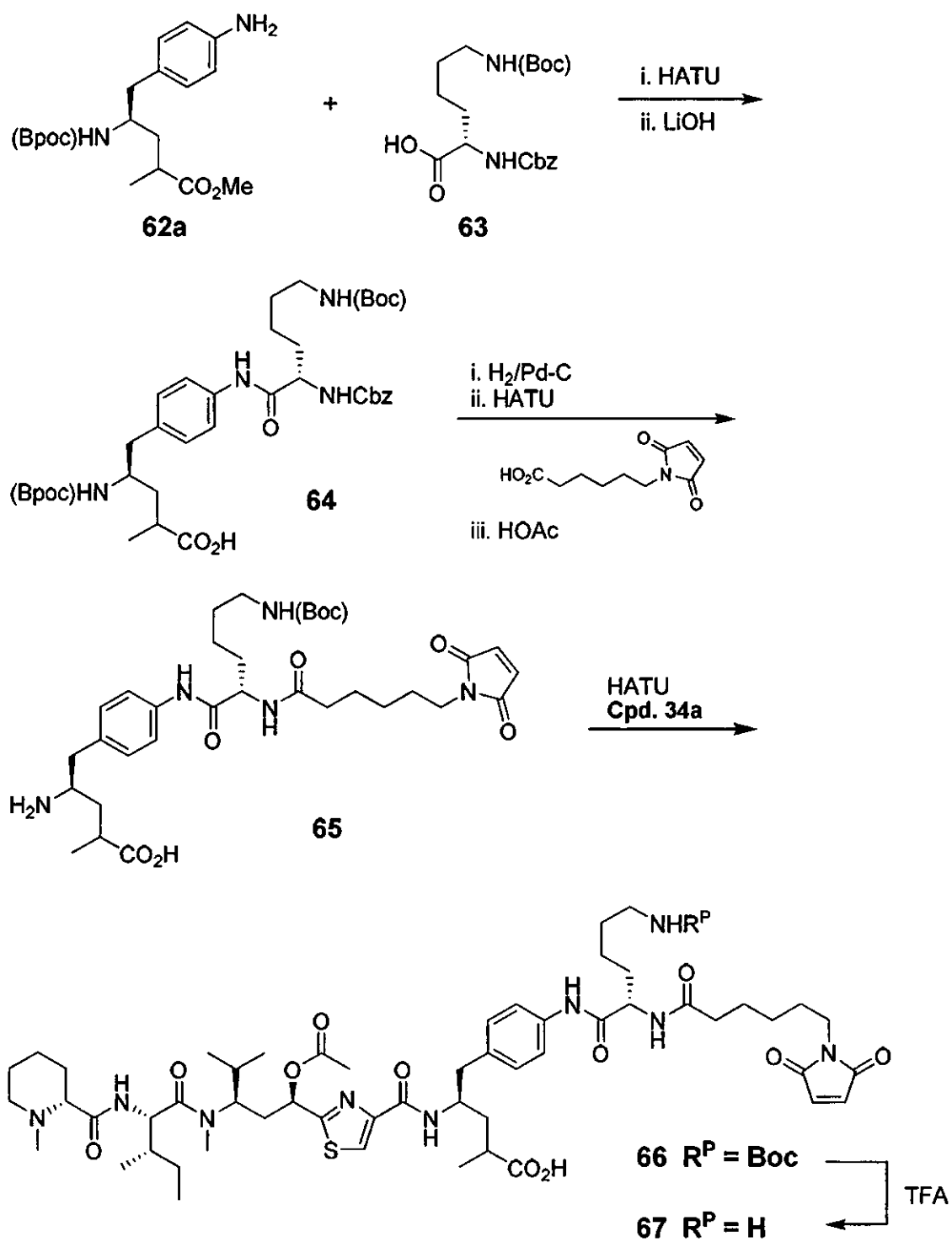
Fig. 7Esquema 7

Fig. 8aEsquema 8**Fig. 8b**Esquema 9**Fig. 8c**Esquema 10

10/27

Fig. 9

Esquema 11



11/27

Fig. 10

Esquema 12

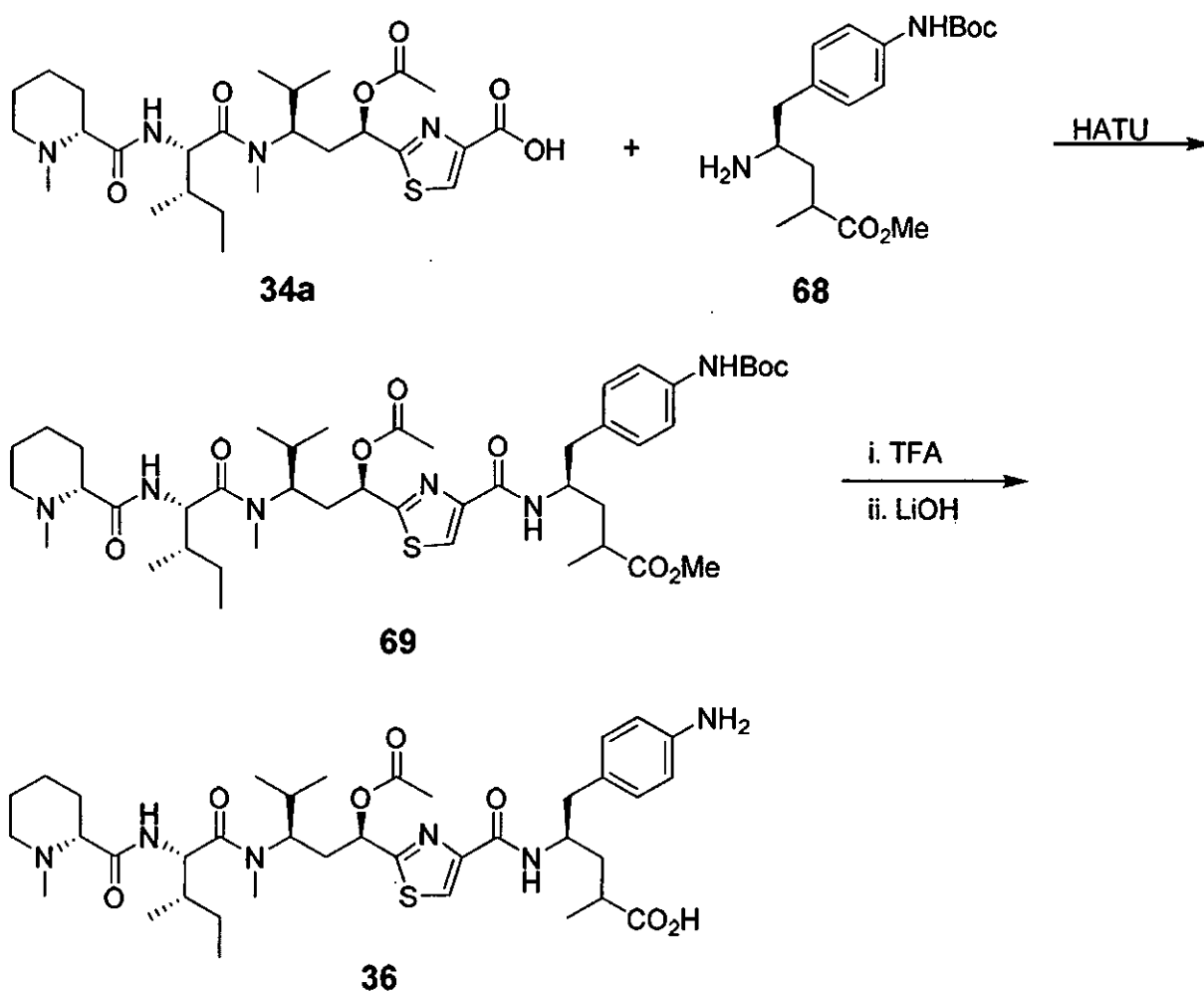


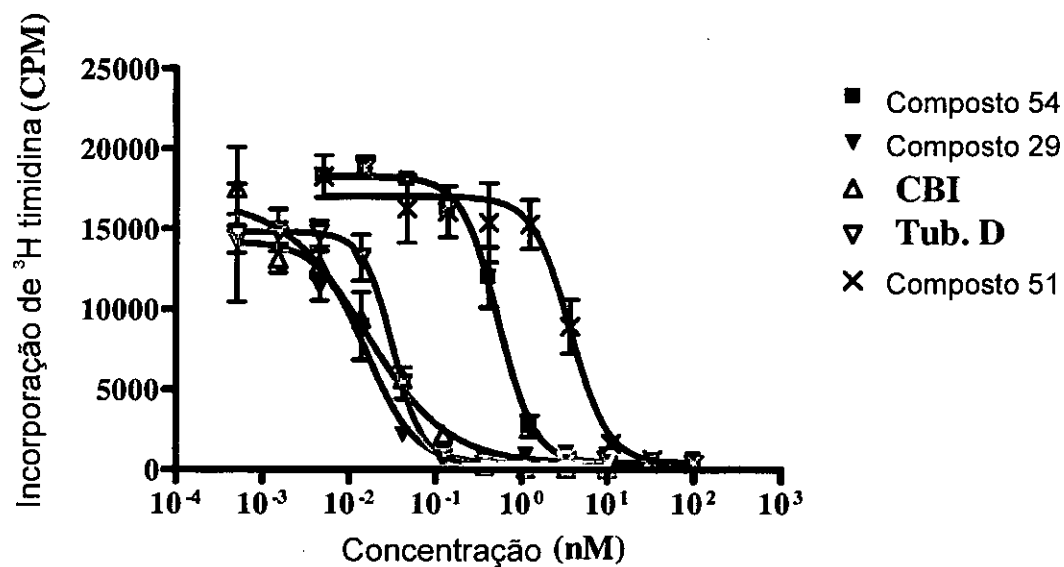
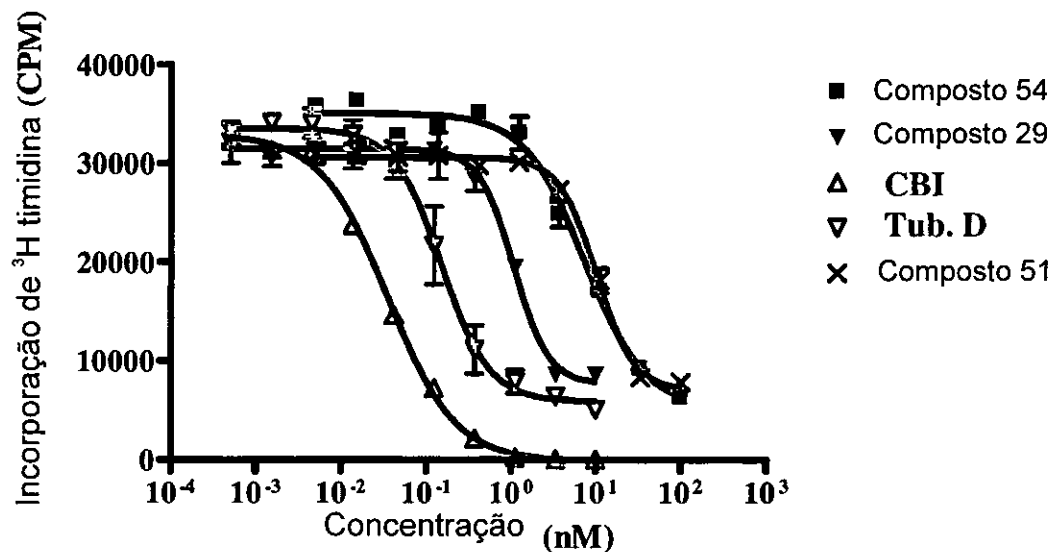
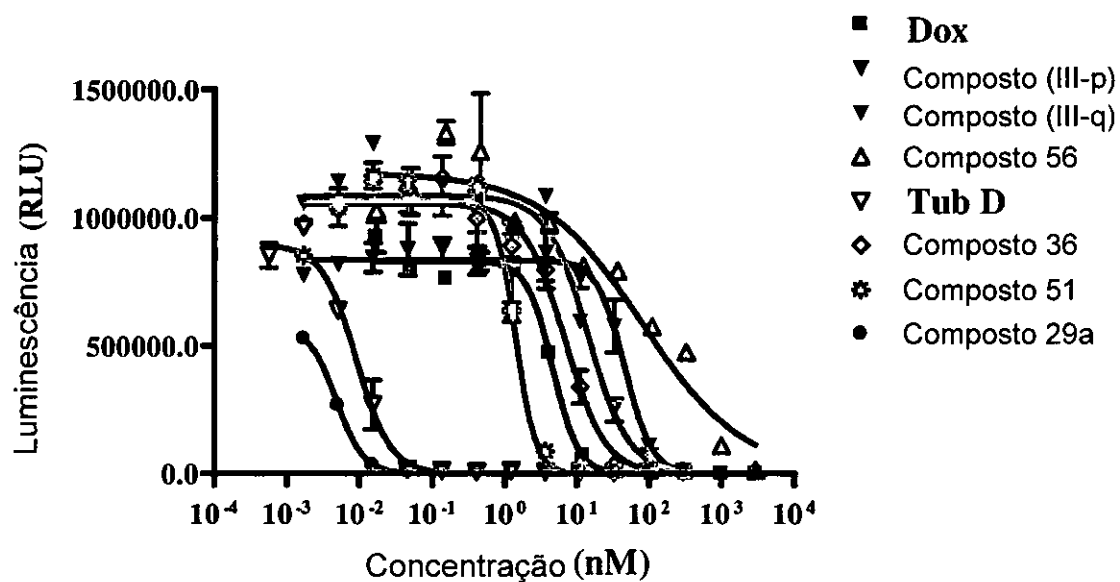
Fig. 11aEnsaio de proliferação de ^3H Timidina de HL-60**Fig. 11b**Ensaio de proliferação de ^3H Timidina de 786-0

Fig. 12a

Ensaio de luminescência de ATP de HL-60

**Fig. 12b**

Ensaio de luminescência de ATP de 786-0

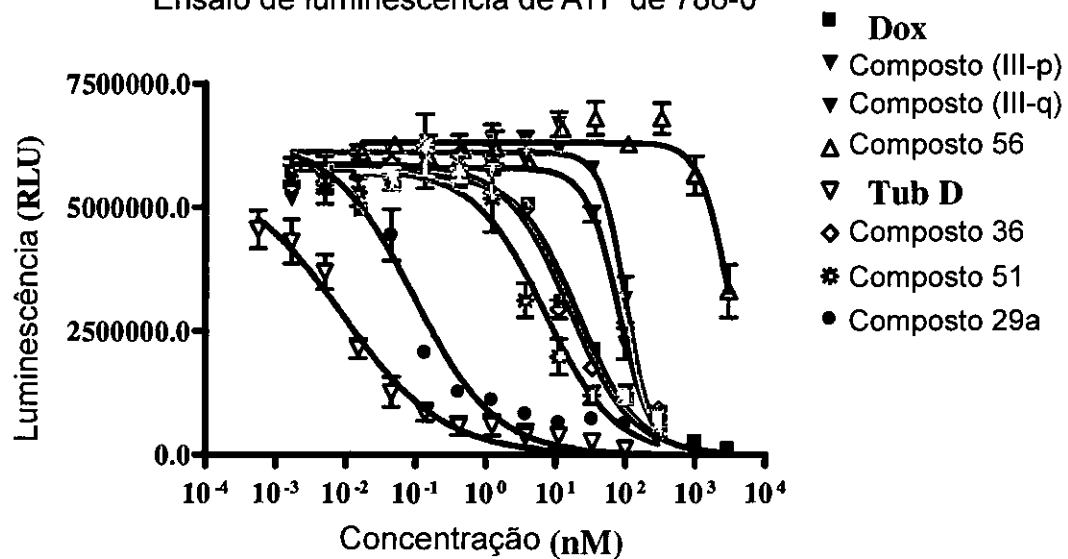


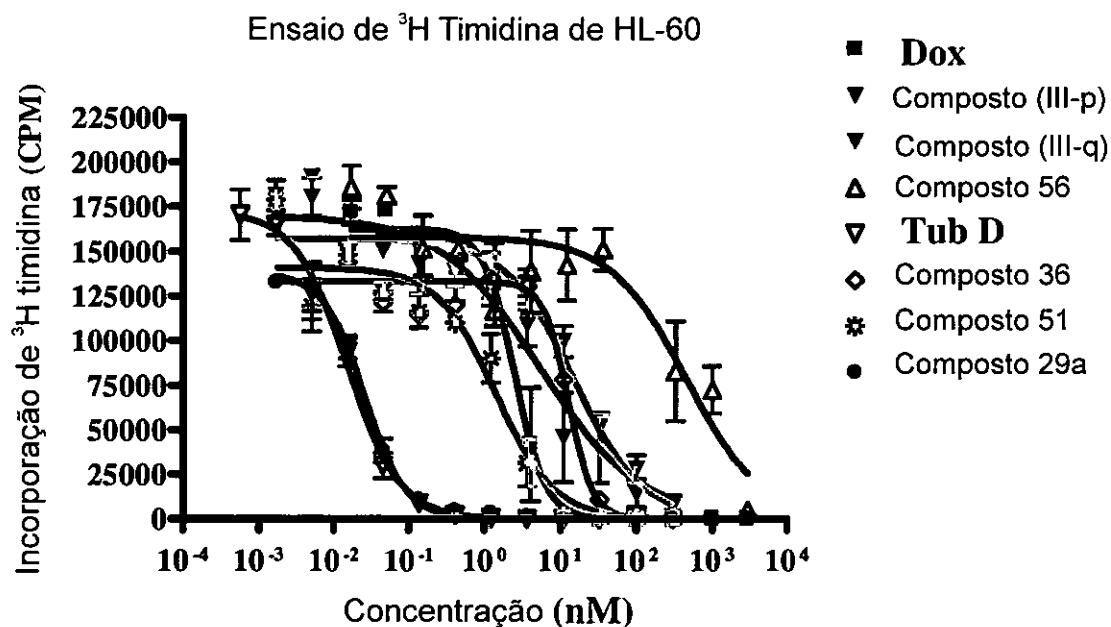
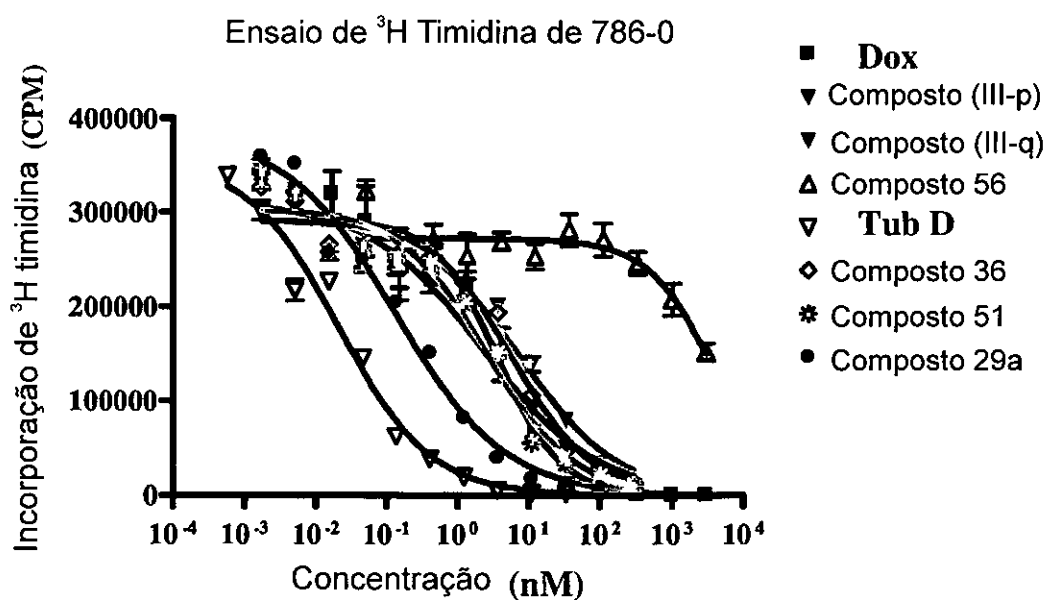
Fig. 12c**Fig. 12d**

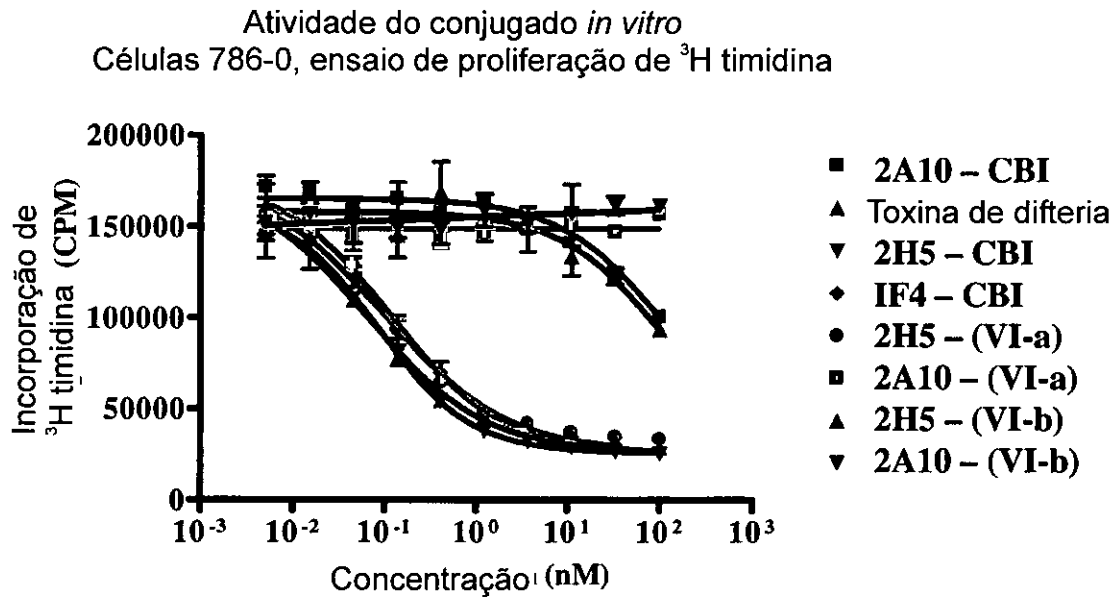
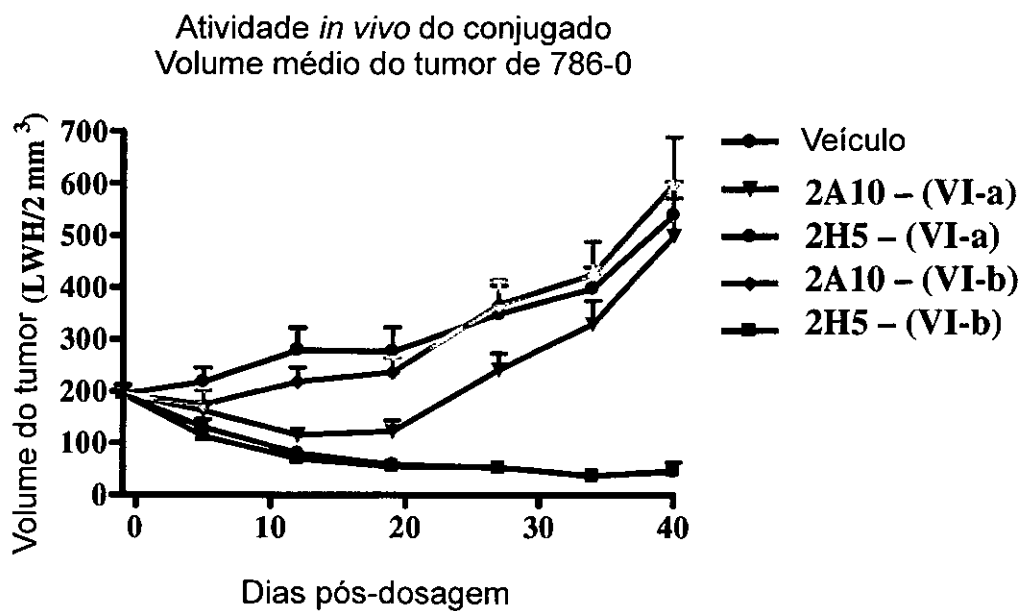
Fig. 13**Fig. 14**

Fig. 15

Esquema13

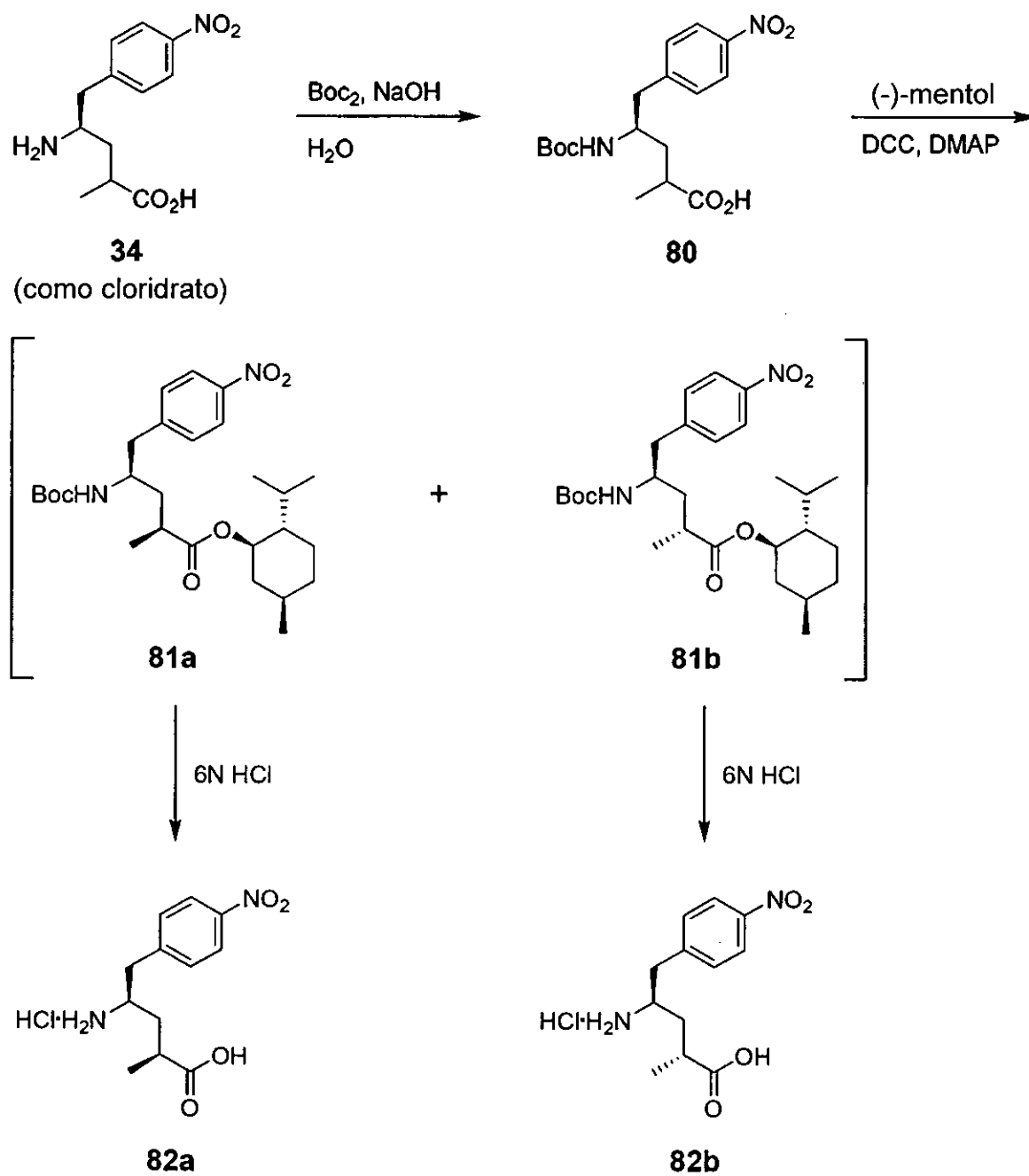


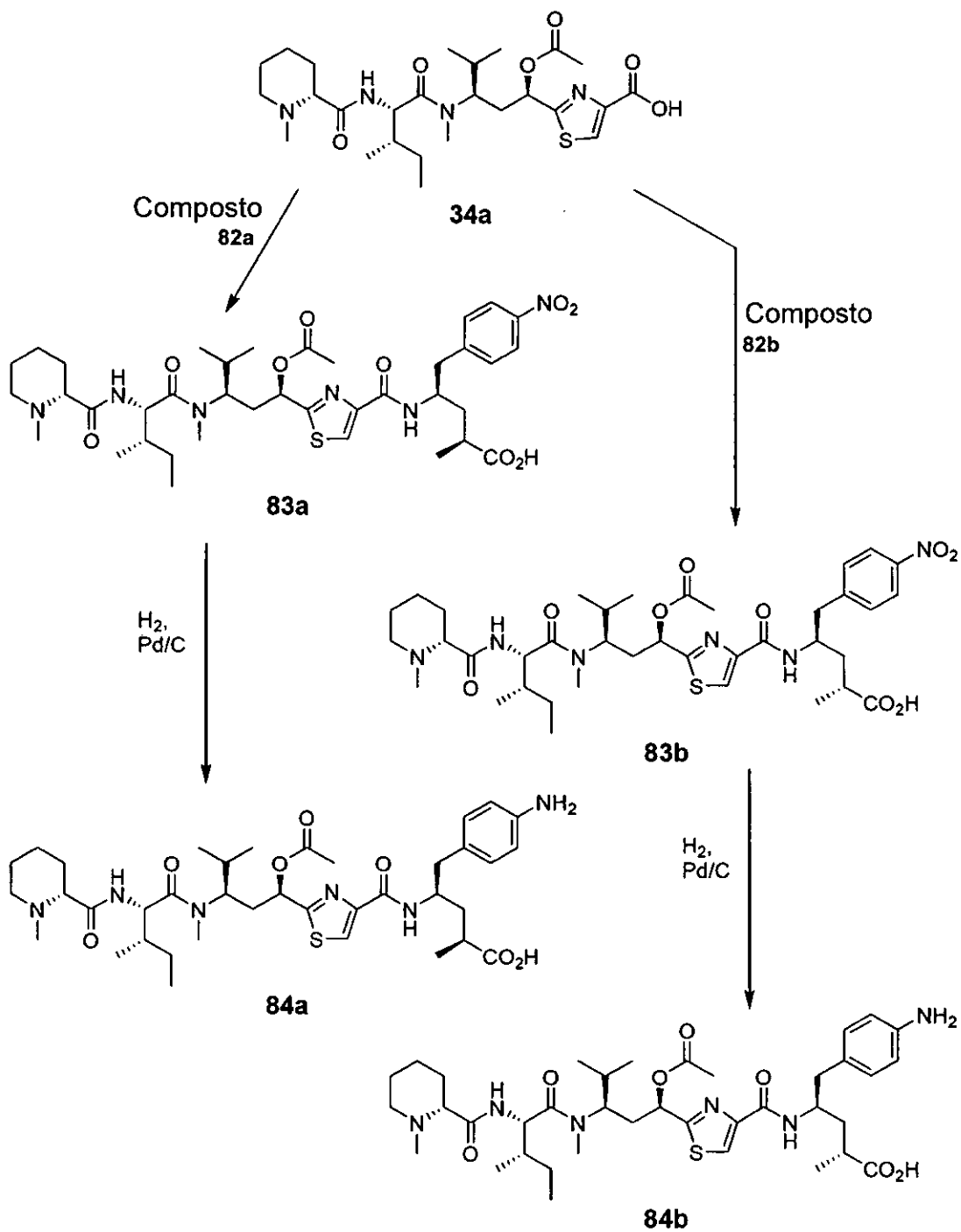
Fig. 16Esquema14

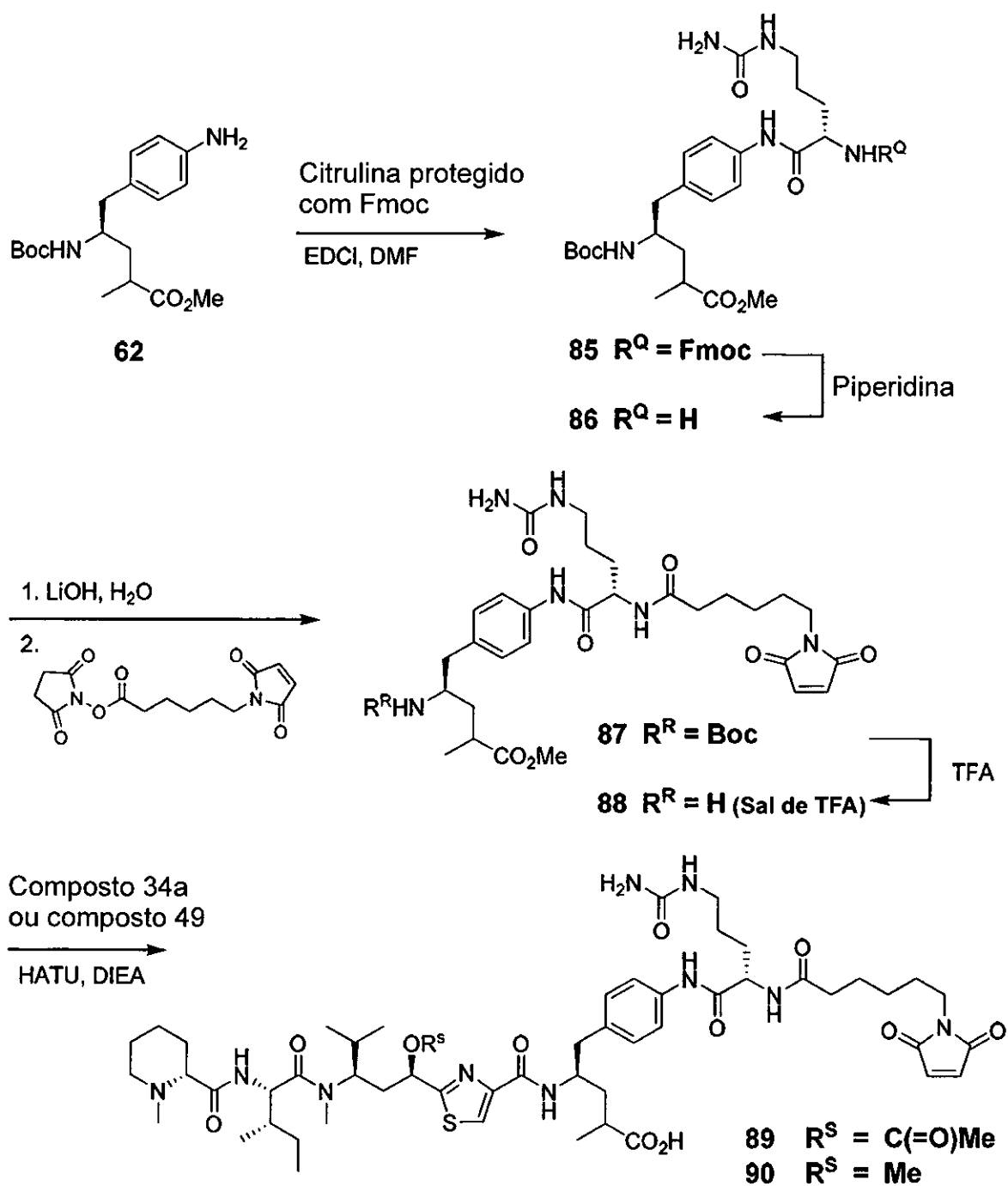
Fig. 17Esquema15

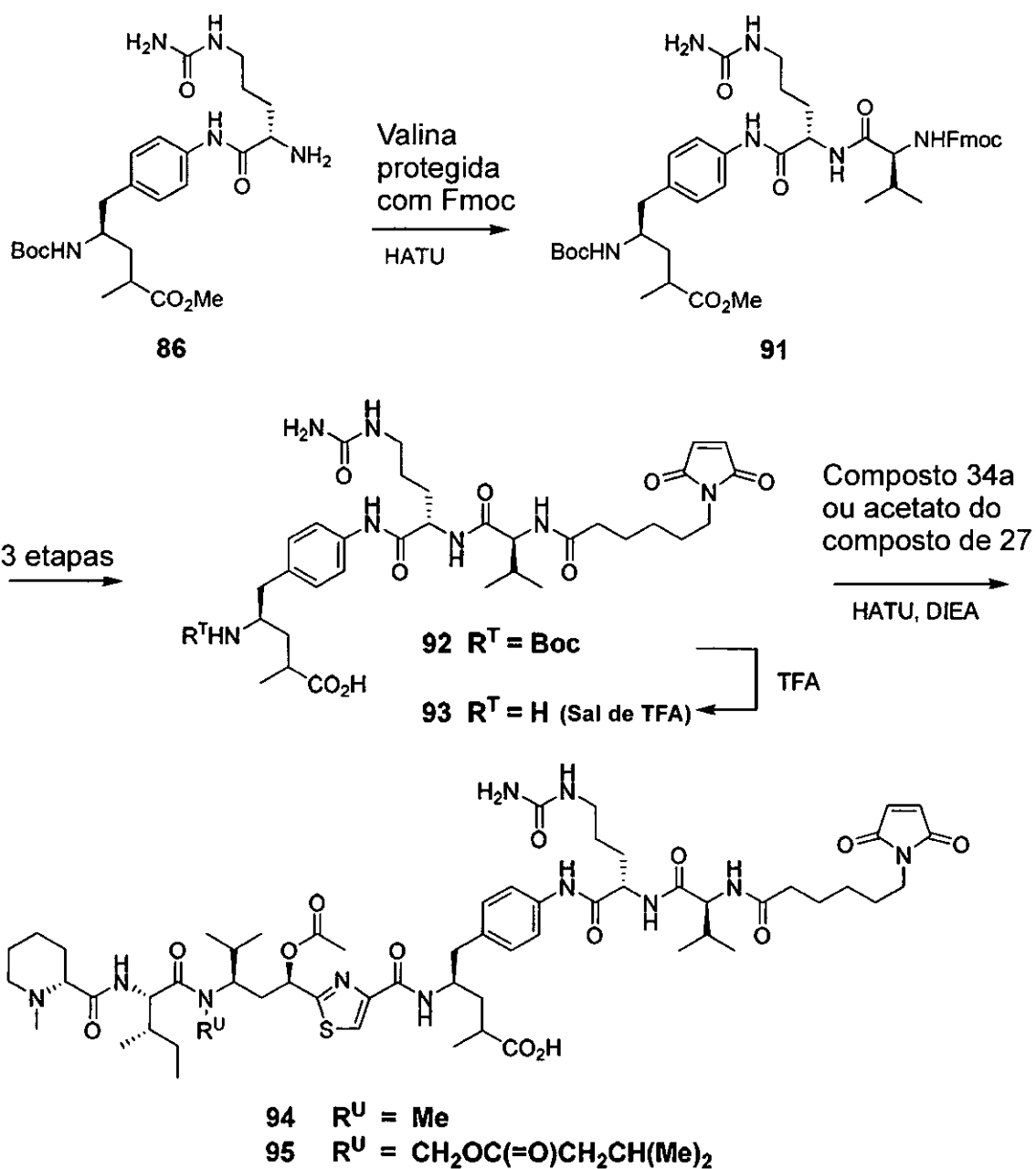
Fig. 18Esquema16

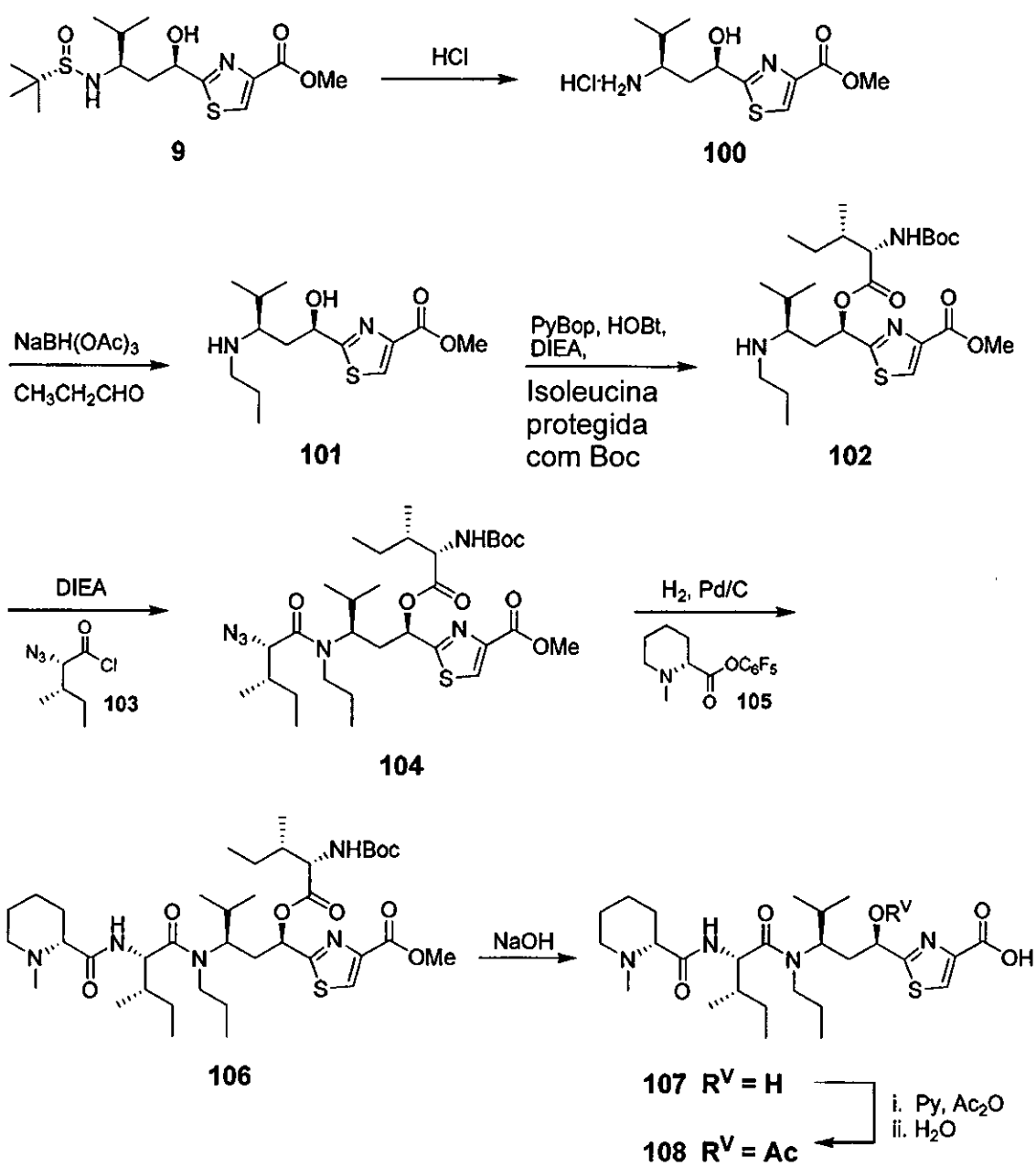
Fig. 19Esquema17

Fig. 20a

Esquema 18 (parte 1 de 2)

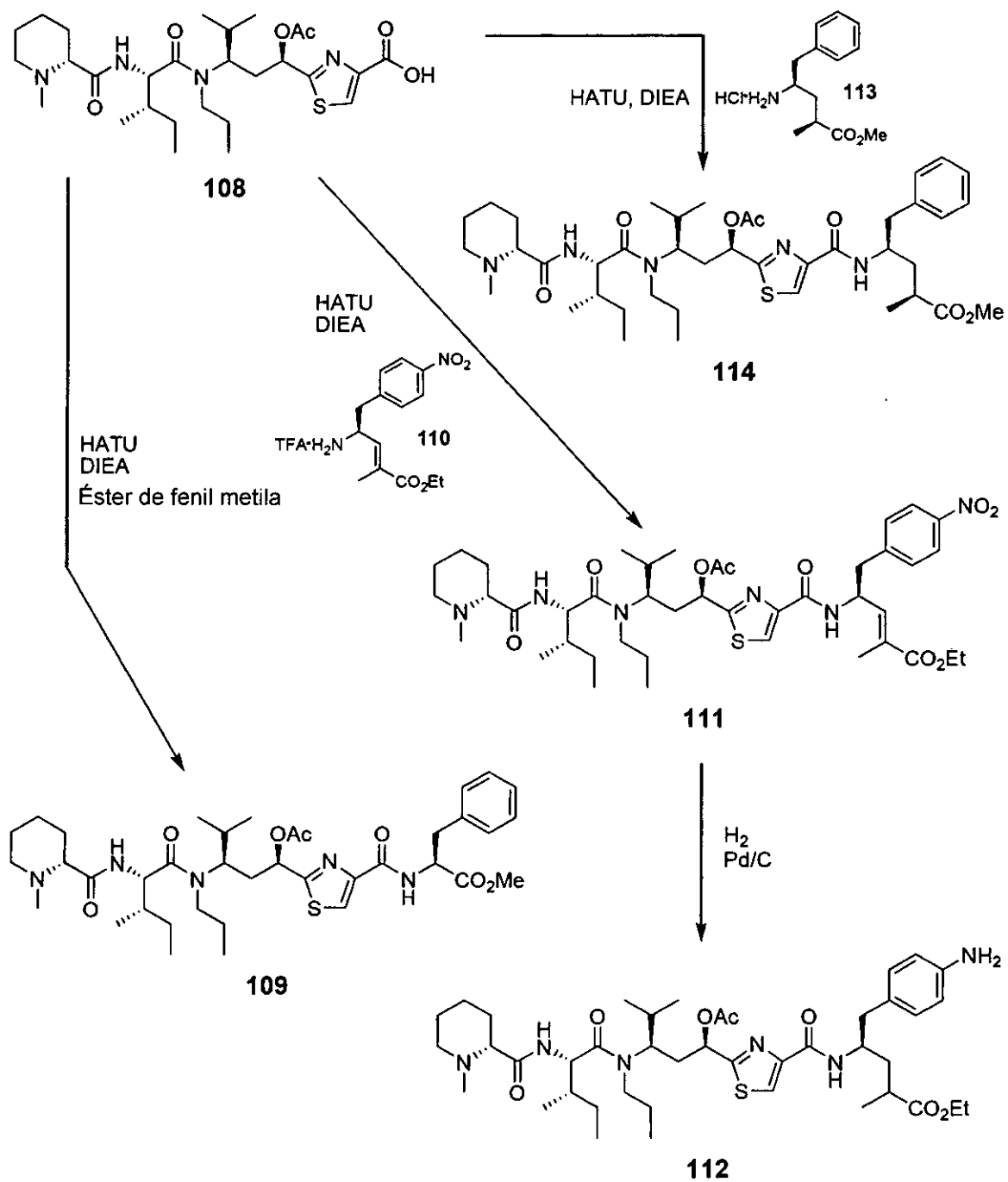


Fig. 20b

Esquema 18 (parte 2 de 2)

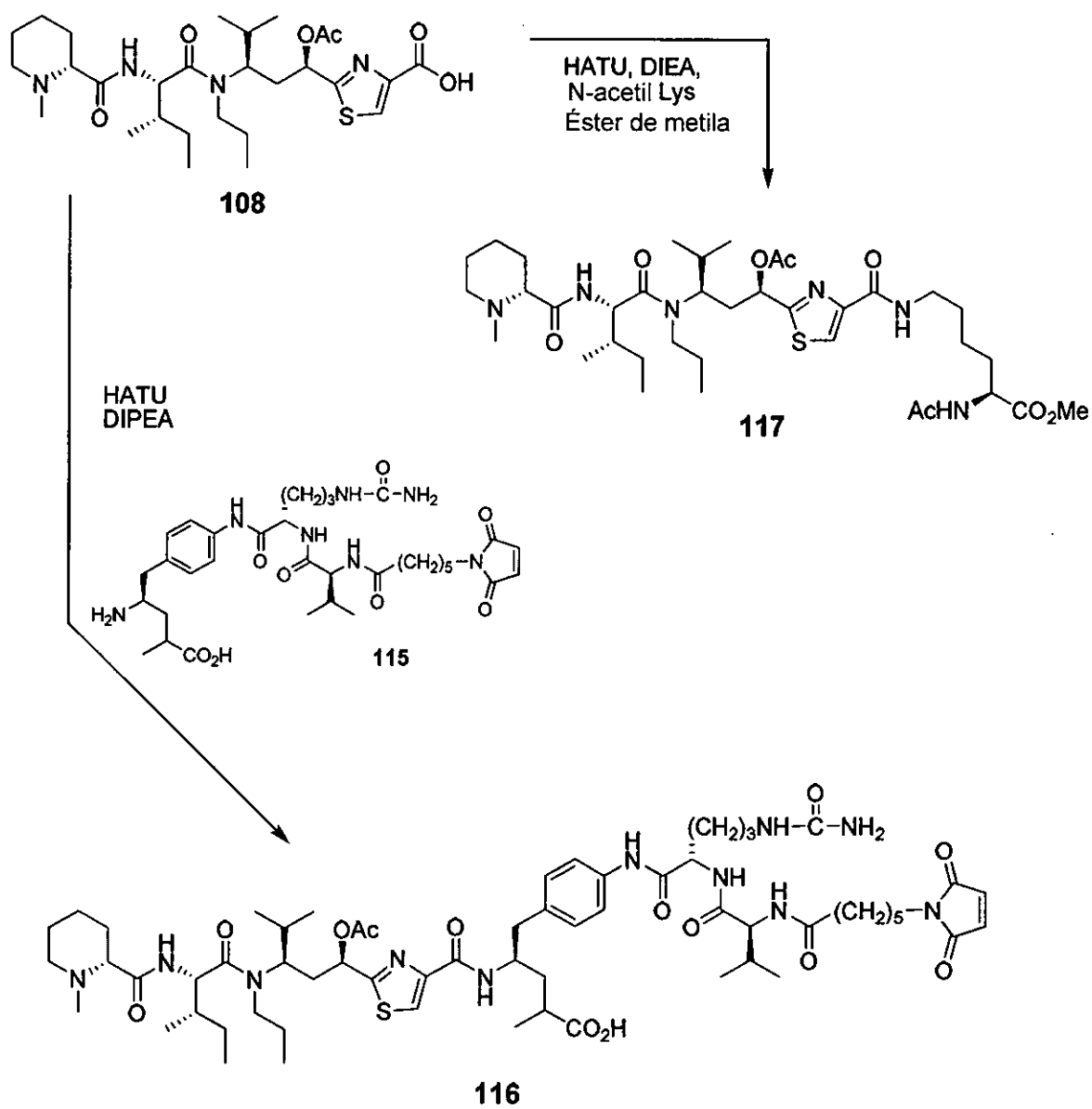


Fig. 21

Esquema 19

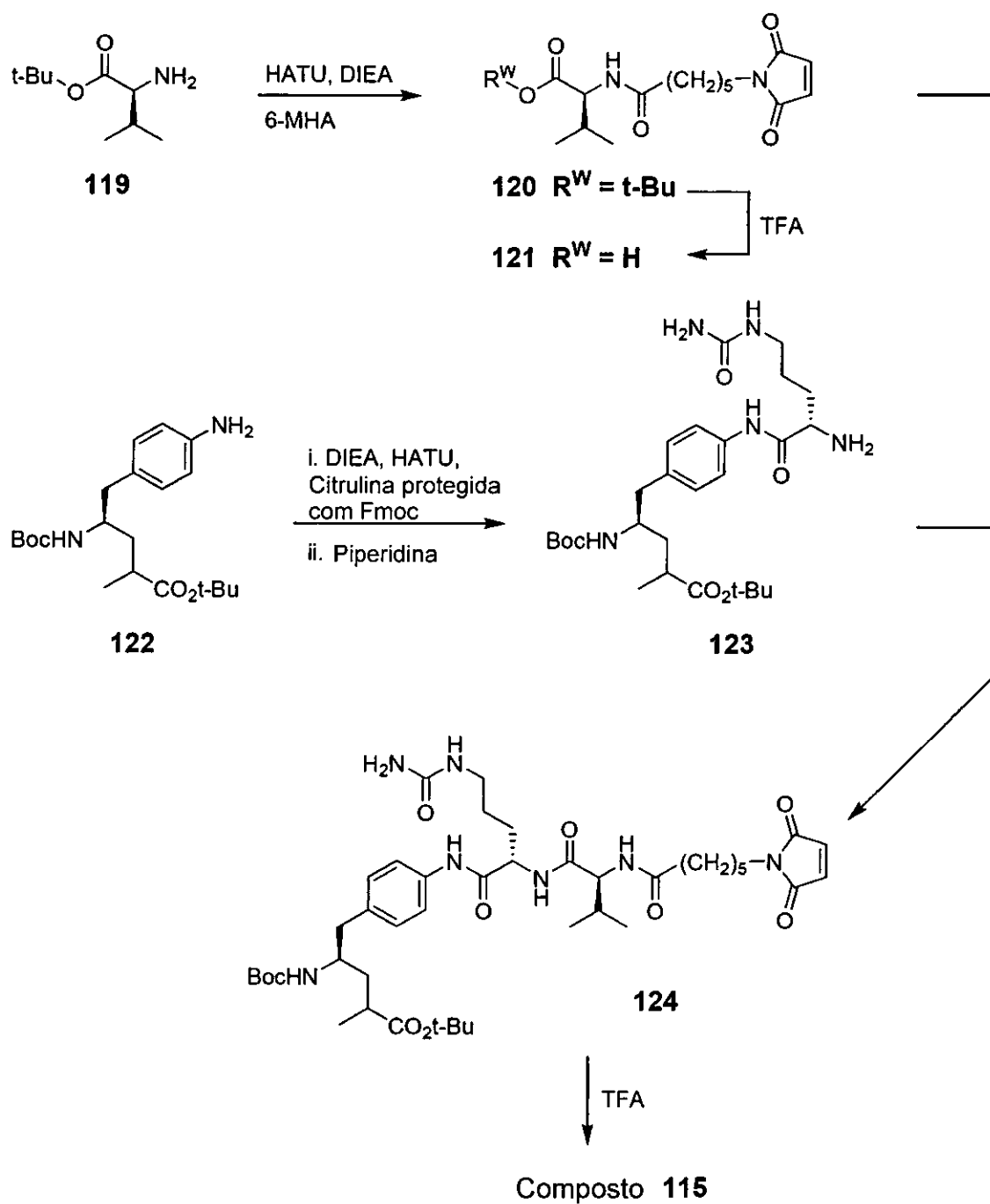


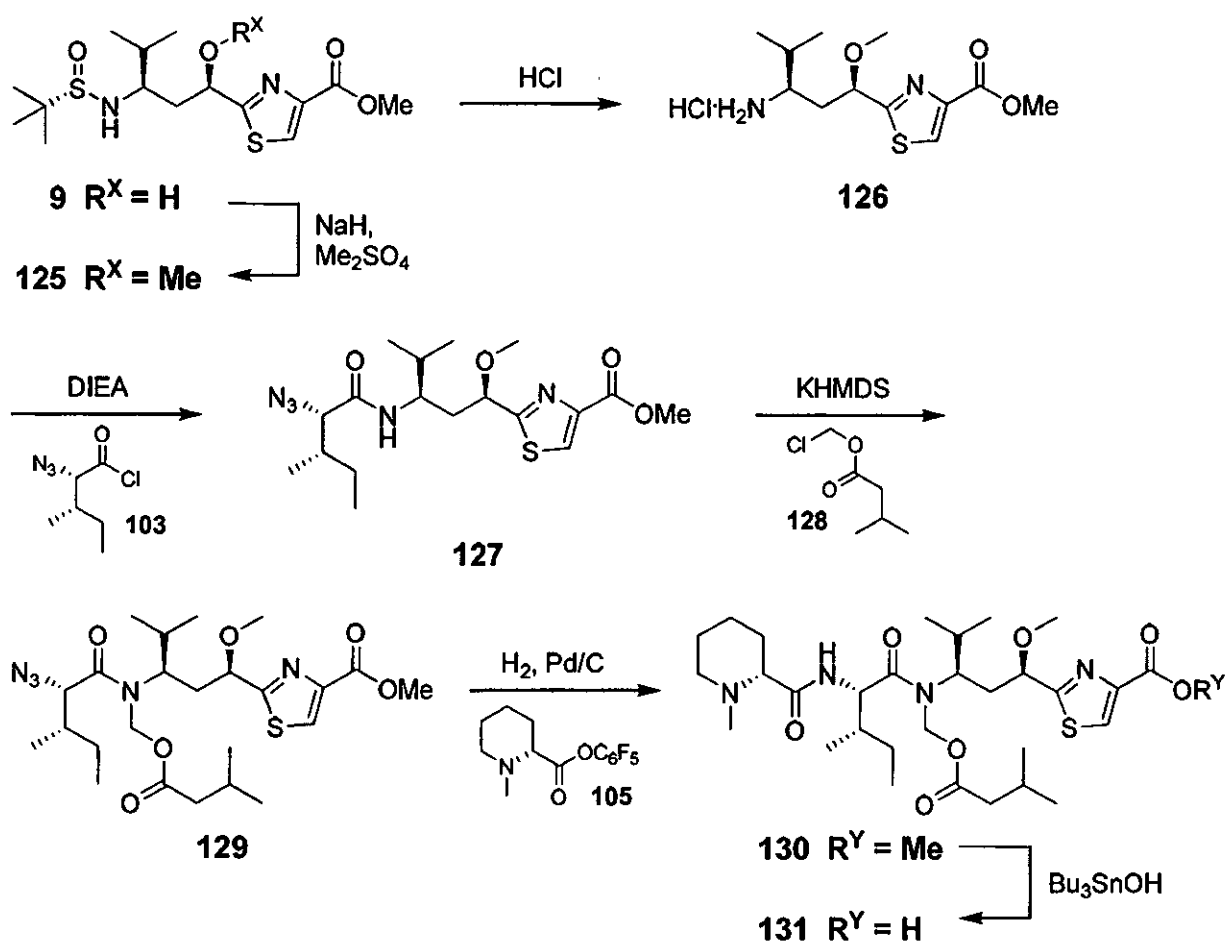
Fig. 22Esquema 20

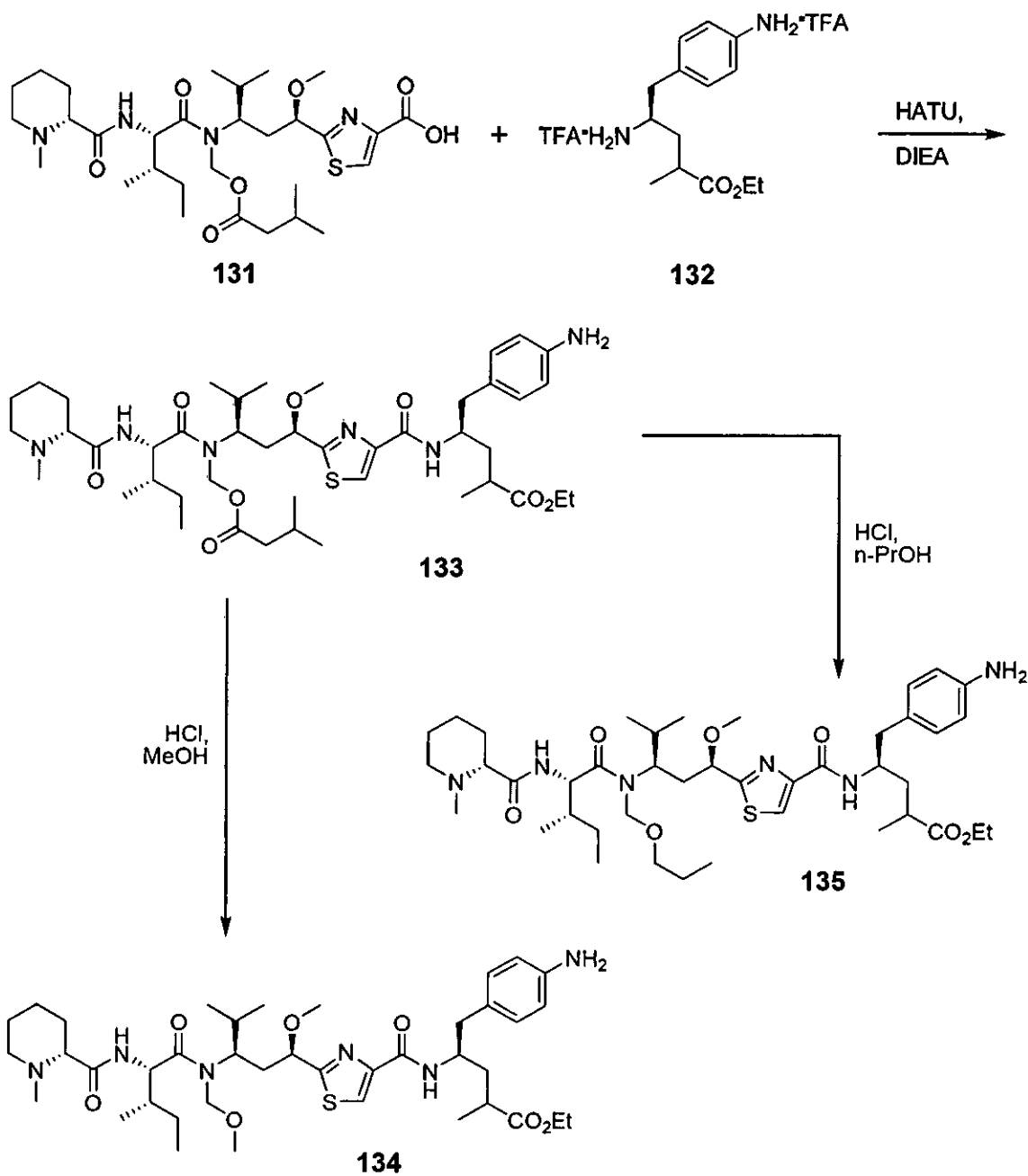
Fig. 23Esquema 21

Fig. 24

Esquema 22

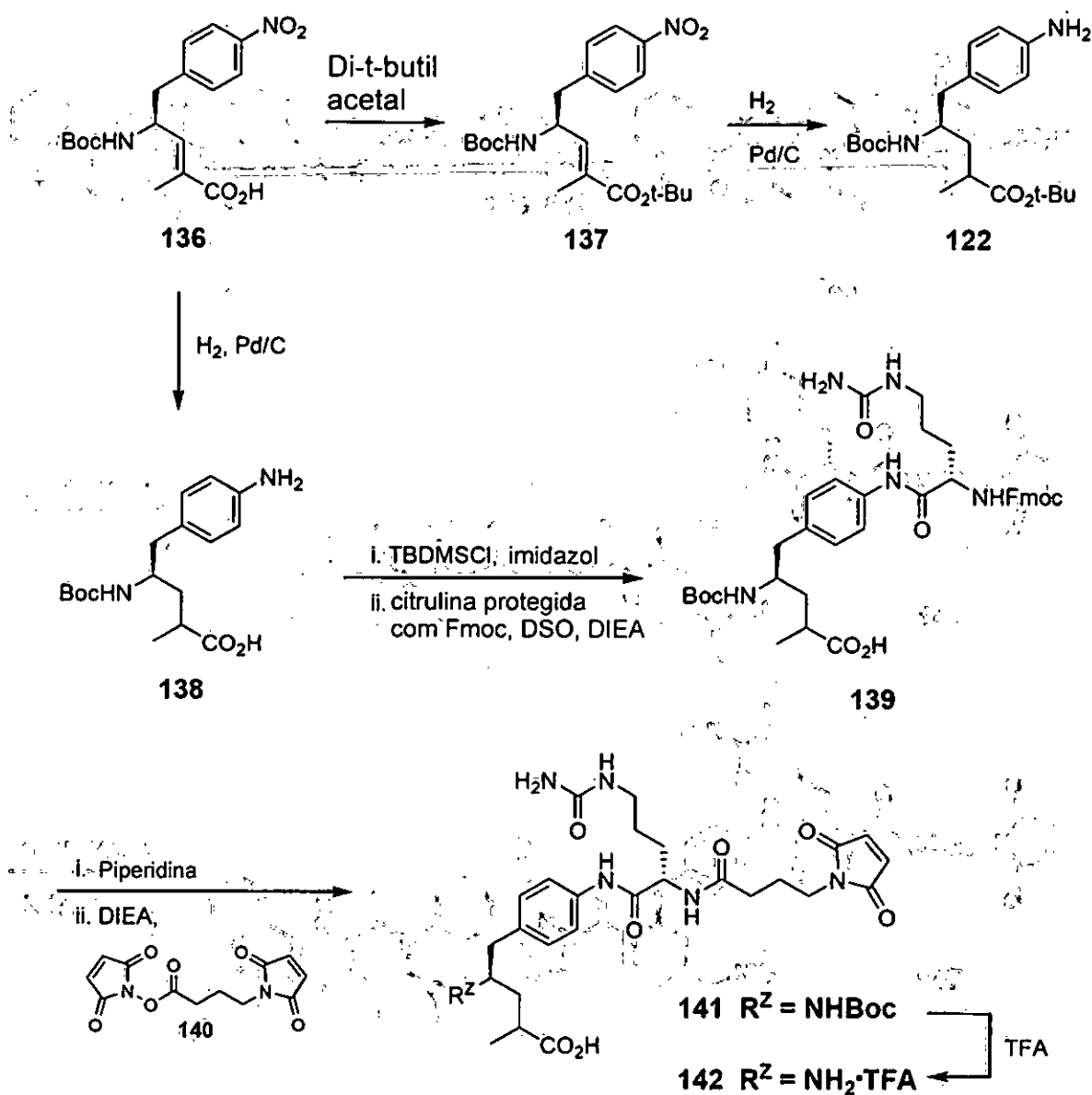
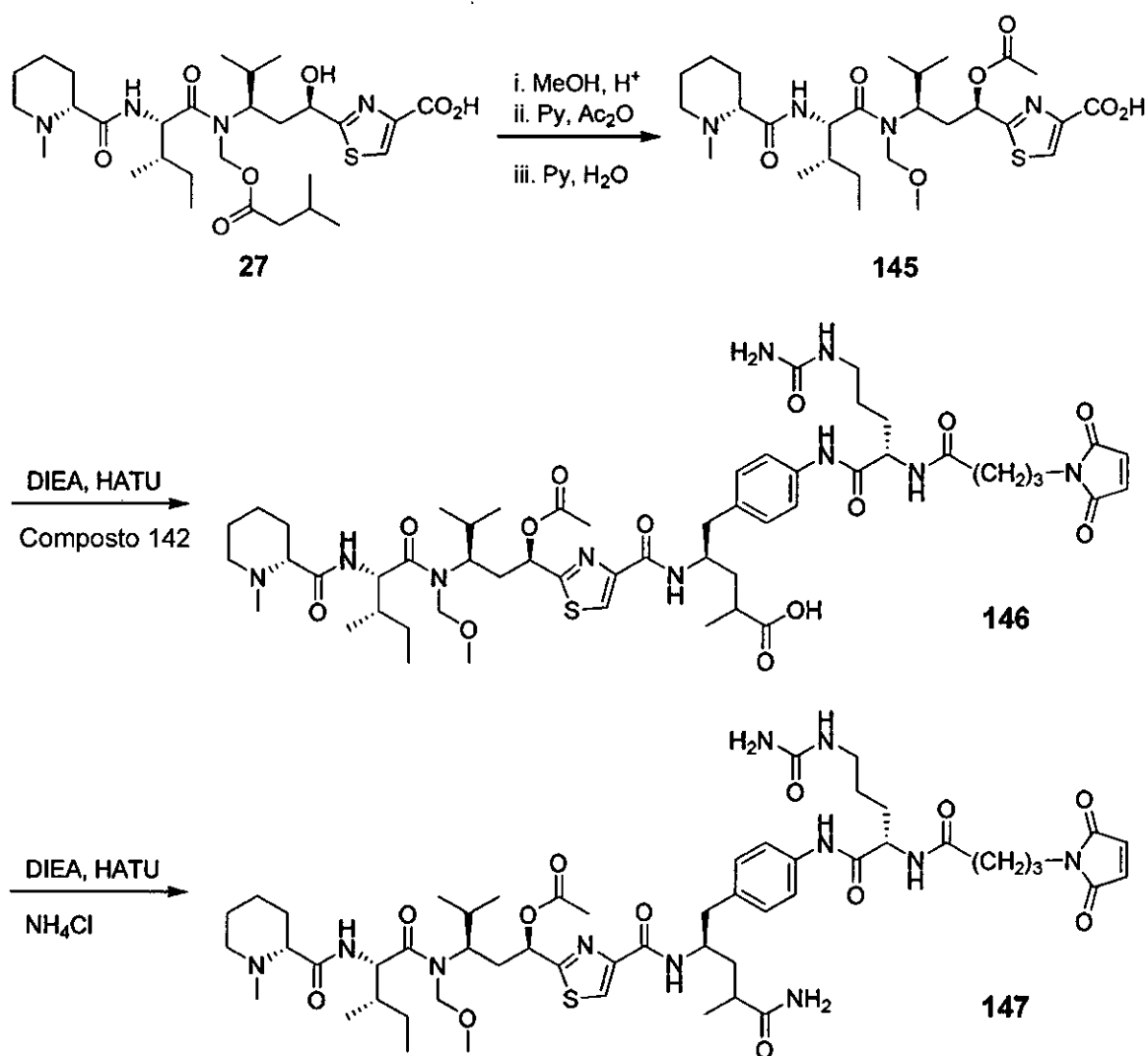
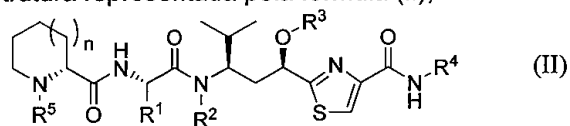


Fig. 25Esquema 23

RESUMO

Patente de Invenção: **"COMPOSTOS ANTIPROLIFERATIVOS, CONJUGADOS, COMPOSIÇÃO DE SUBSTÂNCIA E USO DOS MESMOS".**

A presente invenção refere-se a compostos antiproliferativos tendo uma estrutura representada pela fórmula (II),



onde n, R¹, R², R³, R⁴, e R⁵ são como definidos aqui, que podem ser usados para tratar tumores, opcionalmente quando conjugados com um ligante tal como um anticorpo.