



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

(21) BR 112020010691-7 A2



(22) Data do Depósito: 29/11/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 10/11/2020

(54) Título: CONJUGADOS DE FÁRMACO-ANTICORPO ANTI-CD40

(51) Int. Cl.: A61K 31/585; A61K 39/395; C07K 16/28.

(30) Prioridade Unionista: 01/12/2017 US 62/593,807; 05/12/2017 US 62/595,045.

(71) Depositante(es): ABBVIE INC..

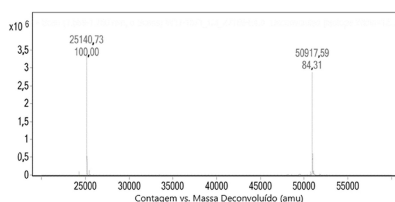
(72) Inventor(es): ADRIAN D. HOBSON; JASON Z. OH; MICHAEL J. MCPHERSON; WENDY WAEGELL; SHAUGHN H. BRYANT; AXEL HERNANDEZ JR; CLAIRE L. IHLE; CHRISTOPHER C. MARVIN; OLIVIA A. PERNG; LING C. SANTORA; LU WANG; LU WANG.

(86) Pedido PCT: PCT IB2018059480 de 29/11/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/106608 de 06/06/2019

(85) Data da Fase Nacional: 27/05/2020

(57) Resumo: Trata-se de conjugados de fármaco-anticorpo anti-CD40 que compreendem um radical de Fórmula (I), em que R1, R2 e R3 são como definidos neste documento. São ainda fornecidos conjugados de fármaco-anticorpo anti-CD40 de Fórmula (II), em que Z, R, AA1, AA2, AA3, m, p, q, n, w, R1, R2 e R3 são como definidos neste documento. Além disso, são fornecidas composições farmacêuticas e kits das mesmas, e métodos para usar as mesmas.



“CONJUGADOS DE FÁRMACO-ANTICORPO ANTI-CD40”

PEDIDOS RELACIONADOS

[001] O presente pedido reivindica prioridade ao Pedido Provisório nº US 62/593.807, depositado em 1 de dezembro de 2017, e Pedido Provisório nº US 62/595.045, depositado em 5 de dezembro de 2017, cujo conteúdo inteiro é incorporado ao presente documento a título de referência.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[002] O presente pedido contém uma Listagem de Sequências que foi enviada eletronicamente no formato ASCII e é, por meio deste documento, incorporada a título de referência em sua totalidade. A dita cópia ASCII, criada em 29 de novembro de 2018, é nomeada A103017_1480WO_SL.txt e tem 13.520 bytes de tamanho.

ANTECEDENTES

[003] O CD40 é uma proteína transmembrana do tipo I de 48 kDa (van Kooten, J. Leukoc Biol. 2000 Jan; 67 (1): 2 a 17) que é expressa em uma ampla gama de tipos de células hematopoiéticas (linfócitos, monócitos, dendríticos) e não hematopoiéticas (epitélio, endotélio, fibroblastos). O CD40 é um membro da família de receptores do fator de necrose tumoral (TNF) que desempenha um papel importante no desenvolvimento de células B, na ativação de linfócitos e na função da célula apresentadora de antígeno (APC).

[004] A via de sinalização CD40/CD40L tem sido implicada na patogênese de muitas doenças autoimunes, incluindo lúpus eritematoso sistêmico (LES), doença inflamatória intestinal (DII), esclerose múltipla, artrite reumatoide e síndrome de Sjogren (Law e Grewal, Adv Exp Med Biol. 2009; 647: 8 a 36). A expressão de CD40 é elevada em macrófagos, endotélio, epitélio e células B em tecidos danificados por autoimunidade crônica, incluindo rim, intestino e articulações (Borcherding, Am J Pathol. Abril de 2010; 176 (4): 1.816 a 1.827; Sawada-Hase, Am J. Gastroenterol. Junho de 2000; 95 (6): 1.516 a 1.523). O CD40L solúvel é elevado em indivíduos que

sofrem de LES, DII e síndrome de Sjogren, consistente com a carga inflamatória nesses indivíduos.

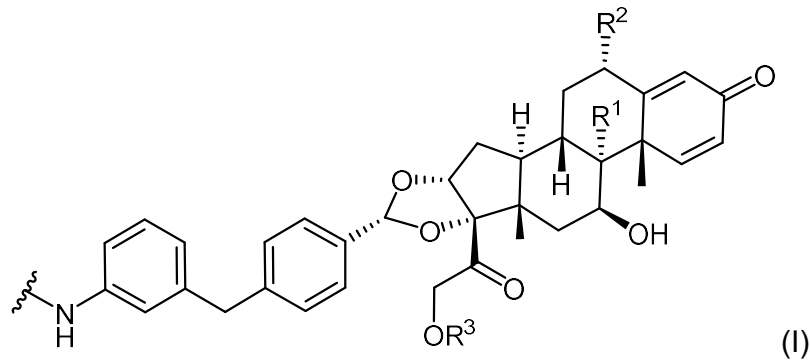
[005] Algumas das primeiras evidências da via CD40/CD40L na inflamação intestinal crônica vieram de modelos pré-clínicos em que os mAbs anti-CD40L protegiam os roedores da colite experimental (de Jong, *Gastroenterology*. Setembro de 2000; 119 (3): 715 a 723; Liu, *J. Immunol.* 1 de junho de 2000; 164 (11): 6.005 a 6.014; Stuber, *J Exp Med*, 1 de fevereiro de 1996, 183 (2): 693 a 698). A redução nos escores de atividade da doença foi associada à produção reduzida de citocinas pró-inflamatórias no intestino e à proteção contra a perda crônica de peso corporal. Resultados semelhantes foram observados em animais geneticamente deficientes para CD40 ou CD40L (de Jong, *Gastroenterology*. Setembro de 2000; 119 (3): 715 a 723). O tratamento de camundongos com mAbs anti-CD40L após o início da doença ainda é eficaz na redução da atividade da doença, sugerindo que essa via é crítica para a manutenção da doença inflamatória crônica. Além disso, os anticorpos agonistas de CD40 são suficientes para conduzir a inflamação intestinal em camundongos que não têm linfócitos (Uhlir, *Immunity*. Agosto de 2006; 25 (2): 309 a 318). Dados mais recentes usando o CD40 siRNA também apontam para um papel importante para a sinalização de CD40 na colite (Arranz, *J Control Release*. 10 de fevereiro de 2013; 165 (3): 163 a 172). Na doença de Crohn, os monócitos da lâmina própria e o epitélio expressam altos níveis de monócitos CD40 e CD40+ são enriquecidos no sangue periférico. Além disso, polimorfismos no locus *CD40* têm sido associados ao aumento da suscetibilidade à DII. Nos sujeitos de Crohn tratados com anticorpos anti-TNF, o perfil transcricional indica que os níveis de mRNA de CD40 diminuem em sujeitos com uma resposta adequada ao tratamento com fármacos. No entanto, em sujeitos com uma fraca resposta aos inibidores de TNF, os níveis de mRNA de CD40 permanecem inalterados, sugerindo que as vias dependentes de CD40 e independentes de TNF podem promover inflamação nesses indivíduos.

Estudos sugerem que a inibição da sinalização mediada por CD40 é importante na patogênese da DII, bem como em outras doenças autoimunes.

[006] Continua a existir uma necessidade, no entanto, de novos antagonistas de CD40 úteis no tratamento de várias condições inflamatórias e autoimunes.

SUMÁRIO

[007] Em um aspecto, a presente divulgação fornece um conjugado de anticorpo-fármaco que compreende: (a) um anticorpo anti-CD40 que compreende regiões determinantes de complementaridade (CDRs) como estabelecido como SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 e SEQ ID NO: 12; e (b) um radical de um agonista do receptor de glicocorticoide de Fórmula (I):



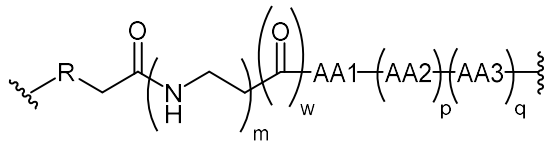
[008] em que:

[009] R¹ é hidrogênio ou flúor;

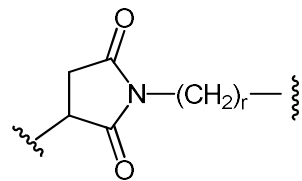
[010] R² é hidrogênio ou flúor; e

[011] R³ é hidrogênio ou -P(=O)(OH)₂;

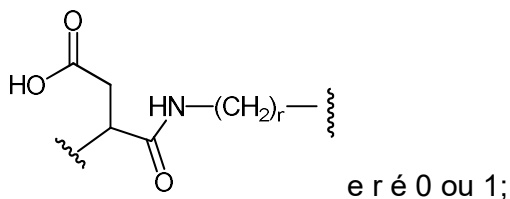
[012] ainda em que o anticorpo é conjugado com o agonista do receptor de glicocorticoide por meio de um ligante representado pela seguinte fórmula:



[013] em que R é uma ligação,



ou



[014] AA1, AA2 e AA3 são selecionados independentemente a partir do grupo que consiste em Alanina (Ala), Glicina (Gly), Isoleucina (Ile), Leucina (Leu), Prolina (Pro), Valina (Val), Fenilalanina (Phe), Triptofano (Trp), Tirosina (Tyr), Ácido aspártico (Asp), Ácido glutâmico (Glu), Arginina (Arg), Histidina (His), Lisina (Lys), Serina (Ser), Treonina (Thr), Cisteína (Cys), Metionina (Met), Asparagina (Asn) e Glutamina (Gln);

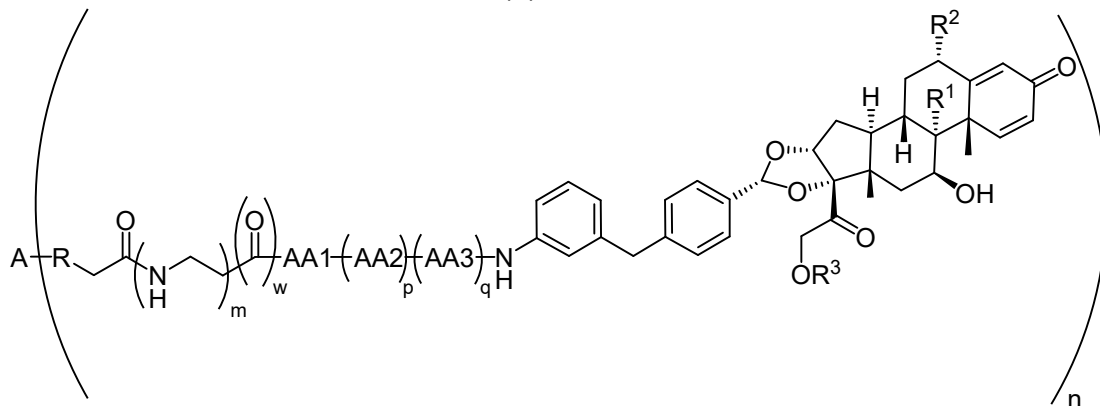
[015] m é 0 ou 1;

[016] w é 0 ou 1;

[017] p é 0 ou 1; e

[018] q é 0 ou 1.

[019] Em outra modalidade, a presente divulgação fornece um conjugado de anticorpo-fármaco de acordo com a Fórmula (II):



(II)

[020] em que A é o anticorpo anti-CD40 e n é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10.

[021] Em certas modalidades, n é 2, 4, 6 ou 8. Em certas modalidades, n é 2.

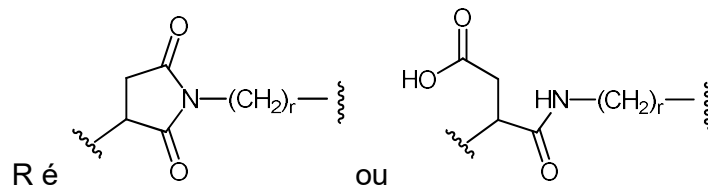
Em certas modalidades, n é 4.

[022] Em uma modalidade, a presente divulgação fornece um conjugado de anticorpo-fármaco de acordo com qualquer modalidade anterior, em que R¹ é

hidrogênio e R^2 é hidrogênio. Em uma modalidade, a presente divulgação fornece um conjugado de anticorpo-fármaco de acordo com qualquer modalidade anterior, em que R^1 é flúor e R^2 é hidrogênio. Em uma modalidade, a presente divulgação fornece um conjugado de anticorpo-fármaco de acordo com qualquer modalidade anterior, em que R^1 é flúor e R^2 é flúor. Em uma modalidade, a presente divulgação fornece um conjugado de anticorpo-fármaco, em que R^3 é $-P(=O)(OH)_2$. Em outra modalidade, a presente divulgação fornece um conjugado de anticorpo-fármaco, em que R^3 é hidrogênio.

[023] Em uma modalidade, a presente divulgação fornece um conjugado de anticorpo-fármaco de acordo com qualquer modalidade anterior, em que $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ é selecionado a partir do grupo que consiste em: $-Gly-Glu-$; $-Ala-Ala-$; $-Glu-Ala-Ala-$; $-Gly-Lys-$; $-Glu-$; $-Glu-Ser-Lys-$; e $-Gly-Ser-Lys-$. Em certas modalidades, $AA1-(AA2)_p-(AA3)_q$ é selecionado a partir do grupo que consiste em $-Gly-Glu-$; $-Gly-Lys-$; $-Glu-Ser-Lys-$; e $-Gly-Ser-Lys-$. Em certas modalidades, $AA1-(AA2)_p-(AA3)_q$ é $-Gly-Glu-$ ou $-Gly-Lys-$. Em certas modalidades, $AA1-(AA2)_p-(AA3)_q$ é $-Glu-Ser-Lys-$ ou $-Gly-Ser-Lys-$.

[024] Em uma modalidade, a presente divulgação fornece um conjugado de anticorpo-fármaco de acordo com qualquer modalidade anterior, em que m é 0; q é 0; e



[025] Em uma modalidade, a presente divulgação fornece um conjugado de anticorpo-fármaco de acordo com qualquer modalidade anterior, em que m é 0 ou 1; p é 1; e R é uma ligação.

[026] Em uma modalidade, a presente divulgação fornece um conjugado de anticorpo-fármaco de acordo com qualquer modalidade anterior, em que m é 1; w é 1;

e q é 0.

[027]Em uma modalidade, a presente divulgação fornece um conjugado de anticorpo-fármaco de acordo com qualquer modalidade anterior, em que m é 0.

[028]Em certas modalidades, a presente divulgação fornece um conjugado de anticorpo-fármaco de acordo com qualquer modalidade anterior, em que R é uma ligação, p é 1, m é 0, w é 0 e q é 0. Em certas modalidades, a presente divulgação fornece um conjugado de fármaco de anticorpo de acordo com qualquer modalidade anterior, em que R é uma ligação, p é 1, m é 0, w é 0 e q é 1.

[029]Em uma modalidade, a presente divulgação fornece um conjugado de anticorpo-fármaco de acordo com qualquer modalidade anterior, selecionado a partir do grupo que consiste em compostos listados na Tabela 5, em que n é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10. Em certas modalidades, n é 2, 4, 6 ou 8. Em certas modalidades, n é 2. Em certas modalidades, n é 4.

[030]Em uma modalidade, a presente divulgação fornece um conjugado de anticorpo-fármaco de acordo com qualquer modalidade anterior, selecionado a partir do grupo que consiste no Exemplo 4-conjugado, Exemplo 28-conjugado e Exemplo 47-conjugado. Em certas modalidades, a presente divulgação fornece um conjugado de anticorpo-fármaco de acordo com qualquer modalidade anterior, em que o conjugado de anticorpo-fármaco é o Exemplo 47-conjugado e em que n é 2. Em certas modalidades, a presente divulgação fornece um conjugado de anticorpo-fármaco de acordo com qualquer modalidade anterior, em que o conjugado de anticorpo-fármaco é o Exemplo 47-conjugado e em que n é 4. Em certas modalidades, a presente divulgação fornece um conjugado de anticorpo-fármaco de acordo com qualquer modalidade anterior, em que o conjugado de anticorpo-fármaco é o Exemplo 28-conjugado e em que n é 2. Em certas modalidades, a presente divulgação fornece um conjugado de anticorpo-fármaco de acordo com qualquer modalidade anterior, em que o conjugado de anticorpo-fármaco é o Exemplo 28-conjugado e em que n é 4.

[031]Em uma modalidade, a presente divulgação fornece um conjugado de anticorpo-fármaco de acordo com qualquer modalidade anterior, selecionado a partir do grupo que consiste em compostos listados na Tabela 6A ou 6B, em que n é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10. Em certas modalidades, n é 2, 4, 6 ou 8. Em certas modalidades, n é 2. Em certas modalidades, n é 4.

[032]Em uma modalidade, a presente divulgação fornece um conjugado de anticorpo-fármaco de acordo com qualquer modalidade anterior, selecionado a partir do grupo que consiste no Exemplo 6-conjugado, o Exemplo 6-hidrolisado, o Exemplo 7-conjugado, o Exemplo 7-hidrolisado, o Exemplo 12-conjugado, o Exemplo 12-hidrolisado, o Exemplo 13-conjugado e o Exemplo 13-hidrolisado.

[033]Em uma modalidade, a presente divulgação fornece um conjugado de anticorpo-fármaco de acordo com qualquer modalidade anterior, selecionado a partir do grupo que consiste no Exemplo 12-conjugado, o Exemplo 13-hidrolisado.

[034] Em certas modalidades, o anticorpo do conjugado de anticorpo-fármaco compreende uma região variável de cadeia pesada apresentada como SEQ ID NO: 5 e uma região variável de cadeia leve apresentada como SEQ ID NO: 6.

[035] Em certas modalidades, o anticorpo do conjugado de anticorpo-fármaco compreende uma cadeia pesada apresentada como SEQ ID NO: 3. Em certas modalidades, o anticorpo do conjugado de anticorpo-fármaco compreende uma cadeia leve apresentada como SEQ ID NO: 4. Em certas modalidades, o anticorpo do conjugado de anticorpo-fármaco compreende uma cadeia pesada apresentada como SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve apresentada como SEQ ID NO: 4.

[036]Em uma modalidade, a presente divulgação fornece uma composição farmacêutica que compreende o conjugado de anticorpo-fármaco de acordo com qualquer modalidade anterior e um carreador farmacêuticamente aceitável.

[037]Em uma modalidade, a presente divulgação fornece um método para tratar uma afecção selecionada a partir do grupo que consiste em doença inflamatória

intestinal (DII), lúpus eritematoso sistêmico (LES), esclerose múltipla, artrite reumatoide, síndrome de Sjogren e Hidradenite supurativa (HS), em um sujeito em necessidade do mesmo, que compreende administrar uma quantidade eficaz do conjugado de anticorpo-fármaco de acordo com qualquer modalidade anterior ou a composição farmacêutica de acordo com qualquer modalidade anterior para o sujeito.

[038]Em uma modalidade, a presente divulgação fornece um kit que compreende: (a) um recipiente compreendendo o conjugado de anticorpo-fármaco de acordo com qualquer modalidade anterior ou a composição farmacêutica de acordo com qualquer modalidade anterior; e (b) um rótulo ou bula ou associado a um ou mais recipientes, em que o rótulo ou a bula indica que o conjugado de anticorpo-fármaco ou composição farmacêutica é usado para tratar uma afecção selecionada a partir do grupo que consiste em doença inflamatória intestinal (DII), lúpus eritematoso sistêmico (LES), esclerose múltipla, artrite reumatoide, síndrome de Sjogren, e Hidradenite supurativa (HS).

[039]Em qualquer uma das modalidades anteriores, a IBD é colite ulcerosa (UC) ou doença de Crohn.

[040]Em uma modalidade, a presente divulgação fornece um método para entregar um agonista do receptor de glicocorticoide a uma célula que expressa CD40 que compreende a etapa de colocar a célula em contato com o conjugado de anticorpo-fármaco de acordo com qualquer modalidade anterior.

[041]Em uma modalidade, a presente divulgação fornece um método para determinar a atividade anti-inflamatória de um conjugado de anticorpo-fármaco que compreende: (a) colocar uma célula que expressa CD40 em contato com o conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com qualquer modalidade anterior; e (b) determinar a liberação reduzida de citocinas pró-inflamatórias da célula em comparação com uma célula de controle.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[042] A Figura 1A representa os dados de espectroscopia de massa deconvoluída, conforme fornecidos no Exemplo 2 da ADC, o Exemplo 4-conjugado (humano) (n = 4). O pico 25.140,73 corresponde à cadeia leve (SEQ ID NO: 4) com um conjugado de molécula ligante de fármaco. O pico 50.917,59 corresponde à cadeia pesada (SEQ ID NO: 3) com um conjugado de molécula ligante de fármaco.

[043] A Figura 1B representa os dados cromatográficos de troca aniônica (AEC), conforme fornecido no Exemplo 2 da ADC para o Exemplo 28-conjugado (humano) (n = 2), com tempo de retenção de cerca de 7,5 minutos.

[044] A Figura 1C representa os dados da espectroscopia de massa deconvoluída, conforme fornecido no Exemplo 2 da ADC do Exemplo 4-conjugado (humano) (n = 2). O pico 25.176,72 corresponde à cadeia leve (SEQ ID NO: 2) com um conjugado de molécula ligante de fármaco. O pico 50.954,63 corresponde à cadeia pesada (SEQ ID NO: 1) com um conjugado de molécula ligante de fármaco.

[045] A Figura 1D representa os dados cromatográficos de troca aniônica (AEC) conforme fornecidos no Exemplo 2 da ADC para o Exemplo 28-conjugado (humano) (n = 4), com tempo de retenção de cerca de 13 minutos.

[046] A Figura 1E representa os dados da espectroscopia de massa deconvoluída, conforme fornecido no Exemplo 2 da ADC do Exemplo 4-conjugado (humano) (n = 4). O pico 25.176,88 corresponde à cadeia leve (SEQ ID NO: 2) com um conjugado de molécula ligante de fármaco. O pico 50.954,80 corresponde à cadeia pesada (SEQ ID NO: 1) com um conjugado de molécula ligante de fármaco.

[047] A Figura 2 representa a atividade *in vitro* de ADCs de CD40 anti-humano no ensaio MoDC humano estimulado por LPS e CD40L, conforme descrito no Exemplo C. Os dados na Figura 2 demonstram que a capacidade máxima de inibir a ativação de células imunes por qualquer um dos dois compostos ADC testados excedem a inibição fornecida pelo anticorpo antagonista parental.

[048] A Figura 3 representa a atividade *in vitro* de ADC de CD40 anti-

camundongo no ensaio de BMDC murino estimulado por LPS e CD40L, conforme descrito no Exemplo D. Os resultados mostrados na Figura 3 demonstram que a capacidade máxima de inibir a ativação de células imunes pelo Exemplo 6-hidrolisado (camundongo) excede a inibição fornecida pelo anticorpo antagonista de parental.

[049] A Figura 4 representa a atividade *in vivo* do Exemplo 6-hidrolisado (camundongo) (n = 4) na inflamação aguda induzida por LPS, como descrito no Exemplo E. Os resultados mostrados na Figura 4 demonstram que o ADC de CD40 exibe maior eficácia na supressão da ativação de DC *in vivo* do que o anticorpo antagonista parental ou isótipo ADC.

[050] A Figura 5A representa a atividade *in vivo* de um ADC de CD40 anti-camundongo (Exemplo 12-hidrolisado (camundongo)) na resposta DTH, e a Figura 5B representa a atividade *in vivo* de um ADC de CD40 anti-camundongo (Exemplo 28-conjugado (camundongo)) na resposta de DTH, como descrito no Exemplo F. Os dados nas Figura 5A e 5B demonstram a eficácia aprimorada de ADC de CD40 para inibir mais potentemente a inflamação mediada por células T *in vivo* do que o anticorpo antagonista parental ou o ADC não alvejado sozinho.

[051] A Figura 6 representa a atividade *in vivo* de ADCs de CD40 anti-camundongo na artrite induzida por colágeno (CIA), como descrito no Exemplo H. Os dados na Figura 6 demonstram que uma dose única de ADC esteroide CD40 anti-camundongo pode exibir uma duração prolongada ação através da melhoria do inchaço da pata por aproximadamente 6 semanas em comparação com os controles 1 e 2.

DEFINIÇÕES

[052] Os termos "CD40 humano" e "tipo selvagem de CD40 humano" (abreviado neste documento como hCD40, hCD40wt), como utilizados neste documento, se referem a uma proteína transmembrana do tipo I. Em uma modalidade, o termo CD40 humano é destinado a incluir CD40 humano recombinante (rhCD40),

que pode ser preparado por métodos de expressão recombinante convencionais. A Tabela 1 fornece a sequência de aminoácidos do CD40 humano (isto é, SEQ ID NO. 1) e domínio extracelular do mesmo (isto é, SEQ ID NO: 2).

Tabela 1. Sequência de CD40 humano	
Proteína	Sequência
CD40 humano	MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSL CQPGQKLVSDCTEFTETECLPCGESEFLDTWNRETHCHQ HKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEHWHCTSEACES CVLHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFE KCHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVCQPQDRLRALVIP IIFGILFAILLVLVFIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDL GSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ (SEQ ID NO: 1)
Domínio extracelular de CD40 humano	EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECL PCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSET DTICTCEEHWHCTSEACESCV (SEQ ID NO: 2)

[053] O termo "anticorpo", como utilizado neste documento, é destinado a se referir a moléculas de imunoglobulina compostas por quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interconectadas por ligações dissulfeto. Cada cadeia pesada é composta por uma região variável da cadeia pesada (abreviada neste documento como HCVR ou VH) e uma região constante da cadeia pesada. A região constante da cadeia pesada é composta por três domínios, CH1, CH2 e CH3. Cada cadeia leve é composta por uma região variável da cadeia leve (abreviada neste documento como LCVR ou VL) e uma região constante da cadeia leve. A região constante da cadeia leve é composta por um domínio, CL. As regiões VH e VL podem ser subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões determinantes de complementaridade (CDR), intercaladas com regiões mais conservadas, denominadas regiões estruturais (FR). Cada VH e VL é composto por três CDRs e quatro FRs, dispostos do terminal amino ao terminal carbóxi na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

[054] O termo "porção de ligação ao antígeno" de um anticorpo (ou simplesmente "porção do anticorpo"), como utilizado neste documento, se refere a um

ou mais fragmentos de um anticorpo que retêm a capacidade de se ligar especificamente a um antígeno (por exemplo, $TNF\alpha$). Foi demonstrado que a função de ligação ao antígeno de um anticorpo pode ser realizada por fragmentos de um anticorpo de comprimento total. Exemplos de fragmentos de ligação abrangidos pelo termo "porção de ligação ao antígeno" de um anticorpo incluem (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente que consiste nos domínios VL, VH, CL e CH1; (ii) um fragmento $F(ab')_2$, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte dissulfeto na região de dobradiça; (iii) um fragmento Fd que consiste nos domínios VH e CH1; (iv) um fragmento Fv consistindo nos domínios VL e VH de um único braço de um anticorpo, (v) um fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544 a 546), que consiste em um domínio VH; e (vi) uma região determinante de complementaridade isolada (CDR). Além disso, embora os dois domínios do fragmento Fv, VL e VH, sejam codificados por genes separados, os mesmos podem ser unidos, usando métodos recombinantes, por um ligante sintético que permite que sejam produzidos como uma única cadeia proteica na qual o VL e as regiões VH se emparelham para formar moléculas monovalentes (conhecidas como Fv de cadeia única (scFv); consultar, por exemplo, Bird et al. (1988) Science 242: 423 a 426; e Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 85: 5.879 a 5.883). Tais anticorpos de cadeia única também se destinam a ser abrangidos pelo termo "porção de ligação ao antígeno" de um anticorpo. Outras formas de anticorpos de cadeia única, como diacorpos, também estão incluídas. Os diacorpos são anticorpos bivalentes e biespecíficos nos quais os domínios VH e VL são expressos em uma única cadeia polipeptídica, mas usando um ligante muito curto para permitir o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia, forçando, dessa forma, os domínios a parear com domínios complementares de outra cadeia e criando dois locais de ligação ao antígeno (consultar, por exemplo, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 90: 6.444 a 6.448; Poljak, RJ, et al. (1994) Estrutura 2: 1.121 a 1.123).

[055] Uma "região variável" de um anticorpo se refere à região variável da cadeia leve do anticorpo ou à região variável da cadeia pesada do anticorpo, isoladamente ou em combinação. As regiões variáveis da cadeia pesada e leve têm quatro regiões estruturais (FR) e três regiões determinantes de complementaridade (CDRs) também conhecidas como regiões hipervariáveis. As CDRs contribuem para a formação do local de ligação ao antígeno dos anticorpos. Existem pelo menos duas técnicas para determinar as CDRs: (1) uma abordagem baseada na variabilidade de sequência entre espécies (por exemplo, Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, (5ª ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)); e (2) uma abordagem baseada em estudos cristalográficos de complexos antígeno-anticorpo (Al-lazikani et al (1997) *J. Molec. Biol.* 273: 927 a 948)). Além disso, as combinações dessas duas abordagens são, algumas vezes, usadas na técnica para determinar CDRs.

[056] Os termos "idêntico" ou porcentagem "de identidade" no contexto de dois ou mais ácidos nucleicos ou polipeptídeos se referem a duas ou mais sequências ou subsequências iguais ou com uma porcentagem especificada de nucleotídeos ou resíduos de aminoácidos iguais, quando comparados e alinhados (introdução de lacunas, se necessário) para correspondência máxima, sem considerar nenhuma substituição conservadora de aminoácidos como parte da identidade da sequência. A porcentagem de identidade pode ser medida usando software ou algoritmos de comparação de sequência ou por inspeção visual. Vários algoritmos e software são conhecidos na técnica que podem ser usados para obter alinhamentos de sequências de aminoácidos ou nucleotídeos. Um exemplo não limitante de um algoritmo de alinhamento de sequência é o algoritmo descrito em Karlin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 2.264 a 2.268 (1990), como modificado em Karlin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 5.873 a 5.877 (1993), e incorporado nos programas NBLAST e XBLAST (Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*, 25: 3.389 a 3.402 (1991)). Em certas modalidades, a

identidade percentual "X" de uma primeira sequência de aminoácidos com uma segunda sequência de aminoácidos é calculada como $100 \times (Y/Z)$, em que Y é o número de resíduos de aminoácidos pontuados como correspondências idênticas no alinhamento da primeira e da segunda sequências (conforme alinhadas por inspeção visual ou um programa de alinhamento de sequência específico) e Z é o número total de resíduos na segunda sequência. Se o comprimento de uma primeira sequência for maior que a segunda, a porcentagem de identidade da primeira sequência para a segunda sequência será maior que a porcentagem de identidade da segunda sequência para a primeira sequência.

[057] Como um exemplo não limitante, se algum polinucleotídeo específico tem uma certa identidade de sequência percentual (por exemplo, é pelo menos 80% idêntico, pelo menos 85% idêntico, pelo menos 90% idêntico e, em algumas modalidades, pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntico) a uma sequência de referência pode, em certas modalidades, ser determinado usando o programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versão 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). O Bestfit usa o algoritmo de homologia local de Smith e Waterman (*Advances in Applied Mathematics* 2: 482 a 489 (1981)) para encontrar o melhor segmento de homologia entre duas sequências. Ao usar o Bestfit ou qualquer outro programa de alinhamento de sequência para determinar se uma sequência específica é, por exemplo, 95% idêntica a uma sequência de referência de acordo com a presente divulgação, os parâmetros são definidos de modo que a porcentagem de identidade seja calculada ao longo de todo o comprimento da sequência de nucleotídeos de referência e que são permitidas lacunas na homologia de até 5% do número total de nucleotídeos na sequência de referência.

[058] Em algumas modalidades, dois ácidos nucleicos ou polipeptídeos são substancialmente idênticos, o que significa que têm pelo menos 70%, pelo menos

75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90% e, em algumas modalidades, pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidade de nucleotídeo ou resíduo de aminoácido, quando comparados e alinhados para a correspondência máxima, conforme medido usando um algoritmo de comparação de sequência ou por inspeção visual. A identidade pode existir sobre uma região das sequências que tem pelo menos cerca de 10, cerca de 20, cerca de 40 a 60 resíduos de comprimento ou qualquer valor integral entre as mesmas e pode estar acima de uma região maior que 60 a 80 resíduos, por exemplo, em pelo menos cerca de 90 a 100 resíduos, e em algumas modalidades, as sequências são substancialmente idênticas ao longo de todo o comprimento das sequências sendo comparadas, como a região de codificação de uma sequência de nucleotídeos, por exemplo.

[059]Uma "substituição conservadora de aminoácidos" é aquela em que um resíduo de aminoácido é substituído por outro resíduo de aminoácido com uma cadeia lateral semelhante. Famílias de resíduos de aminoácidos com cadeias laterais semelhantes foram definidas na técnica, incluindo cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais não polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais ramificadas beta (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Por exemplo, a substituição de uma fenilalanina por uma tirosina é uma substituição conservadora. Em algumas modalidades, substituições conservadoras nas sequências dos polipeptídeos e anticorpos da divulgação não revogam a ligação do anticorpo que contém a sequência de aminoácidos ao antígeno (ou antígenos), por exemplo, o CD40 ao qual o anticorpo se liga. Os métodos para identificar substituições conservadoras de nucleotídeos e aminoácidos que não

eliminam a ligação ao antígeno são bem conhecidos na técnica (consultar, por exemplo, Brummell et al., *Biochem.* 32: 1.180 a 1.187 (1993); Kobayashi et al., *Protein Eng.* 12 (10): 879 a 884 (1999); e Burks et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 412 a 417 (1997)).

[060] "Afinidade de ligação" geralmente se refere à força da soma total de interações não covalentes entre um único local de ligação de uma molécula (por exemplo, um anticorpo ou porção de ligação ao antígeno do mesmo) e parceiro de ligação do mesmo (por exemplo, um antígeno). Salvo indicação em contrário, como utilizado neste documento, "afinidade de ligação" se refere a afinidade de ligação intrínseca que reflete uma interação 1:1 entre membros de um par de ligação (por exemplo, anticorpo e antígeno). A afinidade de uma molécula X para o parceiro Y da mesma pode geralmente ser representada pela constante de dissociação (Kd). A afinidade pode ser medida por métodos comuns conhecidos na técnica. Anticorpos de baixa afinidade geralmente se ligam ao antígeno lentamente e tendem a se dissociar rapidamente, enquanto anticorpos de alta afinidade geralmente se ligam ao antígeno mais rapidamente e tendem a permanecer ligados por mais tempo. Uma variedade de métodos para medir a afinidade de ligação é conhecida na técnica.

[061] O termo "antagonista", conforme usado neste documento, se refere a um anticorpo ou porção de ligação ao antígeno do mesmo que bloqueia ou reduz a atividade biológica ou imunológica do CD40 humano (hCD40). Um anticorpo antagonista, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, do hCD40 pode, por exemplo, inibir a regulação positiva de CD86 de células B humanas primárias que são cultivadas com (ou expostas a) CD40L (como cultivar as células B com células T humanas que expressam CD40L). Em uma modalidade, um anticorpo antagonista anti-CD40, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, que é substancialmente livre de atividade agonista é definido como tendo um nível de atividade que é equivalente a ou dentro de um desvio padrão de um controle negativo em um teste agonista, como

o ensaio de monócitos agonistas descrito no Exemplo 7 da Publicação PCT nº WO 2016/196314. A atividade agonista e antagonista também pode ser avaliada usando métodos conhecidos na técnica, por exemplo, usando uma linha celular repórter que expressa CD40 expressando CD40 humano ligado à fosfatase alcalina (AP) mediada por NFkB ou um ensaio de células B.

[062] Um "radical de um glicocorticosteroide" é derivado da remoção de um átomo de hidrogênio de um grupo amino de um glicocorticosteroide original. A remoção do átomo de hidrogênio facilita a ligação do glicocorticosteroide parental a um ligante.

[063] O termo "carga de fármacos" e "razão de anticorpos de fármacos" (DAR) são usados neste documento de forma intercambiável e se referem ao número de radicais glicocorticosteroides conectados, através de um ligante, a um anticorpo. A "carga de fármaco" ou "razão de anticorpos de fármacos" (DAR) de um conjugado de fármaco de anticorpo que compreende um radical de Fórmula (I) ou um conjugado de fármaco de anticorpo de Fórmula (II), por exemplo, e que representa um ADC individual, se refere ao número de moléculas de glicocorticosteroides ligadas ao anticorpo individual (por exemplo, carga de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 ou variável n é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10, respectivamente) ("composto DAR"). Além disso, a razão de anticorpos de fármacos (DAR) de uma população de conjugados de fármacos de anticorpos (por exemplo, fornecida em uma composição ou fração coletada) se refere a um número médio de moléculas de glicocorticosteroides ligadas a um anticorpo na população em questão, por exemplo, carga de fármacos ou n como um número inteiro ou fração de 1 a $10 \pm 0,5$, $\pm 0,4$, $\pm 0,3$, $\pm 0,2$ ou $\pm 0,1$ ("população DAR").

[064] O termo "sujeito" se refere a qualquer animal (por exemplo, um mamífero), incluindo, entre outros, seres humanos, primatas não humanos, roedores e similares, que deve receber um tratamento específico.

[065] Uma "quantidade eficaz" de um conjugado de anticorpo-fármaco, como divulgado neste documento, é uma quantidade suficiente para realizar um propósito especificamente declarado. Um "valor efetivo" pode ser determinado em relação ao objetivo declarado.

[066] O termo "quantidade terapeuticamente eficaz" se refere a uma quantidade de um conjugado de anticorpo-fármaco eficaz para "tratar" uma doença ou distúrbio em um sujeito ou mamífero. Uma "quantidade profilaticamente eficaz" se refere a uma quantidade eficaz para alcançar o resultado profilático desejado.

[067] Termos como "que trata" ou "tratamento" ou "tratar" ou "que alivia" ou "aliviar" se referem a medidas terapêuticas que curam, desaceleram, diminuem um ou mais sintomas e/ou retardam ou interrompem a progressão de um condição ou distúrbio patológico diagnosticado ("tratamento terapêutico"). Assim, aqueles que precisam de tratamento terapêutico incluem aqueles já diagnosticados ou com suspeita de ter o distúrbio. Medidas profiláticas ou preventivas se referem a medidas que impedem o desenvolvimento de uma condição ou distúrbio patológico direcionado ("tratamento profilático"). Assim, aqueles que precisam de tratamento profilático incluem aqueles propensos a ter o distúrbio e aqueles em quem o distúrbio deve ser prevenido.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[068] A presente divulgação fornece conjugados de anticorpo-fármaco (ADCs) compreendendo um agonista do receptor de glicocorticoide ligado a um anticorpo anti-CD40.

[069] Nas doenças inflamatórias intestinais, como a Doença de Crohn e a colite ulcerosa, a perda da integridade da barreira intestinal permite que bactérias comensais invadam a mucosa intestinal. A resposta imune do hospedeiro correspondente resulta em inflamação exacerbada. A ativação microbiana das células imunes pode ocorrer independentemente da sinalização de CD40 e, portanto,

permaneceria não afetada pelo tratamento com um antagonista anti-CD40, como o Ab-102, limitando sua eficácia. No entanto, um agonista do receptor glicocorticoide ligado ao anticorpo anti-CD40 não apenas bloqueia a ativação mediada por CD40, mas, após a internalização e liberação de sua carga útil de agonista do receptor glicocorticoide, também inibe a sinalização inflamatória de moléculas derivadas de micróbios por meio de receptores do tipo Toll (TLRs). Esse mecanismo duplo exibia resposta inibitória máxima contra células inflamatórias ativadas, resultando em eficácia aprimorada em comparação com um antagonista anti-CD40 isolado.

[070] Os dados do Exemplo C, e como fornecidos na Figura 2 e Tabela 18, confirmam esta hipótese. As células dendríticas derivadas de monócitos semiaderentes (derivadas de células mononucleares do sangue periférico humano primário) foram pré-estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) para induzir a regulação positiva da expressão de CD40 na superfície celular. Após lavagem e pré-tratamento apenas com anticorpo anti-CD40 (Controle 1) versus uma seleção de CDC anti-CD40 humanas, as células foram ativadas com LPS e/ou CD40L e quantificada a secreção da citocina pró-inflamatória IL-6. Os dados demonstram que, enquanto o anticorpo anti-CD40 sozinho (Controle 1) suprime parcialmente a sinalização inflamatória, os CDC anti-CD40 humanos testados suprimem completamente a sinalização inflamatória adicional, independente de CD40 (ou seja, para atingir o nível anterior à pré-estimulação por LPS (linha pontilhada)).

I. ANTICORPO ANTI-CD40

[071] Os termos "anticorpo anti-CD40" e "porção de ligação ao antígeno anti-CD40" se referem a um anticorpo completo e a uma porção de ligação ao antígeno, respectivamente, que é um antagonista do CD40 humano. A sequência completa de aminoácidos para CD40 humano é fornecida na Tabela 1, SEQ ID NO: 1. O domínio extracelular do CD40 humano contém aminoácidos e é fornecido na Tabela 1, SEQ ID NO: 2.

[072] Em uma modalidade, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, é um anticorpo antagonista, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, que causa uma diminuição na atividade ou função de CD40 em comparação com a atividade ou função de CD40 na ausência do anticorpo ou na ligação de antígeno porção do mesmo. Em modalidades particulares, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, está substancialmente livre de atividade agonista, ou seja, o anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, não causa um aumento na magnitude da atividade ou função de CD40 em comparação com a atividade ou atividade de CD40 função na ausência do anticorpo, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 é um anticorpo policlonal, anticorpo monoclonal, anticorpo quimérico, anticorpo humanizado, anticorpo humano ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo.

[073] Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 é lucatumumab (Novartis; como descrito na Patente nº US 8277810); anticorpos 5D12, 3A8 e 3C6, ou versões humanizadas dos mesmos (Novartis; como descrito na Patente nº US 5874082); anticorpo 15B8 (Novartis; como descrito na Patente nº US 7445780); anticorpo 4D11 (Kyowa Hakko Kirin; como descrito na Patente nº US 7193064); temeliximab (Bristol Myers Squibb; como descrito na Patente US No. 6051228); anticorpo PG102 (PanGenetics; como descrito na Patente nº US 8669352); anticorpo 2C10 (Primatepe; Pub. de Pedido de Patente nº US 20140093497); anticorpos anti-CD40 descritos nas Patentes nº US 8591900 e 8778345 (Boehringer Ingelheim); anticorpos anti-CD40 descritos na Patente nº US 5801227 (Amgen); ou APX005 (Boehringer Ingelheim; como descrito na Pub. de Pedido de Patente nº US 20120301488).

[074] Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 compreende regiões determinantes de complementaridade (CDRs), conforme estabelecido na SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, e SEQ ID NO: 12.

[075] Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 compreende uma região variável da cadeia pesada apresentada como SEQ ID NO: 5. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 compreende uma região variável da cadeia leve apresentada como SEQ ID NO: 6. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 compreende uma região variável da cadeia pesada apresentada como SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia leve apresentada como SEQ ID NO: 6.

[076] Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 compreende uma cadeia pesada apresentada como SEQ ID NO: 3. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 compreende uma cadeia leve apresentada como SEQ ID NO: 4. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 é o anticorpo de comprimento completo, Ab102, descrito na Publicação dos EUA No. 2016/0347850, e que compreende uma cadeia pesada definida como SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve definida como SEQ ID NO: 4 (regiões CDR em negrito; regiões constantes sublinhado).

Tabela 3: sequência de anticorpos anti-CD40 (Ab102)	
Região de Anticorpo	Sequência de Aminoácidos
Humano Ab102-HC (Cadeia pesada)	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMN</u> <u>WVRQAPGKGLEWIAYISSGRGNIYYADTVKGRFTISR</u> <u>DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWG YFDVWG</u> <u>QGTTTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC</u> <u>LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLY</u> <u>SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEP</u> <u>KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDQLMI</u> <u>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK</u> <u>TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV</u> <u>NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN</u> <u>QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV</u> <u>LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALH</u> <u>NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 3)</u>
Humano Ab102-LC (Cadeia leve)	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLRGNQKN</u> <u>YLTWFQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGS</u> <u>GTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGQGTKL</u> <u>EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPR</u> <u>EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS</u> <u>TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE</u> <u>C (SEQ ID NO: 4)</u>

Região variável da cadeia pesada	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMN WVRQAPGKGLEWIAYISSGRGNIYYADTVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGYFDVWG QGTTVTVSS (SEQ ID NO: 5)
Região variável da cadeia leve	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLRGNQKN YLTWFQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGS GTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGQGTKL EIK (SEQ ID NO: 6)
VH-CDR1	GFTFSDYGMN (SEQ ID NO: 7)
VH-CDR2	YISSGRGNIYYADTVKG (SEQ ID NO: 8)
VH-CDR3	SWGYFDV (SEQ ID NO: 9)
VL-CDR1	KSSQSLNLRGNQKNYLT (SEQ ID NO: 10)
VL-CDR2	WASTRES (SEQ ID NO: 11)
VL-CDR3	QNDYTYPLT (SEQ ID NO: 12)

[077] Será observado que o anticorpo anti-CD40 pode ser fornecido pela deleção ou substituição parcial de alguns ou mesmo um único aminoácido. Por exemplo, a mutação de um único aminoácido em áreas selecionadas do domínio CH2 pode ser suficiente para reduzir substancialmente a ligação a Fc. Da mesma forma, pode ser desejável simplesmente excluir a parte de um ou mais domínios da região constante que controlam a função efetora (por exemplo, complementar a ligação C1Q) a ser modulada. Tais deleções parciais das regiões constantes podem melhorar as características selecionadas do anticorpo (meia-vida sérica) enquanto deixam intactas outras funções desejáveis associadas ao domínio da região constante do sujeito. Além disso, as regiões constantes dos anticorpos divulgados podem ser modificadas através da mutação ou substituição de um ou mais aminoácidos que aumentam o perfil da construção resultante. A esse respeito, pode ser possível interromper a atividade fornecida por um local de ligação conservado (por exemplo, ligação a Fc) enquanto mantém substancialmente a configuração e o perfil imunogênico dos anticorpos. Certas modalidades podem compreender a adição de um ou mais aminoácidos à região constante para aprimorar características desejáveis, como diminuir ou aumentar a função efetora ou fornecer mais ligação ao agonista de receptores de glicocorticoides. Em tais modalidades, pode ser desejável inserir ou replicar sequências específicas derivadas de domínios de regiões constantes

selecionados.

[078] A presente divulgação abrange ainda variantes e equivalentes que são substancialmente homólogos ao anticorpo anti-CD40 apresentado neste documento. Estes podem conter, por exemplo, mutações de substituição conservadoras, isto é, a substituição de um ou mais aminoácidos por aminoácidos semelhantes. Por exemplo, substituição conservativa se refere à substituição de um aminoácido por outro da mesma classe geral, como, por exemplo, um aminoácido ácido com outro aminoácido ácido, um aminoácido básico com outro aminoácido básico ou um aminoácido neutro por outro aminoácido neutro. O que se pretende com uma substituição conservadora de aminoácidos é bem conhecido na técnica.

[079] O anticorpo anti-CD40 pode ser polipeptídeos recombinantes, polipeptídeos naturais ou polipeptídeos sintéticos de um anticorpo. Será reconhecido na técnica que algumas sequências de aminoácidos da divulgação podem ser variadas sem efeito significativo da estrutura ou função da proteína. Assim, a divulgação inclui ainda variações dos polipeptídeos que mostram atividade substancial ou que incluem regiões de um anticorpo. Tais mutantes incluem deleções, inserções, inversões, repetições e substituições de tipo.

[080] Os anticorpos anti-CD40 descritos neste documento podem ser produzidos por qualquer método adequado conhecido na técnica. Tais métodos variam de métodos sintéticos de proteínas diretas à construção de uma sequência de DNA que codifica sequências polipeptídicas isoladas e que expressa essas sequências em um hospedeiro transformado adequado. Em algumas modalidades, uma sequência de DNA é construída usando a tecnologia recombinante, isolando ou sintetizando uma sequência de DNA que codifica uma proteína do tipo selvagem de interesse. Opcionalmente, a sequência pode ser mutagenizada por mutagênese específica do local para fornecer seus análogos funcionais. Consultar, por exemplo, Zoeller et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. EUA 81: 5.662 a 5.066 (1984) e Pat. nº US

4.588.585.

[081] Em algumas modalidades, uma sequência de DNA que codifica um anticorpo anti-CD40 seria construída por síntese química usando um sintetizador de oligonucleotídeo. Tais oligonucleotídeos podem ser projetados com base na sequência de aminoácidos do polipeptídeo desejado e na seleção dos códons que são favorecidos na célula hospedeira na qual o polipeptídeo recombinante de interesse será produzido. Métodos padrão podem ser aplicados para sintetizar uma sequência polinucleotídica isolada que codifica um polipeptídeo isolado de interesse.

[082] Em certas modalidades, os vetores de expressão recombinantes são usados para amplificar e expressar anticorpos anti-CD40 anticorpos codificadores de DNA. Uma ampla variedade de combinações de expressão hospedeiro/vetor pode ser empregada. Os vetores de expressão úteis para hospedeiros eucarióticos incluem, por exemplo, vetores compreendendo sequências de controle de expressão de SV40, vírus do papiloma bovino, adenovírus e citomegalovírus. Os vetores de expressão úteis para hospedeiros bacterianos incluem plasmídeos bacterianos conhecidos, como plasmídeos de *Escherichia coli*, incluindo pCR1, pBR322, pMB9 e derivados dos mesmos, plasmídeos de maior variedade de hospedeiros, como M13 e fagos filamentosos de DNA de fita simples.

[083] As células hospedeiras adequadas para expressão de anticorpos anti-CD40 incluem células procariontes, leveduras, insetos ou eucarióticas superiores sob o controle de promotores apropriados. Os procariotas incluem organismos gram-negativos ou gram-positivos, por exemplo *E. coli* ou bacilos. As células eucarióticas superiores incluem linhas celulares estabelecidas de origem em mamíferos. Sistemas de tradução sem células também podem ser empregados. Os vetores de clonagem e expressão apropriados para uso com hospedeiros celulares de bactérias, fungos, leveduras e mamíferos são descritos por Pouwels et al. (*Cloning Vectors: A Labocamundongory Manual*, Elsevier, NY, 1985). Informações adicionais sobre

métodos de produção de proteínas, incluindo produção de anticorpos, podem ser encontradas, por exemplo, na Publicação de Patente nº US 2008/0187954, Patentes nºs US 6.413.746 e 6.660.501, e Publicação Internacional de Patente nº WO 04009823.

[084] Vários sistemas de cultura de células de mamíferos ou insetos também são vantajosamente empregados para expressar proteína recombinante. A expressão de proteínas recombinantes em células de mamíferos pode ser realizada porque essas proteínas são geralmente dobradas corretamente, modificadas adequadamente e completamente funcionais. Exemplos de linhas celulares hospedeiras de mamíferos adequadas incluem HEK-293 e HEK-293T, as linhas COS-7 de células renais de macaco, descritas por Gluzman (Cell 23: 175, 1981) e outras linhas celulares, incluindo, por exemplo, células L, C127, 3T3, linhas de células de ovário de hamster chinês (CHO), HeLa e BHK. Os vetores de expressão em mamíferos podem compreender elementos não traduzidos, como uma origem de replicação, um promotor e um intensificador adequados ligados ao gene a ser expresso e outras sequências não transcritas de flanco 5' ou 3' e sequências não traduzidas de 5' ou 3', como necessárias locais de ligação ao ribossomo, um local de poliadenilação, locais de doação e aceitação de emendas e sequências de terminação transcricional. Os sistemas de baculovírus para produção de proteínas heterólogas em células de insetos são revisados por Luckow e Summers, Bio/Technology 6:47 (1988).

[085] As proteínas produzidas por um hospedeiro transformado podem ser purificadas de acordo com qualquer método adequado. Tais métodos padrão incluem cromatografia (por exemplo, cromatografia em coluna de troca iônica, afinidade e dimensionamento), centrifugação, solubilidade diferencial ou por qualquer outra técnica padrão para purificação de proteínas. Etiquetas de afinidade, como hexahistidina, domínio de ligação à maltose, sequência do revestimento da gripe e glutational-S-transferase podem ser anexadas à proteína para permitir uma fácil

purificação por passagem através de uma coluna de afinidade apropriada. As proteínas isoladas também podem ser fisicamente caracterizadas usando técnicas como proteólise, ressonância magnética nuclear e cristalografia de raios-X.

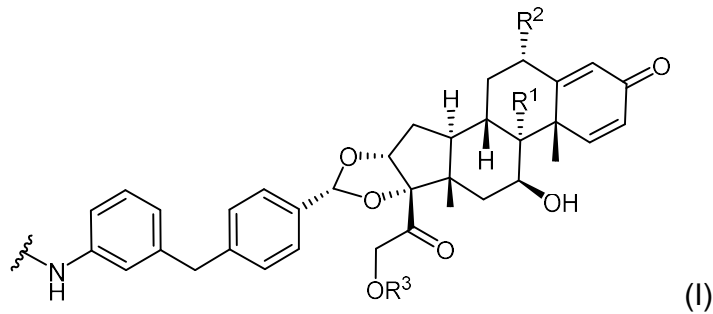
[086] A proteína recombinante produzida em cultura bacteriana pode ser isolada, por exemplo, por extração inicial a partir de grânulos de células, seguida de uma ou mais etapas de concentração, salga, troca iônica aquosa ou cromatografia de exclusão por tamanho. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) pode ser empregada para as etapas finais de purificação. As células microbianas empregadas na expressão de uma proteína recombinante podem ser interrompidas por qualquer método conveniente, incluindo ciclagem por congelamento e descongelamento, sonicação, interrupção mecânica ou uso de agentes de lise celular.

[087] Os métodos para a purificação de anticorpos incluem, por exemplo, os descritos nas Publicações de Patentes US Nos. 2008/0312425, 2008/0177048 e 2009/0187005.

II. ANTICORPO ANTI-CD40 LIGADO A UM AGONISTA DO RECEPTOR DE GLICOCORTICOIDE

[088] Conjugados de anticorpo-fármaco (ADCs) compreendendo um agonista do receptor de glicocorticoide ligado a um anticorpo anti-CD40 são fornecidos neste documento. Em algumas modalidades, o ADC se liga ao receptor gama Fc. Em algumas modalidades, o ADC é ativo em um ensaio de repórter de células Jurkat. Em algumas modalidades, o ADC é ativo em um ensaio repórter CD40L. Em algumas modalidades, o ADC mostra imunogenicidade reduzida (resposta imune antifármacos reduzida (ADA)) em comparação com o anticorpo anti-CD40 sozinho.

[089] Em uma modalidade, é fornecido um conjugado de anticorpo-fármaco que compreende: (a) um anticorpo anti-CD40; e (b) um radical de um agonista do receptor de glicocorticoide de Fórmula (I):



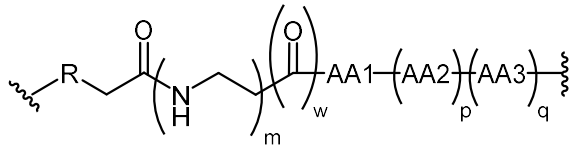
em que:

R^1 é hidrogênio ou flúor;

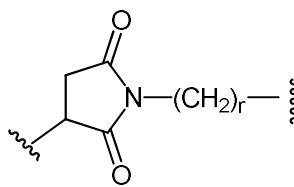
R^2 é hidrogênio ou flúor; e

R^3 é hidrogênio ou $-P(=O)(OH)_2$; e

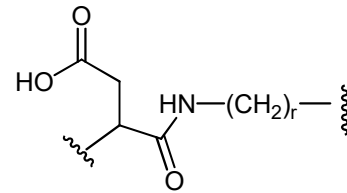
ainda em que o anticorpo é conjugado com o agonista do receptor de glicocorticoide por um ligante de fórmula:



R é uma ligação,



ou



em

que r é 0 ou 1;

[090] AA1, AA2 e AA3 são selecionados independentemente a partir do grupo que consiste em Alanina (Ala), Glicina (Gly), Isoleucina (Ile), Leucina (Leu), Prolina (Pro), Valina (Val), Fenilalanina (Phe), Triptofano (Trp), Tirosina (Tyr), Ácido aspártico (Asp), Ácido glutâmico (Glu), Arginina (Arg), Histidina (His), Lisina (Lys), Serina (Ser), Treonina (Thr), Cisteína (Cys), Metionina (Met), Asparagina (Asn) e Glutamina (Gln);

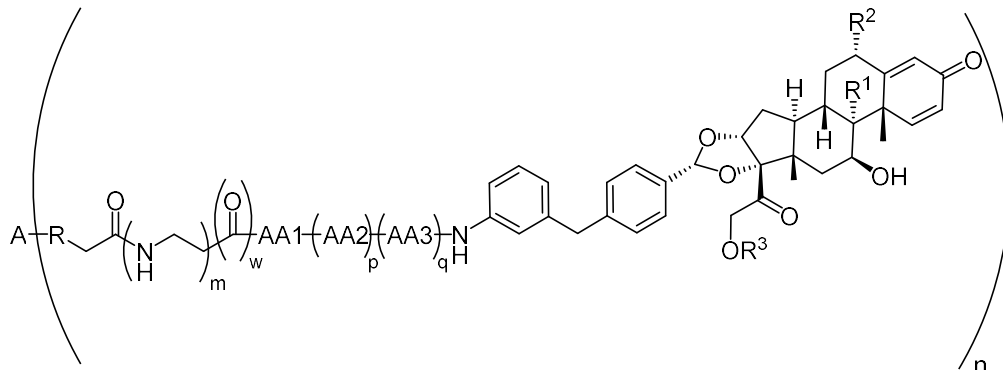
m é 0 ou 1;

w é 0 ou 1;

p é 0 ou 1; e

q é 0 ou 1.

[091] Em outra modalidade, é fornecido um conjugado de anticorpo-fármaco de Fórmula (II):



(II)

em que:

A é um anticorpo anti-CD40; e

n é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10.

[092] Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 compreende regiões determinantes de complementaridade (CDRs), conforme estabelecido na SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, e SEQ ID NO: 12. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 compreende uma região variável da cadeia pesada apresentada como SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia leve apresentada como SEQ ID NO: 6. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 compreende uma cadeia pesada apresentada como SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve apresentada como SEQ ID NO: 4.

[093] O anticorpo pode estar ligado à variável R por qualquer porção química do anticorpo que possua um grupo nucleofílico, por exemplo, como um grupo OH (para fornecer um grupo -O-, quando ligado), um grupo -SH (para fornecer um -S- grupo, quando vinculado) ou um grupo -NH₂ (para fornecer um grupo -NH-, quando vinculado). Em certas modalidades, o ponto de ligação do anticorpo à variável R é por meio de um grupo SH de um resíduo de cisteína do anticorpo (para fornecer um grupo -S-, quando ligado).

[094] Em certas modalidades, R¹ é hidrogênio e R² é hidrogênio.

[095] Em certas modalidades, R¹ é flúor e R² é hidrogênio.

[096] Em certas modalidades, R¹ é flúor e R² é flúor.

[097] Em certas modalidades, R³ é hidrogênio.

[098] Em certas modalidades, R³ é -P(=O)(OH)₂.

[099] Em certas modalidades preferidas, pelo menos um dentre R¹ e R² é flúor e R³ é -P(=O)(OH)₂.

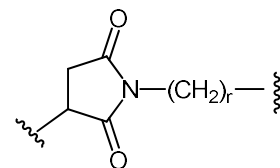
[0100] Em certas modalidades, -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- é selecionado a partir do grupo que consiste em:

[0101] -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; -Glu-Ala-Ala-; -Gly-Lys-; -Glu-; -Glu-Ser-Lys-; e -Gly-Ser-Lys-. Deve-se entender que essa lista de aminoácidos deve ser lida da esquerda para a direita, em que o aminoácido mais à esquerda corresponde a AA1 e o aminoácido mais à direita corresponde a AA2 (quando q é 0) ou AA3 (quando q é 1).

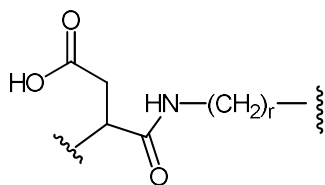
[0102] Em certas modalidades preferidas, a porção química ligante compreende 1, 2 ou 3 aminoácidos hidrofílicos -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-, por exemplo, em que a cadeia lateral de AA1, AA2 e/ou AA3 compreende um grupo de ligação de hidrogênio, tal como um grupo =O e/ou grupo de doação de hidrogênio tal como um -OH, -NH₂ ou -SH. Aumentar a hidrofiliicidade do ligante pode levar a estabilidade e armazenamento a longo prazo do ADC. Por exemplo, em certas modalidades preferidas, -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- é selecionado a partir do grupo que consiste em -Gly-Glu-; -Gly-Lys-; -Glu-Ser-Lys-; e -Gly-Ser-Lys-.

[0103] Em certas modalidades, em que m é 0, então w é 0. Em certas modalidades, em que m é 1, então w é 1.

[0104] Em certas modalidades, m é 0; q é 0; e R é

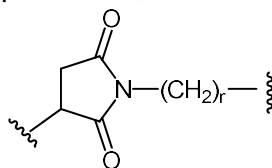


ou

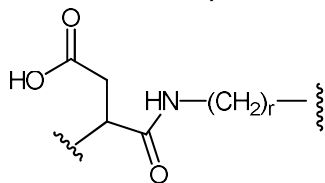


, em que r é 0 ou 1. Em certas modalidades, w é 0. Em certas modalidades, r é 0. Em certas modalidades, r é 1.

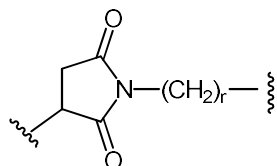
[0105] Em certas modalidades preferidas, R é uma ligação. ADCs que



compreendem um grupo R de fórmula $\text{N}-(\text{CH}_2)_r$ podem ser instáveis *in vivo*. ADCs que compreendem um grupo R aberto por anel de fórmula



podem tocar próximo a um grupo de fórmula



durante armazenamento prolongado em excipientes líquidos.

Além disso, a preparação do ADC aberto por anel a partir do ADC fechado por anel pode exigir condições básicas de pH por um período prolongado, o que pode levar a tempos de produção mais longos e custos de fabricação mais altos, além de decomposição indesejável do ADC devido ao alto pH.

[0106] Em certas modalidades, m é 0 ou 1; p é 1; e R é uma ligação. Em certas modalidades, w é 0. Em certas modalidades, q é 0. Em certas modalidades, q é 1.

[0107] Em certas modalidades, m é 1; e q é 0. Em certas modalidades, w é 1. Em certas modalidades, m é 1; e w é 1. Em certas modalidades, m é 1; w é 1; e q é 0.

[0108] Em certas modalidades, m é 0.

[0109] Em certas modalidades preferidas, p é 1. Em certas modalidades preferidas, p é 1 e m é 0. Em certas modalidades preferidas, p é 1, m é 0 e w é 0. Em

certas modalidades preferidas, p é 1, m é 0, w é 0, q é 0 e R é uma ligação. Em certas modalidades preferidas alternativas, p é 1, m é 0, w é 0, q é 1 e R é uma ligação.

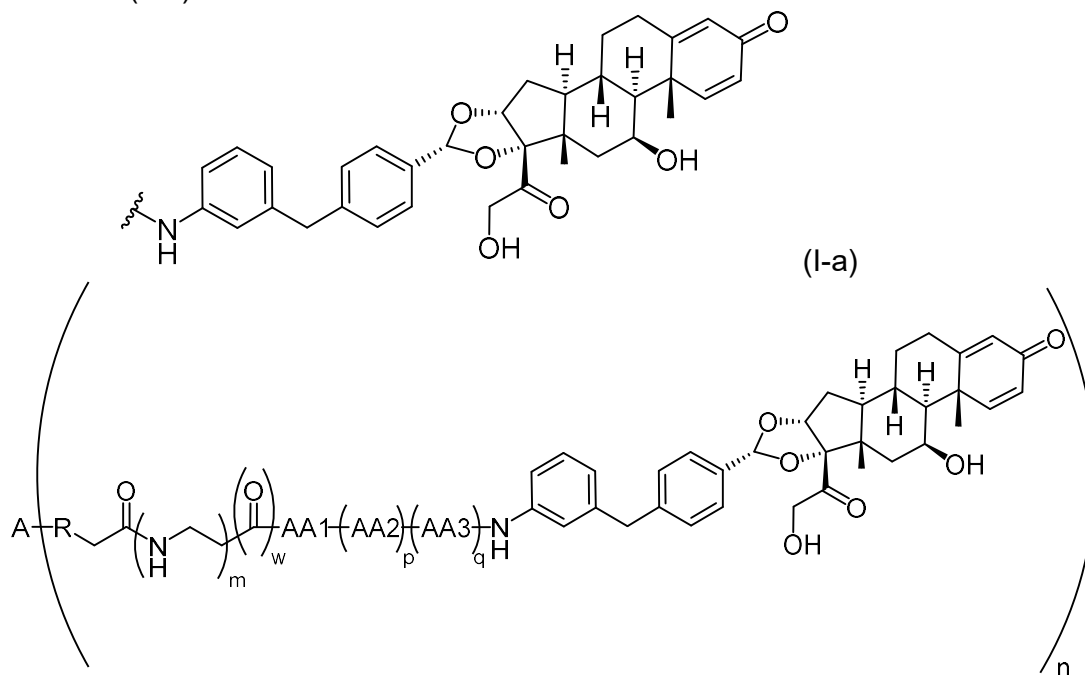
[0110]Em certas modalidades, o conjugado de anticorpo-fármaco que compreende um radical de Fórmula (I), a carga do fármaco é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10. Em certas modalidades, a carga do fármaco é 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8. Em outra modalidade, a carga do fármaco é 1, 2, 3, 4 ou 5. Em outra modalidade, a carga do fármaco é 2, 3, 4 ou 5. Em outra modalidade, a carga do fármaco é 2, 4, 6 ou 8. Em outra modalidade, a carga do fármaco é 1. Em outra modalidade, a carga do fármaco é 2. Em outra modalidade, a carga do fármaco é 3. Em outra modalidade, a carga do fármaco é 4. Em outra modalidade, a carga do fármaco é 5. Em outra modalidade, a carga do fármaco é 6. Em outra modalidade, a carga do fármaco é 7. Em outra modalidade, a carga do fármaco é 8. Em uma modalidade preferida, a carga do fármaco é 2 ou 4.

[0111]Em certas modalidades da Fórmula (II), n é 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8. Em certas modalidades da Fórmula (II), n é 1, 2, 3, 4 ou 5. Em certas modalidades da Fórmula (II), n é 2, 3, 4 ou 5. Em certas modalidades da Fórmula (II), n é 2, 4, 6 ou 8. Em certas modalidades da Fórmula (II), n é 1. Em certas modalidades da Fórmula (II), n é 2. Em certas modalidades da Fórmula (II), n é 3. Em certas modalidades da Fórmula (II), n é 4. Em certas modalidades da Fórmula (II), n é 5. Em certas modalidades da Fórmula (II), n é 6. Em certas modalidades da Fórmula (II), n é 7. Em certas modalidades da Fórmula (II), n é 8. Em uma modalidade preferida da Fórmula (II), n é 2 ou 4.

[0112]Várias combinações das modalidades descritas acima são ainda contempladas neste documento.

[0113]Por exemplo, em certas modalidades, em que R¹ é hidrogênio, R² é hidrogênio e R³ é hidrogênio, é fornecido um conjugado de anticorpo-fármaco que compreende um radical de Fórmula (I-a), ou um conjugado de anticorpo-fármaco de

Fórmula (II-a):

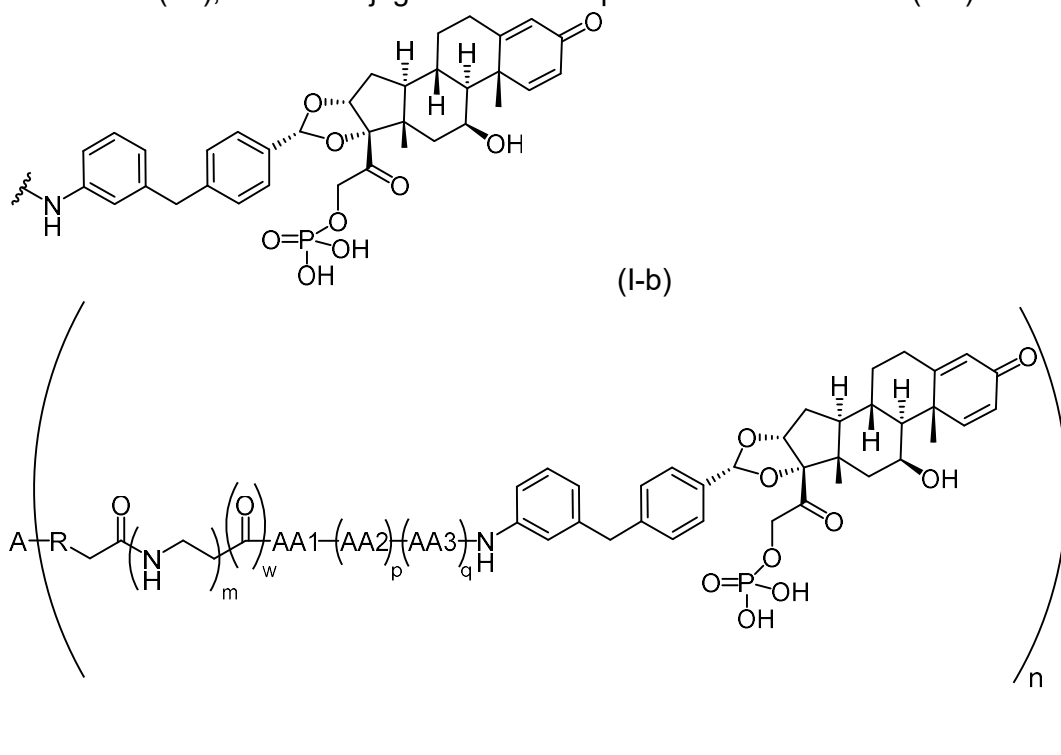


(II-a).

[0114] Em certas modalidades, R é uma ligação. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 1, p é 1 e q é 0. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 1, p é 1, q é 0 e -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- é selecionado a partir do grupo que consiste em: -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; e -Gly-Lys-. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 0, p é 1 e q é 0 ou 1. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 0, p é 1, q é 0 ou 1 e -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- é selecionado a partir do grupo que consiste em: -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; -Glu-Ala-Ala-; -Gly-Lys-; -Glu-Ser-Lys-; e -Gly-Ser-Lys-. No entanto, em certas modalidades, -Ala-Ala- e -Glu-Ala-Ala- são excluídos. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 0, p é 1, q é 0 e -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- é -Gly-Glu- ou -Gly-Lys-. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 0, p é 1, q é 1 e -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- é -Glu-Ser-Lys-; e -Gly-Ser-Lys-. Em certas modalidades, em que m é 0, então w é 0. Em certas modalidades, em que m é 1, então w é 1. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 compreende regiões determinantes de complementaridade (CDRs), conforme estabelecido na SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8,

SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, e SEQ ID NO: 12. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 compreende uma região variável da cadeia pesada apresentada como SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia leve apresentada como SEQ ID NO: 6. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 compreende uma cadeia pesada apresentada como SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve apresentada como SEQ ID NO: 4. Em certas modalidades, n é 2. Em certas modalidades, n é 4.

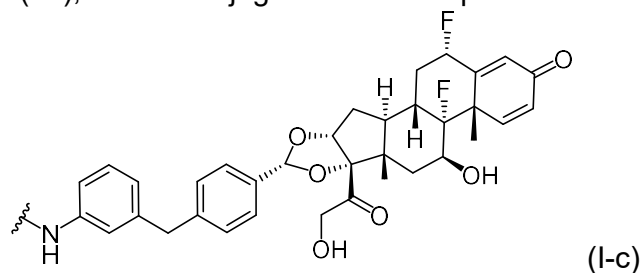
[0115] Em certas modalidades, em que R¹ é hidrogênio, R² é hidrogênio e R³ é -P(=O)(OH)₂, é fornecido um conjugado de anticorpo-fármaco que compreende um radical de Fórmula (I-b), ou um conjugado de anticorpo-fármaco de fórmula (II-b):

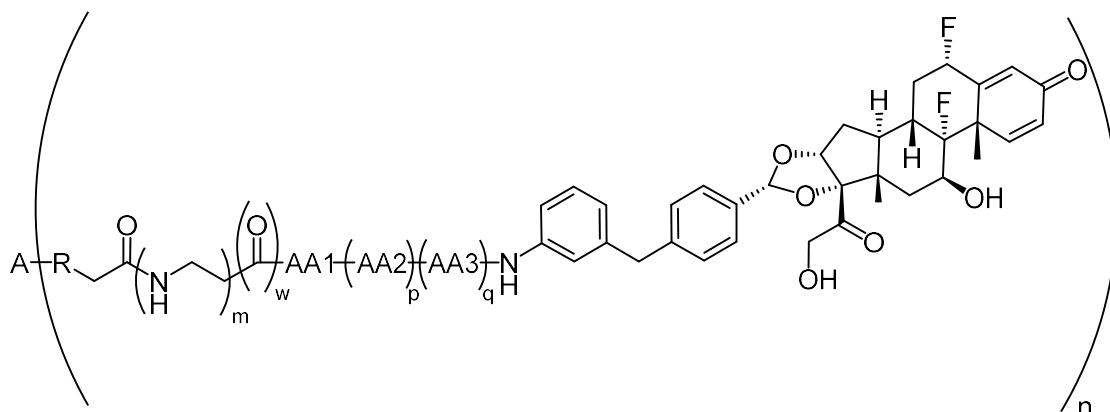


[0116] Em certas modalidades, R é uma ligação. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 1, p é 1 e q é 0. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 1, p é 1, q é 0 e -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- é selecionado a partir do grupo que consiste em: -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; e -Gly-Lys-. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 0, p é 1 e q é 0 ou 1. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 0, p é 1, q é 0 ou 1

e $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ é selecionado a partir do grupo que consiste em: $-Gly-Glu-$; $-Ala-Ala-$; $-Glu-Ala-Ala-$; $-Gly-Lys-$; $-Glu-Ser-Lys-$; e $-Gly-Ser-Lys-$. No entanto, em certas modalidades, $-Ala-Ala-$ e $-Glu-Ala-Ala-$ são excluídos. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 0, p é 1, q é 0 e $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ é $-Gly-Glu-$ ou $-Gly-Lys-$. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 0, p é 1, q é 1 e $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ é $-Glu-Ser-Lys-$; e $-Gly-Ser-Lys-$. Em certas modalidades, em que m é 0, então w é 0. Em certas modalidades, em que m é 1, então w é 1. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 compreende regiões determinantes de complementaridade (CDRs), conforme estabelecido na SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, e SEQ ID NO: 12. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 compreende uma região variável da cadeia pesada apresentada como SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia leve apresentada como SEQ ID NO: 6. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 compreende uma cadeia pesada apresentada como SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve apresentada como SEQ ID NO: 4. Em certas modalidades, n é 2. Em certas modalidades, n é 4.

[0117] Em certas modalidades, em que R^1 é flúor, R^2 é flúor e R^3 é hidrogênio, é fornecido um conjugado de anticorpo-fármaco que compreende um radical de Fórmula (I-c), ou um conjugado de anticorpo-fármaco de Fórmula (II-c):



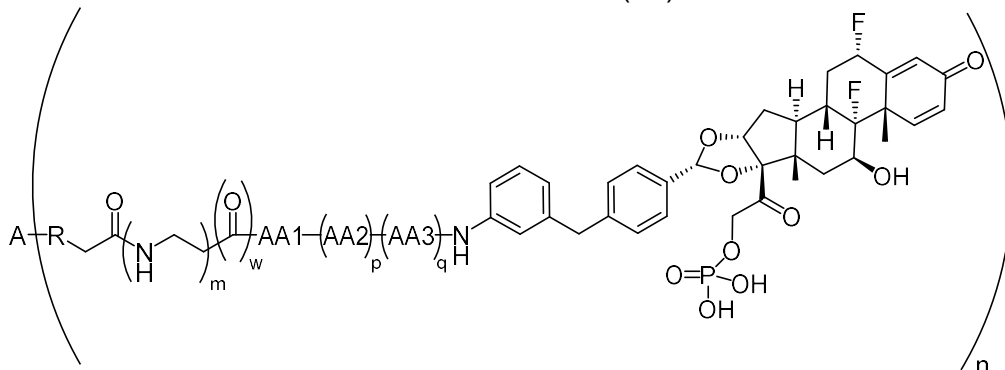
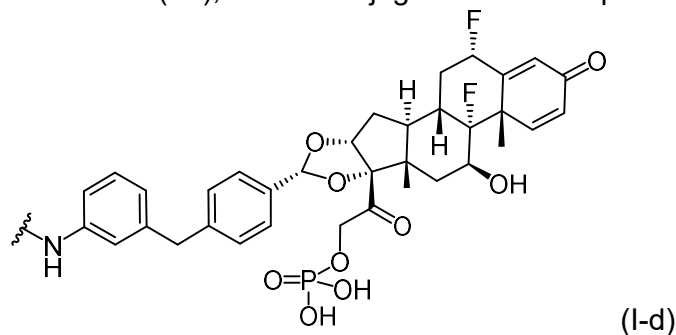


(II-c).

[0118] Em certas modalidades, R é uma ligação. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 1, p é 1 e q é 0. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 1, p é 1, q é 0 e -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- é selecionado a partir do grupo que consiste em: -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; e -Gly-Lys-. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 0, p é 1 e q é 0 ou 1. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 0, p é 1, q é 0 ou 1 e -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- é selecionado a partir do grupo que consiste em: -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; -Glu-Ala-Ala-; -Gly-Lys-; -Glu-Ser-Lys-; e -Gly-Ser-Lys-. No entanto, em certas modalidades, -Ala-Ala- e -Glu-Ala-Ala- são excluídos. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 0, p é 1, q é 0 e -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- é -Gly-Glu- ou -Gly-Lys-. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 0, p é 1, q é 1 e -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- é -Glu-Ser-Lys-; e -Gly-Ser-Lys-. Em certas modalidades, em que m é 0, então w é 0. Em certas modalidades, em que m é 1, então w é 1. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 compreende regiões determinantes de complementaridade (CDRs), conforme estabelecido na SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, e SEQ ID NO: 12. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 compreende uma região variável da cadeia pesada apresentada como SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia leve apresentada como SEQ ID NO: 6. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 compreende uma cadeia pesada apresentada como SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve

apresentada como SEQ ID NO: 4. Em certas modalidades, n é 2. Em certas modalidades, n é 4.

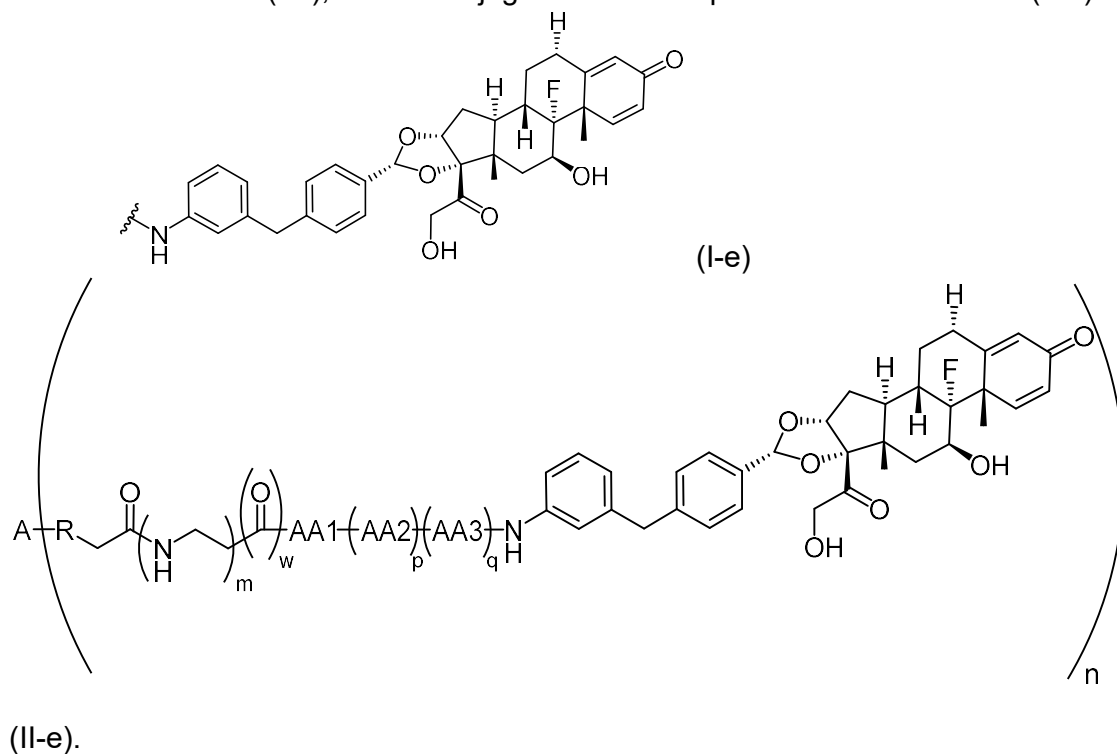
[0119] Em certas modalidades, em que R¹ é flúor, R² é flúor, e R³ é -P(=O)(OH)₂, é fornecido um conjugado de anticorpo-fármaco que compreende um radical de Fórmula (I-d), ou um conjugado de anticorpo-fármaco de Fórmula (II-d):



[0120] Em certas modalidades, R é uma ligação. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 1, p é 1 e q é 0. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 1, p é 1, q é 0 e -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- é selecionado a partir do grupo que consiste em: -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; e -Gly-Lys-. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 0, p é 1 e q é 0 ou 1. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 0, p é 1, q é 0 ou 1 e -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- é selecionado a partir do grupo que consiste em: -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; -Glu-Ala-Ala-; -Gly-Lys-; -Glu-Ser-Lys-; e -Gly-Ser-Lys-. No entanto, em certas modalidades, -Ala-Ala- e -Glu-Ala-Ala- são excluídos. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 0, p é 1, q é 0 e -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- é -Gly-Glu- ou -Gly-Lys-. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 0, p é 1, q é 1 e -AA1-

(AA2)_p-(AA3)_q- é -Glu-Ser-Lys-; e -Gly-Ser-Lys-. Em certas modalidades, em que m é 0, então w é 0. Em certas modalidades, em que m é 1, então w é 1. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 compreende regiões determinantes de complementaridade (CDRs), conforme estabelecido na SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, e SEQ ID NO: 12. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 compreende uma região variável da cadeia pesada apresentada como SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia leve apresentada como SEQ ID NO: 6. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 compreende uma cadeia pesada apresentada como SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve apresentada como SEQ ID NO: 4. Em certas modalidades, n é 2. Em certas modalidades, n é 4.

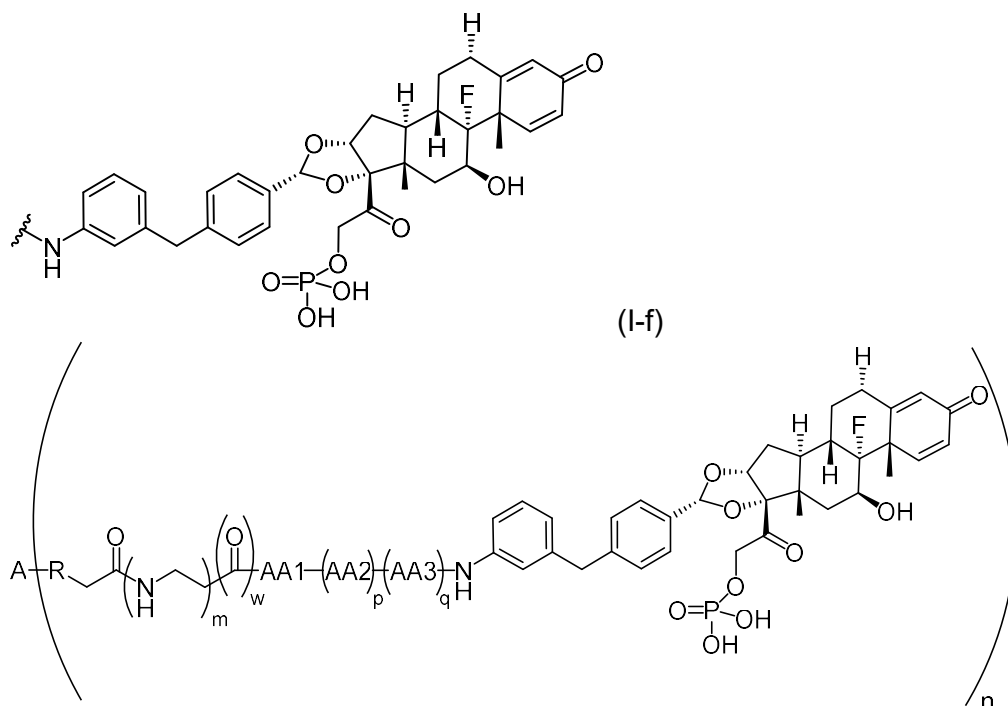
[0121] Em certas modalidades, em que R¹ é flúor, R² é hidrogênio, e R³ é hidrogênio, é fornecido um conjugado de anticorpo-fármaco que compreende um radical de Fórmula (I-e), ou um conjugado de anticorpo-fármaco de Fórmula (II-e):



[0122] Em certas modalidades, R é uma ligação. Em certas modalidades, R é

uma ligação, m é 1, p é 1 e q é 0. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 1, p é 1, q é 0 e $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ é selecionado a partir do grupo que consiste em: $-Gly-Glu-$; $-Ala-Ala-$; e $-Gly-Lys-$. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 0, p é 1 e q é 0 ou 1. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 0, p é 1, q é 0 ou 1 e $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ é selecionado a partir do grupo que consiste em: $-Gly-Glu-$; $-Ala-Ala-$; $-Glu-Ala-Ala-$; $-Gly-Lys-$; $-Glu-Ser-Lys-$; e $-Gly-Ser-Lys-$. No entanto, em certas modalidades, $-Ala-Ala-$ e $-Glu-Ala-Ala-$ são excluídos. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 0, p é 1, q é 0 e $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ é $-Gly-Glu-$ ou $-Gly-Lys-$. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 0, p é 1, q é 1 e $-AA1-(AA2)_p-(AA3)_q-$ é $-Glu-Ser-Lys-$; e $-Gly-Ser-Lys-$. Em certas modalidades, em que m é 0, então w é 0. Em certas modalidades, em que m é 1, então w é 1. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 compreende regiões determinantes de complementaridade (CDRs), conforme estabelecido na SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, e SEQ ID NO: 12. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 compreende uma região variável da cadeia pesada apresentada como SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia leve apresentada como SEQ ID NO: 6. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 compreende uma cadeia pesada apresentada como SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve apresentada como SEQ ID NO: 4. Em certas modalidades, n é 2. Em certas modalidades, n é 4.

[0123]Em certas modalidades, em que R^1 é flúor, R^2 é hidrogênio, e R^3 é $-P(=O)(OH)_2$, é fornecido um conjugado de anticorpo-fármaco que compreende um radical de fórmula (I-f), ou um conjugado de anticorpo-fármaco de fórmula (II-f):



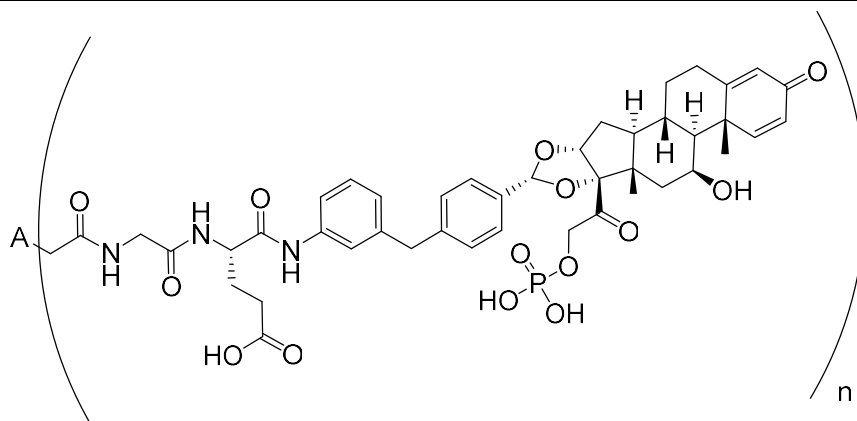
(II-f).

[0124] Em certas modalidades, R é uma ligação. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 1, p é 1 e q é 0. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 1, p é 1, q é 0 e -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- é selecionado a partir do grupo que consiste em: -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; e -Gly-Lys-. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 0, p é 1 e q é 0 ou 1. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 0, p é 1, q é 0 ou 1 e -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- é selecionado a partir do grupo que consiste em: -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; -Glu-Ala-Ala-; -Gly-Lys-; -Glu-Ser-Lys-; e -Gly-Ser-Lys-. No entanto, em certas modalidades, -Ala-Ala- e -Glu-Ala-Ala- são excluídos. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 0, p é 1, q é 0 e -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- é -Gly-Glu- ou -Gly-Lys-. Em certas modalidades, R é uma ligação, m é 0, p é 1, q é 1 e -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- é -Glu-Ser-Lys-; e -Gly-Ser-Lys-. Em certas modalidades, em que m é 0, então w é 0. Em certas modalidades, em que m é 1, então w é 1. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 compreende regiões determinantes de complementaridade (CDRs), conforme estabelecido na SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, e SEQ ID NO: 12. Em certas

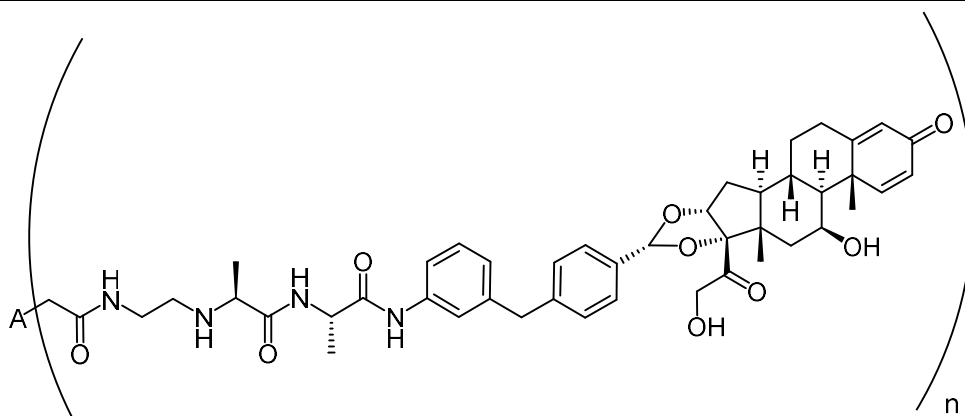
modalidades, o anticorpo anti-CD40 compreende uma região variável da cadeia pesada apresentada como SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia leve apresentada como SEQ ID NO: 6. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 compreende uma cadeia pesada apresentada como SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve apresentada como SEQ ID NO: 4. Em certas modalidades, n é 2. Em certas modalidades, n é 4.

[0125]Conjugados de anticorpo-fármaco exemplares que compreendem um radical de Fórmula (I) e conjugados de anticorpo-fármaco de Fórmula (II) incluem conjugados de anticorpo-fármaco listados nas Tabelas 5, 6A e 6B, em que n é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10, e A é um anticorpo anti-CD40.

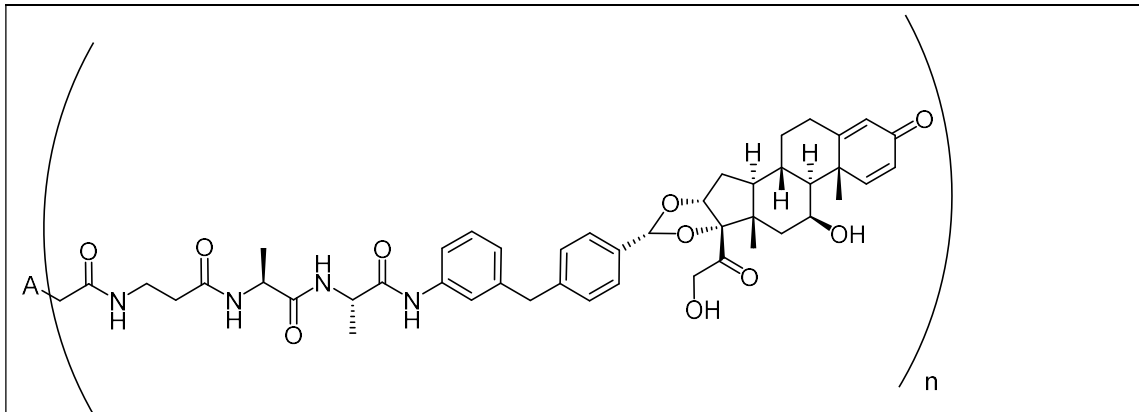
Tabela 5. ADC conjugado



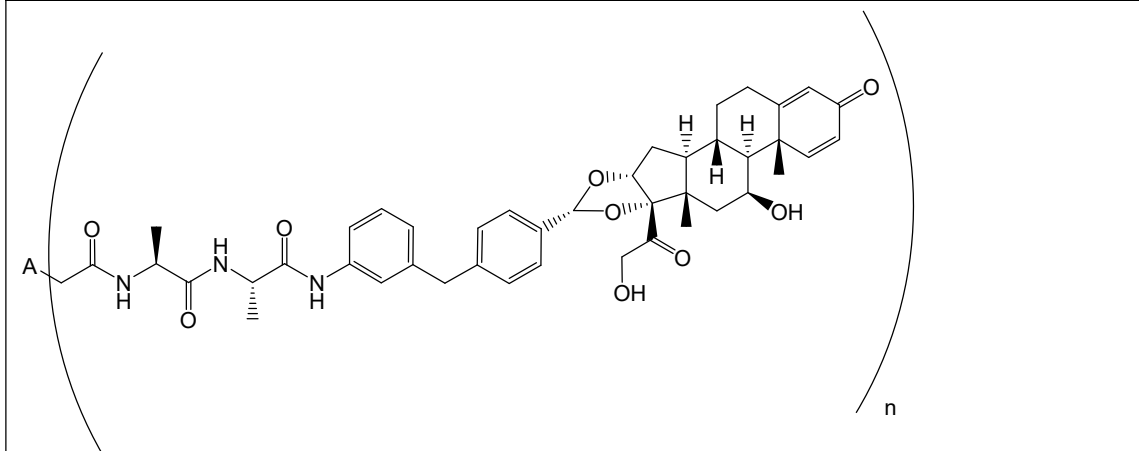
Exemplo 4-conjugado



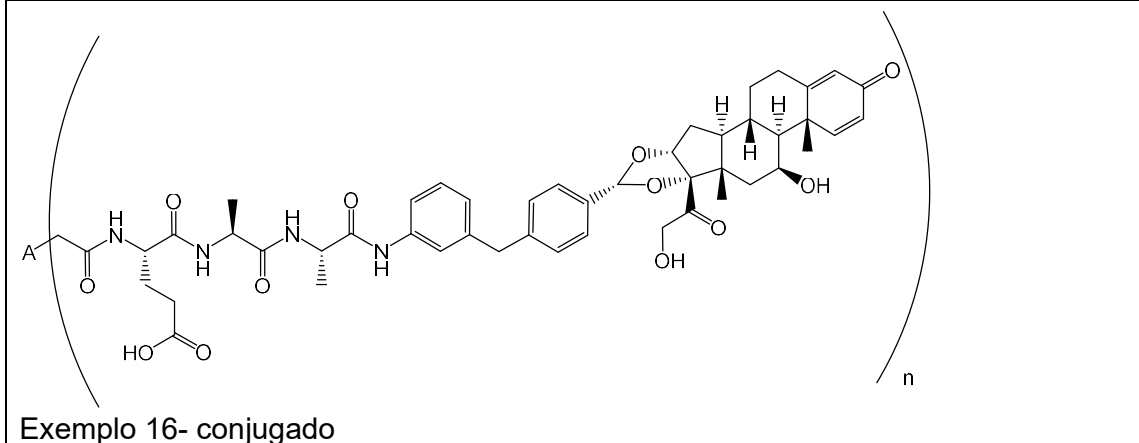
Exemplo 14A-conjugado



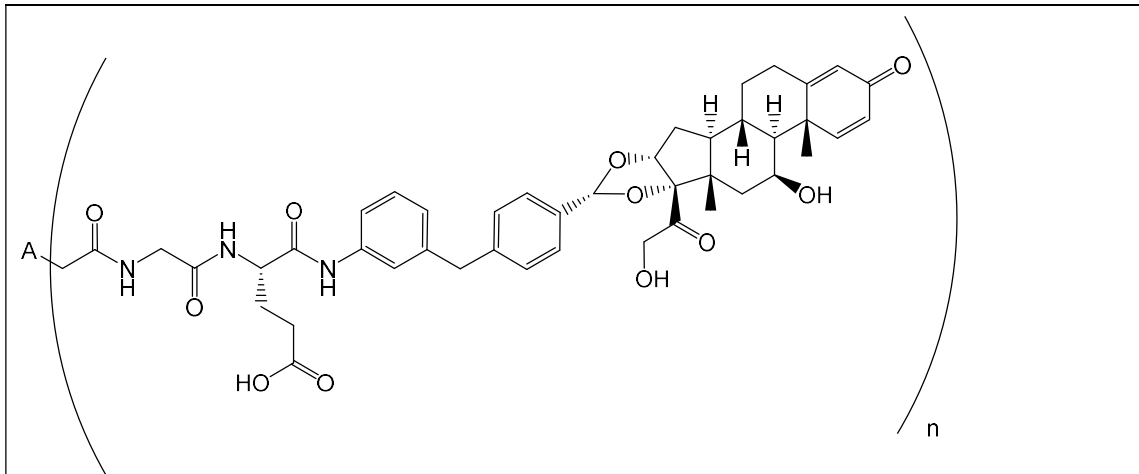
Exemplo 14B-conjugado



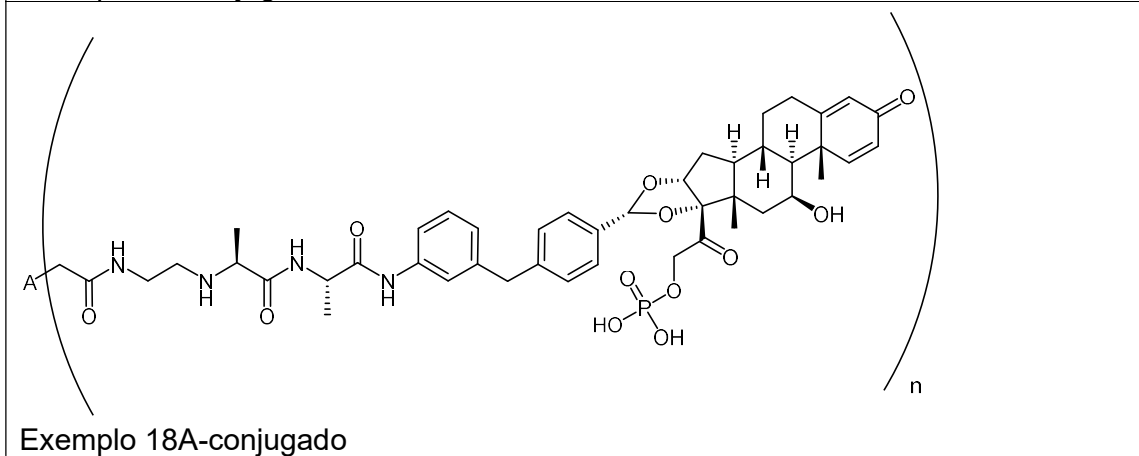
Exemplo 15-conjugado



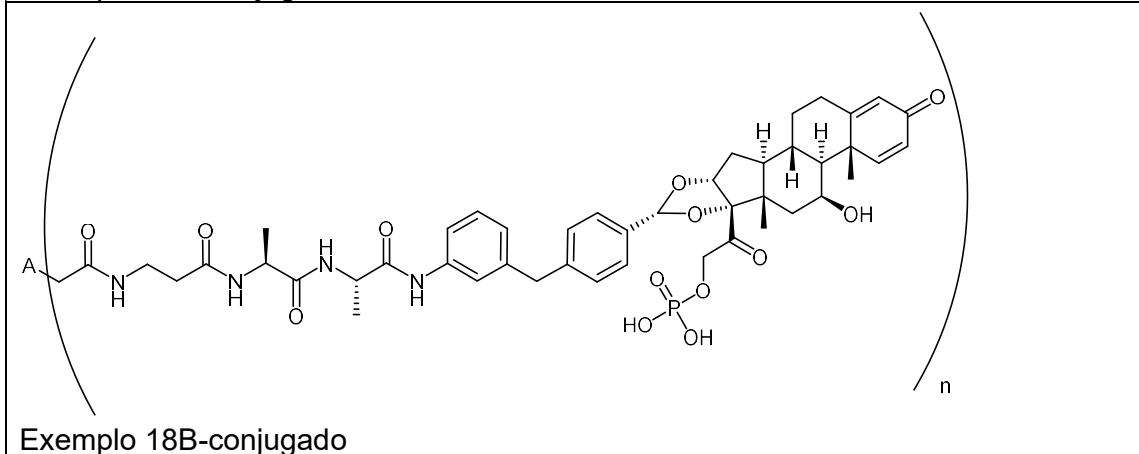
Exemplo 16-conjugado



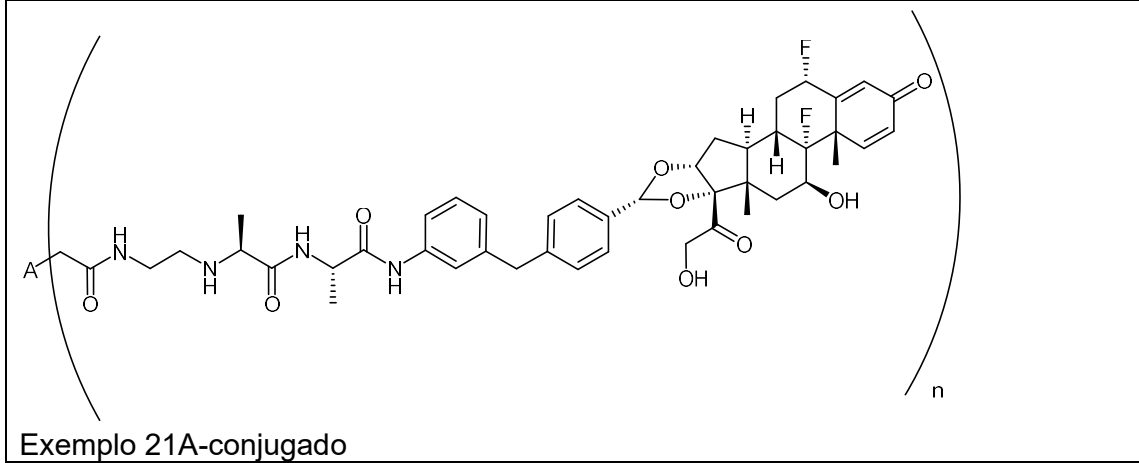
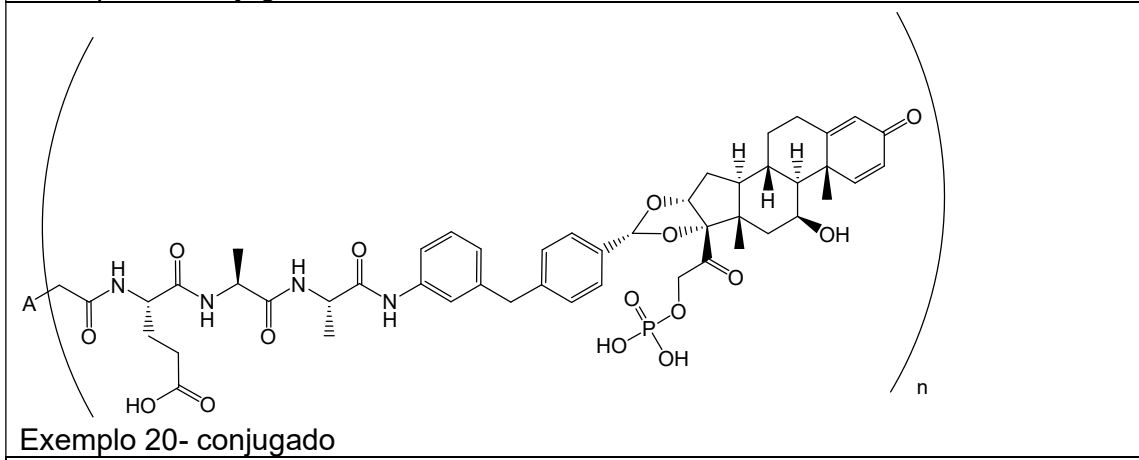
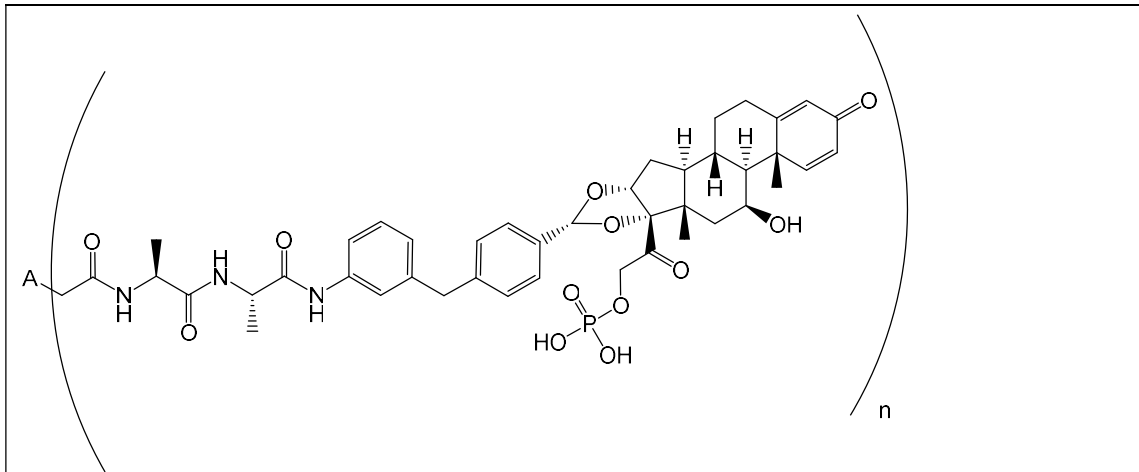
Exemplo 17-conjugado

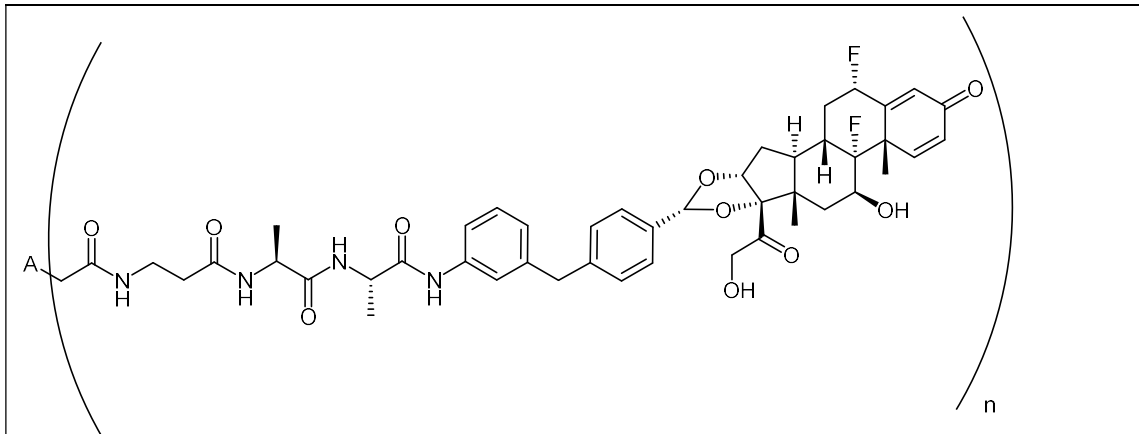


Exemplo 18A-conjugado

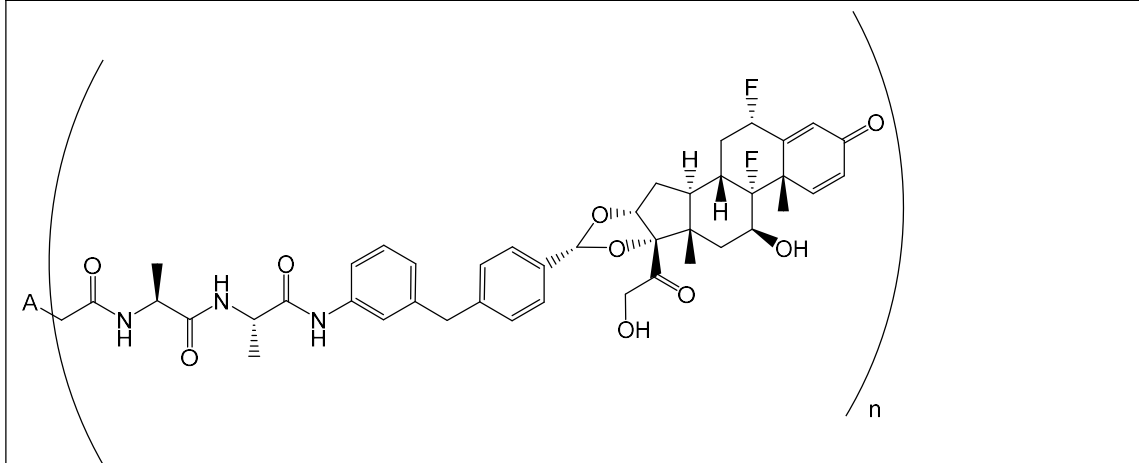


Exemplo 18B-conjugado

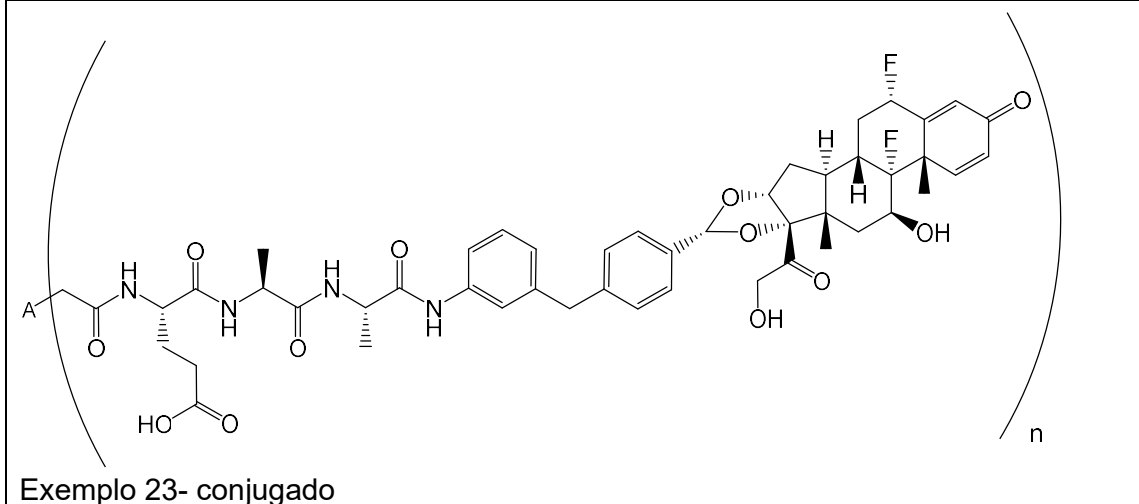




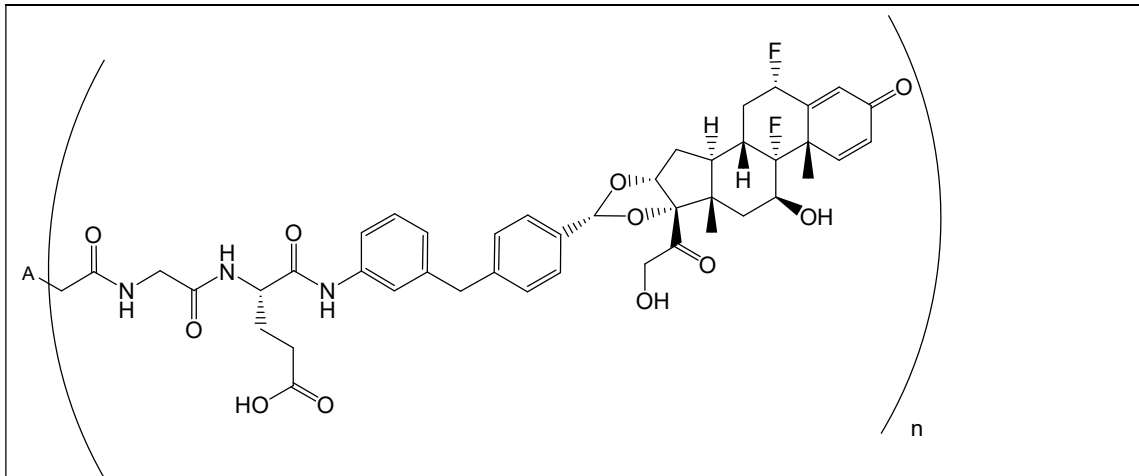
Exemplo 21B-conjugado



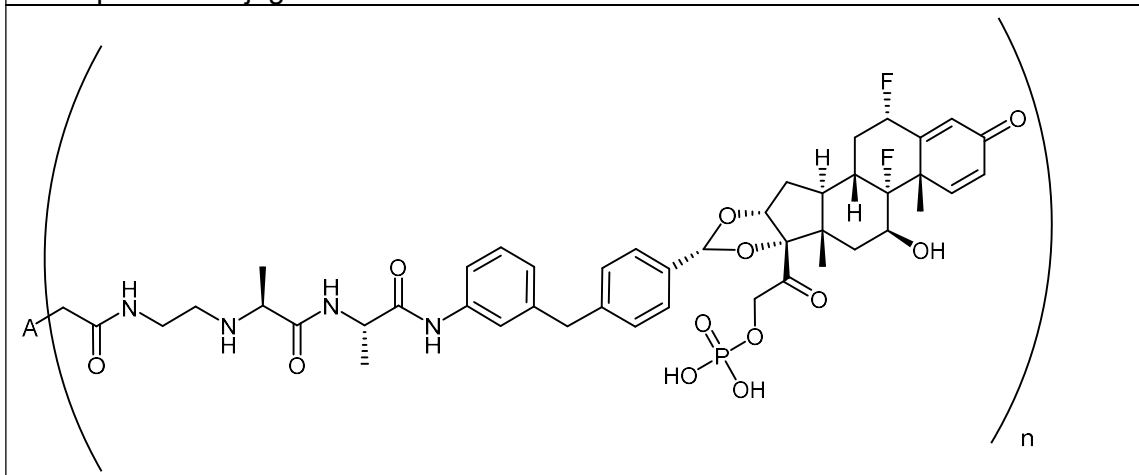
Exemplo 22- conjugado



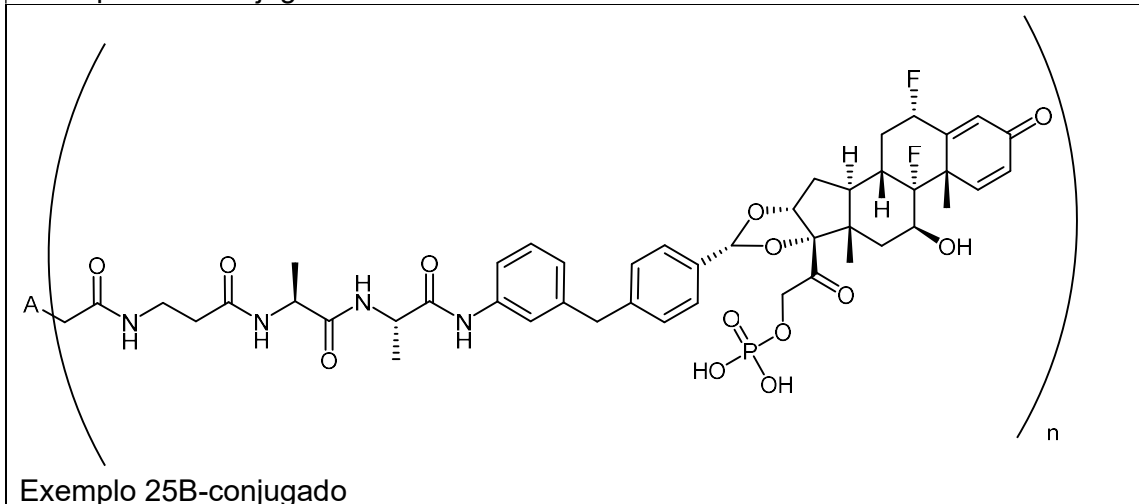
Exemplo 23- conjugado



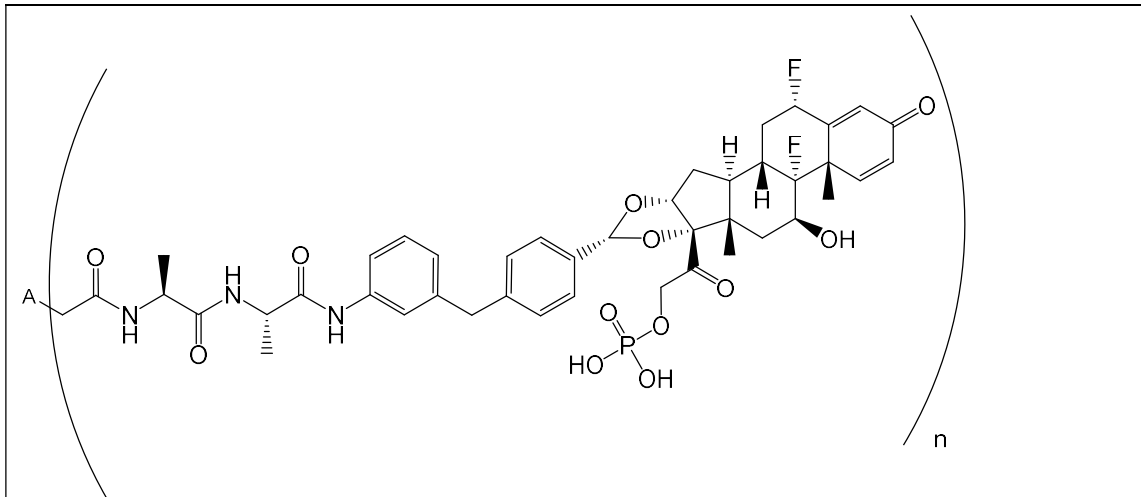
Exemplo 24-conjugado



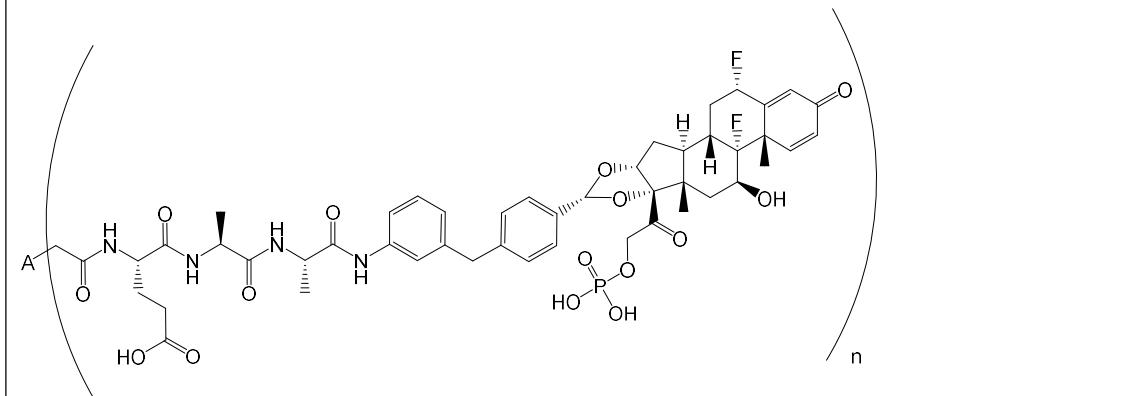
Exemplo 25A-conjugado



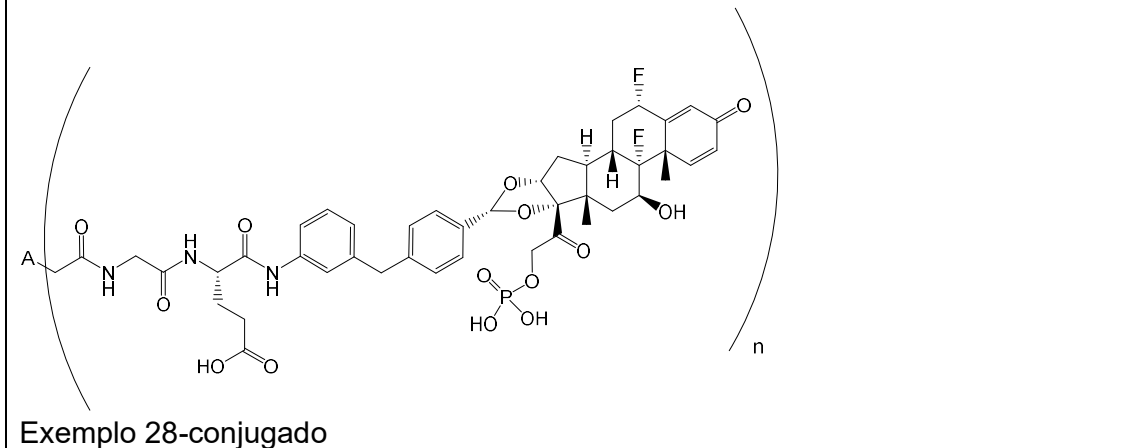
Exemplo 25B-conjugado



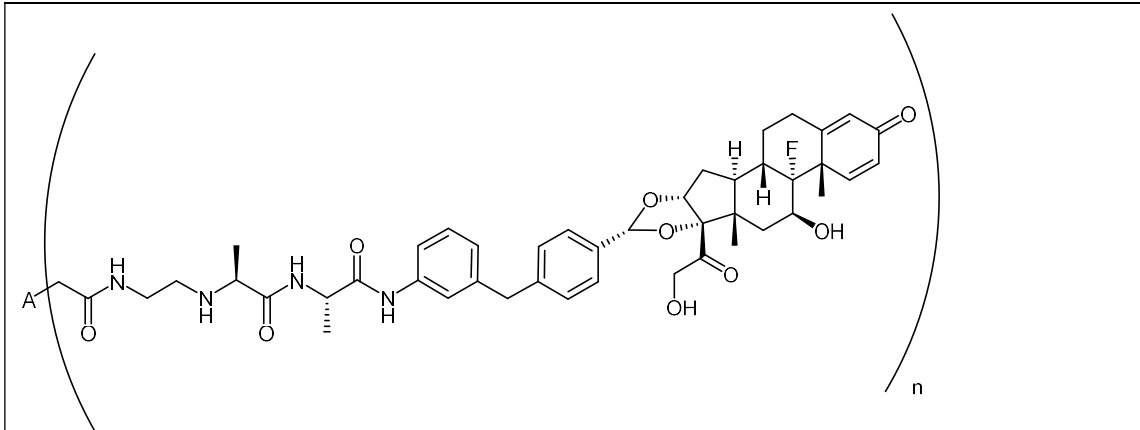
Exemplo 26-conjugado



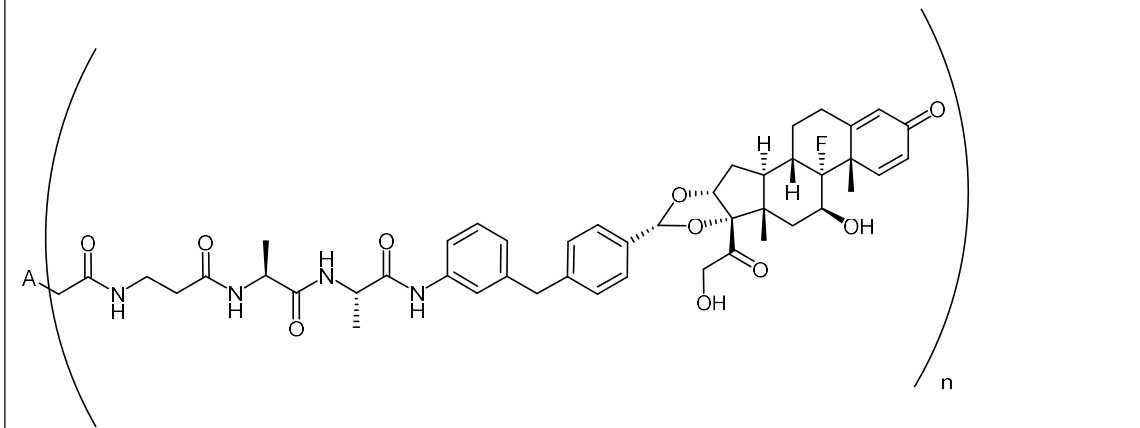
Exemplo 27-conjugado



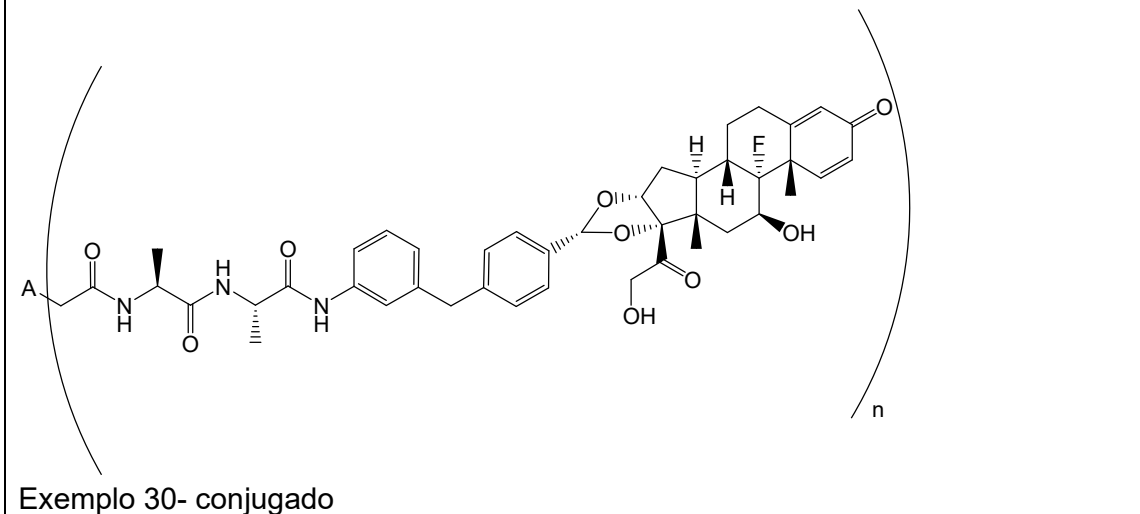
Exemplo 28-conjugado



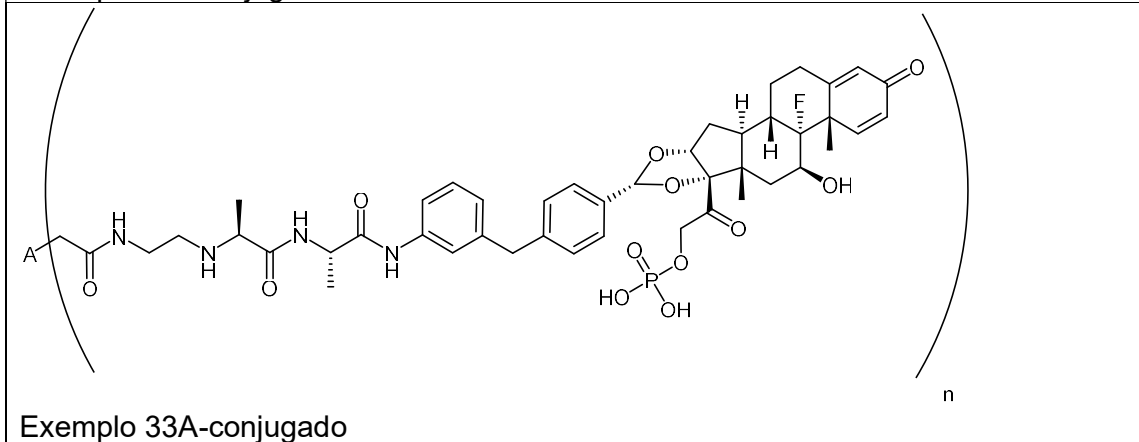
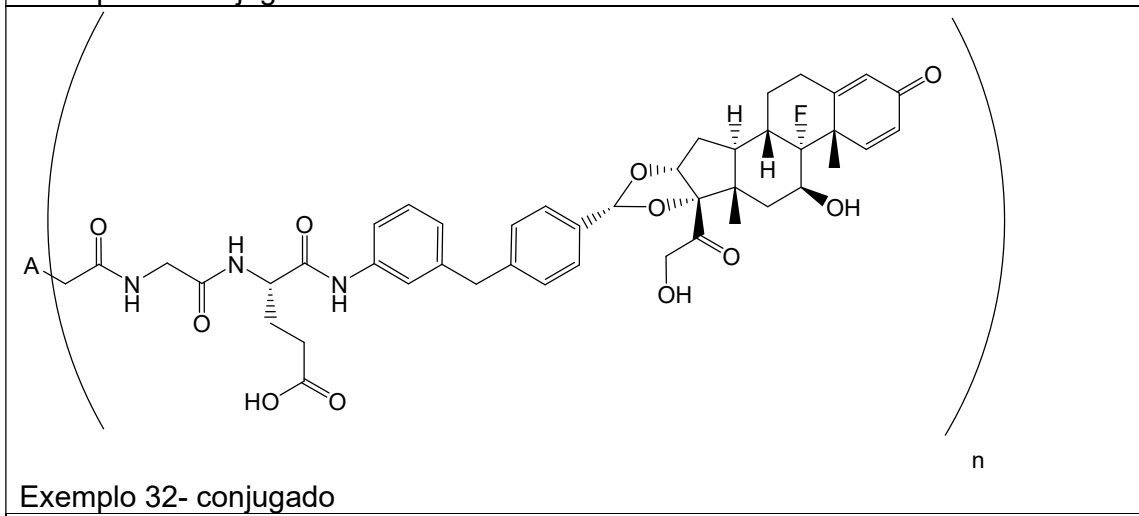
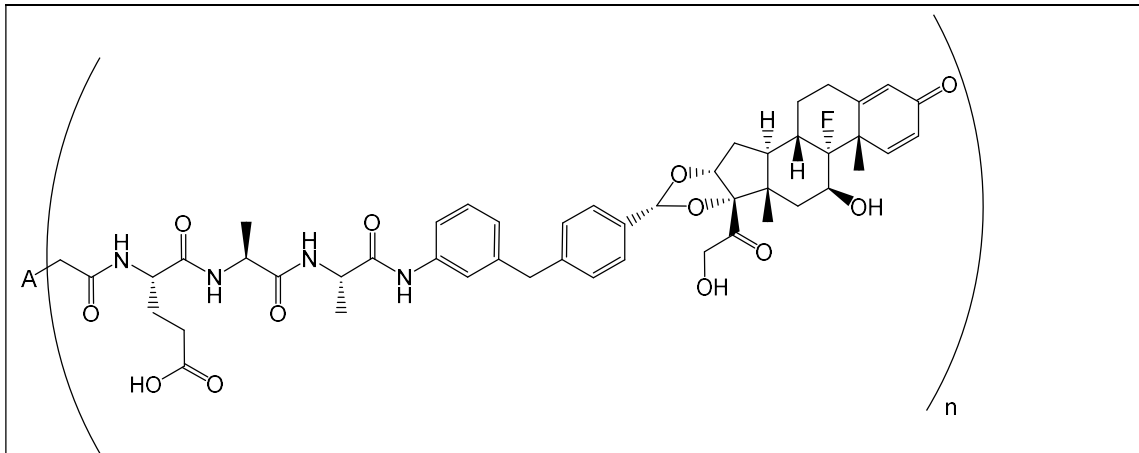
Exemplo 29A-conjugado

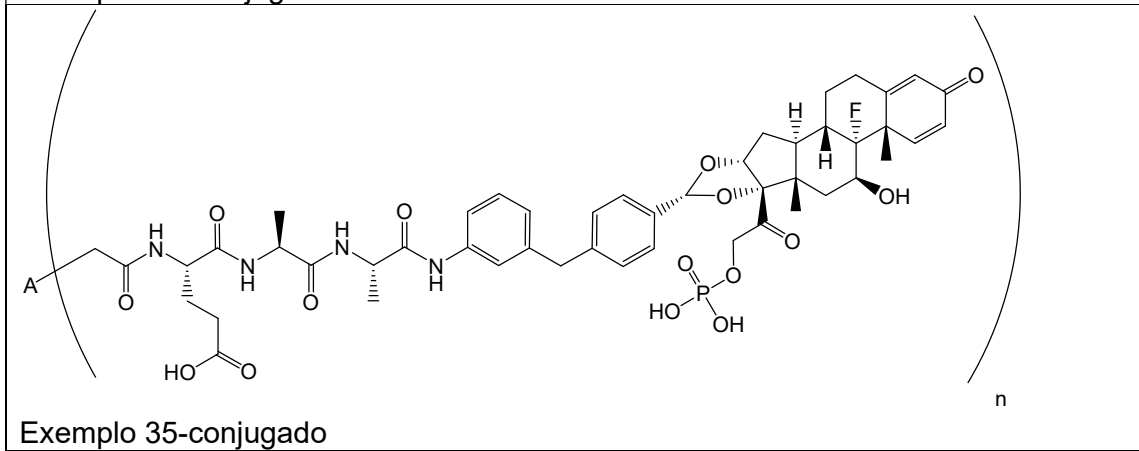
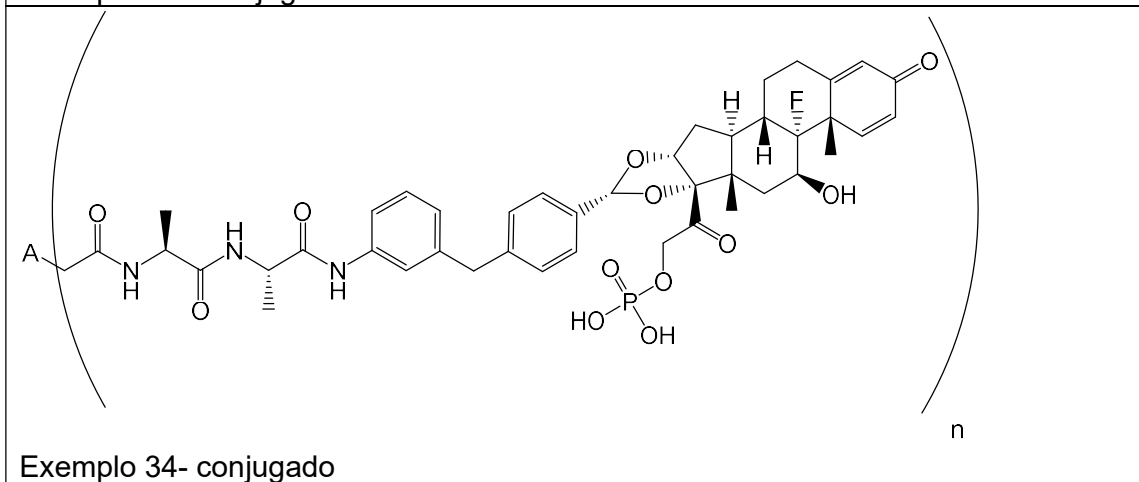
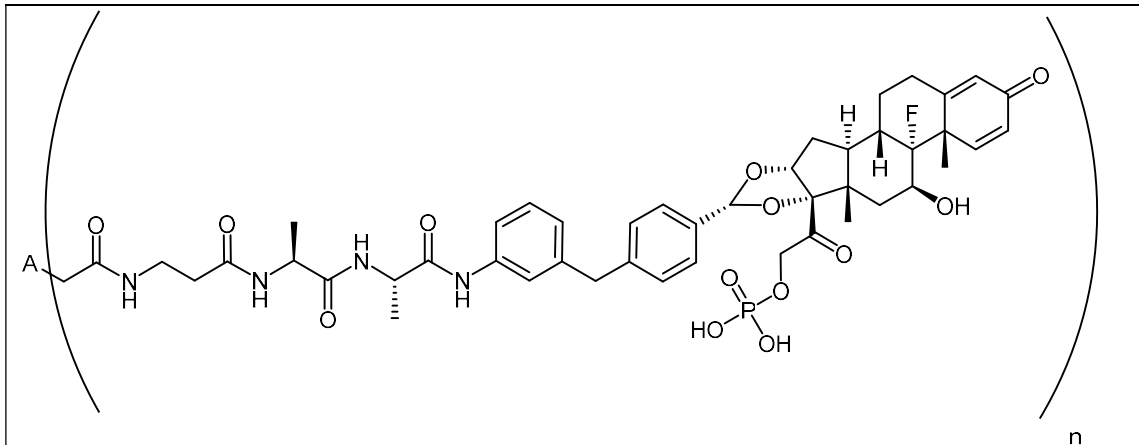


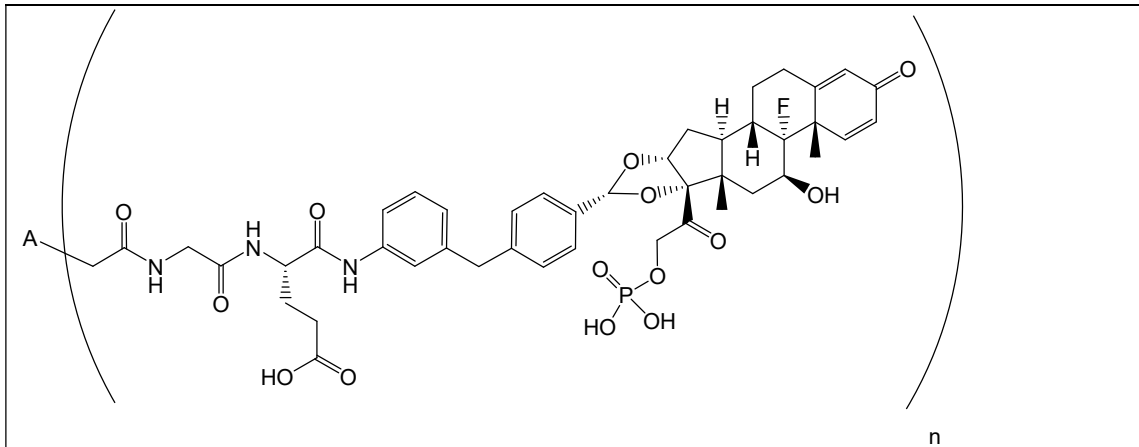
Exemplo 29B-conjugado



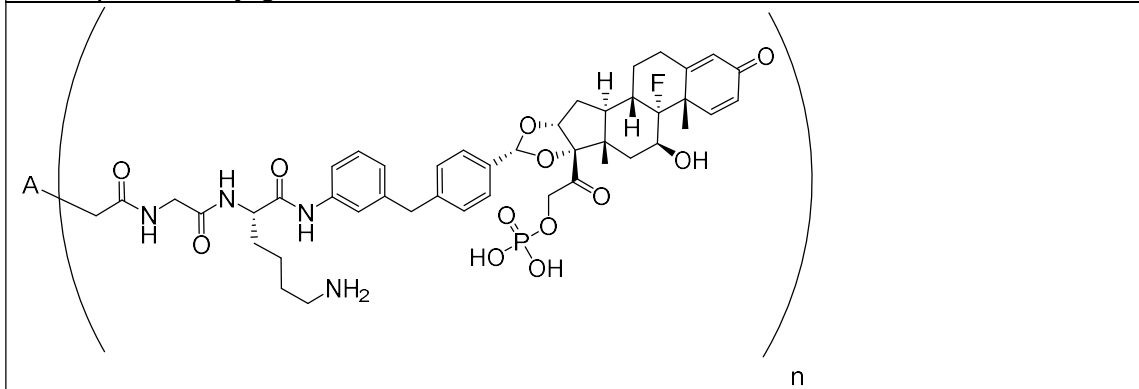
Exemplo 30- conjugado



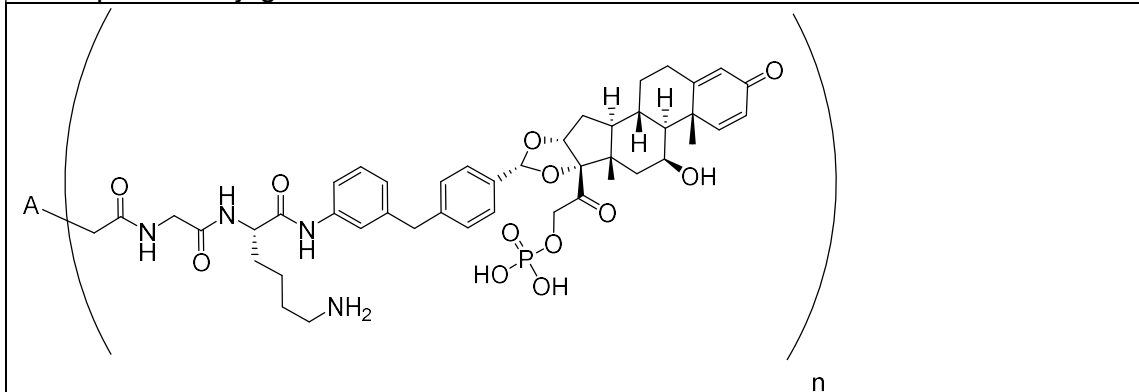




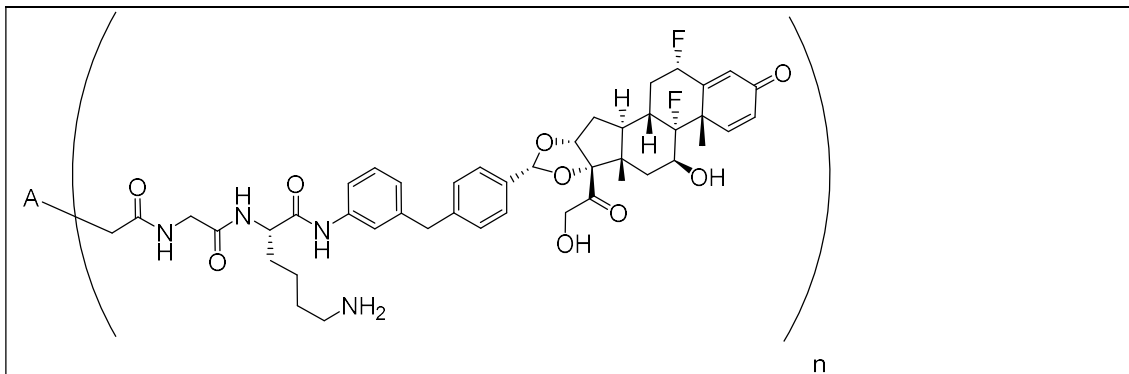
Exemplo 36-conjugado



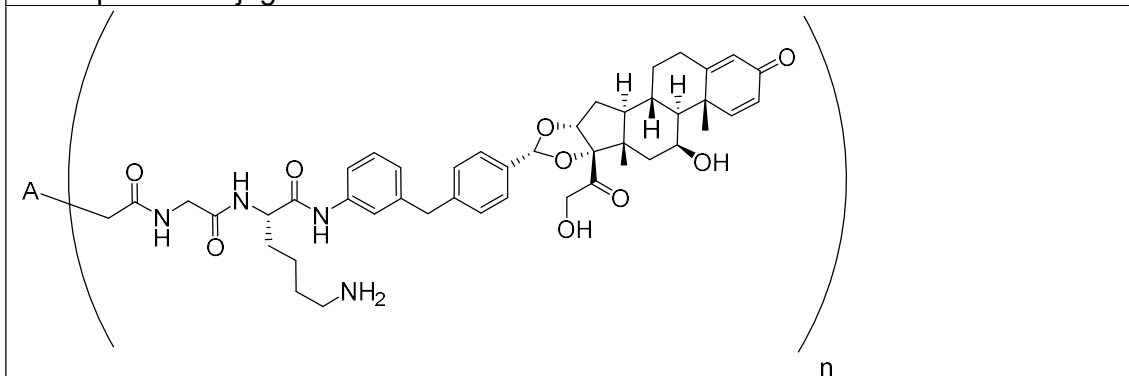
Exemplo 37-conjugado



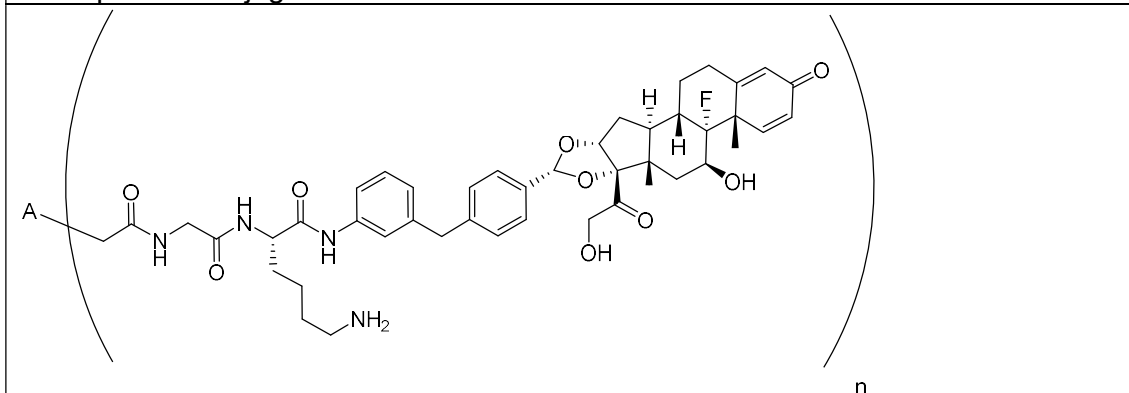
Exemplo 38-conjugado



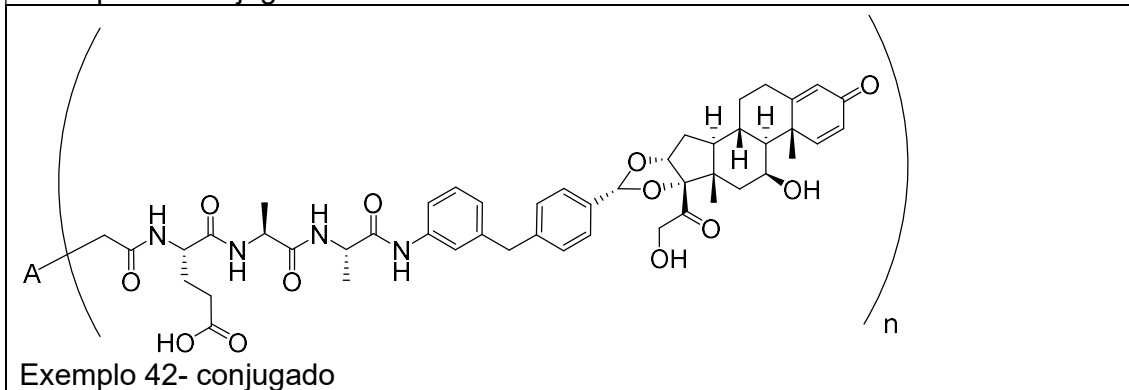
Exemplo 39-conjugado



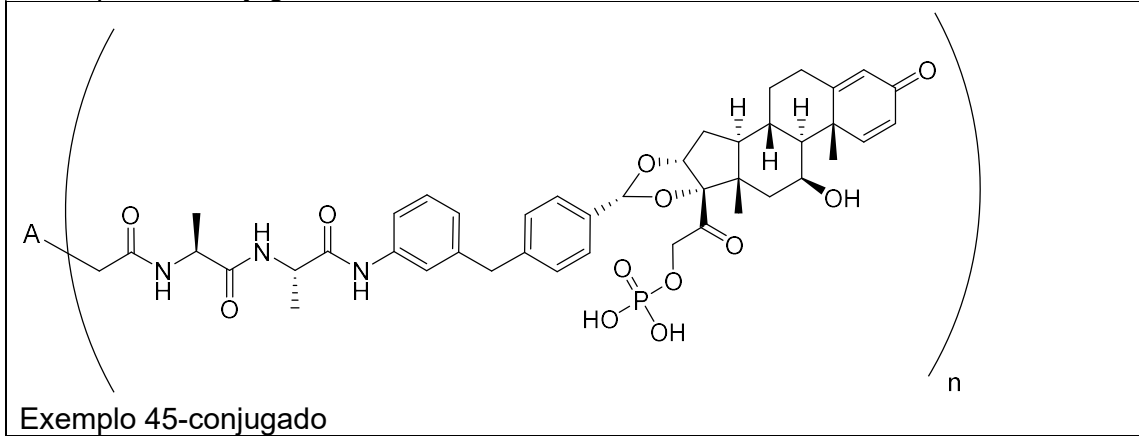
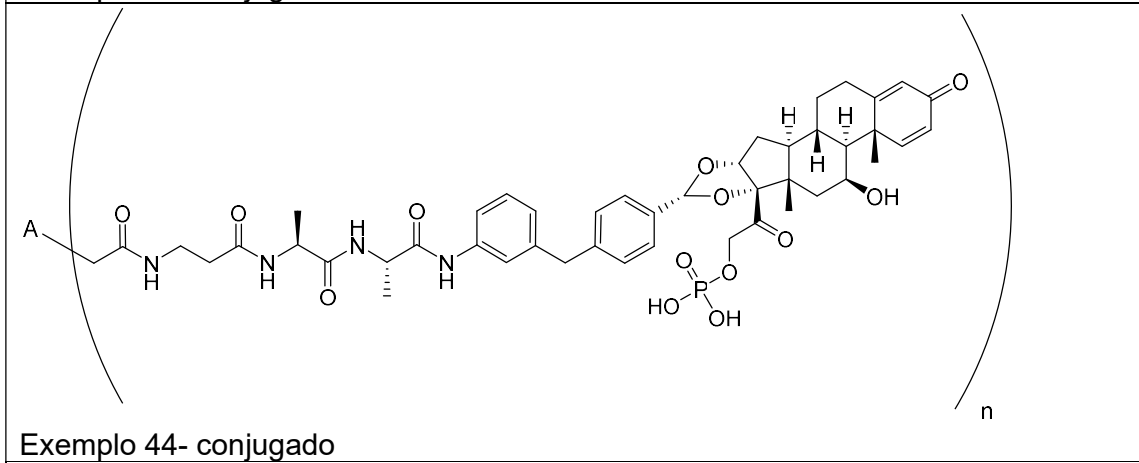
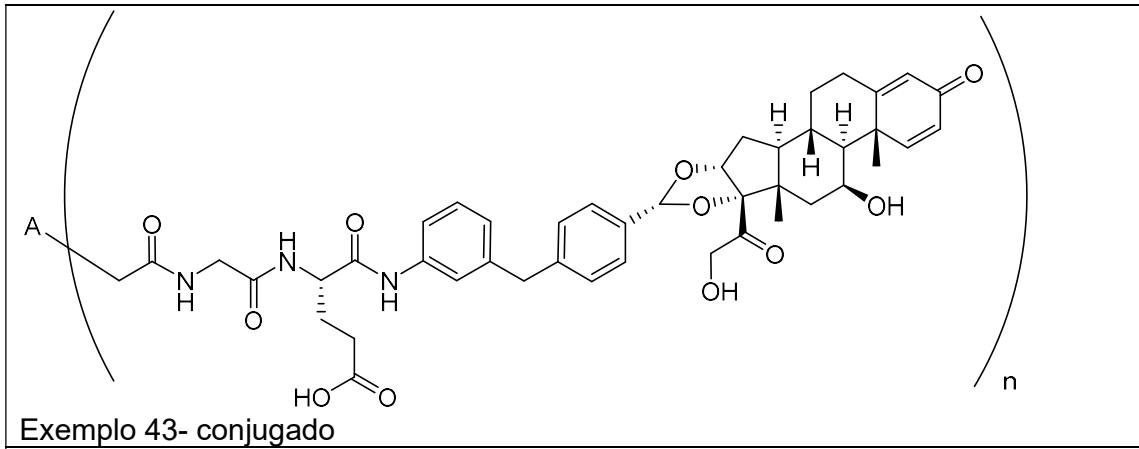
Exemplo 40- conjugado



Exemplo 41-conjugado



Exemplo 42- conjugado



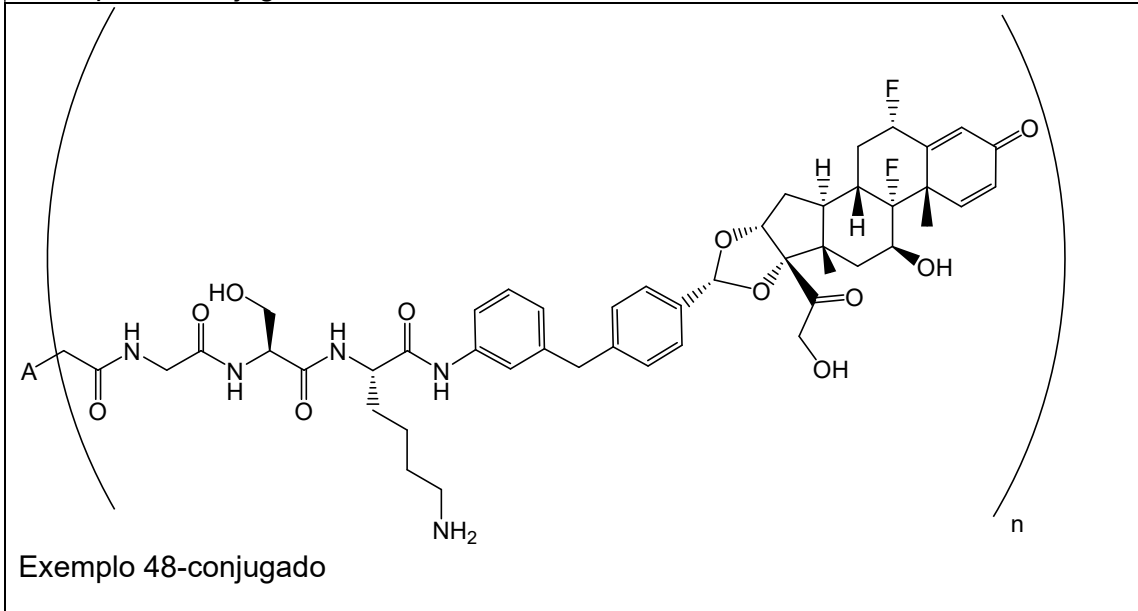
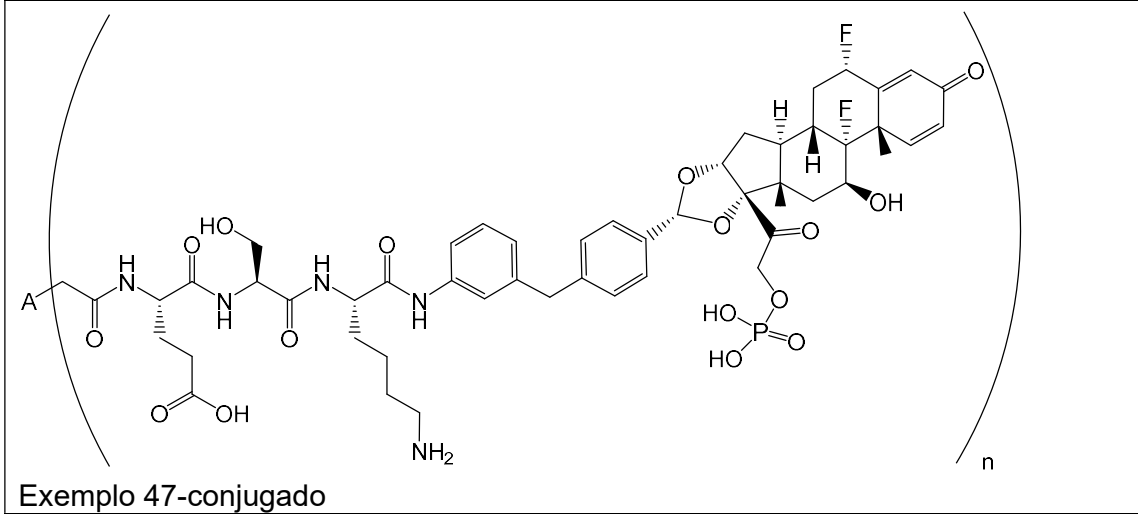
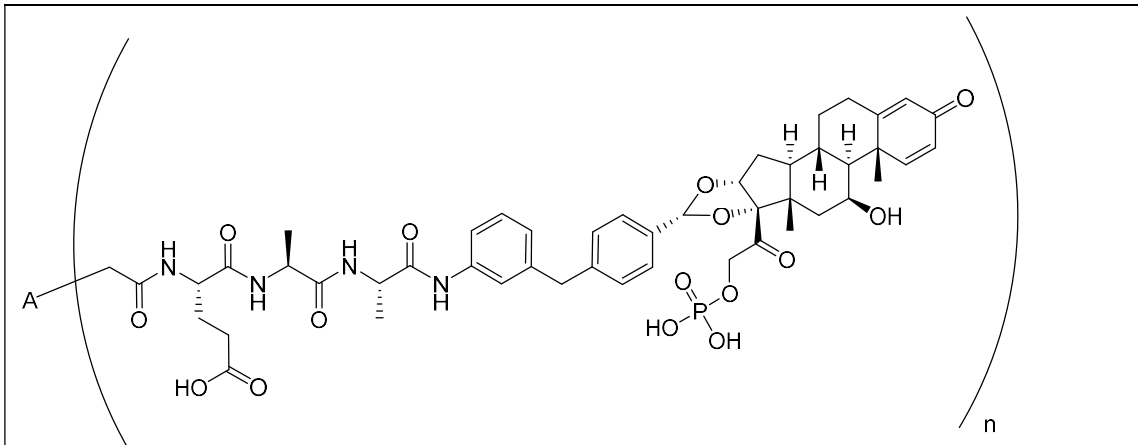
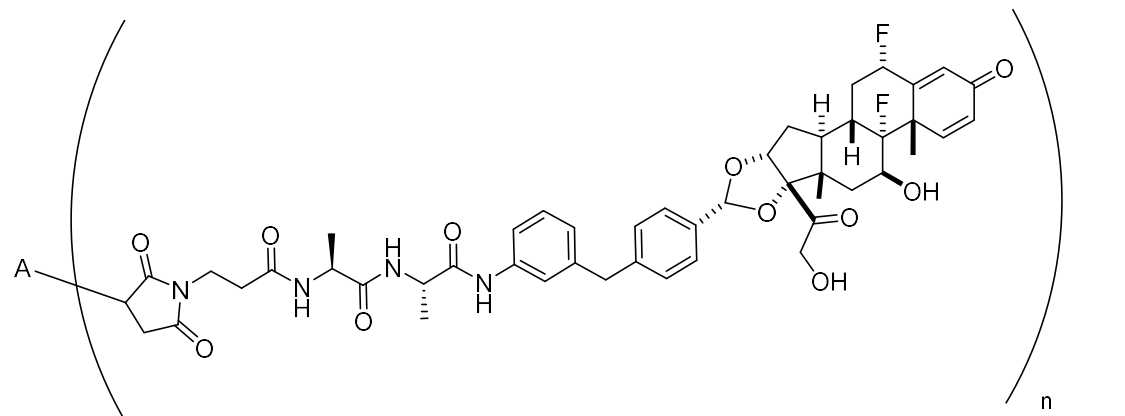
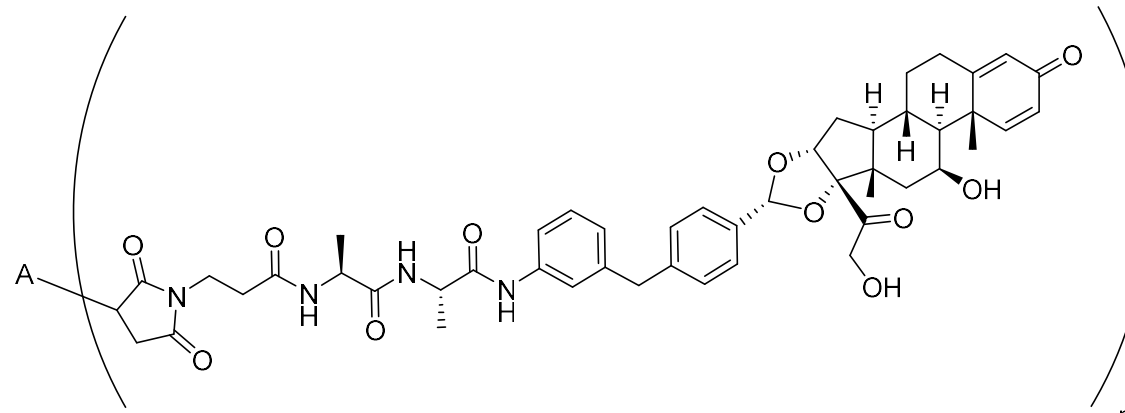


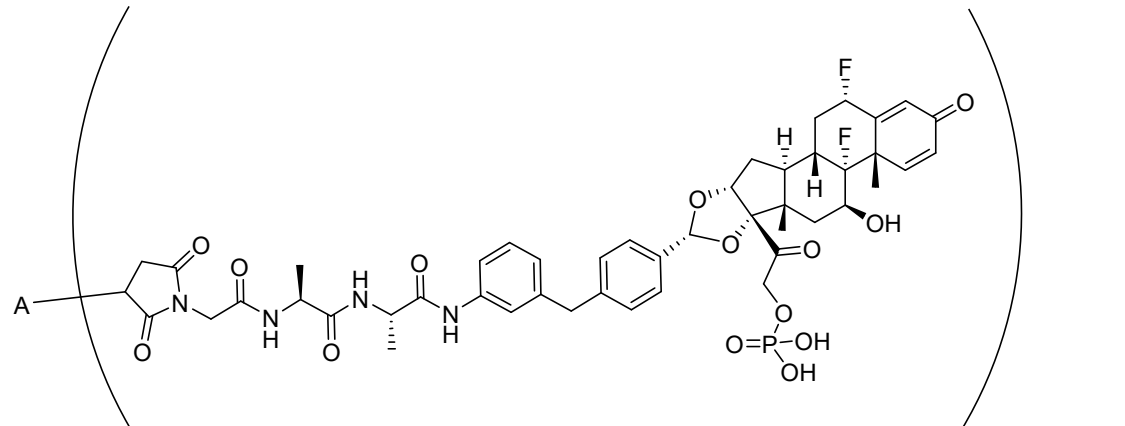
Tabela 6A. ADC conjugado



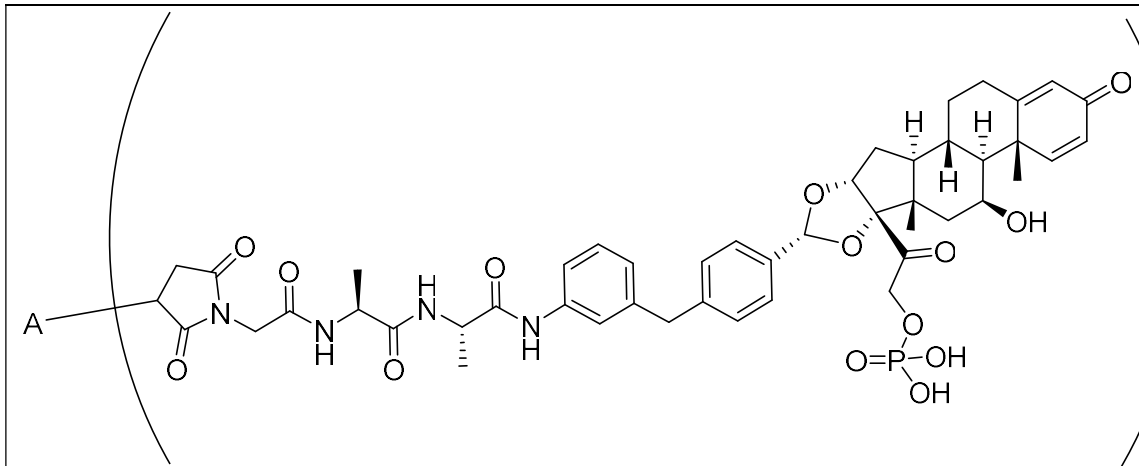
Exemplo 6-conjugado



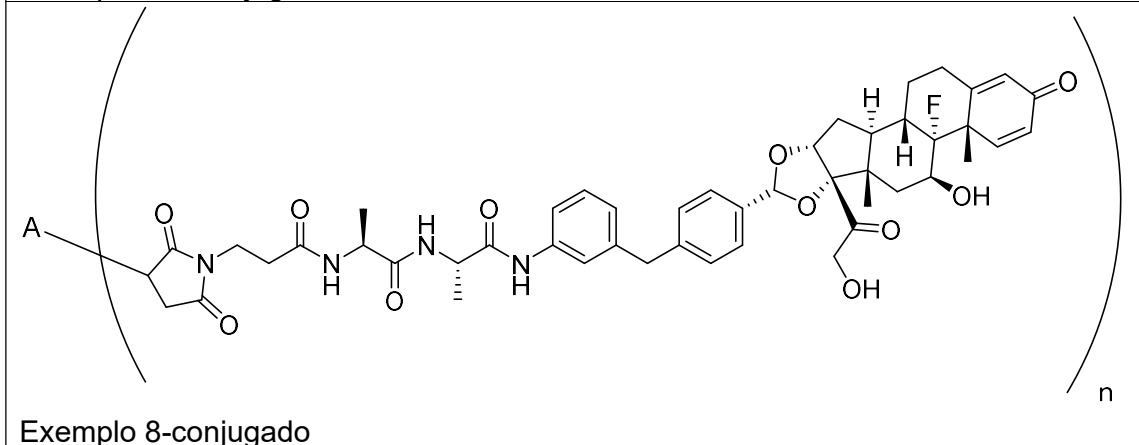
Exemplo 7-conjugado



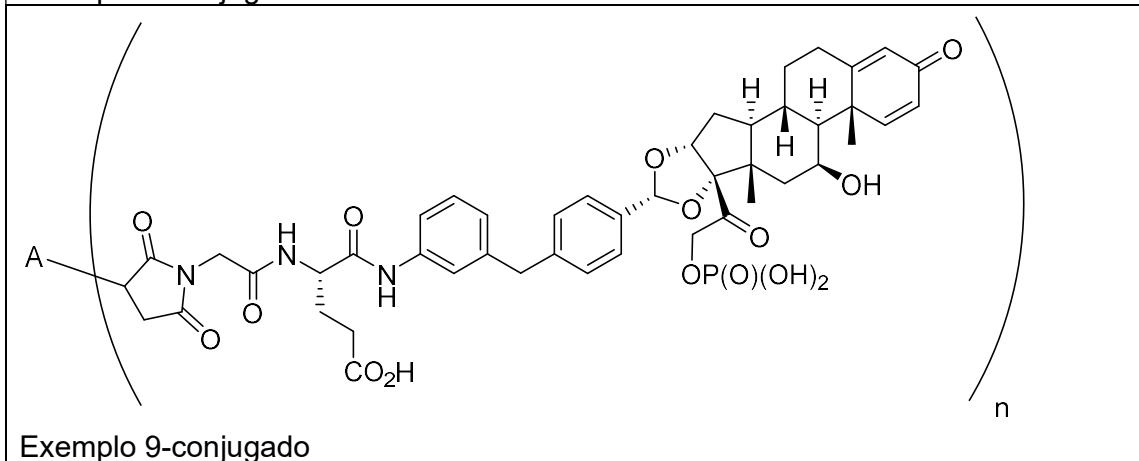
Exemplo 12- conjugado



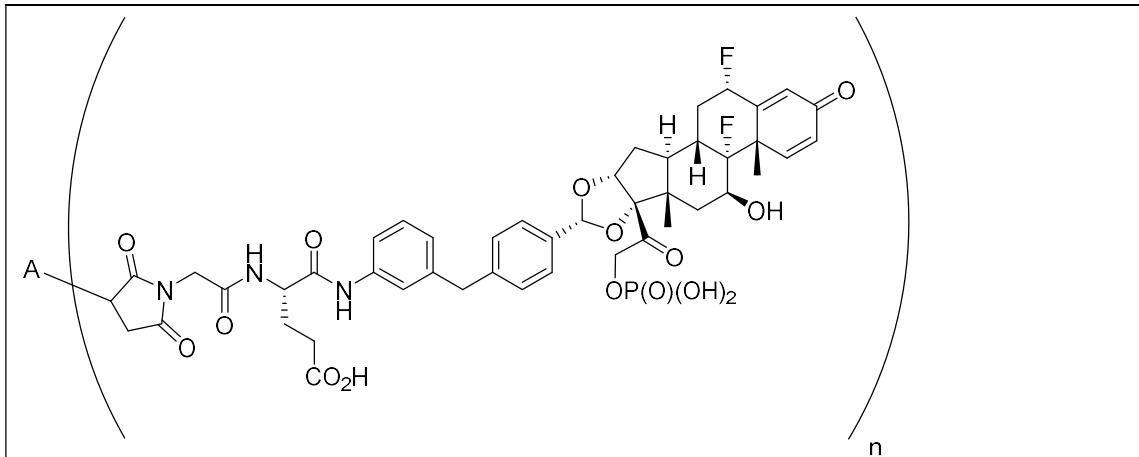
Exemplo 13-conjugado



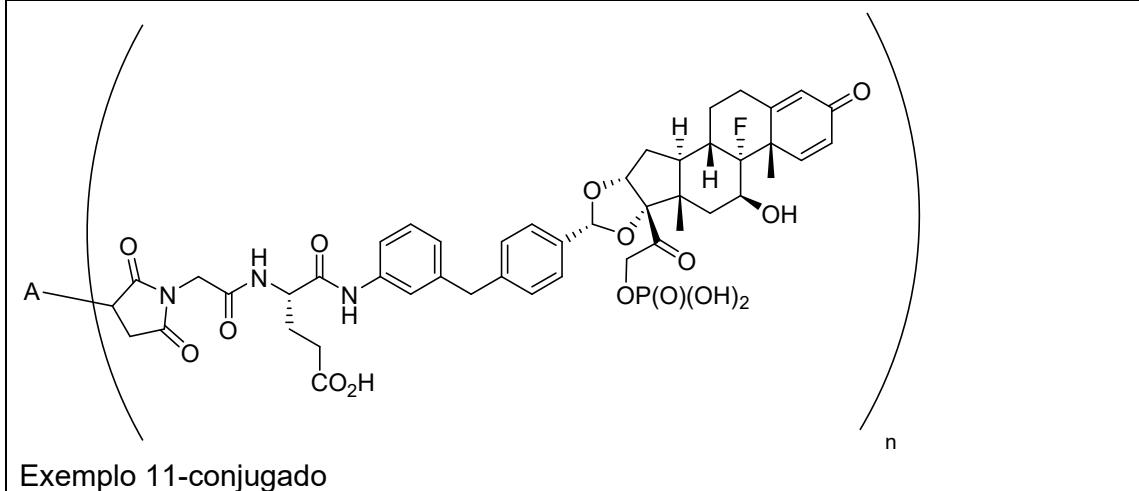
Exemplo 8-conjugado



Exemplo 9-conjugado

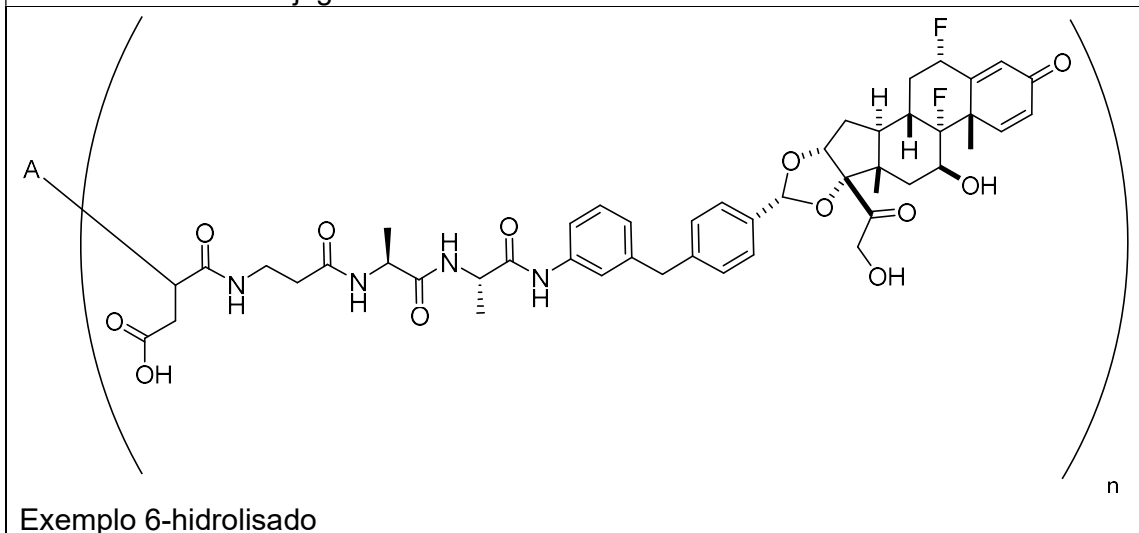


Exemplo 10- conjugado

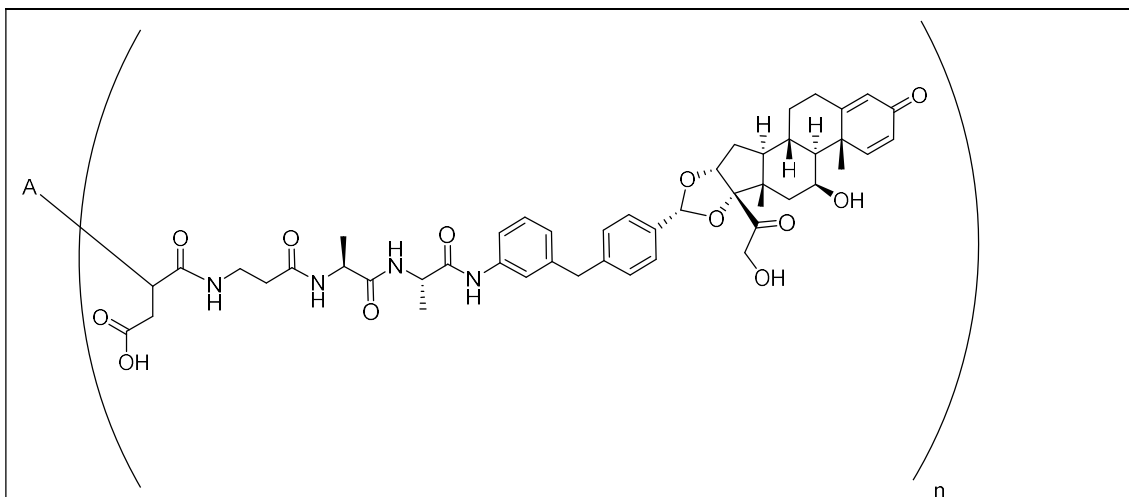


Exemplo 11-conjugado

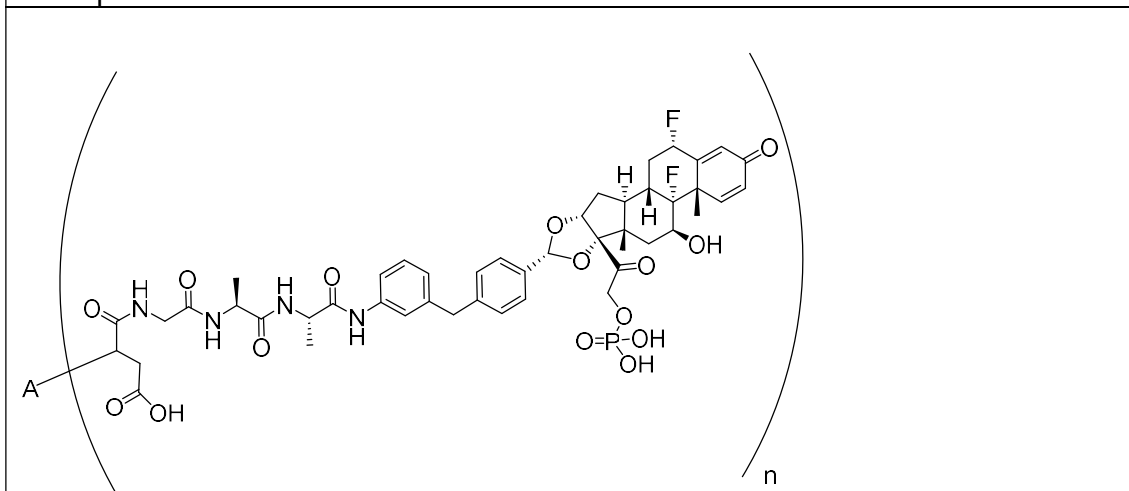
Tabela 6B. ADC conjugado e hidrolisado



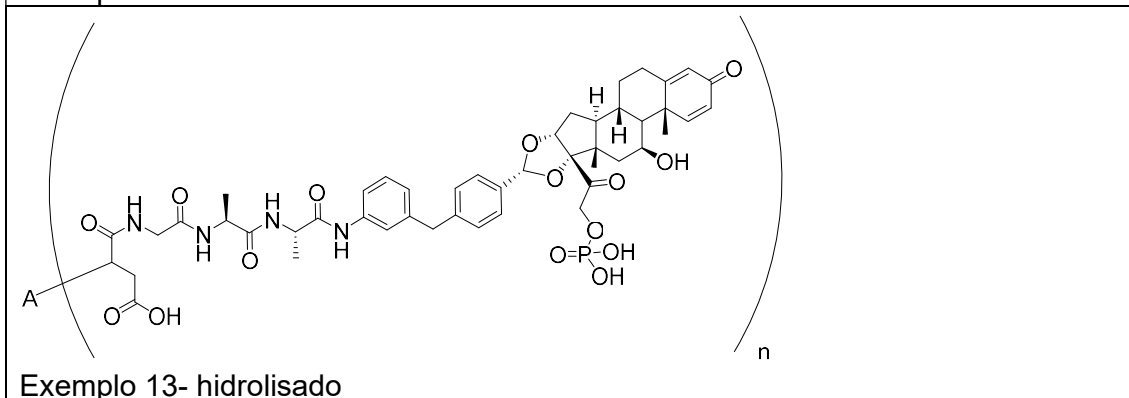
Exemplo 6-hidrolisado



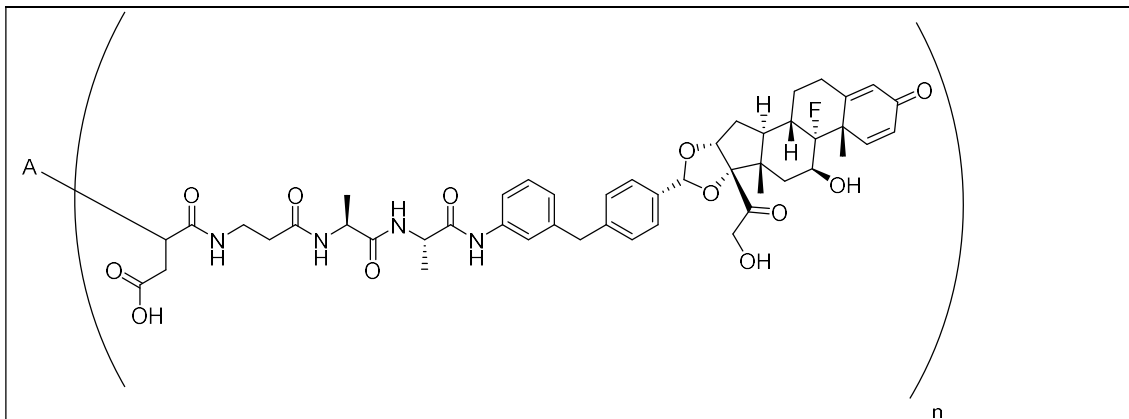
Exemplo 7-hidrolisado



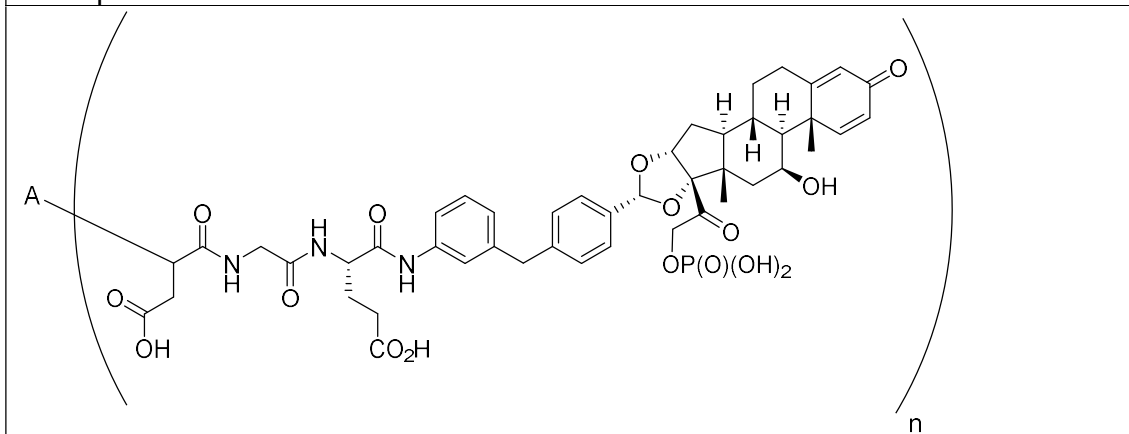
Exemplo 12- hidrolisado



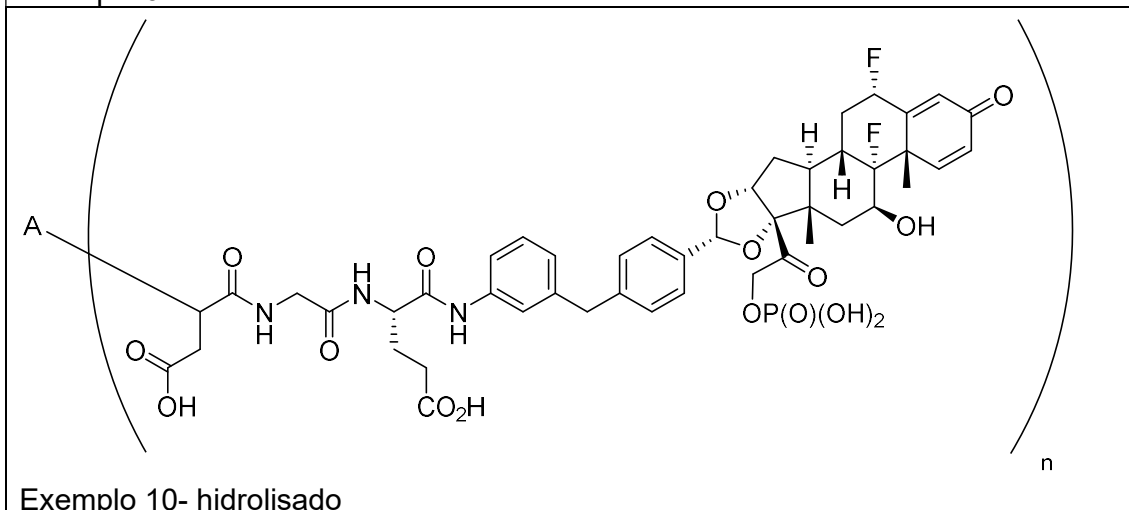
Exemplo 13- hidrolisado



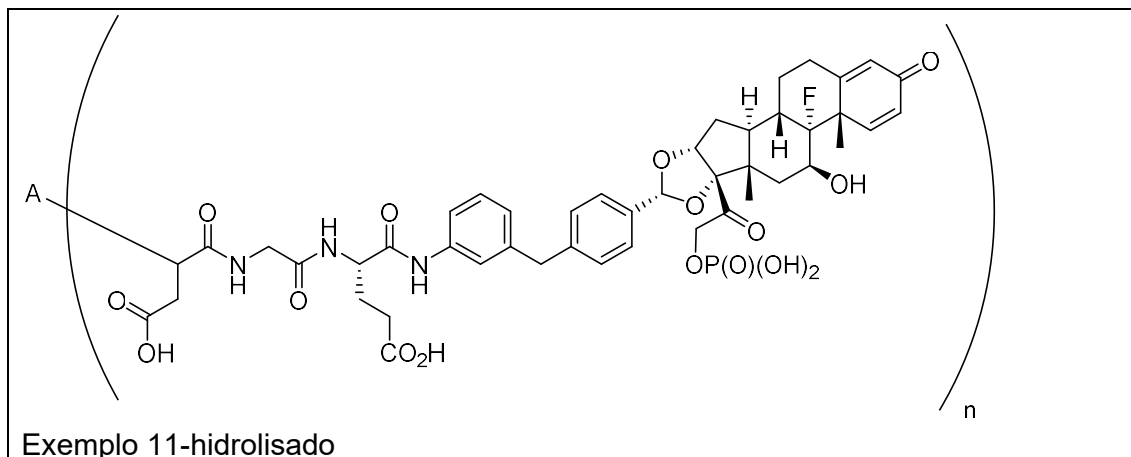
Exemplo 8-hidrolisado



Exemplo 9-hidrolisado



Exemplo 10- hidrolisado



[0126] Em certas modalidades da Tabela 5, o conjugado de anticorpo-fármaco é conjugado com o Exemplo 4 ou conjugado com o Exemplo 28. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 compreende regiões determinantes de complementaridade (CDRs), conforme estabelecido na SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, e SEQ ID NO: 12. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 compreende uma região variável da cadeia pesada apresentada como SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia leve apresentada como SEQ ID NO: 6. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 compreende uma cadeia pesada apresentada como SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve apresentada como SEQ ID NO: 4. Em certas modalidades, n é 2. Em certas modalidades, n é 4. Em certas modalidades da Tabela 5, o conjugado anticorpo-fármaco é conjugado com o Exemplo 4, conjugado com o Exemplo 28 ou conjugado com o Exemplo 47, em que n é 2 ou 4. Em certas modalidades da Tabela 5, o conjugado de anticorpo-fármaco é conjugado com o Exemplo 47 em que n é 2. Em certas modalidades da Tabela 5, o conjugado de anticorpo-fármaco é conjugado com o Exemplo 47 em que n é 4. Em certas modalidades da Tabela 5, o conjugado de anticorpo-fármaco é conjugado com o Exemplo 28 em que n é 2. Em certas modalidades da Tabela 5, o conjugado de anticorpo-fármaco é conjugado com o Exemplo 28, em que n é 4.

[0127] Em certas modalidades das Tabelas 6A e 6B, o conjugado de anticorpo-

fármaco é o Exemplo 6-conjugado, Exemplo 6-hidrolisado, Exemplo 7-conjugado, Exemplo 7-hidrolisado, Exemplo 12-conjugado, Exemplo 12-hidrolisado, Exemplo 13-conjugado ou Exemplo 13-hidrolisado. Em certas modalidades, o conjugado de anticorpo-fármaco é o Exemplo 6-hidrolisado, Exemplo 7-hidrolisado, Exemplo 12-hidrolisado ou Exemplo 13-hidrolisado. Em certas modalidades, o composto é hidrolisado no Exemplo 6, hidrolisado no Exemplo 7 ou hidrolisado no Exemplo 12. Em certas modalidades, o conjugado de anticorpo-fármaco é hidrolisado no Exemplo 12 ou hidrolisado no Exemplo 13. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 compreende regiões determinantes de complementaridade (CDRs), conforme estabelecido na SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, e SEQ ID NO: 12. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 compreende uma região variável da cadeia pesada apresentada como SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia leve apresentada como SEQ ID NO: 6. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CD40 compreende uma cadeia pesada apresentada como SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve apresentada como SEQ ID NO: 4. Em certas modalidades, n é 2. Em certas modalidades, n é 4.

III. MÉTODOS DE USO E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

[0128]São fornecidos neste documento conjugados de anticorpo-fármaco de Fórmula (I) ou (II) que podem ser utilizados *in vitro* ou *in vivo*. Por conseguinte, também são fornecidas composições, por exemplo, composições farmacêuticas para certos usos *in vivo*, compreendendo um conjugado de anticorpo-fármaco de Fórmula (I) ou (II) com o grau de pureza desejado em um carreador, excipiente ou estabilizador fisiologicamente aceitável (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA). Carreadores, excipientes ou estabilizadores aceitáveis não são tóxicos para os receptores nas dosagens e concentrações empregadas.

[0129]As composições (por exemplo, composições farmacêuticas) a serem usadas para administração *in vivo* podem ser estéreis, o que pode ser realizado por

filtração através, por exemplo, de membranas de filtração estéreis. As composições (por exemplo, composições farmacêuticas) a serem usadas para administração *in vivo* podem compreender um conservante.

[0130]Os conjugados de anticorpo-fármaco podem ser formulados em formas de dosagem e administrados (por exemplo, via administração intravenosa ou infusão) de acordo com o conhecimento na técnica.

[0131]Conjugados de anticorpo-fármaco e/ou composições farmacêuticas compreendendo conjugados de anticorpo-fármaco descritos neste documento podem ser úteis na lisação de uma célula que expressa CD40 (*in vitro* ou *in vivo*) e/ou no tratamento de doenças ou distúrbios caracterizados pelo aumento de CD40. Em algumas modalidades, os conjugados de fármacos de anticorpo e/ou composições são úteis na inibição da liberação de citocinas (*in vitro* ou *in vivo*) e/ou no tratamento de doenças autoimunes ou inflamatórias.

[0132]Em certas modalidades, é fornecido um método para tratar uma afecção selecionada a partir do grupo que consiste em doença inflamatória intestinal (DII), lúpus eritematoso sistêmico (LES), esclerose múltipla, artrite reumatoide, síndrome de Sjogren e hidradenite supurativa (HS), em um sujeito em necessidade do mesmo, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz do conjugado de anticorpo-fármaco ou composição farmacêutica, como descrito neste documento, ao sujeito. Em certas modalidades, a afecção é doença inflamatória intestinal (DII). Em certas modalidades, a IBD é colite ulcerosa (UC) ou doença de Crohn. Em certas modalidades, a condição é lúpus eritematoso sistêmico (LES). Em certas modalidades, a afecção é esclerose múltipla. Em certas modalidades, a afecção é artrite reumatoide. Em certas modalidades, a afecção é a síndrome de Sjogren. Em certas modalidades, a afecção é Hidradenite supurativa (HS).

[0133]Em outra modalidade, é fornecido o conjugado de anticorpo-fármaco ou a composição farmacêutica, conforme descrito neste documento, para uso no

tratamento de uma condição selecionada do grupo que consiste em doença inflamatória intestinal (DII), lúpus eritematoso sistêmico (LES), esclerose múltipla, artrite reumatoide, síndrome de Sjogren e hidradenite supurativa (HS).

[0134]Em outra modalidade, é fornecido o conjugado de anticorpo-fármaco ou a composição farmacêutica, como descrito neste documento, para a preparação de um medicamento para o tratamento de uma afecção selecionada a partir do grupo que consiste em doença inflamatória intestinal (DII), lúpus eritematoso sistêmico (LES), esclerose múltipla, artrite reumatoide, síndrome de Sjogren e hidradenite supurativa (SH).

[0135]Algumas modalidades compreendem métodos de entrega de um agonista do receptor de glicocorticoide a uma célula que expressa CD40. Tais métodos podem incluir uma etapa de contato de uma célula que expressa CD40 com um conjugado de anticorpo-fármaco, como descrito neste documento. Algumas modalidades compreendem um método *in vitro* de administração de um agonista do receptor de glicocorticoide a uma célula que expressa CD40.

[0136]Também são fornecidos métodos para determinar a atividade anti-inflamatória de um conjugado de anticorpo-fármaco. Tais métodos podem incluir uma etapa de contato de uma célula que expressa CD40 com um conjugado de anticorpo-fármaco, como descrito neste documento. Algumas modalidades compreendem o contato de uma célula que expressa CD40 com um conjugado de anticorpo-fármaco como descrito neste documento e a determinação da liberação reduzida de citocinas pró-inflamatórias da célula em comparação com uma célula de controle. Algumas modalidades compreendem um método *in vitro* para determinar a atividade anti-inflamatória de um conjugado de fármaco de anticorpo.

[0137]Algumas modalidades compreendem métodos de triagem (por exemplo, métodos *in vitro*) que incluem o contato, direta ou indiretamente, de células (por exemplo, células que expressam CD40) com um conjugado de anticorpo-fármaco

e determinar se o conjugado de anticorpo-fármaco modula uma atividade ou função das células, como refletido, por exemplo, por alterações na morfologia ou viabilidade celular, expressão de um marcador, diferenciação ou des-diferenciação, respiração celular, atividade mitocondrial, integridade da membrana, maturação, proliferação, viabilidade, apoptose ou morte celular. Um exemplo de interação direta é a interação física, enquanto uma interação indireta inclui, por exemplo, a ação de uma composição sobre uma molécula intermediária que, por sua vez, atua sobre a entidade referenciada (por exemplo, célula ou cultura de células).

[0138]Assim, em certas modalidades, é fornecido um método de entrega de um agonista do receptor de glicocorticoide a uma célula que expressa CD40, compreendendo a etapa de contatar a célula com o conjugado de anticorpo-fármaco ou uma composição farmacêutica como descrito neste documento.

[0139]Em certas modalidades adicionais, é fornecido um método para determinar a atividade anti-inflamatória de um conjugado de anticorpo-fármaco, compreendendo o contato de uma célula que expressa CD40 com o conjugado de anticorpo-fármaco, como descrito neste documento; e determinar uma liberação reduzida de citocinas pró-inflamatórias da célula em comparação com uma célula de controle.

IV. ARTIGOS DE FABRICAÇÃO

[0140]A divulgação também inclui embalagens e kits farmacêuticos compreendendo um ou mais recipientes, em que um recipiente pode compreender uma ou mais doses de um conjugado de anticorpo-fármaco ou composição, como descrito neste documento. Em certas modalidades, a embalagem ou kit contém uma dosagem unitária, significando uma quantidade predeterminada de uma composição ou conjugado de anticorpo-fármaco, com ou sem um ou mais agentes adicionais.

[0141]Em algumas modalidades, os kits são fornecidos em uma ou mais soluções líquidas, que podem ser uma solução não aquosa ou aquosa. Em algumas

modalidades, a solução é uma solução estéril. A composição no kit também pode ser fornecida como pó (ou pós) seco ou na forma liofilizada que pode ser reconstituída após a adição de um líquido apropriado. O líquido usado para reconstituição pode estar contido em um recipiente separado. Esses líquidos podem compreender tampão (ou tampões) estéril aceitável sob o ponto de vista farmacêutico ou outro diluente (ou diluentes), como água bacteriostática para injeção, solução salina tamponada com fosfato, solução de Ringer ou solução de dextrose.

[0142]O kit pode compreender um ou vários contêineres e um rótulo ou bula no, ou associado ao contêiner (ou contêineres), indicando que a composição fechada é usada para tratar a condição de doença de escolha. Contêineres adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos, seringas, etc. Os contêineres podem ser formados a partir de uma variedade de materiais, como vidro ou plástico. O recipiente (ou recipientes) pode compreender uma porta de acesso estéril, por exemplo, o recipiente pode ser uma bolsa de solução intravenosa ou um frasco com uma rolha que pode ser perfurada por uma agulha de injeção hipodérmica.

[0143]Em algumas modalidades, o kit pode conter um meio pelo qual administrar o conjugado de anticorpo-fármaco e quaisquer componentes opcionais a um indivíduo em necessidade, por exemplo, uma ou mais agulhas ou seringas (pré-cheias ou vazias), um conta-gotas, pipeta, ou outro aparelho semelhante, a partir do qual a composição pode ser injetada ou introduzida no sujeito ou aplicada a uma área doente do corpo. Os kits da divulgação também incluem tipicamente um meio para conter os frascos, ou semelhantes, e outros componentes em confinamento próximo para venda comercial, como, por exemplo, recipientes de plástico moldados por sopro nos quais os frascos e outros aparelhos desejados são colocados e retido.

[0144]Assim, em certas modalidades, é fornecido um kit que compreende:

(a)um contêiner que compreende o conjugado de anticorpo-fármaco ou uma composição farmacêutica como descrito neste documento; e

(b)um rótulo ou bula ou associado a um ou mais contêineres, em que o rótulo ou a bula indica que o conjugado de anticorpo-fármaco ou composição farmacêutica é usado para tratar uma afecção selecionada a partir do grupo que consiste em doença inflamatória intestinal (DII), lúpus eritematoso sistêmico (LES), esclerose múltipla, artrite reumatoide, síndrome de Sjogren, e Hidradenite supurativa (HS).

EXEMPLOS

[0145]Entende-se que os exemplos e modalidades descritos neste documento são apenas para fins ilustrativos e que várias modificações ou alterações à luz serão sugeridas a pessoas versadas na técnica e serão incluídas no espírito e alcance desta divulgação.

MÉTODOS ANALÍTICOS

1. PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS DE MOLÉCULAS PEQUENAS

[0146]A menos que indicado de outra forma, todos RMN de ^1H e ^{13}C (ressonância magnética nuclear) foram recolhidos dados sobre um Varian Mercury Plus 400 MHz ou num instrumento Bruker AVIII 300 MHz; os desvios químicos são cotados em partes por milhão (ppm). Os dados analíticos de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e LCMS são detalhados no experimental ou referenciados às condições listadas na Tabela 7.

Tabela 7. Lista de métodos LCMS e HPLC	
Método	Condições
a	O gradiente foi de 1 a 90% B em 3,4 min, 90 a 100% B em 0,45 min, 100 a 1% B em 0,01 min e depois mantido em 1% B por 0,65 min (taxa de fluxo de 0,8 ml/min). A fase móvel A foi de 0,0375% de ácido acético Trifluoro em H ₂ O, fase mel B foi de 0,018% de ácido trifluoroacético em acetonitrila. A coluna utilizada para a cromatografia foi uma coluna Phenomenex Luna-C18 de 2,0 x 50 mm (partículas de 5 µm). Os métodos de detecção são matriz de diodos (DAD) e detector de dispersão por luz evaporativa (ELSD), além de ionização por eletropulverização positiva.
b	Foi utilizado um gradiente de 5 a 100% de acetonitrila (A) e 0,1% de ácido trifluoroacético em água (B), a uma taxa de fluxo de 1,5 ml/min (0 a 0,05 min 5% A, 0,05 a 1,2 min 5 a 100% A, 1,2 a 1,4 min 100% A, 1,4 a 1,5 min 100 a 5% A. 0,25 min de atraso pós-execução).

c	O gradiente foi de 5 a 90% B em 3,4 min, 90 a 100% B em 0,45 min, 100 a 5% B em 0,01 min e, em seguida, mantido em 5% B por 0,65 min (taxa de fluxo de 0,8 ml/min). A fase móvel A foi de NH_4HCO_3 a 10 mM, fase móvel B era acetonitrila de grau HPLC. A coluna usada para a cromatografia é uma coluna Xbridge Shield RPC18 de 2,1 x 50 mm (partículas de 5 μm). Os métodos de detecção são a matriz de diodos (DAD) e a detecção de espalhamento evaporativo da luz (ELSD), bem como a ionização por eletropulverização positiva (MS)
AA1	Instrumento: HPLC preparativa para Shimadzu LC-8A. Coluna: Phenomenex Luna C18 200 * 40 mm * 10 μm . Fase móvel A: H_2O (0,09% de ácido trifluoroacético) e B: acetonitrila. Gradiente: B de 40% a 60% em 20 min. Taxa de fluxo: 60 ml/min. Comprimento de onda: 220 e 254 nm.
AA2	Instrumento: sistema HPLC semipreparativo Gilson 281. A fase móvel A: ácido trifluoroacético/ H_2O = 0,075% v/v; B: acetonitrila. Coluna: Nano-micro Kromasil C18 100 * 30 mm 5 μm . Taxa de fluxo: 25 ml/min. Comprimento de onda do monitor: 220 e 254 nm.
AA3	Instrumento: sistema HPLC semipreparativo Gilson 281. Fase móvel A: ácido trifluoroacético/ H_2O = 0,075% v/v; B: acetonitrila. Coluna: Phenomenex Synergi C18 100 * 30mm * 4 μm Taxa de fluxo: 25 ml/min. Comprimento de onda do monitor: 220 e 254 nm.
AA4	O gradiente foi de 1 a 90% B em 3,4 min, 90 a 100% B em 0,45 min, 100 a 1% B em 0,01 min e depois mantido em 1% B por 0,65 min (taxa de fluxo de 0,8 ml/min). Fase móvel A: ácido trifluoroacético a 0,0375% em água, B: ácido trifluoroacético a 0,018% em acetonitrila. A coluna utilizada para a cromatografia foi uma coluna Phenomenex Luna-C18 de 2,0 x 50 mm (partículas de 5 μm). Os métodos de detecção são DAD e ELSD, bem como ionização por eletropulverização (MS) positiva.
AA5	Instrumento: sistema HPLC semipreparativo Gilson 281. A fase móvel A: ácido trifluoroacético/ H_2O = 0,075% v/v; B: acetonitrila. Coluna: Luna C18 100 * 30 5 μm . Taxa de fluxo: 25 ml/min. Comprimento de onda do monitor: 220 e 254 nm. Gradiente B 25 a 100% ao longo de 10 min.
AA6	Instrumento: HPLC preparativa para Shimadzu LC-8A. Coluna: Phenomenex Luna C18 200 * 40 mm * 10 μm . Fase móvel A: H_2O (ácido trifluoroacético 0,09%); B: acetonitrila. Gradiente: B de 15% a 45% em 20 min. Taxa de fluxo: 60 ml/min. Comprimento de onda: 220 e 254 nm.
AA7	Instrumento: HPLC preparativa para Shimadzu LC-8A. Coluna: Phenomenex Luna C18 200 * 40 mm * 10 μm . Fase móvel A: H_2O e B: acetonitrila. Gradiente: B de 50% a 100% em 30 min. Taxa de fluxol: 60 ml/min. Comprimento de onda: 220 e 254 nm.
AA8	Coluna: Phenomenex Luna C18 200 * 40mm * 10 μm . Fase móvel A: H_2O (0,09% de ácido trifluoroacético) e B: acetonitrila. Gradiente: B de 35% a 55% em 20 min. Taxa de fluxo: 60 ml/min. Comprimento de onda: 220 e 254 nm.
AA9	Instrumento: sistema HPLC semipreparativo Gilson 281. A fase móvel A: ácido trifluoroacético/ H_2O = 0,075% v/v; B: acetonitrila. Coluna: Luna C18 100 * 30 5 μm . Taxa de fluxo: 15 ml/min. Comprimento de onda do monitor: 220 e 254 nm. Gradiente B 15 a 100% ao longo de 10 min.

AA10	Instrumento: HPLC preparativa para Shimadzu LC-8A. Coluna: Phenomenex Luna C18 200 * 40mm * 10 um. Fase móvel A H ₂ O (0,09% de ácido trifluoroacético) e B: acetonitrila. Gradiente: B de 20% a 40% em 20 min. Taxa de fluxo: 60 ml/min. Comprimento de onda: 220 e 254 nm.
AA11	Instrumento: sistema HPLC semipreparativo Gilson 281. A fase móvel A: ácido trifluoroacético/H ₂ O = 0,075% v/v; B: acetonitrila. Coluna: Luna C18 100 * 30 5 um. Taxa de fluxo: 15 ml/min. Comprimento de onda do monitor: 220 e 254 nm. Gradiente B 50 a 100% ao longo de 10 min.
AA12	Instrumento: sistema HPLC semipreparativo Gilson 281. A fase móvel A: ácido trifluoroacético/H ₂ O = 0,075% v/v; B: acetonitrila. Coluna: Luna C18 100 * 30 5um. Taxa de fluxo: 25 ml/min. Comprimento de onda do monitor: 220 e 254 nm. Gradiente B 10 a 100% ao longo de 10 min.
AA13	O gradiente foi de 5 a 95% B em 0,7 min, 95 a 95% B em 0,45 min, 95 a 5% B em 0,01 min e, em seguida, mantido a 0% B por 0,44 min (taxa de fluxo de 1,5 ml/min). Fase móvel A: ácido trifluoroacético a 0,0375% em água, fase móvel B: ácido trifluoroacético a 0,018% em acetonitrila. A coluna usada para a cromatografia é uma coluna Chromolith Flash RP-18e 25-2mm. Os métodos de detecção são DAD e ELSD, bem como ionização por eletropulverização (MS) positiva.
AA14	Instrumento: HPLC preparativa para Shimadzu LC-8A. Coluna: Phenomenex Luna C18 200 * 40 mm * 10 um. Fase móvel A: H ₂ O (0,05% de ácido trifluoroacético) e B: acetonitrila. Gradiente: B de 30% a 100% em 30 min. Taxa de fluxo: 60 ml/min. Comprimento de onda: 220 e 254 nm.
AA15	O gradiente foi de 10 a 80% B em 4 min, mantido a 80% B por 0,9 min, 80 a 10% B em 0,01 min e, em seguida, mantido a 10% B por 1 min (taxa de fluxo de 0,8 ml/min). A fase móvel A foi de 0,0375% de ácido trifluoroacético em água, a fase móvel B foi de 0,018% de ácido trifluoroacético em acetonitrila. A coluna utilizada para a cromatografia era uma coluna fenexex Luna-C18 de 2,0 x 50 mm (partículas de 5 µm). O método de detecção é DAD.
AA16	O gradiente foi de 15 a 100% de B em 8,00 minutos e manteve-se a 100% de B por 2 minutos, 100-15% de B em 0,01 min e, em seguida, mantido a 15% por 5,00 minutos, a taxa de fluxo foi de 0,80 ml/min. A fase móvel A foi bicarbonato de amônio a 10 mM, a fase móvel B foi acetonitrila de HPLC. A coluna usada para cromatografia era uma coluna Xbridge Shield RPC18 de 2,1 * 50 mm (partículas de 5 um). Os métodos de detecção são DAD e ELSD, bem como ionização por eletropulverização positiva.
AA17	Instrumento: HPLC preparativa para Shimadzu LC-8A. Coluna: Phenomenex Luna C18 200 * 40 mm * 10 um. Fase móvel: A para H ₂ O (ácido trifluoroacético 0,09%) e B em acetonitrila. Gradiente: B de 30% a 40% em 20 min. Taxa de fluxo: 60 ml/min. Comprimento de onda: 220 e 254 nm

AA18	O gradiente foi de 5 a 95% B em 1,0 min, 95 a 100% B em 0,80 min, 100 a 5% B em 0,01 min e, em seguida, mantido a 5% B por 0,39 min (taxa de fluxo de 1,0 ml/min). A fase móvel A foi de 0,0375% de TFA em água, a fase móvel B foi de 0,018% de TFA em MeCN. A coluna utilizada para a cromatografia foi um ZORBAX Eclipse XDB-C18 2.1 * 30 mm, 3,5 um. Os métodos de detecção são matriz de diodos (DAD) e ionização por eletropulverização positiva (MS).
AA19	O gradiente foi de 10 a 90% B em 1,15 min, mantido a 90% B por 0,50 min, 90 a 10% B em 0,01 min e, em seguida, mantido a 10% B por 0,34 min. A fase móvel A era NH ₄ HCO ₃ a 10 mM em água, fase móvel B era de MeCN. A coluna utilizada para a cromatografia foi um Xbridge Shield RP18 2,1 * 50 mm, 5 um. Os métodos de detecção são matriz de diodos (DAD) e ionização por electropulverização positiva (MS).). A taxa de fluxo do sistema foi de 0,8 ml/min (0,00 a 1,51 min) 1,2 ml/min (1,52 a 2,00 min).
AA20	Instrumento: sistema HPLC semipreparativo Gilson 281. Fase móvel: A: NH ₄ OH/H ₂ O = 0,040% v/v; B: MeCN. Coluna: YMC-Actus Triart C18 100 * 30mm * 5um. Taxa de fluxo: 25ml/min. Comprimento de onda do monitor: 220 e 254 nm. Gradiente B 10 a 30% durante 12 min.

2. PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS DE ADC

[0147]Os ADCs foram perfilados por cromatografia de troca aniônica (AEC) ou Cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) para determinar o grau de conjugação e pureza do ADC.

CROMATOGRAFIA DE TROCA ANIÔNICA (AEC).

[0148]Aproximadamente 20 ug de ADC foram carregados em um sistema Ultimate 3000 Dual LC (Thermo Scientific) equipado com uma coluna Propac™ WAX-10 de 4 x 250 mm (Tosoh Bioscience, cat. 054.999). A coluna foi equilibrada com 100% de tampão A e eluída usando um gradiente linear de 100% de tampão A a 100% de tampão B ao longo de 18 min a 1,0 ml/min, em que o tampão A é MES a 20 mM, pH 6,7 e o tampão B é MES a 20 mM, 500 cloreto de sódio, pH 6,7.

CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA (HIC).

[0149]Aproximadamente 20 ug do ADC foram carregados em um sistema Ultimate 3000 Dual LC (Thermo Scientific) equipado com uma coluna NPR butil-4,6 x 35 mm (Tosoh Bioscience, cat. 14.947). A coluna foi equilibrada em 100% de tampão A e eluída usando um gradiente linear de 100% de tampão A a 100% de tampão B durante 12 min a 0,8 ml/min,, em que o tampão A é fosfato de sódio a 25 mM, sulfato

de amônio a 1,5 M, pH 7,0 e o tampão B é fosfato de sódio a 25 mM, isopropanol a 25%, pH 7,0.

CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO (SEC).

[0150]As distribuições de tamanho dos ADCs foram perfiladas por exclusão de tamanho SEC usando um sistema Ultimate 3000 Dual LC (Thermo Scientific) equipado com uma coluna TSK-gel 3000SW_{XL} de 7,8 X 300 mm (Tosoh Bioscience, cat. 08541). Aproximadamente 20 ug de ADC foram carregados na coluna e eluídos ao longo de 17 min usando um gradiente isocrático de sulfato de sódio a 100 mM, fosfato de sódio a 100 mM, pH 6,8 a uma taxa de fluxo de 1,0 ml/min.

[0151]Os estudos de agregação também podem ser conduzidos usando SEC, e a porcentagem do agregado pode ser medida integrando a área do pico de agregados conforme determinado pelo padrão de filtração em gel (Bio-rad, 151-1901).

ESPECTROSCOPIA DE MASSA (MS).

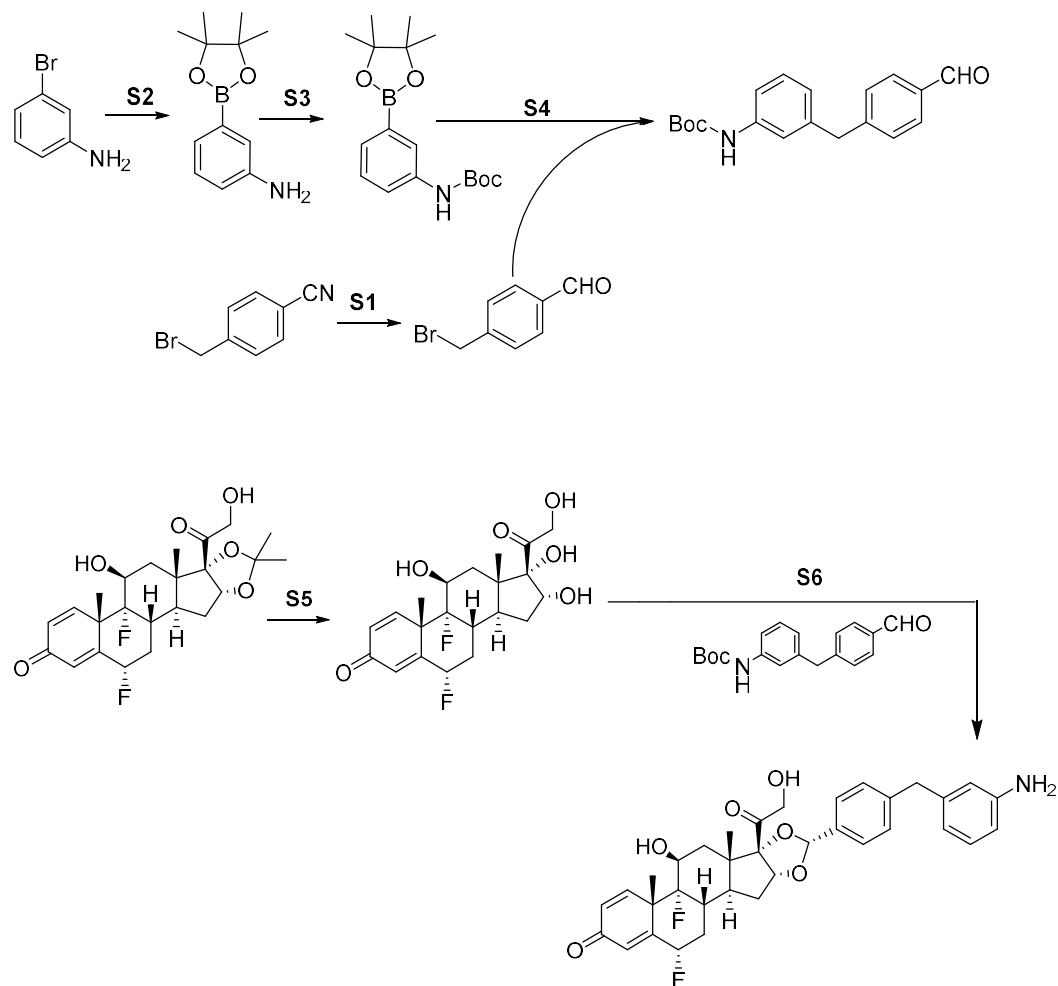
[0152]Amostras reduzidas (10 µl) foram injetadas em um sistema Agilent 6550 QToF LC/MS através de um amostrador automático CTC com temperatura controlada (5 °C). A eluição da amostra foi obtida em Waters C-4, 3,5 µm, 300 Å, 2,1 x 50 mm i.d. Coluna HPLC. As fases móveis foram: A: ácido fórmico a 0,1% em água e B: ácido fórmico a 0,1% em acetonitrila; o taxa de fluxo foi de 0,45 ml/min, e o compartimento da coluna foi mantido a 40 °C. O gradiente de HPLC é o seguinte:

Tempo (min)	% de A	% de B
0	95	5
0,6	95	5
1,1	10	90
2,2	10	90
2,4	95	5
3,5	95	5

SÍNTESE DAS MOLÉCULAS PRECURSORAS

EXEMPLO 1 DO PRECURSOR: SÍNTESE DE (2S,6AS,6BR,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-10-(4-(3-AMINO BENZIL)FENIL)-2,6B-DIFLUORO-7-HIDROXI-8B-(2-HIDROXIACETIL)-6A,8A-DIMETIL-

1,2,6A,6B,7,8,8A,8B,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-4H-
NAFTO[2',1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-4-ONA



[0153]Etapa 1: Síntese de 4-(bromometil)benzaldeído. Foi adicionado hidreto de di-isobutilalumínio (153 ml, 153 mmol, 1 M em tolueno) gota a gota a uma solução a 0 °C de 4-(bromometil)benzonitrila (20 g, 102 mmol) em tolueno (400 ml) durante 1 hora. Duas reações adicionais foram estabelecidas como descrito acima. Todas as três misturas de reação foram combinadas. À mistura foi adicionado HCl aquoso a 10% (1,5 l). A mistura foi extraída com diclorometano (3 x 500 ml). A camada orgânica foi seca sobre Na₂SO₄, filtrou-se e concentrou-se sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna sobre gel de sílica (eluída com éter de

petróleo/Acetato de etila = 10/1) para se obter o composto do título (50 g, rendimento de 82%). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 10,02 (s, 1H), 7,91-7,82 (m, 2H), 7,56 (d, J = 7,9 Hz, 2H), 4,55-4,45 (m, 2H).

[0154]Etapa 2: Síntese de 3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)anilina. A uma solução de 3-bromoanilina (40 g, 233 mmol) em 1,4-dioxano (480 ml) foi adicionado 4,4,4',4',5,5,5',5'-tetrametil-2,2'-bi(1,3,2-dioxaborolano) (94 g, 372 mmol), acetato de potássio (45,6 g, 465 mmol), 2-diciclo-hexilfosfino-2',4',6'-tri-*i*-propil-1,1'-bifenila (8,07 g, 13,95 mmol), tris(dibenzilidenacetona)dipaládio (0) (8,52 g, 9,30 mmol). Em seguida, a mistura resultante foi aquecida a 80 °C por 4 horas sob nitrogênio. Uma reação adicional foi estabelecida como descrito acima. As duas misturas de reação foram combinadas e concentradas e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna sobre sílica gel (eluído com éter de petróleo: acetato de etila = 10: 1) para obter o composto do título (60 g, rendimento 55,4%). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,23-7,13 (m, 3H), 6,80 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 3,82-3,38 (m, 2H), 1,34 (s, 12H).

[0155]Etapa 3: Síntese de (3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)carbamato de *tert*-butila. O produto do Precursor do Exemplo 1, Etapa 2 (30 g, 137 mmol) e dicarbonato de di-*tert*-butila (38,9 g, 178 mmol) foram misturados em tolueno (600 ml) a 100 °C por 24 horas. Outra reação foi estabelecida como descrito acima. As duas misturas de reação foram combinadas e a mistura castanha foi evaporada, dissolvida em acetato de etila (1,5 l), lavou-se com HCl 0,1 N (3 x 2 l) e água salgada (3 l), secou-se sobre Na_2SO_4 , filtrada e concentrada sob pressão reduzida para dar o composto do título (50 g, rendimento 57%). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,63 (br m, 2H), 7,48 (d, J = 7,1 Hz, 1H), 7,37-7,28 (m, 1H), 1,52 (s, 9H), 1,34 (s 12H). Boc = *tert*-butoxicarbonila.

[0156]Etapa 4: Síntese de (3-(4-formilbenzil)fenil)carbamato de *tert*-butila. Uma mistura do produto do Precursor do Exemplo 1, Etapa 1 (24,94 g, 125 mmol),

1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocenodichloro paládio (II) complexo diclorometano (13,75 g, 18,80 mmol), o produto do Precursor do Exemplo 1, Etapa 3 (20 g, 62,7 mmol) e carbonato de potássio (43,3 g, 313 mmol) em tetra-hidrofurano (400 ml) foi aquecido a 80 °C por 12 horas. Outra reação adicional foi estabelecida como descrito acima. As duas misturas de reação foram combinadas e diluídas com água (500 ml). A mistura aquosa foi extraída com acetato de etila (3 x 500 ml). As camadas orgânicas foram combinadas e secas sobre Na₂SO₄, filtrou-se e concentrou-se sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna sobre gel de sílica (eluída com éter de petróleo:acetato de etila = 10:1) para se obter o composto do título (15 g, rendimento de 38,4%). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 9,95 (s, 1H), 7,78 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H), 7,33 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H), 7,27-7,13 (m, 3H), 6,82 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H), 6,47 (br. s., 1H), 4,00 (s, 2H), 1,48 (s, 9H).

[0157]Etapa 5: Síntese de (6S,8S,9R,10S,11S,13S,14S,16R,17S)-6,9-difluoro-11,16,17-tri-hidroxi-17-(2-hidroxiacetil)-10,13-dimetil-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodeca-hidro-3H-ciclopenta[a]fenantren-3-ona. (2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,11aR,12aS,12bS)-2,6b-Difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a,10,10-tetrametil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona (20 g, 44,2 mmol) foi suspenso em HBF₄ aquoso a 40% (440 ml) e a mistura foi agitada a 25 °C por 48 horas. Após a reação estar completa, adicionou-se 2 l de H₂O e o sólido foi recolhido por filtração. Este sólido foi lavado com H₂O (1 l) e depois com metanol (200 ml) para dar o composto do título (11 g, rendimento de 60,3%). RMN de ¹H (400 MHz, dimetilsulfóxido-d₆) δ 7,25 (d, *J* = 10,1 Hz, 1H), 6,28 (d, *J* = 10,1 Hz, 1H), 6,10 (s, 1H), 5,73-5,50 (m, 1H), 5,39 (br. s., 1H), 4,85 - 4,60 (m, 2H), 4,50 (d, *J* = 19,4 Hz, 1H), 4,20 - 4,04 (m, 2H), 2,46 - 2,06 (m, 6H), 1,87 - 1,75 (m, 1H), 1,56 - 1,30 (m, 6H), 0,83 (s, 3H). dimetilsulfóxido = dimetilsulfóxido.

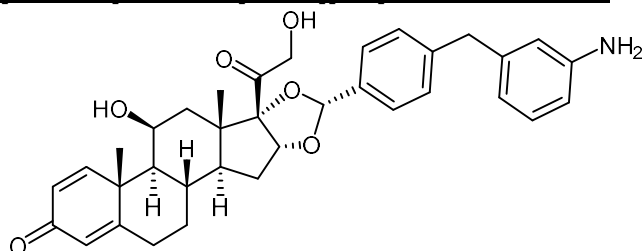
[0158]Etapa 6: Síntese de (2S,6aS,6Br,7S,8aS,8BS,10S,11aR,12aS,12bS)-

10-(4-(3-aminobenzil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona. Uma suspensão do produto do Precursor do Exemplo 1, Etapa 5 (4,4 g, 10,67 mmol) e MgSO₄ (6,42 g, 53,3 mmol) em acetonitrila (100 ml) foi agitada a 20 °C durante 1 hora. Uma solução do produto do Precursor do Exemplo 1, Etapa 4 (3,65 g, 11,74 mmol) em acetonitrila (100 ml) foi adicionada em uma porção. Adicionou-se gota a gota ácido trifluorometanossulfônico (9,01 ml, 53,3 mmol) enquanto se mantinha uma temperatura interna abaixo da temperatura ambiente utilizando um banho de gelo. Após a adição, a mistura foi agitada a 20 °C durante 2 horas. Três reações adicionais foram estabelecidas como descrito acima. Todas as quatro misturas de reação foram combinadas e concentradas e o resíduo foi purificado por HPLC Prep para dar o composto do título (4,5 g, rendimento 14,2%). LCMS (Método A, Tabela 7) R_t = 2,65 min; MS m/z = 606,2 (M+H)⁺. RMN de ¹H (400 MHz, dimetilsulfóxido-d₆) δ 7,44-7,17 (m, 5H), 6,89 (t, J = 7,7 Hz, 1H), 6,44-6,25 (m, 4H), 6,13 (br. s., 1H), 5,79 - 5,52 (m, 2H), 5,44 (s, 1H), 5,17 - 4,89 (m, 3H), 4,51 (d, J = 19,4 Hz, 1H), 4,25 - 4,05 (m, 2H), 3,73 (s, 2H), 3,17 (br. S., 1H), 2,75 - 2,55 (m, 1H), 2,36 - 1,97 (m, 3H), 1,76 - 1,64 (m, 3H), 1,59 - 1,39 (m, 4H), 0,94 - 0,78 (m, 3H). Método de HPLC Prep: Instrumento: sistema HPLC semipreparativo Gilson 281; Fase móvel: A: Ácido Fórmico/H₂O = 0,01% v/v; B: acetonitrila; Coluna: Luna C18 150 * 25 5 microns; Taxa de fluxo: 25 ml/min; Comprimento de onda do monitor: 220 e 254nm.

Tabela 9. Condições da fase móvel para o eluente B							
Tempo (min)	0,0	10,5	10,6	10,7	13,7	13,8	15,0
% de B	15	35	35	100	100	10	10

EXEMPLO 2 DO PRECURSOR: SÍNTESE DE
(6AR,6BS,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-10-(4-(3-AMINOENZIL)FENIL)-7-

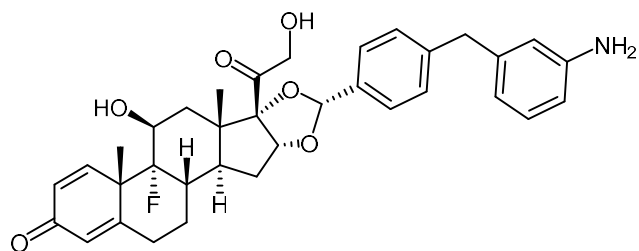
HIDROXI-8B-(2-HIDROXIACETIL)-6A,8A-DIMETIL-
1,2,6A,6B,7,8,8A,8B,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-4H-
NAFTO[2',1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-4-ONA.



[0159]O produto do Exemplo 2 do precursor foi sintetizado em um procedimento semelhante ao do Exemplo 1 do precursor usando (6aR,6bS,7S,8aS,8bS,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a,10,10-tetrametil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona.

[0160]RMN de ^1H (400 MHz, dimetilsulfóxido- d_6) δ 7,36 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 7,31 (d, $J = 10,1$ Hz, 1H), 7,20 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 6,89 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H), 6,39 - 6,28 (m, 3H), 6,16 (dd, $J = 1,5, 9,9$ Hz, 1H), 5,93 (s, 1H), 5,39 (s, 1H), 5,08 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H), 4,98 - 4,87 (m, 3H), 4,78 (d, $J = 3,1$ Hz, 1H), 4,49 (dd, $J = 6,2, 19,4$ Hz, 1H), 4,29 (br. s, 1H), 4,17 (dd, $J = 5,5, 19,6$ Hz, 1H), 3,74 (s, 2H), 2,61 - 2,53 (m, 1H), 2,36 - 2,26 (m, 1H), 2,11 (d, $J = 11,0$ Hz, 1H), 2,07 (s, 1H), 2,02 (d, $J = 12,8$ Hz, 1H), 1,83 - 1,54 (m, 5H), 1,39 (s, 3H), 1,16 - 0,96 (m, 2H), 0,85 (s, 3H). LCMS (Método A, Tabela 7) $R_t = 2,365$ min; $m/z = 570,2$ ($M+H$) $^+$.

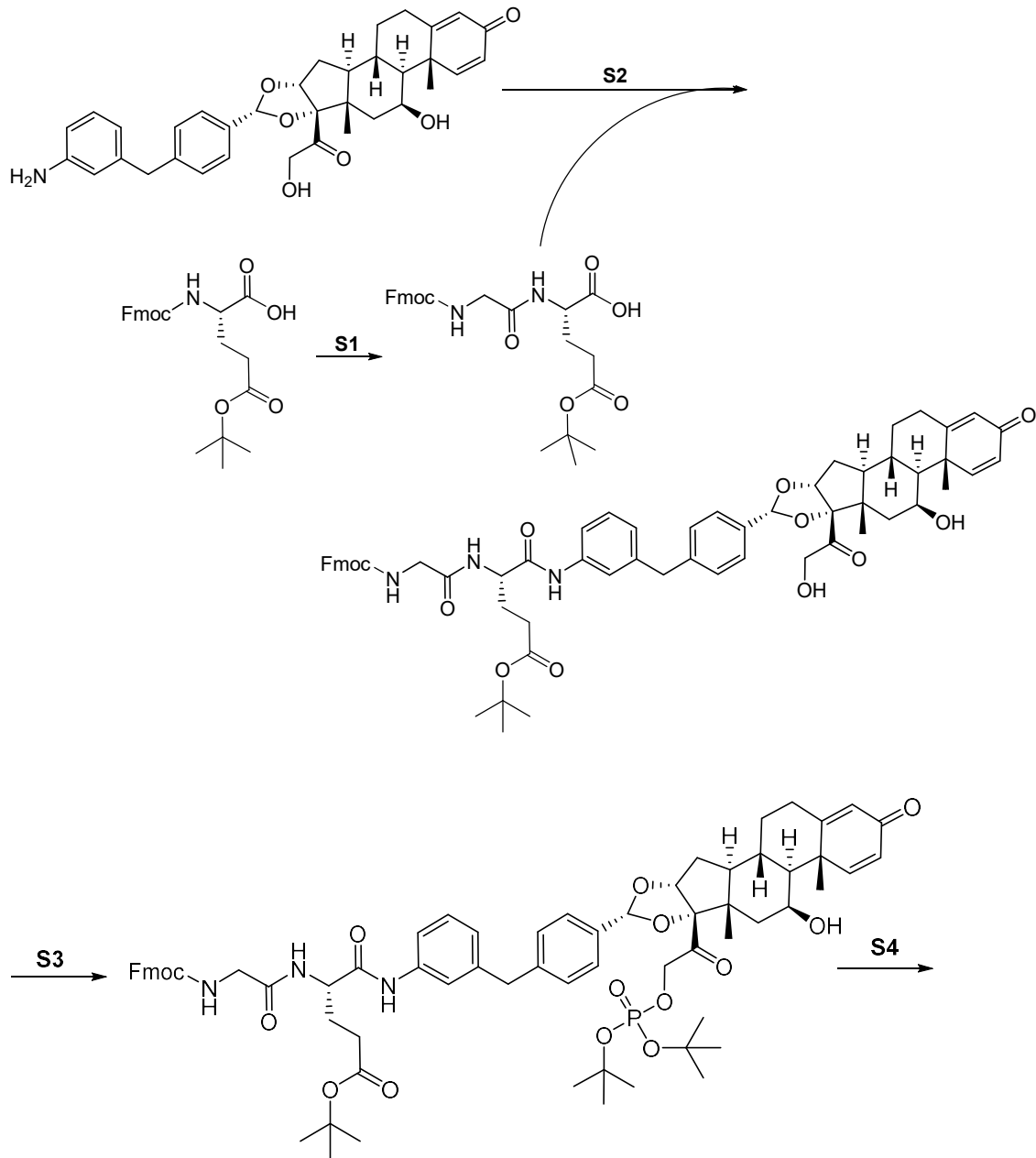
EXEMPLO 3 DO PRECURSOR: SÍNTESE DE
(6AS,6BR,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-10-(4-(3-AMINOBENZIL)FENIL)-6B-
FLUORO-7-HIDROXI-8B-(2-HIDROXIACETIL)-6A,8A-DIMETIL-
1,2,6A,6B,7,8,8A,8B,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-4H-
NAFTO[2',1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-4-ONA.

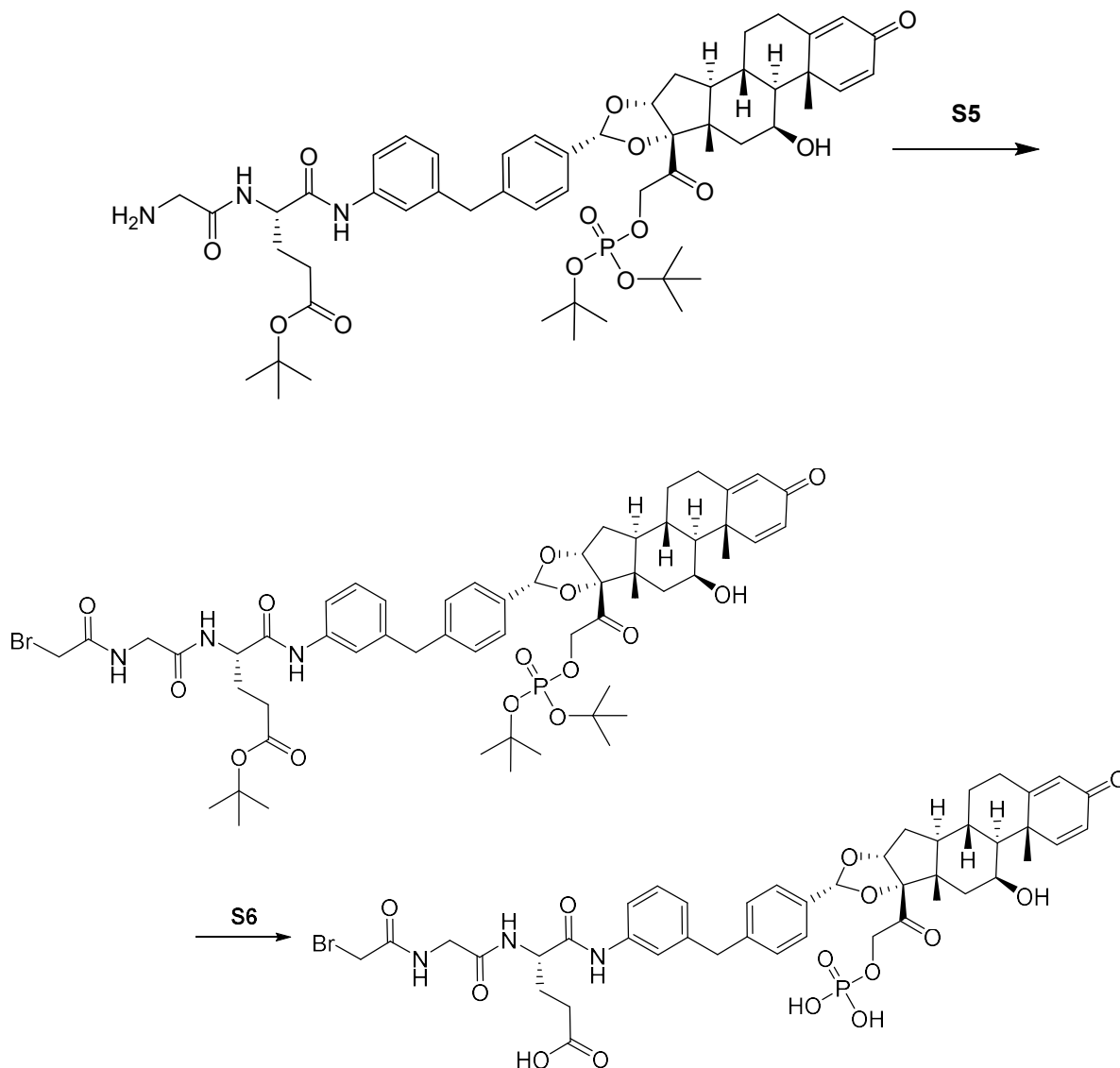


[0161]O produto do Exemplo 3 do precursor foi sintetizado em um procedimento semelhante ao Precursor do Exemplo 1 usando (6aS,6bR,7S,8aS,8bS,11aR,12aS,12bS)-6b-fluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a,10,10-tetrametil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona.

[0162]RMN de ^1H (400 MHz, dimetilsulfóxido- d_6) δ 7,37-7,26 (m, 3H), 7,21 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 6,89 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H), 6,43-6,30 (m, 3H), 6,23 (d, $J = 10,1$ Hz, 1H), 6,04 (s, 1H), 5,75 (s, 1H), 5,44 (s, 2H), 5,09 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H), 4,93 (br. s., 3H), 4,50 (dd, $J = 6,2, 19,4$ Hz, 1H), 4,28 - 4,09 (m, 2H), 3,74 (s, 2H), 2,73 - 2,54 (m, 2H), 2,35 (d, $J = 13,2$ Hz, 1H), 2,25 - 2,12 (m, 1H), 2,05 (d, $J = 15,0$ Hz, 1H), 1,92 - 1,77 (m, 1H), 1,74 - 1,58 (m, 3H), 1,50 (s, 3H), 1,45 - 1,30 (m, 1H), 0,87 (s, 3H). LCMS (Método A, Tabela 7) $R_t = 2,68$ min; $m/z = 588,1$ ($M+H$) $^+$.

EXEMPLO 4 DO PRECURSOR: SÍNTESE DE ÁCIDO (S)-4-(2-(2-BROMOACETAMIDO)ACETAMIDO)-5-((3-(4-((6AR,6BS,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-7-HIDROXI-6A,8A-DIMETIL-4-OXO-8B-(2-(FOSFONOXI)ACETIL)-2,4,6A,6B,7,8,8A,8B,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-1H-NAFTO[2',1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-10-IL)BENZIL)FENIL)AMINO)-5-OXOPENTANOICO





[0163]Etapa 1: Síntese do ácido (S)-2-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-5-(terc-butoxi)-5-oxopentanoico. Uma mistura de resina de cloreto de 2-clorotritila (30 g, 92 mmol), trietilamina (46,4 g, 458 mmol) e ácido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-5-(terc-butoxi)-5-oxopentanoico (25,5 g, 60 mmol) em diclorometano seco (200 ml) foi borbulhada com N₂ a 20 °C durante 8 horas. A mistura foi filtrada e a resina foi lavada com diclorometano (2 x 200 ml), metanol (MeOH) (2 x 200 ml) e dimetil formamida (2 x 200 ml). A resina adicionou-se uma solução de piperidina:formamida de dimetila (1:4, 400 ml) e a mistura foi borbulhada com N₂ durante 8 minutos e, em seguida, filtrada. Esta operação foi

repetida cinco vezes para dar a remoção completa do grupo protetor 9-fluorenilmetiloxycarbonila (Fmoc). A resina foi lavada com dimetil formamida (5 x 500 ml) para proporcionar ácido (S)-2-amino-5-(terc-butoxi)-5-oxopentanoico ligado à resina. Uma mistura de ácido 2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acético (13,38 g, 45,0 mmol), *N,N*-di-isopropiletilamina (7,86 ml, 45 mmol), hidroxibenzotriazol (6,89 g, 45 mmol), hexafluorofosfato de 2-(6-cloro-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilisourônio (V) (18,62 g, 45,0 mmol) em dimetil formamida (200 ml) foi agitada a 20 °C por 30 min. À mistura adicionou-se o ácido (S)-2-amino-5-(terc-butoxi)-5-oxopentanoico ligado a resina e a mistura resultante foi borbulhada com N₂ a 25 °C durante 1,5 horas. A mistura foi filtrada e a resina foi lavada com dimetil formamida (4 x 500 ml) e diclorometano (2 x 500 ml). À mistura foi adicionado 1% ácido acético trifluór/diclorometano (5 x 500 ml) e borbulhado com N₂ durante 5 min. A mistura foi filtrada e o filtrado foi adicionado a uma solução saturada de NaHCO₃ (200 ml) diretamente. A mistura combinada foi separada e a fase orgânica foi lavada com solução aquosa saturada de ácido cítrico (4 x 400 ml) e salmoura (2 x 300 ml). A solução orgânica final foi seca sobre Na₂SO₄ (20 g), filtrou-se, concentrou-se sob pressão reduzida para se obter o composto do título (10 g, rendimento de 20%). RMN de ¹H: (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,75 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,59 (br d, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,41-7,36 (m, 2H), 7,30 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H), 5,82 (br s, 1H), 4,57 (br d, *J* = 4,8 Hz, 1H), 4,38 (br d, *J* = 7,5 Hz, 2H), 4,27 - 4,15 (m, 1H), 4,06 - 3,83 (m, 2H), 2,50 - 2,29 (m, 2H), 2,26 - 2,13 (m, 1H), 2,06 - 2,02 (m, 1H), 1,43 (s, 9H).

[0164]Etapa 2: Síntese de (S)-4-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzila)fenil)amino)-5-oxopentanoato de terc-butila. A uma solução do produto do Exemplo 4, foi adicionada a etapa 1 (424 mg,

0,878 mmol) em dimetil formamida (3,5 ml) Exemplo 2 (500 mg, 0,878 mmol) e trietilamina (0,3 ml, 2,63 mmol) a 25 °C. A solução foi arrefecida a 0 °C e depois foi adicionado 2,4,6-tripropil-1,3,5,2,4,6-trioxatrilfosfinano 2,4,6-trióxido (1,12 g, 1,755 mmol). A mistura de reação foi agitada por 12 horas a 25 °C. LCMS mostrou que a reação estava completa. Quatorze reações adicionais foram estabelecidas como descrito acima. Todas as quinze misturas de reação foram combinadas. A mistura foi purificada por coluna de fase inversa para se obter o composto do título (5 g, rendimento de 38,4%) como um sólido amarelo. Método da coluna de fase reversa: Instrumento: HPLC preparativa para Shimadzu LC-8A; Coluna: Phenomenex Luna C18 200 * 40 mm * 10 µm; Fase móvel: A para H₂O (0,05% de ácido trifluoroacético) e B acetonitrila; Gradiente: B de 30% a 100% em 30min; Taxa de fluxo: 60 ml/min; Comprimento de onda: 220 e 254nm. LCMS (Método A, Tabela 7) R_t = 1,34 min; m/z 1016,6 (M+H-18)⁺.

[0165]Etapa 3: Síntese de (S)-4-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-terc-butoxifosforil)oxi)acetil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-5-oxopentanoato de terc-butila. A uma solução do produto do Exemplo 4, foi adicionada a etapa 2 (400 mg, 0,387 mmol) em dimetil formamida (2,5 ml) 1H-tetrazol (271 mg, 3,87 mmol) e di-terc-butil-dietilfosforamidita (1,16 g, 4,64 mmol). A reação foi agitada à temperatura ambiente durante 2,5 horas e depois foi arrefecida a 0 °C. Foi adicionado peróxido de hidrogênio (241 mg, 2,127 mmol) à mistura resultante, deixada aquecer até a temperatura ambiente e agitada por 1 hora, após o que LCMS mostrou que a reação estava completa. Onze reações adicionais foram estabelecidas como descrito acima. Todas as doze misturas de reação foram combinadas. A mistura foi purificada por coluna de fase reversa para

dar o composto do título (4,4 g, rendimento 64,2%). Método da coluna de fase reversa: Instrumento: HPLC preparativa para Shimadzu LC-8A; Coluna: Phenomenex Luna C18 200 * 40 mm * 10 µm; Fase móvel: A para H₂O e B para acetonitrila; Gradiente: B de 50% a 100% em 30 min; Taxa de fluxo: 60 ml/min; Comprimento de onda: 220 e 254 nm. LCMS (Método A, Tabela 7) R_t = 1,41 min; m/z 1226,7 (M+H)⁺.

[0166]Etapa 4: Síntese de (S)-4-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-terc-butoxifosforil)oxi)acetil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-5-oxopentanoato de terc-butila. A uma solução do produto do Exemplo 4, Etapa 3 (1,1 g, 0,897 mmol) em acetonitrila (6 ml) foi adicionada piperidina (0,75 ml, 7,58 mmol) a 25 °C. A reação foi agitada à temperatura ambiente por 20 minutos, após o que LCMS mostrou que a reação estava completa. Três reações adicionais foram estabelecidas como descrito acima. Todas as quatro misturas de reação foram combinadas. A mistura foi concentrada para proporcionar um resíduo, o qual foi tratado com éter de petróleo (10 ml) sob agitação durante 2 horas. O sólido resultante foi recolhido por filtração, e secou-se sob pressão reduzida para se proporcionar o composto do título (3,8 g, rendimento de 90%). LCMS (Método A, Tabela 7) R_t = 1,16 min; m/z 1004,6 (M+H)⁺.

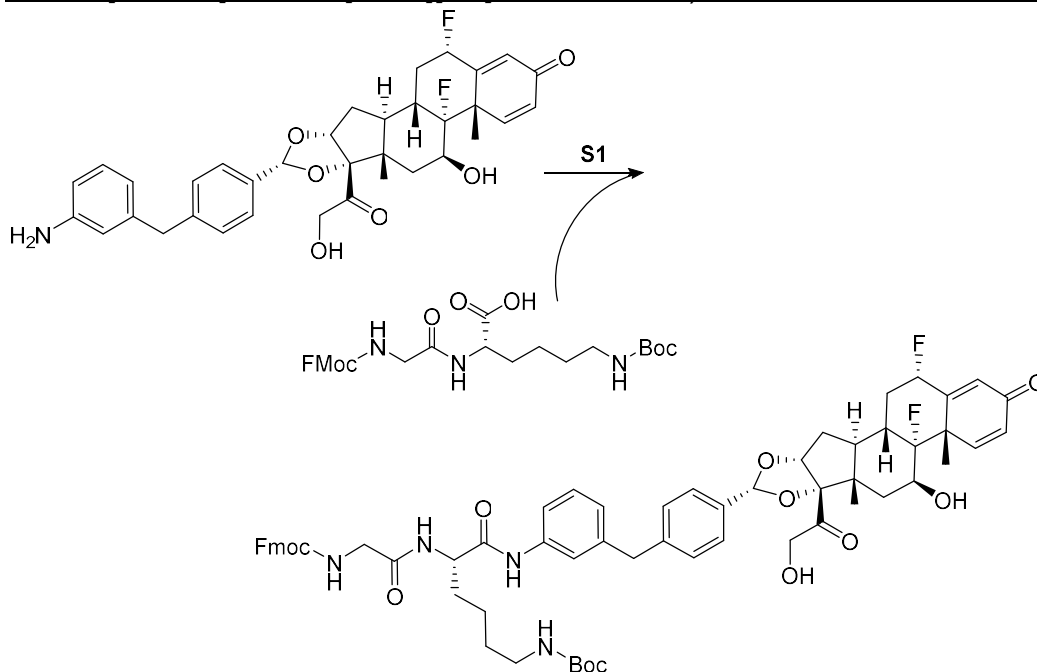
[0167]Etapa 5: Síntese de (S)-4-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-terc-butoxifosforil)oxi)acetil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-5-oxopentanoato de terc-butila. A uma solução de ácido 2-bromoacético (97 mg, 0,697 mmol) em dimetil formamida (2,5 ml) foi adicionada 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-di-hidroquinolina (EEDQ) (172 mg, 0,697 mmol)

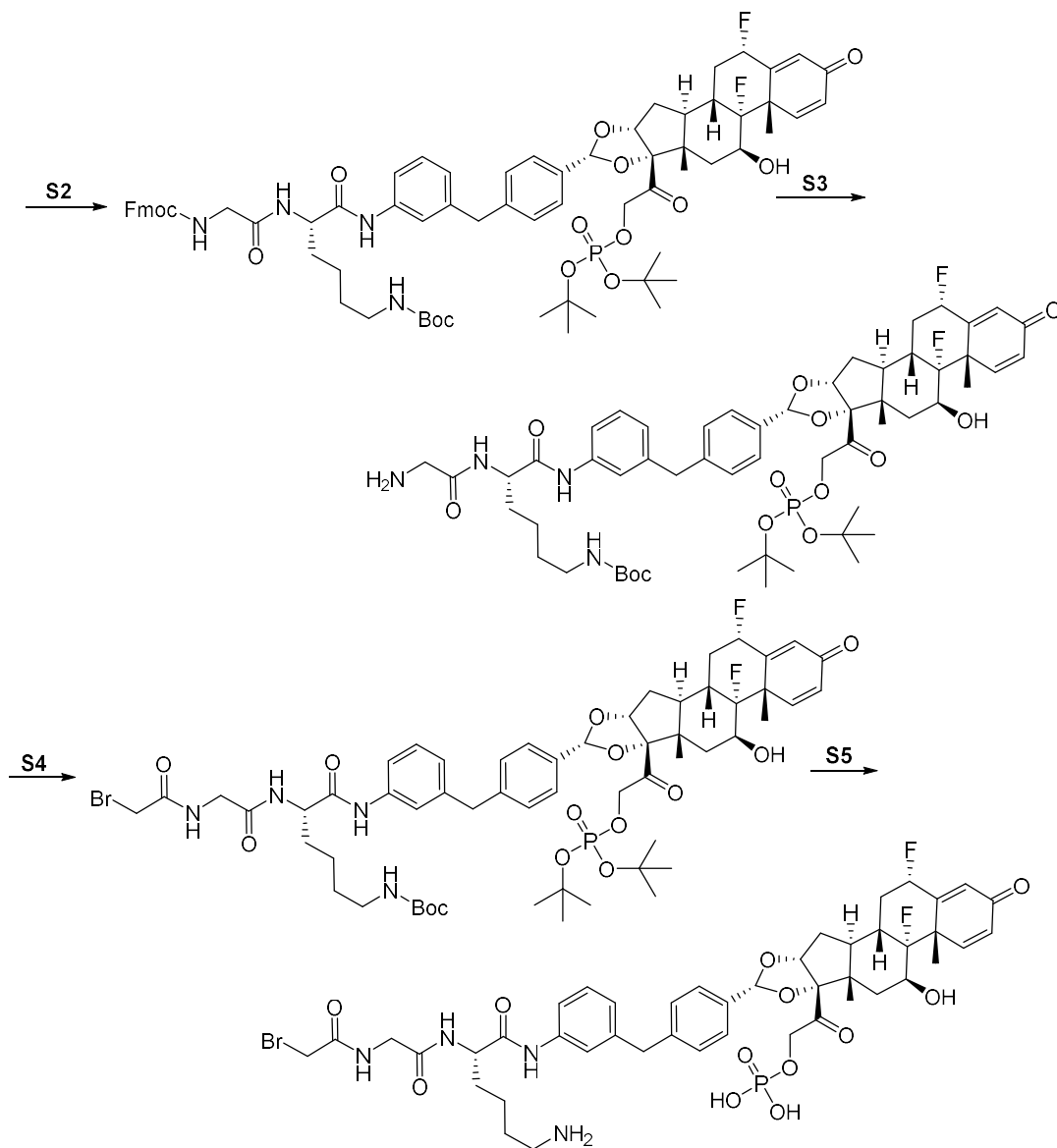
à temperatura ambiente. A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 1 hora. O produto do Exemplo 4, Etapa 4 (350 mg, 0,349 mmol) foi adicionado e o resultante foi agitado por 2,5 horas após o que LCMS mostrou que a reação estava completa. Sete reações adicionais foram criadas como descrito acima. Todas as oito misturas de reação foram combinadas. A reação foi diluída com diclorometano (100 ml), lavou-se com HBr aquoso (1 M, 2 x 80 ml), NaHCO₃ aquoso (60 ml), salmoura (60 ml). A camada orgânica foi seca sobre Na₂SO₄, filtrou-se e concentrou-se sob pressão reduzida para se obter o composto do título (2 g, rendimento de 63,7%). LCMS (Método a, Tabela 7) R_t = 1,30 min; m/z 1126,4 (M+H)⁺.

[0168]Etapa 6: Síntese de ácido (S)-4-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-8b-(2-(fosfonooxi)acetil)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-5-oxopentanoico. A uma solução do produto do Exemplo 4, Etapa 5 (2 g, 1,778 mmol) em diclorometano (16 ml) foi adicionado ácido trifluoroacético (8 ml, 104 mmol) e a mistura resultante foi agitada à temperatura ambiente por 40 minutos após momento em que LCMS mostrou que a reação estava completa. O solvente foi removido sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi purificado por HPLC Prep. A fase móvel foi liofilizada diretamente para proporcionar o composto do título (640 mg, rendimento 35,3%). Método de preparação para HPLC: Instrumento: HPLC preparativa para Shimadzu LC-8A; Coluna: Phenomenex Luna C18 200 * 40 mm * 10 µm; Fase móvel: A para H₂O (0,09% de ácido trifluoroacético) e B acetonitrila; Gradiente: B de 30% a 40% em 20min; Taxa de fluxo: 60ml/min; Comprimento de onda: 220 e 254 nm. RMN de ¹H: (dimetilsulfóxido-d₆, 400 MHz) δ 9,88 (s, 1H), 8,52 (s, 1H), 8,24 (br d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,46 (br d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,42 (s, 1H), 7,36 (br d, J = 7,9 Hz, 2H), 7,30 (br d, J = 9,7 Hz, 1H), 7,23 - 7,17 (m, 3H), 6,90 (br d, J = 6,8 Hz, 1H), 6,16 (br d, J = 10,4 Hz, 1H), 5,93 (s, 1H), 5,47 (s, 1H), 4,96 - 4,85 (m, 3H), 4,58 (br dd, J = 7,9, 18,7 Hz, 1H), 4,38

(br d, $J = 5,3$ Hz, 1H), 4,29 (br s, 1H), 3,93 (s, 2H), 3,89 (s, 2H), 3,80 (br s, 2H), 2,30-2,22 (m, 2H), 2,16-1,91 (m, 4H), 1,85-1,62 (m, 6H), 1,39 (s, 3H), 1,00 (br s, 2H), 0,87 (s, 3H). LCMS (Método A, Tabela 7) $R_t = 2,86$ min; m/z 956,0, 958,0 ($M+H$)⁺.

EXEMPLO 5 DO PRECURSOR: SÍNTESE DE FOSFATO DE 2-((2S,6AS,6BR,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-10-(4-(3-((S)-6-AMINO-2-(2-(2-BROMOACETAMIDO)ACETAMIDO)HEXANAMIDO)BENZIL)FENIL)-2,6B-DIFLUORO-7-HIDROXI-6A,8A-DIMETIL-4-OXO-1,2,4,6A,6B,7,8,8A,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-8BH-NAFTO[2',1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-8B-IL)-2-OXOETIL DI-HIDROGÊNIO.





[0169]Etapa 1: Síntese de ((S)-5-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-6-oxo-hexil)carbamato de terc-butila. Para uma solução de N²-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)glicil)-N⁶-(terc-butoxicarbonil)-L-lisina (5,58 g, 8,26 mmol) em dimetil formamida (60 ml) a 0 °C foi adicionado 2,4,6-tripropil-1,3,5,2,4,6-

trioxatrilfosfinano 2,4,6-trióxido (10,51 g, 16,51 mmol) e trietilamina (3,45 ml, 24,77 mmol). A mistura resultante foi agitada à temperatura ambiente durante 1 hora e, em seguida, foi adicionado o produto do Precursor do Exemplo 1, Etapa 6 (5 g, 8,26 mmol). A mistura resultante foi agitada durante 5 horas à temperatura ambiente, após o que LCMS mostrou que a reação estava completa. Seis reações adicionais foram criadas como descrito acima. Todas as sete misturas de reação foram combinadas. A reação foi purificada por coluna de fase reversa para proporcionar o composto do título (24 g, rendimento 24,62%). Método da coluna de fase reversa: Instrumento: Shimadzu LC-8A prep HPLC; Coluna: Phenomenex Luna C18 200 * 40 mm * 10 µm; Fase móvel: A para H₂O (0,05% de ácido trifluoroacético) e B acetonitrila; Gradiente: B de 30% a 100% em 30 min; Taxa de fluxo: 60 ml/min; Comprimento de onda: 220 e 254 nm. LCMS (Método A, Tabela 7) R_t = 1,29 min; m/z 1095,6 (M+H-18)⁺. Fmoc = fluorenilmetiloxycarbonila; Boc = terc-butoxicarbonila.

[0170]Etapa 2: Síntese de ((S)-5-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-terc-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-6-oxo-hexil)carbamato de terc-butila. A uma solução do produto do Exemplo 5, Etapa 1 (3 g, 2,69 mmol) em dimetil formamida (30 ml) foi adicionado 1H-tetrazol (1,888 g, 26,9 mmol) e di-terc-butil-dietilfosforamidita (8,06 g, 32,3 mmol) e a reação foi agitada à temperatura ambiente por 3,5 horas. Foi adicionado peróxido de hidrogênio (224 mg, 1,97 mmol) à reação e agitado por 0,5 hora, após o que LCMS mostrou que a reação estava completa. Seis reações adicionais foram criadas como descrito acima. Todas as sete misturas de reação foram combinadas. A reação foi purificada por coluna de fase reversa para proporcionar o composto do título (10 g, pureza: 78%, rendimento 37,1%). Método da

coluna de fase reversa: Instrumento: HPLC de preparação para Shimadzu LC-8A; Coluna: Phenomenex Luna C18 200 * 40 mm * 10 µm; Fase móvel: A para H₂O e B acetonitrila; Gradiente: B de 50% a 100% em 30 min; Taxa de fluxo: 60 ml/min; Comprimento de onda: 220 e 254 nm. LCMS (Método A, Tabela 7) R_t = 1,42 min; m/z 1305,7 (M+H)⁺.

[0171]Etapa 3: Síntese de ((S)-5-(2-aminoacetamido)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-terc-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-6-oxo-hexil)carbamato de terc-butila. A uma solução do produto do Exemplo 5, a Etapa 2 (2,5 g, 1,969 mmol) em acetonitrila (10 ml) foi adicionada piperidina (2 ml, 1,969 mmol) e a reação foi agitada à temperatura ambiente por 1 hora, após o que LCMS mostrou a reação estava completa. Três reações adicionais foram estabelecidas como descrito acima. Todas as quatro misturas de reação foram combinadas. A reação foi concentrada para proporcionar um produto bruto, que foi agitado em éter de petróleo (30 ml) por 2 horas. O sólido resultante foi recolhido por filtração e seco sob pressão reduzida para dar o composto do título (7 g, pureza: 83%, rendimento 70,4%) como um sólido amarelo. LCMS (Método a, Tabela 7) R_t = 1,17 min; m/z 1083,5 (M+H)⁺.

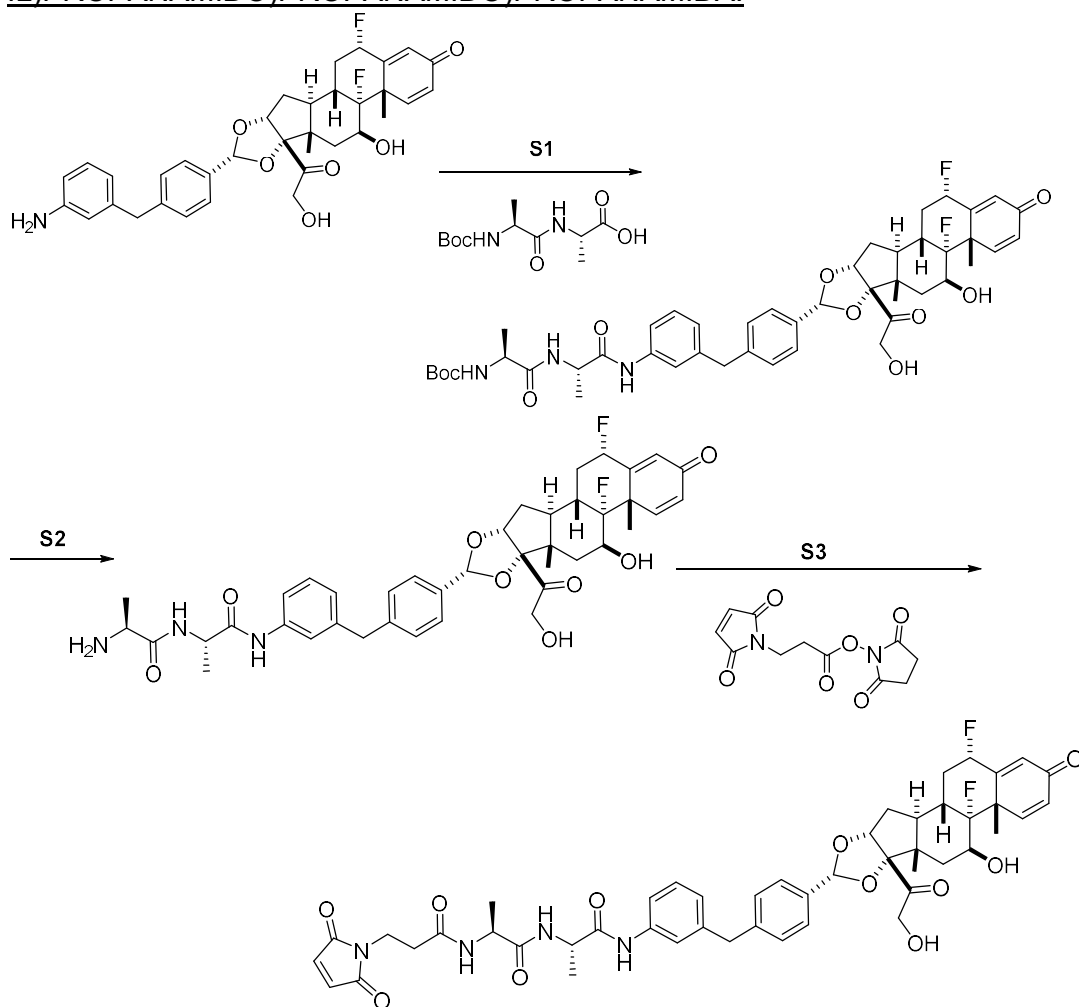
[0172]Etapa 4: Síntese de ((S)-5-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-terc-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-6-oxo-hexil)carbamato de terc-butila. A uma solução de ácido 2-bromoacético (0,929 g, 6,68 mmol) em dimetil formamida (35 ml) foi adicionada 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-di-hidroquinolina (1,653 g, 6,68 mmol) e a mistura resultante foi agitada a temperatura ambiente por 1 hora. O produto do

Exemplo 5, Etapa 3 (3,5 g, 3,34 mmol) foi adicionado e a mistura resultante foi agitada à temperatura ambiente por 2 horas. LCMS mostrou que a reação foi concluída. A reação foi diluída com diclorometano (100 ml), lavou-se com HBr aquoso (1 M, 2 x 80 ml), NaHCO₃ aquoso (60 ml) e salmoura (60 ml). A camada orgânica foi seca sobre Na₂SO₄, filtrou-se e concentrou-se sob reduzida pressão para proporcionar o composto do título (2 g, rendimento de 51,2%). LCMS (Método a, Tabela 7) R_t = 1,32 min; m/z 1205,5 (M+H)⁺.

[0173] Etapa 5: Síntese de fosfato de 2-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-6-amino-2-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)hexanamido)benzil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil di-hidrogênio. A uma solução do produto do Exemplo 5, Etapa 4 (2 g, 1,661 mmol) em diclorometano (10 ml) foi adicionado ácido trifluoroacético (5 ml, 64,9 mmol) e a reação foi agitada à temperatura ambiente durante 40 minutos, após o que LCMS mostrou que a reação estava completa. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o produto em bruto purificado por HPLC Prep. A fase móvel foi liofilizada diretamente para dar o composto do título (550 mg, pureza: 96,9%, rendimento 32,3%). Método de preparação para HPLC: Instrumento: HPLC preparativa para Shimadzu LC-8A; Coluna: Phenomenex Luna C18 200 * 40 mm * 10 μm; Fase móvel: A para H₂O (0,09% de ácido trifluoroacético) e B acetonitrila; Gradiente: B de 30% a 40% em 20 min; Taxa de fluxo: 60 ml/min; Comprimento de onda: 220 e 254 nm. LCMS (Método a, Tabela 7) R_t = 2,31 min. RMN de ¹H: (dimetilsulfóxido-d₆, 400 MHz) ppm δ 0,90 (s, 3 H) 1,19-1,41 (m, 2 H) 1,43-1,62 (m, 7 H), 1,64-1,77 (m, 3 H) 1,84 (br d, J = 14,55 Hz, 1 H) 1,95 - 2,07 (m, 1 H) 2,18 - 2,36 (m, 3 H) 2,65 - 2,78 (m, 3 H) 3,71 - 3,86 (m, 3 H) 3,89 (s, 2 H) 3,93 (s, 2 H) 4,20 (br d, J = 9,48 Hz, 1 H) 4,33 - 4,41 (m, 1 H) 4,59 (br dd, J = 18,41, 8,05 Hz, 1 H) 4,81 (br dd, J = 18,52, 8,60 Hz, 1 H) 4,94 (d, J = 4,63 Hz, 1 H) 5,50 (s, 1

H) 5,54 - 5,76 (m, 1 H) 6,13 (s, 1 H) 6,29 (dd, $J = 10,14, 1,32$ Hz, 1 H) 6,95 (d, $J = 7,72$ Hz, 1 H) 7,15 - 7,28 (m, 4 H) 7,30 - 7,41 (m, 3 H) 7,51 (br d, $J = 7,94$ Hz, 1 H) 7,72 (br s, 3 H) 8,21 (br d, $J = 7,72$ Hz, 1 H) 8,54 (t, $J = 5,62$ Hz, 1 H) 9,93 (br d, $J = 2,65$ Hz, 1 H).

EXEMPLO 6 DO PRECURSOR: SÍNTESE DE (S)-N-(3-(4-((2S,6AS,6BR,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-2,6B-DIFLUORO-7-HIDROXI-8B-(2-HIDROXIACETIL)-6A,8A-DIMETIL-4-OXO-2,4,6A,6B,7,8,8A,8B,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-1H-NAFTO[2',1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-10-IL)BENZIL)FENIL)-2-((S)-2-(3-(2,5-DIOXO-2,5-DI-HIDRO-1H-PIRROL-1-IL)PROPANAMIDO)PROPANAMIDO)PROPANAMIDA.



[0174]Etapa 1: Síntese de ((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropano-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)carbamato de *tert*-butila. 3-oxid hexafluorofosfato de 1-[Bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridínio (HATU) (610 mg, 1,605 mmol) e 2,6-lutidina (0,3 ml, 2,58 mmol) foram adicionados à temperatura ambiente uma mistura do produto do Exemplo 1 do Precursor, Etapa 6 (648,1 mg, 1,070 mmol) e ácido (S)-2-((S)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)propanamido)propanoico (334 mg, 1,284 mmol) em THF (11,5 ml). Após 9 horas a reação foi diluída com acetato de etila (16 ml), em seguida, lavada com uma solução aquosa 1 N de HCl (3 x 4 ml), seguido por uma solução aquosa saturada de salmoura (4 ml). A purificação por cromatografia (sílica, 40 g) eluindo com um gradiente de 0 a 10% de metanol/diclorometano forneceu o composto do título (773,7 mg, 0,912 mmol, 85% de rendimento). LCMS (Método B, Tabela 7) $R_t = 0,92$ min, $m/z = 848,53$ [M+H⁺].

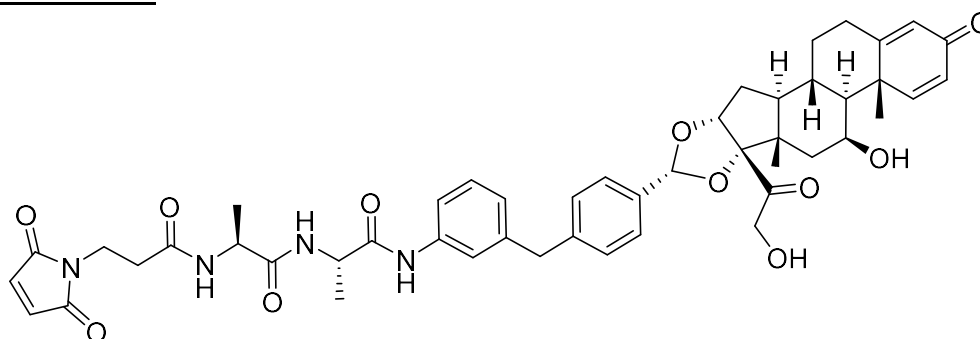
[0175]Etapa 2: Síntese de (S)-2-amino-N-((S)-1-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)propanamida. Foi adicionado gota a gota ácido trifluoroacético (1,97 ml, 25,6 mmol) a uma solução à temperatura ambiente do produto do Exemplo 6, Etapa 1 (0,7683 g, 0,906 mmol) em diclorometano (6,0 ml). Após 50 min, o solvente foi removido sob pressão reduzida para dar um xarope marrom. O resíduo foi dissolvido em 1:1 dimetilsulfóxido:metanol (12 ml) e purificado por HPLC de fase reversa em uma coluna Phenomenex C18 (2) de 10 microns (coluna de 250 x 50 mm). Utilizou-se um gradiente de acetonitrila (A) e 0,1% de ácido trifluoroacético em água (B), a um taxa de fluxo de 90 ml/min, (0 a 5,0 min 15% de A, 5,0 a 20 min gradiente linear 15 a 75%

A, mantenha 2 min, 22,0 a 22,5 min gradiente linear 75 a 95% A, mantenha 4 min). As frações combinadas foram concentradas sob pressão reduzida até à secura e o resíduo foi seco durante a noite no forno a vácuo a 50 °C para dar o composto do título (230 mg, 0,308 mmol, rendimento de 34%). LC-MS (Método b, Tabela 7) acetal isômero principal $R_t = 0,73$ min, $m/z = 748,78$ $[M+H^+]$. RMN de 1H (400 MHz, dimetilsulfóxido- d_6) δ 10,01 (s, 1H), 8,62 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 8,04 (d, $J = 5,4$ Hz, 3H), 7,46-7,31 (m, 4H), 7,31 - 7,13 (m, 4H), 6,91 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 6,27 (dd, $J = 10,2, 1,9$ Hz, 1H), 6,11 (s, 1H), 5,76 - 5,47 (m, 2H), 5,43 (s, 1H), 4,93 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H), 4,49 (d, $J = 19,5$ Hz, 1H), 4,42 (q, $J = 7,1$ Hz, 1H), 4,23 - 4,13 (m, 2H), 2,72 - 2,54 (m, 1H), 2,33 - 2,16 (m, 2H), 2,02 (dt, $J = 13,6, 3,6$ Hz, 1H), 1,69 (h, $J = 5,9, 5,1$ Hz, 3H), 1,48 (s, 4H), 1,33 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H), 1,30 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H), 0,85 (s, 3H).

[0176]Etapa 3: Síntese de (S)-N-(3-(4-((2S,6aS,6Br,7S,8aS,8BS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)-2-((S)-2-(3-(2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)propanamido)propanamida. Di-isopropiletilamina (0,1 ml, 0,573 mmol) foi adicionada a uma solução em temperatura ambiente do produto do Exemplo 6, Etapa 2 (0,220 g, 0,294 mmol) e 3-maleimidopropionato de N-succinimidila (0,086 g, 0,324 mmol) em dimetil formamida (2,8 ml). Após 30 minutos o pH da mistura reacional foi ajustado para 4 a 5 por adição gota a gota de uma solução de 7% de ácido trifluoroacético em água (1,0 ml). A mistura em bruto foi purificado por HPLC de fase inversa em uma coluna Phenomenex C18 (2) coluna de 10 microns (coluna de 250 x 50 mm). Foi utilizado um gradiente de acetonitrila (A) e ácido trifluoroacético a 0,1% em água (B), a uma taxa de fluxo de 90 ml/min, (0 a 5,0 min 15% A, 5,0 a 20 min de gradiente linear 15 a 85% A, manter 2 min). As frações combinadas foram concentradas sob pressão reduzida para remover solventes voláteis, e a solução resultante foi congelada e liofilizada para dar o composto do título

(175,2 mg, 0,195 mmol, 66% de rendimento). LCMS (Método b, Tabela 7) $R_t = 0,82$ min, $m/z = 899,87$ $[M+H^+]$. RMN de 1H (400 MHz, dimetilsulfóxida- d_6) δ 9,70 (s, 1H), 8,14 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H), 8,01 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 7,47 - 7,35 (m, 2H), 7,32 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 7,26 - 7,10 (m, 4H), 6,95 (s, 1H), 6,87 (dt, $J = 7,6, 1,3$ Hz, 1H), 6,26 (dd, $J = 10,2, 1,9$ Hz, 1H), 6,09 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H), 5,72 - 5,51 (m, 1H), 5,48 (s, 1H), 5,41 (s, 1H), 4,91 (d, $J = 4,9$ Hz, 1H), 4,47 (d, $J = 19,4$ Hz, 1H), 4,30 (p, $J = 7,1$ Hz, 1H), 4,25 - 4,11 (m, 3H), 3,85 (s, 2H), 3,57 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H), 2,71 - 2,48 (m, 1H), 2,36 (dd, $J = 8,0, 6,7$ Hz, 2H), 2,23 (ddt, $J = 25,1, 12,2, 6,6$ Hz, 2H), 2,01 (dt, $J = 13,7, 3,7$ Hz, 1H), 1,75 - 1,57 (m, 3H), 1,48 (p, $J = 11,9$ Hz, 1H), 1,46 (s, 3H), 1,24 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H), 1,13 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H), 0,83 (s, 3H).

EXEMPLO 7 DO PRECURSOR: SÍNTESE DE 3-(2,5-DIOXO-2,5-DI-HIDRO-1H-PIRROL-1-IL)-N-((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6AR,6BS,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-7-HIDROXI-8B-(2-HIDROXIACETIL)-6A,8A-DIMETIL-4-OXO-2,4,6A,6B,7,8,8A,8B,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-1H-NAFTO[2',1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-10-IL)BENZIL)FENIL)AMINO)-1-OXOPROPAN-2-IL)AMINO)-1-OXOPROPAN-2-IL)PROPANAMIDA

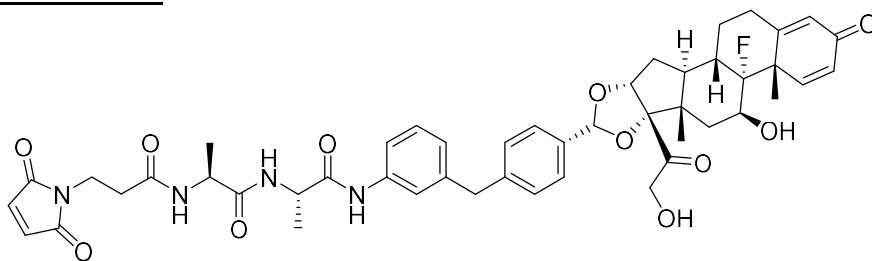


[0177]O produto do Exemplo 7 do precursor foi sintetizado em um procedimento semelhante ao Exemplo 6 usando (6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobenzil)fenil)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona. LCMS (Método b, Tabela 7) $R_t = 0,85$

min, m/z = 863,4 [M+H].

[0178]RMN de ^1H (501 MHz, dimetilsulfóxido- d_6) δ 9,71 (s, 1H), 8,17 (d, J = 7,0 Hz, 1H), 8,03 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 7,43 (dd, J = 7,8, 1,1 Hz, 2H), 7,38 - 7,32 (m, 2H), 7,29 (d, J = 10,1 Hz, 1H), 7,22 - 7,15 (m, 3H), 6,96 (s, 2H), 6,88 (dt, J = 7,8, 1,3 Hz, 1H), 6,13 (dd, J = 10,1, 1,9 Hz, 1H), 5,90 (t, J = 1,6 Hz, 1H), 5,37 (s, 1H), 4,90 (d, J = 5,4 Hz, 1H), 4,48 (d, J = 19,4 Hz, 1H), 4,32 (p, J = 7,1 Hz, 1H), 4,27 (q, J = 3,3 Hz, 1H), 4,21 (p, J = 7,1 Hz, 1H), 4,16 (d, J = 19,4 Hz, 1H), 3,87 (s, 2H), 3,59 (t, J = 7,3 Hz, 2H), 2,57 - 2,49 (m, 1H), 2,38 (dd, J = 8,0, 6,6 Hz, 2H), 2,32 - 2,24 (m, 1H), 2,15 - 2,04 (m, 1H), 2,04 - 1,95 (m, 1H), 1,80 - 1,54 (m, 5H), 1,37 (s, 3H), 1,26 (d, J = 7,1 Hz, 3H), 1,15 (d, J = 7,1 Hz, 3H), 1,02 (ddd, J = 21,2, 12,1, 4,2 Hz, 2H), 0,84 (s, 3H).

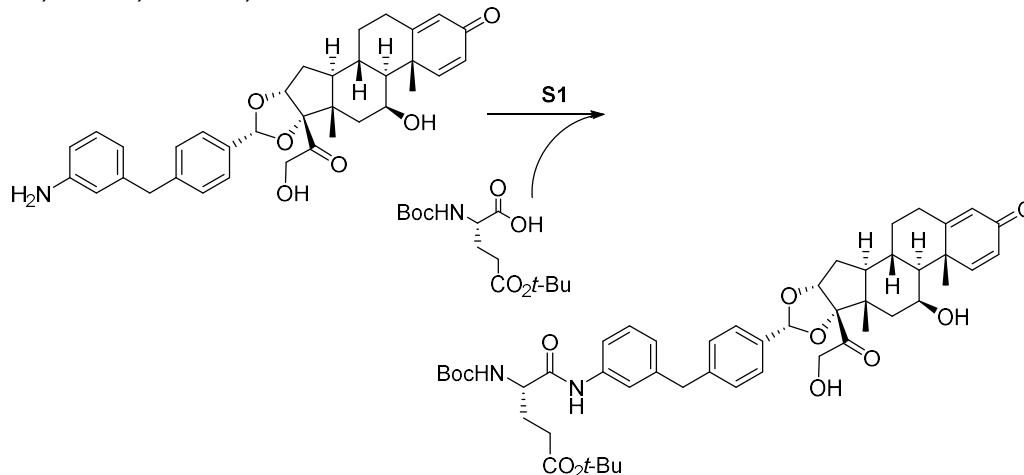
EXEMPLO 8 DO PRECURSOR: SÍNTESE DE 3-(2,5-DIOXO-2,5-DI-HIDRO-1H-PIRROL-1-IL)-N-((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6AS,6BR,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-6B-FLUORO-7-HIDROXI-8B-(2-HIDROXIACETIL)-6A,8A-DIMETIL-4-OXO-2,4,6A,6B,7,8,8A,8B,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-1H-NAFTO[2',1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-10-IL)BENZIL)FENIL)AMINO)-1-OXOPROPAN-2-IL)AMINO)-1-OXOPROPAN-2-IL)PROPANAMIDA.

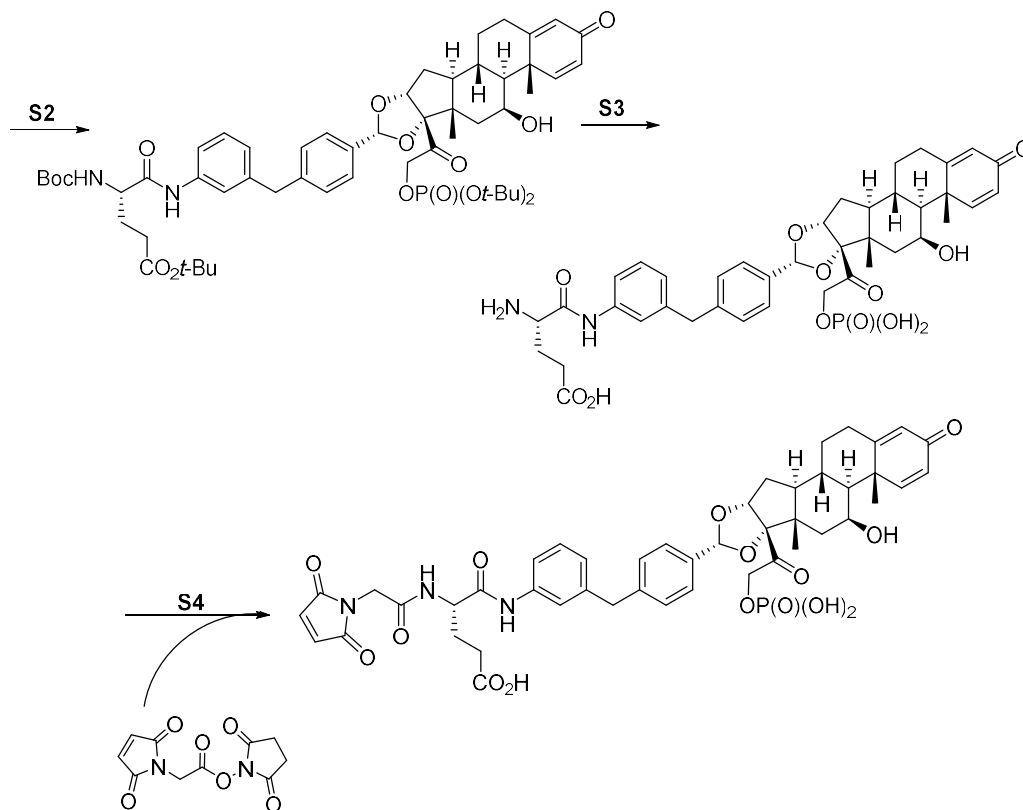


[0179]O produto do Exemplo 8 do Precursor foi sintetizado em um procedimento semelhante ao Exemplo 6 usando (6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobenzil)fenil)-6b-fluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona. LCMS (Método b, Tabela 7) R_t = 0,85 min; m/z = 881,46 [M+H] $^+$.

[0180]RMN de ^1H (dimetilsulfóxido- d_6) δ 0,83 (s, 3H), 1,13 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H), 1,24 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H), 1,35 (qd, $J = 13,3, 12,8, 5,1$ Hz, 1H), 1,46 (s, 3H), 1,63 (q, $J = 9,7, 8,5$ Hz, 3H), 1,73 - 1,88 (m, 1H), 2,01 (dt, $J = 13,7, 3,5$ Hz, 1H), 2,14 (td, $J = 11,8, 7,2$ Hz, 1H), 2,26 - 2,40 (m, 3H), 2,48 - 2,69 (m, 2H), 3,57 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H), 3,85 (s, 2H), 4,17 (ddd, $J = 17,5, 11,7, 6,2$ Hz, 3H), 4,30 (p, $J = 7,2$ Hz, 1H), 4,47 (d, $J = 19,4$ Hz, 1H), 4,83 - 4,95 (m, 1H), 5,40 (s, 2H), 5,99 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H), 6,20 (dd, $J = 10,1, 1,9$ Hz, 1H), 6,87 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 6,95 (s, 2H), 7,16 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H), 7,20 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 7,25 (d, $J = 10,1$ Hz, 1H), 7,31 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 7,38 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H), 7,43 (dd, $J = 8,0, 2,0$ Hz, 1H), 8,01 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H), 8,14 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H), 9,70 (s, 1H).

EXEMPLO 9 DO PRECURSOR: SÍNTESE DE ÁCIDO (S)-4-(2-(2,5-DIOXO-2,5-DI-HIDRO-1H-PIRROL-1-IL)ACETAMIDO)-5-((3-(4-((6AR,6BS,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-7-HIDROXI-6A,8A-DIMETIL-4-OXO-8B-(2-(FOSFONOOXI)ACETIL)-2,4,6A,6B,7,8,8A,8B,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-1H-NAFTO[2',1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-10-IL)BENZIL)FENIL)AMINO)-5-OXOPENTANOICO





[0181]Etapa 1: Síntese de (S)-4-((terc-butoxicarbonil)amino)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-5-oxopentanoato de *terc*-butila. Hexafluorofosfato de 3-oxidação de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridínio (HATU) (260 mg, 0,685 mmol) e 2,6-dimetilpiridina (0,184 ml, 1,580 mmol) foram adicionados a uma suspensão à temperatura ambiente do produto do Exemplo Precursor 2 (300 mg, 0,527 mmol) e ácido (S)-5-(terc-butoxi)-2-((terc-butoxicarbonil)amino)-5-oxopentanoico (168 mg, 0,553 mmol) em dimetil formamida (6 ml). Após 2 horas à temperatura ambiente, a reação foi diluída com acetato de etila (30 ml) e depois lavou-se sequencialmente com uma solução aquosa de HCl (2 x 15 ml), uma solução aquosa saturada de NaHCO₃ 1 N (15 ml) e salmoura (15 ml). A camada orgânica foi seca (Na₂SO₄) e o solvente foi removido sob pressão reduzida. A purificação por cromatografia (sílica) eluindo com um gradiente de 0 a

10% de metanol/diclorometano forneceu o composto do título (400 mg, 0,47 mmol, 89% de rendimento) como um sólido esbranquiçado. LCMS (Método b, Tabela 7) $R_t = 1,09$ min; MS $m/z = 854,9$ $[M+H]^+$.

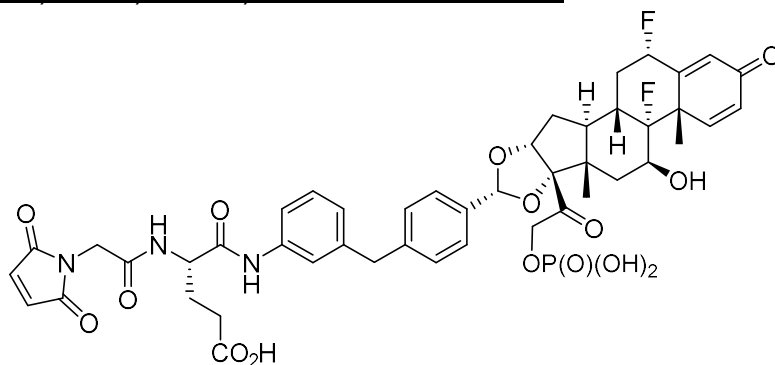
[0182]Etapa 2: Síntese de (S)-4-((terc-butoxicarbonil)amino)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-terc-butoxifosforil)oxi)acetil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-5-oxopentanoato de *terc*-butila. Di-*terc*-butil dietilfosforamidita (0,42 ml, 1,5 mmol) foi adicionado a uma solução em temperatura ambiente do produto do Exemplo Precursor 9, Etapa 1 (400 mg, 0,468 mmol) e 1H-tetrazol (0,35 ml, 2,25 mmol) em dimetil acetamida (5 ml). A reação foi agitada à temperatura ambiente por 2 horas, após o que uma solução a 50% de peróxido de hidrogênio em água (1,5 ml) foi adicionada gota a gota. Uma vez que a LCMS indicou que a oxidação estava completa, a reação foi arrefecer a 0 °C e extinguiu-se por adição de uma solução aquosa 1 M de $Na_2S_2O_3$ (8 ml). A mistura foi extraída com acetato de etila (2 X 30 ml), as camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura (15 ml), secou-se (Na_2SO_4), filtrada e o solvente foi removido sob pressão reduzida. A purificação por HPLC preparativa em fase reversa deu o composto do título (420 mg, 0,40 mmol, 86% de rendimento). LCMS (Método b, Tabela 7) $R_t = 1,27$ min; MS $m/z = 1047,6$ $[M+H]^+$. RMN de 1H (400 MHz, dimetilsulfóxido- d_6) δ 9,80 (s, 1H), 7,41 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 7,37-7,31 (m, 3H), 7,29 (d, $J = 10,1$ Hz, 1H), 7,20 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 7,17 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H), 6,94 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 6,88 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 6,11 (dd, $J = 10,1, 1,9$ Hz, 1H), 5,89 (s, 1H), 5,46 (s, 1H), 5,00 - 4,81 (m, 3H), 4,58 (dd, $J = 18,0, 9,1$ Hz, 1H), 4,26 (s, 1H), 4,00 (d, $J = 6,7$ Hz, 1H), 3,86 (s, 2H), 2,49 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H), 2,29 (p, $J = 2,0$ Hz, 1H), 2,27 - 2,16 (m, 2H), 2,06 (d, $J = 10,3$ Hz, 1H), 1,98 (d, $J = 11,0$ Hz, 1H), 1,91 - 1,56 (m, 6H), 1,39 (d, $J = 1,5$ Hz, 18H), 1,35 (s, 3H), 1,33 (s, 18H), 1,01 (t, $J = 13,7$ Hz, 2H), 0,85 (s, 3H).

[0183]Etapa 3: Síntese de ácido (S)-4-Amino-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-8b-(2-(fosfonooxi)acetil)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-5-oxopentanoico. Foi adicionado ácido trifluoroacético (2,0 ml, 0,40 mmol) a uma solução em temperatura ambiente do produto do Exemplo 9 do Precursor, Etapa 2 (420 mg, 0,401 mmol) em diclorometano (6 ml). A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 45 minutos, após o que o solvente foi removido sob pressão reduzida. O composto do título foi levado adiante sem purificação adicional. LCMS (Método a, Tabela 7) principal acetal isômero $R_t = 0,69$ min, MS $m/z = 779,8$ $[M+H]^+$; isômero acetal menor $R_t = 0,72$ min, MS $m/z = 779,9$ $[M+H]^+$.

[0184]Etapa 4: Síntese de ácido (S)-4-(2-(2,5-Dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)acetamido)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-8b-(2-(fosfonooxi)acetil)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-5-oxopentanoico. Adicionaram-se sequencialmente *N,N*-di-isopropiletilamina (0,90 ml, 5,1 mmol) e éster *N*-hidroxissuccinimida do ácido maleimidoacético (141 mg, 0,561 mmol) a uma solução à temperatura ambiente do produto do Exemplo 9 do Precursor, Etapa 3 (364 mg, 0,467 mmol) em dimetil formamida (5 ml). LCMS indicou que a reação estava completa dentro de 15 minutos, após o que a reação foi arrefecida a 0 °C e o pH foi ajustado para 1 pela adição de ácido 2,2,2-trifluoroacético (0,432 ml, 6,6 mmol). A purificação por HPLC preparativa em fase reversa e liofilização deu o composto em epígrafe (146 mg, 0,159 mmol, 34% de rendimento). LCMS (Método b, Tabela 7) $R_t = 0,79$ min; MS $m/z = 915,9$ $[M+H]^+$. RMN de 1H (400 MHz, dimetilsulfóxido- d_6) δ 9,92 (s, 1H), 8,45 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,43-7,38 (m, 1H), 7,35 (d, $J = 8,1$ Hz, 3H), 7,28 (d, $J = 10,1$ Hz, 1H), 7,21 (d, $J = 8,3$ Hz, 3H), 7,16 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 7,05 (s, 2H), 6,89 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 6,13 (dd, $J = 10,1, 1,9$ Hz, 1H), 5,89 (d, $J =$

1,6 Hz, 1H), 5,44 (s, 1H), 4,93 - 4,83 (m, 2H), 4,80 (s, 1H), 4,53 (dd, $J = 18,2, 8,2$ Hz, 1H), 4,34 (td, $J = 8,1, 5,3$ Hz, 1H), 4,27 (s, 1H), 4,08 (s, 2H), 3,87 (s, 2H), 2,58 - 2,48 (m, 1H), 2,34 - 2,16 (m, 3H), 2,16 - 2,03 (m, 1H), 2,03 - 1,84 (m, 2H), 1,84 - 1,53 (m, 4H), 1,36 (s, 3H), 1,01 (td, $J = 13,1, 11,3, 4,0$ Hz, 2H), 0,84 (s, 3H).

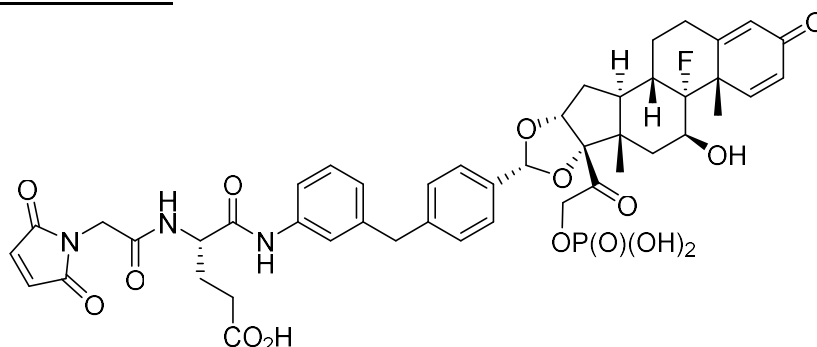
EXEMPLO 10 DO PRECURSOR: SÍNTESE DE ÁCIDO (S)-4-(2-(2,5-DIOXO-2,5-DI-HIDRO-1H-PIRROL-1-IL)ACETAMIDO)-5-((3-(4-((6AR,6BS,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-7-HIDROXI-6A,8A-DIMETIL-4-OXO-8B-(2-(FOSFONOOXI)ACETIL)-2,4,6A,6B,7,8,8A,8B,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-1H-NAFTO[2'.1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-10-IL)BENZIL)FENIL)AMINO)-5-OXOPENTANOICO.



[0185]O produto do Exemplo 10 do Precursor foi sintetizado em um procedimento semelhante ao Exemplo 9 do Precursor usando o produto do Exemplo 1 do Precursor, Etapa 6. LCMS (Método b, Tabela 7) $R_t = 0,79$ min; PM m/z 974,3 $[M+Na]^+$.

[0186]RMN de 1H (400 MHz, dimetilsulfóxido- d_6) δ 9,91 (s, 1H), 8,45 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,42 (dd, $J = 8,0, 1,9$ Hz, 1H), 7,37-7,29 (m, 3H), 7,28 - 7,20 (m, 3H), 7,17 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H), 7,04 (s, 1H), 6,89 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 6,26 (dd, $J = 10,2, 1,8$ Hz, 1H), 6,09 (s, 1H), 5,67 (dd, $J = 11,2, 6,7$ Hz, 1H), 5,60 - 5,48 (m, 2H), 4,94 - 4,85 (m, 2H), 4,56 (dd, $J = 18,2, 8,4$ Hz, 1H), 4,34 (td, $J = 8,2, 5,4$ Hz, 1H), 4,23 - 4,13 (m, 1H), 4,08 (s, 2H), 3,86 (s, 2H), 2,69 - 2,52 (m, 1H), 2,32 - 2,12 (m, 4H), 2,03 (dt, $J = 13,7, 3,7$ Hz, 1H), 1,96 - 1,85 (m, 1H), 1,83 - 1,60 (m, 4H), 1,55-1,41 (m, 4H), 0,85 (s, 3H).

EXEMPLO 11 DO PRECURSOR: SÍNTESE DE ÁCIDO (S)-4-(2-(2,5-DIOXO-2,5-DI-HIDRO-1H-PIRROL-1-IL)ACETAMIDO)-5-((3-(4-((6AS,6BR,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-6B-FLUORO-7-HIDROXI-6A,8A-DIMETIL-4-OXO-8B-(2-(FOSFONOOXI)ACETIL)-2,4,6A,6B,7,8,8A,8B,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-1H-NAFTO[2',1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-10-IL)BENZIL)FENIL)AMINO)-5-OXOPENTANOICO.

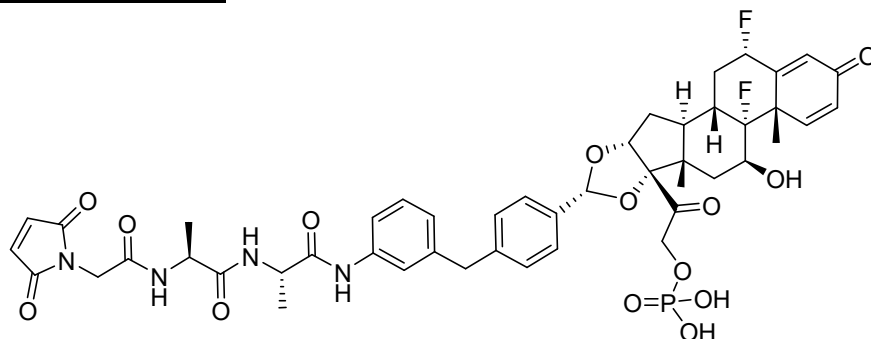


[0187]O produto do Exemplo 11 do Precursor foi sintetizado em um procedimento semelhante ao Exemplo 9 do Precursor usando o produto do Exemplo 3 do Precursor. LCMS (Método b, Tabela 7) $R_t = 0,80$ min; MW m/z 934 $[M+H]^+$.

[0188]RMN de 1H (400 MHz, dimetilsulfóxido- d_6) δ 0,89 (s, 3H), 1,39 (dd, $J = 12,7, 5,1$ Hz, 1H), 1,50 (s, 3H), 1,67 (q, $J = 6,2$ Hz, 3H), 1,76 - 2,02 (m, 3H), 2,07 (d, $J = 13,1$ Hz, 1H), 2,22 (dtd, $J = 16,7, 11,1, 10,4, 4,6$ Hz, 3H), 2,31 - 2,43 (m, 1H), 2,57 - 2,75 (m, 1H), 3,90 (s, 2H), 4,11 (s, 2H), 4,20 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 4,38 (td, $J = 8,2, 5,5$ Hz, 1H), 4,58 (dd, $J = 18,2, 8,3$ Hz, 1H), 4,84 - 5,00 (m, 2H), 5,51 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H), 6,04 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H), 6,24 (dd, $J = 10,2, 1,9$ Hz, 1H), 6,88 - 6,99 (m, 1H), 7,09 (s, 2H), 7,15 - 7,32 (m, 4H), 7,32 - 7,42 (m, 3H), 7,42 - 7,53 (m, 1H), 8,48 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 9,95 (s, 1H).

EXEMPLO 12 DO PRECURSOR. 2-((2S,6AS,6BR,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-(2-(2,5-DIOXO-2,5-DI-HIDRO-1H-PIRROL-1-IL)ACETAMIDO)PROPANAMIDO)PROPANAMIDO)BENZIL)FENIL)-2,6B-

DIFLUORO-7-HIDROXI-6A,8A-DIMETIL-4-OXO-
1,2,4,6A,6B,7,8,8A,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-8BH-
NAFTO[2',1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-8B-IL)-2-OXOETIL-DI-
HIDROGENOFOSFATO

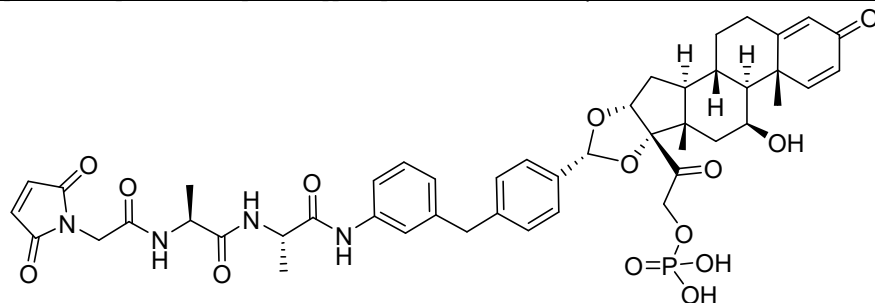


[0189]O produto do Exemplo 12 do precursor foi sintetizado em um procedimento semelhante ao Exemplo 9 do Precursor usando o produto amino do Exemplo 1 do Precursor, dipeptídeo do Exemplo 6 do Precursor (Etapa 1) e reagente de maleimida do Exemplo 9 do Precursor (Etapa 4). LCMS (Método b, Tabela 7) $R_t = 0,82$ min; $m/z = 965,2$ $[M+H]^+$.

[0190]RMN de 1H (400 MHz, dimetilsulfóxido- d_6) δ 9,74 (s, 1H), 8,36 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H), 8,09 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 7,40 (dd, $J = 8,0, 2,0$ Hz, 1H), 7,35 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H), 7,32 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 7,26 7,19 (m, 3H), 7,15 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,04 (s, 2H), 6,87 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 6,26 (dd, $J = 10,1, 1,9$ Hz, 1H), 6,09 (s, 1H), 5,74 5,51 (m, 2H), 5,50 (s, 1H), 4,96 4,83 (m, 2H), 4,56 (dd, $J = 18,2, 8,4$ Hz, 1H), 4,29 (dp, $J = 14,3, 7,1$ Hz, 2H), 4,18 (d, $J = 9,3$ Hz, 1H), 4,11 3,98 (m, 2H), 3,85 (s, 2H), 2,62 (dtd, $J = 33,1, 12,3, 4,2$ Hz, 1H), 2,34 2,14 (m, 2H), 2,03 (dt, $J = 13,3, 3,7$ Hz, 1H), 1,67 (dd, $J = 13,2, 5,1$ Hz, 3H), 1,46 (s, 4H), 1,24 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H), 1,17 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H), 0,85 (s, 3H).

EXEMPLO 13 DO PRECURSOR. FOSFATO DE 2-
((6AR,6BS,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-(2-(2,5-
DIOXO-2,5-DI-HIDRO-1H-PIRROL-1-
IL)ACETAMIDO)PROPANAMIDO)PROPANAMIDO)BENZIL)FENIL)-7-HIDROXI-

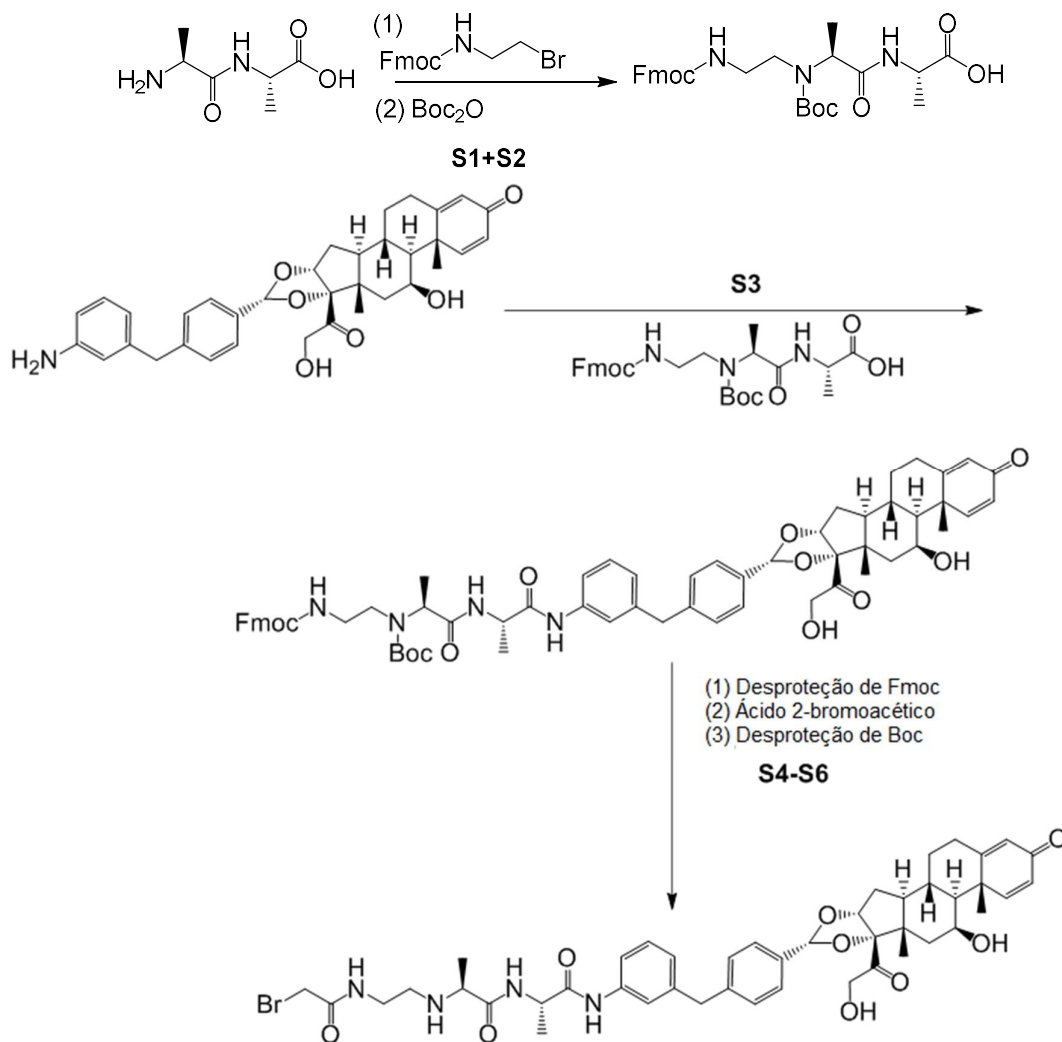
6A,8A-DIMETIL-4-OXO-1,2,4,6A,6B,7,8,8A,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-8BH-NAFTO[2',1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-8B-IL)-2-OXOETIL DI-HIDROGÊNIO



[0191]O produto do Exemplo 13 do precursor foi sintetizado em um procedimento semelhante ao Exemplo 9 do Precursor usando o produto amino do Exemplo 2 do Precursor, dipeptídeo do Exemplo 6 do Precursor (Etapa 1) e reagente de maleimida do Exemplo 9 do Precursor (Etapa 4). LCMS (Método c, Tabela 7) $R_t = 0,82$ min; $m/z = 929,4$ $[M+H]^+$.

[0192]RMN de 1H (400 MHz, dimetilsulfóxido- d_6) $\delta = 9,79$ (s, 1H), 8,42 (br d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 8,15 (br d, $J = 7,0$ Hz, 1H), 7,49-7,28 (m, 5H), 7,25 - 7,12 (m, 3H), 7,07 (s, 2H), 6,90 (br d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 6,16 (br d, $J = 10,1$ Hz, 1H), 5,92 (s, 1H), 5,48 (s, 1H), 4,96 - 4,85 (m, 2H), 4,56 (dd, $J = 8,3, 18,4$ Hz, 1H), 4,37 - 4,23 (m, 3H), 4,08 (br d, $J = 2,6$ Hz, 2H), 3,89 (s, 2H), 2,19 - 1,95 (m, 3H), 1,84 - 1,60 (m, 6H), 1,38 (s, 3H), 1,27 (br d, $J = 7,0$ Hz, 3H), 1,20 (br d, $J = 6,6$ Hz, 3H), 1,02 (br d, $J = 11,4$ Hz, 2H), 0,87 (s, 3H), 0,00 - 0,00 (m, 1H).

EXEMPLO 14A DO PRECURSOR. (S)-2-((2-(2-BROMOACETAMIDO)ETIL)AMINO)-N-((S)-1-((3-(4-((6AR,6BS,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-7-HIDROXI-8B-(2-HIDROXIACETIL)-6A,8A-DIMETIL-4-OXO-2,4,6A,6B,7,8,8A,8B,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-1H-NAFTO[2',1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-10-IL)BENZIL)FENIL)AMINO)-1-OXOPROPAN-2-IL)PROPANAMIDA

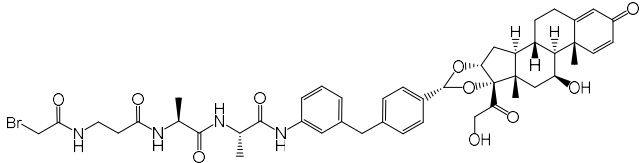
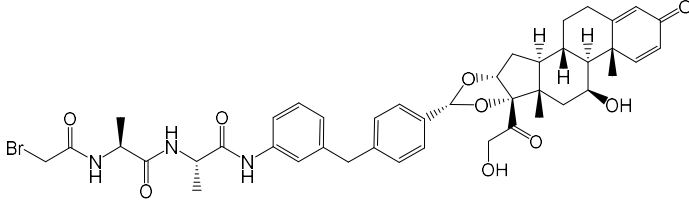


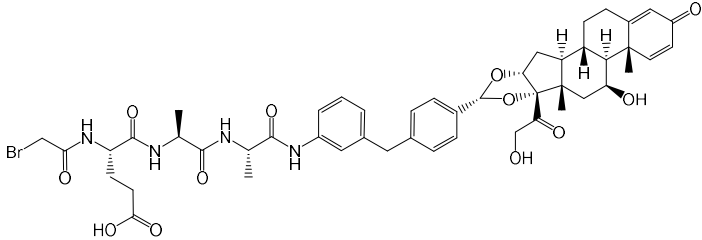
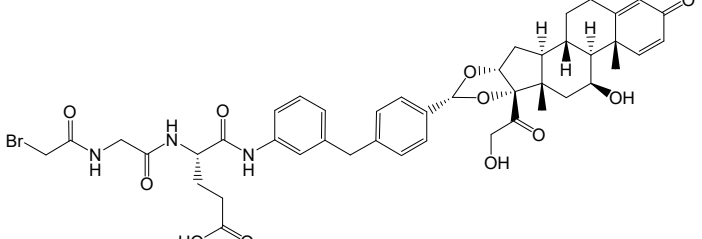
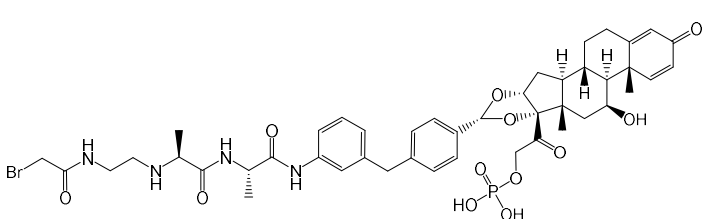
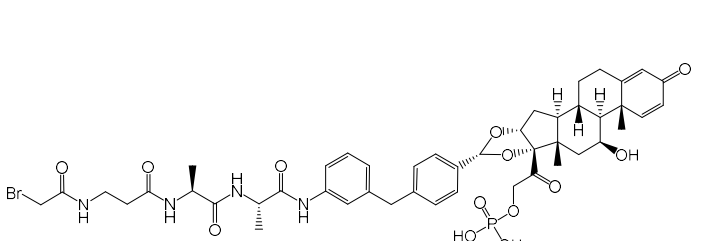
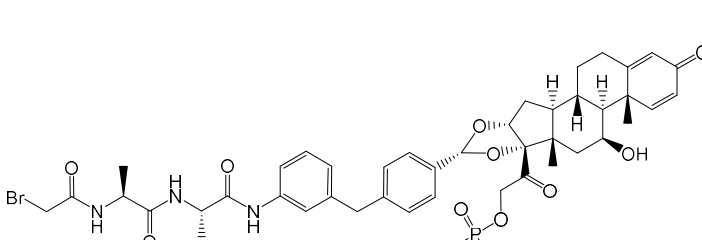
[0193]O produto do Exemplo 14A do precursor pode ser sintetizado a partir do acoplamento de N-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)etil)-N-(terc-butoxicarbonil)-L-alanil-L-alanina (o produto das etapas S1 e S2) ao produto amino do Exemplo 2, seguido das etapas S4 a S6: (1) desproteção de Fmoc, (2) acoplamento com ácido 2-bromoacético e (3) desproteção de Boc. Fmoc = Fluorenilmetiloxicarbonila; Boc = terc-butoxicarbonila.

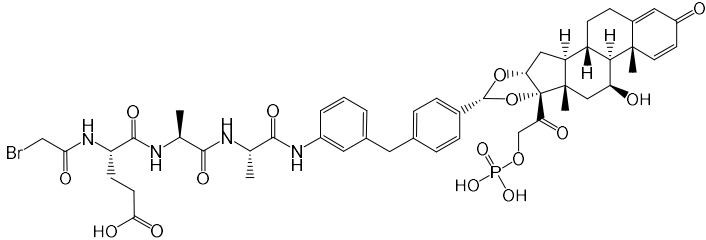
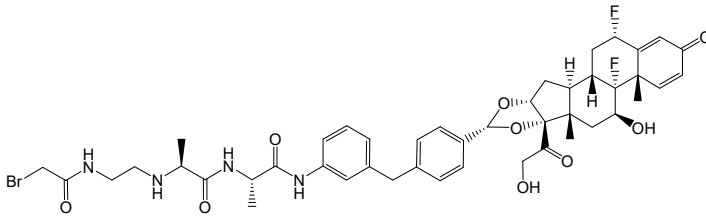
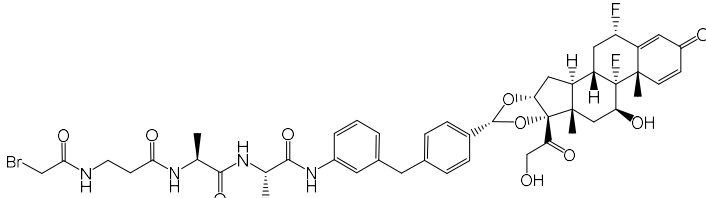
EXEMPLOS ADICIONAIS DO PRECURSOR

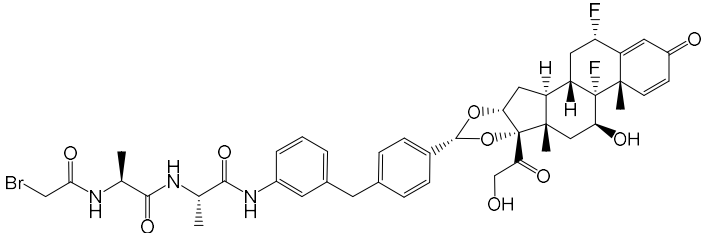
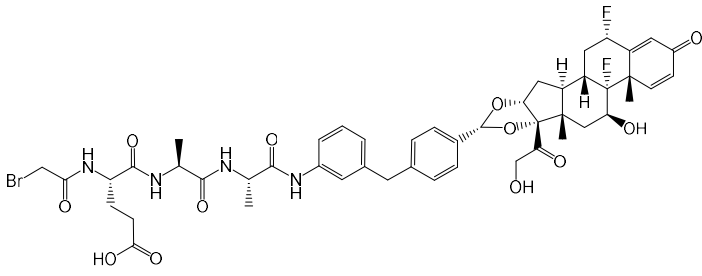
[0194]Exemplo 14B-48 Os produtos de bromoacetamida, listados na Tabela 10, podem ser sintetizados seguindo os procedimentos descritos neste documento.

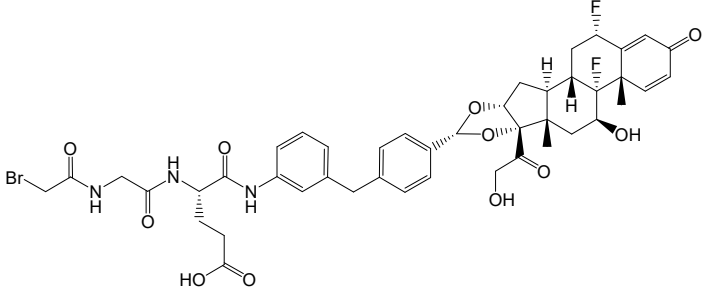
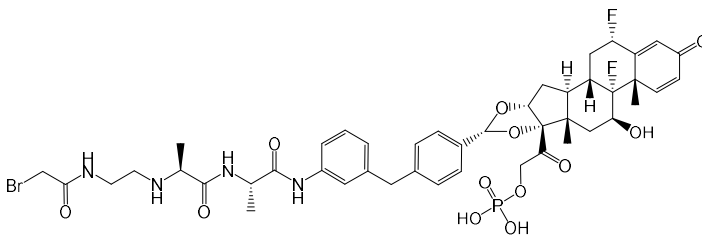
Tabela 10. Precursores adicionais de bromoacetamida

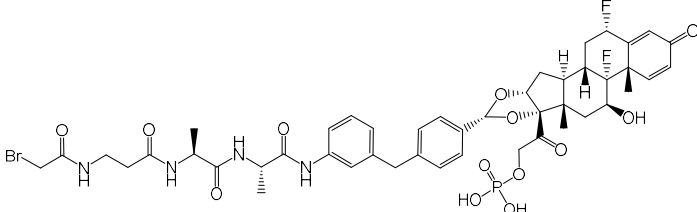
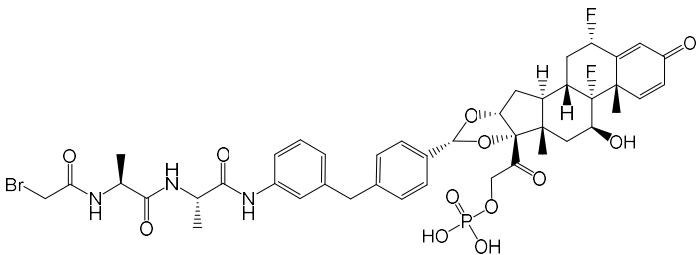
Ex.	Produtos de Bromoacetamide	Protocolo Sintético
14B		<p>Pode ser produzido a partir do Exemplo 2 usando uma rota semelhante ao Exemplo 6, Etapas 1 e 2 e Exemplo 4, Etapa 5.</p> <p>Um protocolo sintético e uma caracterização para este precursor também são fornecidos após esta tabela.</p>
15		<p>Pode ser produzido a partir do Exemplo 2 usando uma rota semelhante ao Exemplo 6, Etapas 1 e 2 e Exemplo 4, Etapa 5.</p> <p>Um protocolo sintético e uma caracterização para este precursor também são fornecidos após esta tabela.</p>

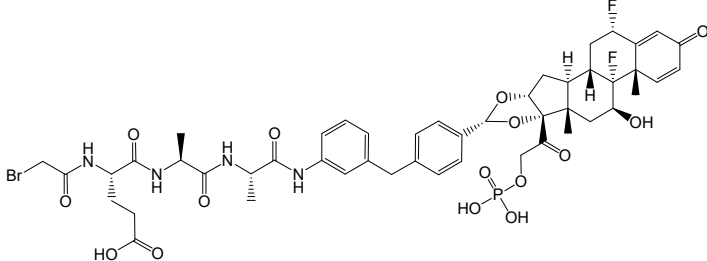
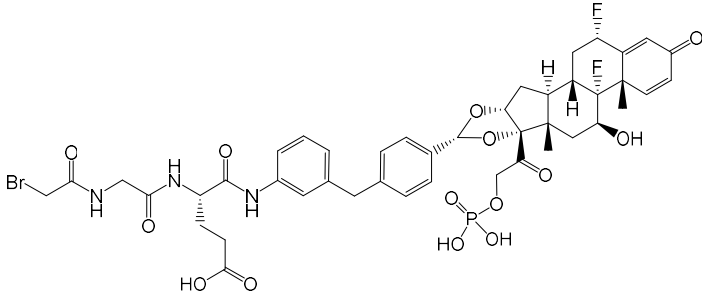
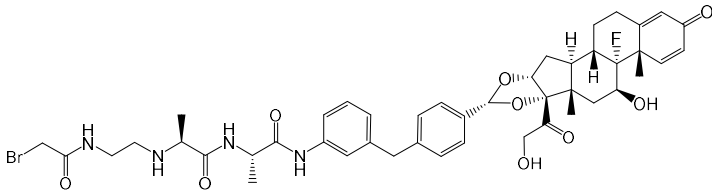
16		Pode ser produzido a partir do Exemplo 2, usando uma rota semelhante ao Exemplo 4.
17		Pode ser produzido a partir do Exemplo 2, usando uma rota semelhante ao Exemplo 4.
18A		Pode ser produzido a partir do Exemplo 2 usando uma rota semelhante ao Exemplo 14A.
18B		Pode ser produzido a partir do Exemplo 2 usando uma rota semelhante ao Exemplo 6, Etapas 1 e 2 e Exemplo 4.
19		Pode ser produzido a partir do Exemplo 2 usando uma rota semelhante ao Exemplo 6, Etapas 1 e 2 e Exemplo 4.

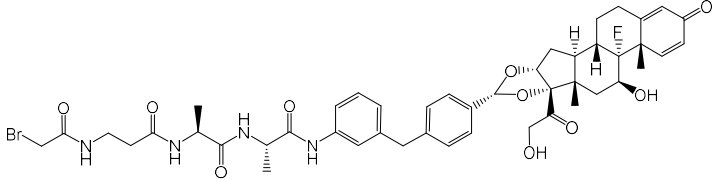
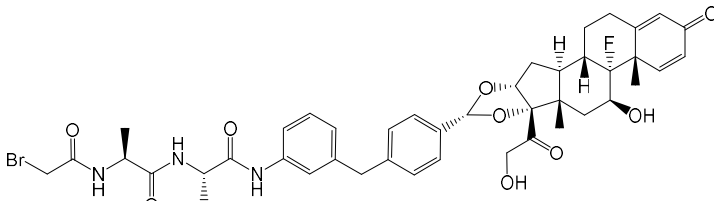
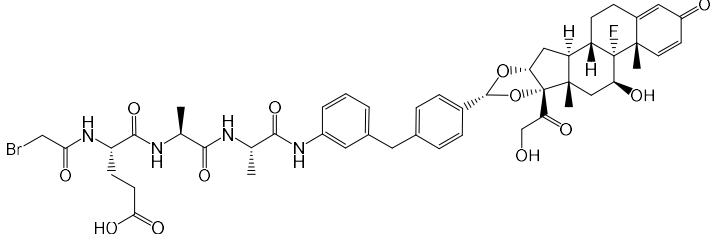
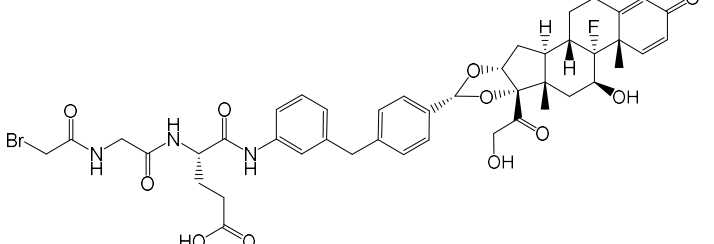
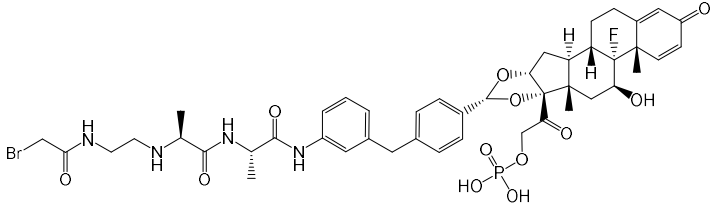
20		<p>Pode ser produzido a partir do Exemplo 2, usando uma rota semelhante ao Exemplo 4.</p>
21A		<p>Pode ser produzido a partir do Exemplo 1 usando uma rota semelhante ao Exemplo 14A.</p>
21B		<p>Pode ser produzido a partir do Exemplo 1 usando uma rota semelhante ao Exemplo 6, Etapas 1 e 2 e Exemplo 4, Etapa 5.</p> <p>Um protocolo sintético e uma caracterização para este precursor também são fornecidos após esta tabela.</p>

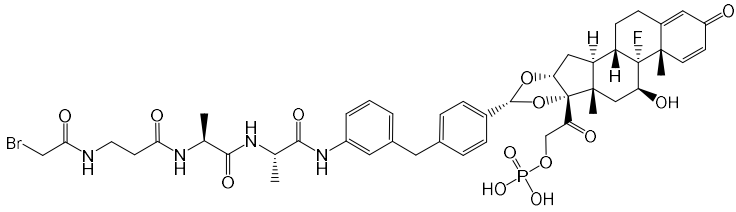
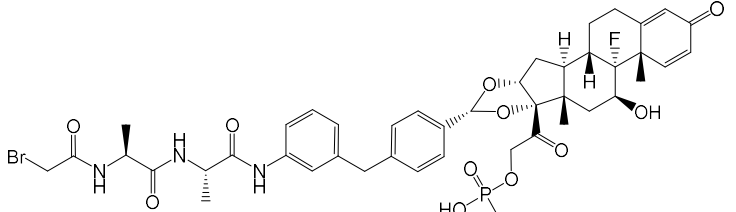
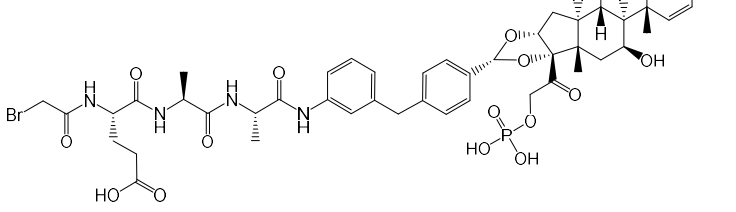
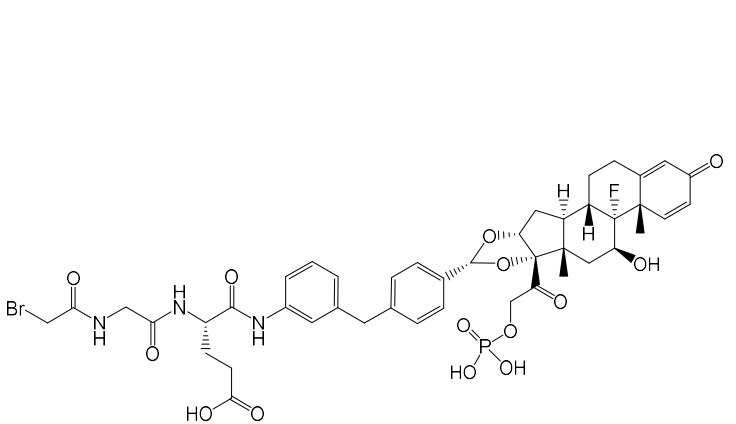
22		<p>Pode ser produzido a partir do Exemplo 1 usando uma rota semelhante ao Exemplo 6, Etapas 1 e 2 e Exemplo 4, Etapa 5.</p> <p>Um protocolo sintético e uma caracterização para este precursor também são fornecidos após esta tabela.</p>
23		<p>Pode ser produzido a partir do Exemplo 1 usando uma rota semelhante ao Exemplo 4.</p> <p>Um protocolo sintético e uma caracterização para este precursor também são fornecidos após esta tabela.</p>

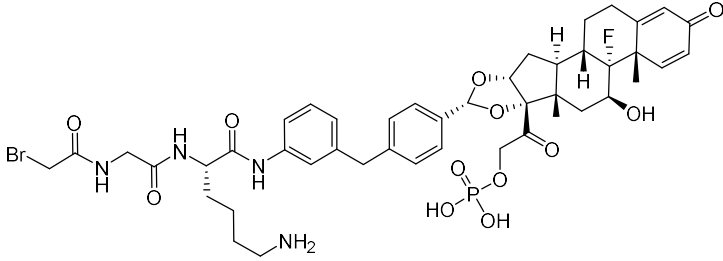
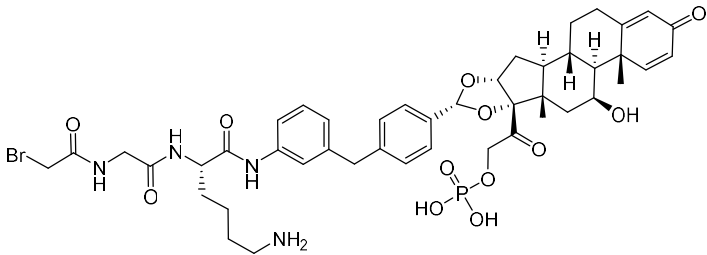
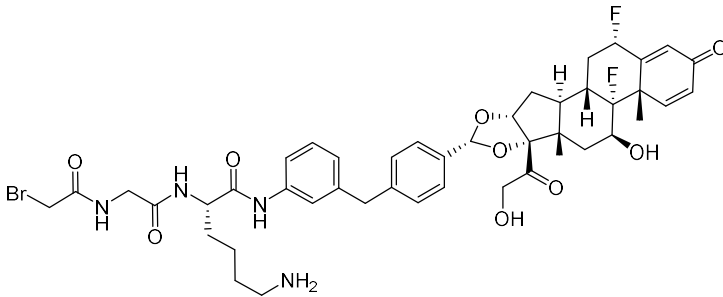
24	 <p>The structure of compound 24 features a complex polycyclic core with multiple stereocenters, including a quaternary carbon and a quaternary oxygen. It is substituted with a bromoacetyl group, a propanoic acid chain, and a biphenyl moiety. The core includes a cyclohexane ring fused to a cyclopentane ring, which is further fused to a six-membered ring containing a carbonyl group and a hydroxyl group. Two fluorine atoms are attached to the six-membered ring.</p>	<p>Pode ser produzido a partir do Exemplo 1 usando uma rota semelhante ao Exemplo 4.</p> <p>Um protocolo sintético e uma caracterização para este precursor também são fornecidos após esta tabela.</p>
25A	 <p>The structure of compound 25A is similar to compound 24, but the propanoic acid chain is replaced by a chain containing a secondary amine and a methyl group. Additionally, a phosphate group is attached to the six-membered ring of the core.</p>	<p>Pode ser produzido a partir do Exemplo 1 usando uma rota semelhante ao Exemplo 14A.</p>

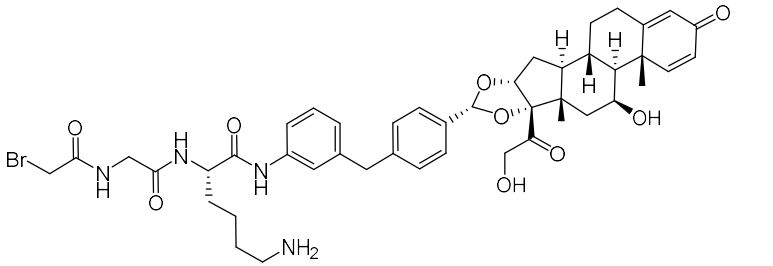
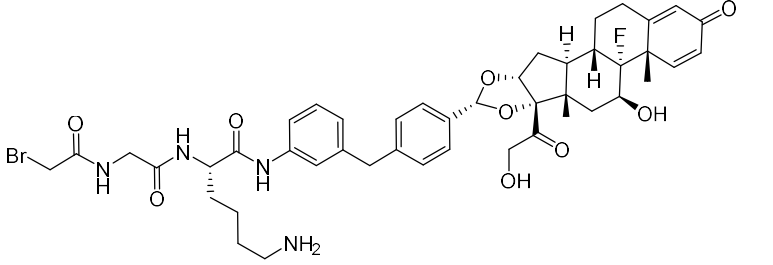
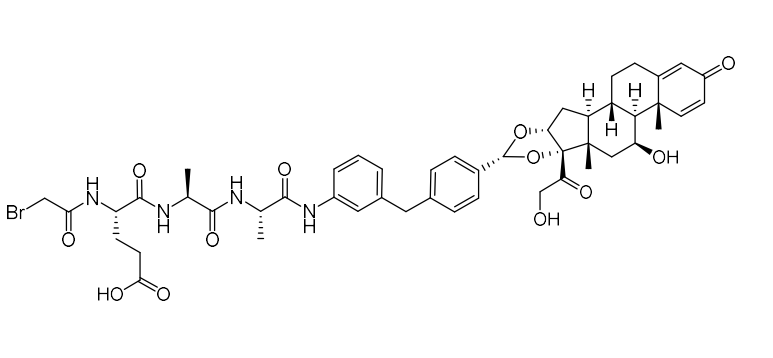
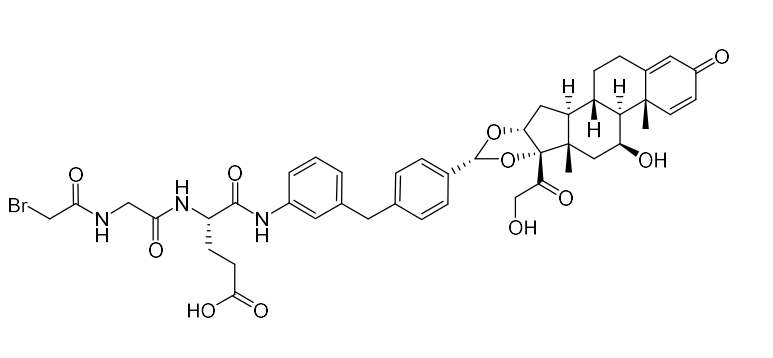
25B		<p>Pode ser produzido a partir do Exemplo 1 usando uma rota semelhante ao Exemplo 6, Etapas 1 e 2 e Exemplo 4.</p> <p>Um protocolo sintético e uma caracterização para este precursor também são fornecidos após esta tabela.</p>
26		<p>Pode ser produzido a partir do Exemplo 1 usando uma rota semelhante ao Exemplo 6, Etapas 1 e 2 e Exemplo 4.</p> <p>Um protocolo sintético e uma caracterização para este precursor também são fornecidos após esta tabela.</p>

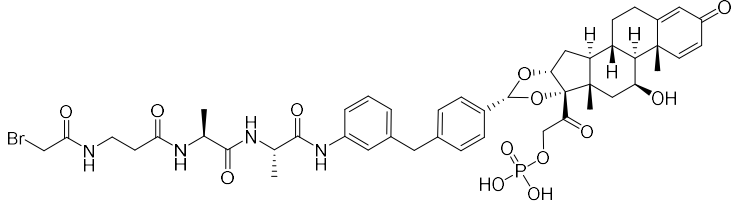
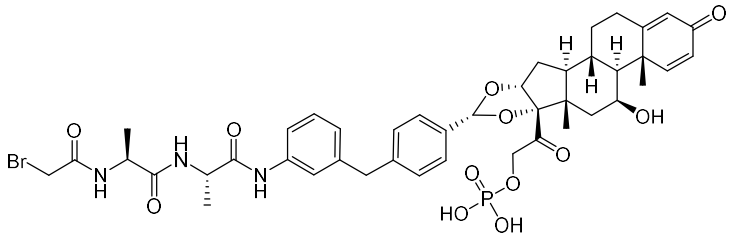
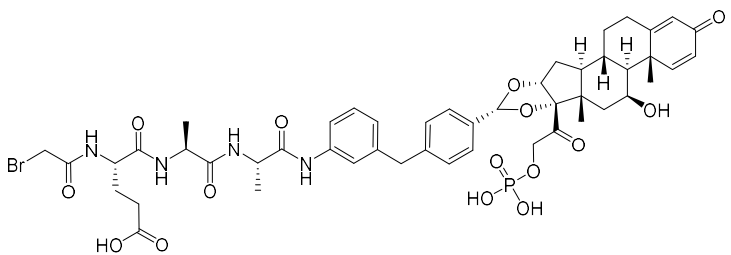
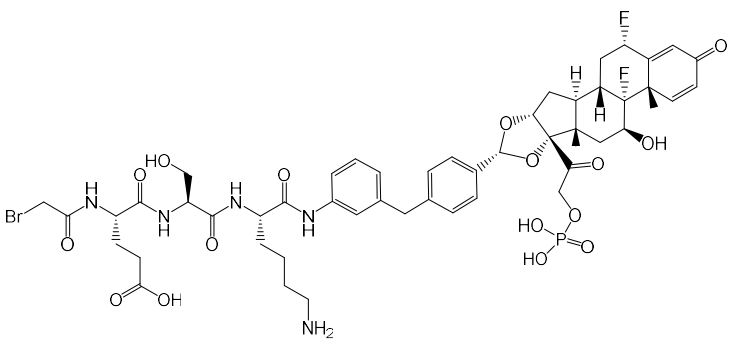
27		<p>Pode ser produzido a partir do Exemplo 1 usando uma rota semelhante ao Exemplo 4.</p> <p>Um protocolo sintético e uma caracterização para este precursor também são fornecidos após esta tabela.</p>
28		<p>Pode ser produzido a partir do Exemplo 1 usando uma rota semelhante ao Exemplo 4.</p> <p>Um protocolo sintético e uma caracterização para este precursor também são fornecidos após esta tabela.</p>
29A		<p>Pode ser produzido a partir do Exemplo 3, usando uma rota semelhante ao Exemplo 14A.</p>

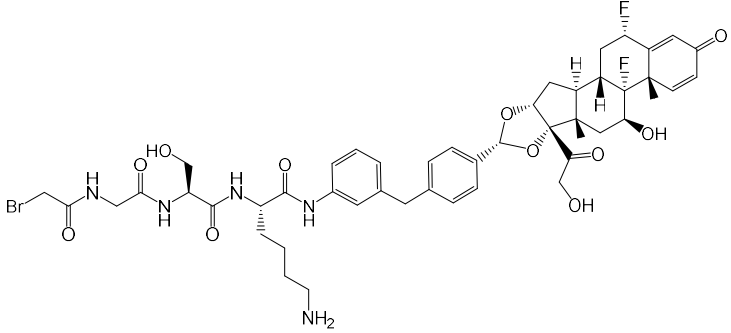
29B		<p>Pode ser feita a partir do Exemplo 3 usando uma rota semelhante ao Exemplo 6, Etapas 1 e 2 e Exemplo 4, Etapa 5.</p>
30		<p>Pode ser feita a partir do Exemplo 3 usando uma rota semelhante ao Exemplo 6, Etapas 1 e 2 e Exemplo 4, Etapa 5.</p>
31		<p>Pode ser produzido a partir do Exemplo 3, usando uma rota semelhante ao Exemplo 4.</p>
32		<p>Pode ser produzido a partir do Exemplo 3, usando uma rota semelhante ao Exemplo 4.</p>
33A		<p>Pode ser produzido a partir do Exemplo 3, usando uma rota semelhante ao Exemplo 14A.</p>

33B		<p>Pode ser produzido a partir do Exemplo 3 usando uma rota semelhante ao Exemplo 6, Etapas 1 e 2 e Exemplo 4.</p>
34		<p>Pode ser produzido a partir do Exemplo 3 usando uma rota semelhante ao Exemplo 6, Etapas 1 e 2 e Exemplo 4.</p>
35		<p>Pode ser produzido a partir do Exemplo 3, usando uma rota semelhante ao Exemplo 4.</p>
36		<p>Pode ser produzido a partir do Exemplo 3, usando uma rota semelhante ao Exemplo 4.</p> <p>Um protocolo sintético e uma caracterização para este precursor também são fornecidos após esta tabela.</p>

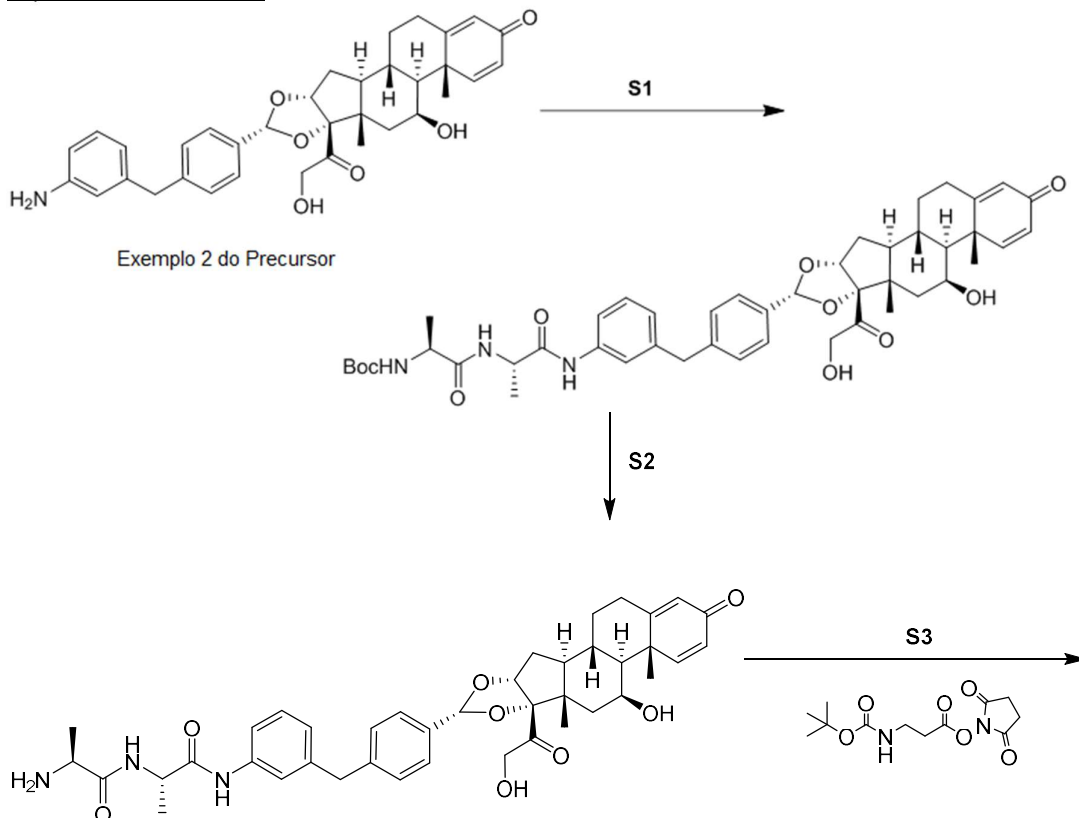
37		<p>Pode ser produzido a partir do Exemplo 3 usando uma rota semelhante ao Exemplo 5.</p> <p>Um protocolo sintético e uma caracterização para este precursor também são fornecidos após esta tabela.</p>
38		<p>Pode ser produzido a partir do Exemplo 2 usando uma rota semelhante ao Exemplo 5.</p>
39		<p>Pode ser produzido a partir do Exemplo 2 usando uma rota semelhante ao Exemplo 5.</p> <p>Um protocolo sintético e uma caracterização para este precursor também são fornecidos após esta tabela.</p>

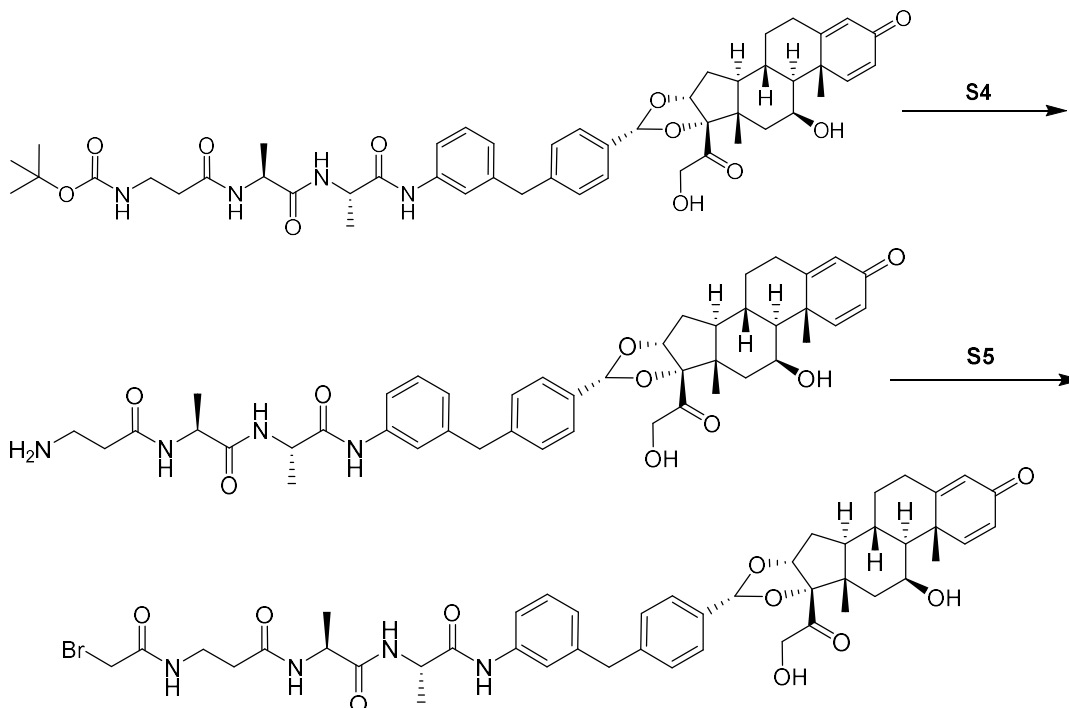
40		<p>Pode ser produzido a partir do Exemplo 2 usando uma rota semelhante ao Exemplo 5.</p>
41		<p>Pode ser produzido a partir do Exemplo 3 usando uma rota semelhante ao Exemplo 5.</p>
42		<p>Um protocolo sintético e uma caracterização para este precursor também são fornecidos após esta tabela.</p>
43		<p>Um protocolo sintético e uma caracterização para este precursor também são fornecidos após esta tabela.</p>

44		Um protocolo sintético e uma caracterização para este precursor também são fornecidos após esta tabela.
45		Um protocolo sintético e uma caracterização para este precursor também são fornecidos após esta tabela.
46		Um protocolo sintético e uma caracterização para este precursor também são fornecidos após esta tabela.
47		Um protocolo sintético e uma caracterização para este precursor também são fornecidos após esta tabela.

48		Um protocolo sintético e uma caracterização para este precursor também são fornecidos após esta tabela.
----	--	---

EXEMPLO 14B DO PRECURSOR. 3-(2-BROMOACETAMIDO)-N-((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6AR,6BS,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-7-HIDROXI-8B-(2-HIDROXIACETIL)-6A,8A-DIMETIL-4-OXO-2,4,6A,6B,7,8,8A,8B,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-1H-NAFTO[2',1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-10-IL)BENZIL)FENIL)AMINO)-1-OXOPROPAN-2-IL)AMINO)-1-OXOPROPAN-2-IL)PROPANAMIDA





[0195]Etapa 1: Síntese de ((S)-1-(((S)-1-((3-(4-

((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)carbamato de terc-butila. A uma solução de (terc-butoxicarbonil)-L-alanil-L-alanina (11,9 g, 45,6 mmol, 1,30 eq) em tetra-hidrofurano (140 ml) foi adicionado *N*-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-di-hidroquinolina (11,3 g, 45,6 mmol, 1,30 eq), a mistura de reação foi agitada a 15 °C por 0,5 hora. Em seguida, o produto do Exemplo 2 do Precursor ((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobenzil)fenil)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona foi adicionado (20,0 g, 35,1 mmol)) e a mistura foi agitada a 15 °C durante 2 horas. A mistura de reação foi concentrada sob pressão reduzida para se obter um resíduo e purificou-se por cromatografia em coluna sobre gel de sílica (SiO₂, éter de petróleo/acetato de etila = 3/1 a 0/1) para se obter o composto do título (25,0 g, 88% de rendimento). RMN de ¹H (400 MHz dimetilsulfóxido-*d*₆) δ 9,85 (s, 1H), 7,96

(d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,37-7,41 (m, 4H), 7,31 (d, J = 10,0 Hz, 1H), 7,21-7,23 (m, 3H), 6,94 (dd, J = 23,6, 7,2 Hz, 2H), 6,16 (d, J = 10,0 Hz, 1H), 5,93 (s, 1H), 5,41 (s, 1H), 5,08 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 4,92 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 4,78 (d, J = 3,2 Hz, 1H), 4,50 (dd, J = 19,6, 6,4 Hz, 1H), 4,35-4,38 (m, 1H), 4,29 (s, 1H), 4,18 (dd, J = 19,6, 5,6 Hz, 1H), 3,98-4,16 (m, 1H), 3,89 (s, 2H), 2,54- 2,58 (m, 1H), 2,31 (d, J = 10,8 Hz, 1H), 2,03 - 2,10 (m, 2H), 1,67 - 1,77 (m, 6H), 1,39 (s, 3H), 1,37 (s, 9H), 1,16-1,19 (m, 3H), 1,01-1,03 (m, 2H), 0,86 (s, 3H).

[0196]Etapa 2: Síntese de cloridcamundongo de (S)-2-amino-N-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)propanamida. Uma solução de ((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)carbamato de terc-butila (15,0 g, 18,5 mmol, 1,0 eq) em HCl/éter metil-terc-butílico (90 ml, 4 M) foi agitada a 20 °C durante 0,5 hora. A mistura de reação foi filtrada e o bolo do filtro foi seco. O resíduo foi purificado por HPLC preparativa para proporcionar o composto do título (10,2 g, 74% de rendimento). RMN de ¹H (400 MHz, dimetilsulfóxido-*d*₆) δ 10,0 (s, 1 H), 8,68 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 8,13 (br d, J = 3,6 Hz, 3H), 7,43-7,45 (m, 2H), 7,39 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 7,32 (d, J = 10,4 Hz, 1H), 7,21 - 7,24 (m, 3H), 6,93 (br d, J = 7,6 Hz, 1H), 6,16 (dd, J = 10,0, 1,6 Hz, 1H), 5,93 (s, 1H), 5,41 (s, 1H), 4,92 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 4,82 (br s, 1H), 4,41 - 4,52 (m, 2H), 4,29 (br s, 1H), 4,18 (d, J = 19,6 Hz, 1H), 3,87 - 3,89 (m, 3H), 2,54 - 2,58 (m, 1H), 2,29 - 2,33 (m, 1H), 2,01 - 2,03 (m, 2H), 1,67 - 1,77 (m, 5H), 1,40 (s, 3H), 1,34 (dd, J = 14,4, 6,8 Hz, 6H), 1,02 - 1,03 (m, 2H), 0,86 (s, 3H).

[0197]Etapa 3: Síntese de (3-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-

((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-oxopropil)carbamato de terc-butila. A uma solução de 3-((terc-butoxicarbonil)amino)propanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ila (205 mg, 0,716 mmol) em dimetilformamida (3 ml) foi adicionado (S)-2-amino-N-((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)propanamida (333 mg, 0,477 mmol) e N,N-di-isopropiletilamina (0,167 ml, 0,954 mmol) a 25 °C. A reação foi agitada a 25 °C por 2 horas. Dois frascos adicionais foram montados como descrito acima. Todas as três misturas de reação foram combinadas e purificadas por Prep-HPLC (Método AA1) para proporcionar o composto do título (300 mg, 24% de rendimento). LCMS (Método AA13) Rt = 1,152 min, m/z 883,5 (M+H)⁺.

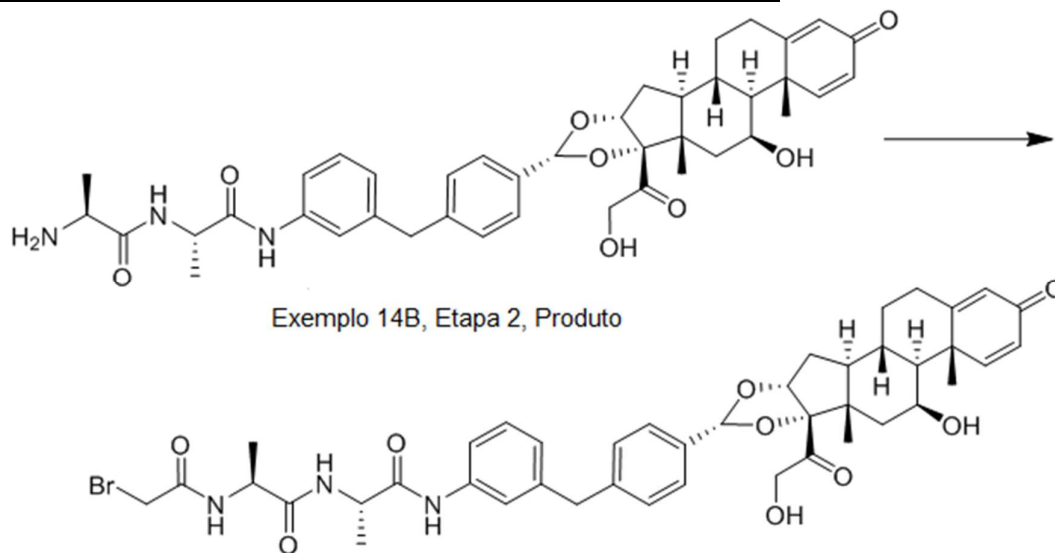
[0198]Etapa 4: Síntese de 3-amino-N-((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)propanamida. Para uma solução de (3-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-oxopropil)carbamato de terc-butila (100 mg, 0,113 mmol) em diclorometano (1 ml) foi adicionado ácido trifluoroacético (0,33 ml, 4,28 mmol) a 25 °C. A reação foi agitada a 25 °C por 1 hora. Um frasco adicional foi montado como descrito acima. Ambas as misturas de reação foram combinadas e

purificadas por Prep-HPLC (Método AA2) para fornecer o composto do título (50 mg, 28% de rendimento). LCMS (Método AA13) Rt = 0,987 min, m/z 783,4 (M+H)⁺.

[0199]Etapa 5: Síntese de 3-(2-bromoacetamido)-N-((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)propanamida. A uma solução de ácido 2-bromoacético (35,5 mg, 0,255 mmol) em dimetilformamida (1 ml) adicionou-se 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-di-hidroquinolina (63,2 mg, 0,255 mmol) a 25 °C. A reação foi agitada a 25 °C por 30 minutos e então 3-amino-N-((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)propanamida (100 mg, 0,128 mmol) foi adicionado a 25 °C. A reação foi agitada a 25 °C por 2 horas. Um frasco adicional foi montado como descrito acima. Ambas as misturas de reação foram combinadas e purificadas por Prep-HPLC (Método AA3) para fornecer o composto do título (80 mg, 35% de rendimento). LCMS (Método AA4) Rt: 2,993 min. m/z 905,3 (M+H)⁺. RMN de ¹H (metanol-*d*4, 400 MHz) δ 7,53 - 7,48 (m, 1H), 7,46 - 7,40 (m, 2H), 7,34 (dd, J = 1,5, 8,2 Hz, 2H), 7,23 - 7,14 (m, 3H), 6,92 (t, J = 7,5 Hz, 1H), 6,24 (d, J = 9,5 Hz, 1H), 6,01 (s, 1H), 5,42 (d, J = 1,3 Hz, 1H), 5,04 (d, J = 4,9 Hz, 1H), 4,62 (d, J = 19,4 Hz, 1H), 4,48 - 4,21 (m, 4H), 3,93 (d, J = 2,2 Hz, 2H), 3,76 (s, 1H), 3,65 (s, 1H), 3,45 (quind, J = 6,4, 12,8 Hz, 2H), 2,65 (dt, J = 5,6, 13,1 Hz, 1H), 2,52 - 2,34 (m, 3H), 2,25 (dq, J = 3,9, 10,8 Hz, 1H), 2,13 (br dd, J = 5,7, 12,6 Hz, 1H), 1,95 (br d, J = 13,7 Hz, 1H), 1,89 - 1,64 (m, 5H), 1,48 (s, 3H), 1,43 (dd, J = 2,2, 7,3 Hz, 3H), 1,36 (dd, J = 7,2, 10,7 Hz, 3H), 1,20 - 1,07 (m, 1H), 1,03 (ddd, J = 3,6, 7,5, 11,1 Hz, 1H), 0,98 (s, 3H).

EXEMPLO 15 DO PRECURSOR: (S)-2-(2-BROMOACETAMIDO)-N-((S)-1-

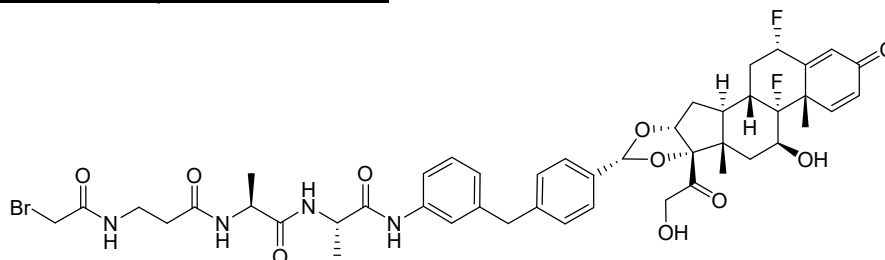
((3-(4-((6AR,6BS,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-7-HIDROXI-8B-(2-HIDROXIACETIL)-6A,8A-DIMETIL-4-OXO-2,4,6A,6B,7,8,8A,8B,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-1H-NAFTO[2',1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-10-IL)BENZIL)FENIL)AMINO)-1-OXOPROPAN-2-IL)PROPANAMIDA



[0200]Etapa 1: Síntese de (S)-2-(2-bromoacetamido)-N-((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)propanamida. A uma solução de ácido 2-bromoacético (109 mg, 0,787 mmol) em dimetilformamida (2 ml) adicionou-se 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-di-hidroquinolina (195 mg, 0,787 mmol) a 25 °C. A reação foi agitada a 25 °C por 30 minutos, após o que o produto do Exemplo Precursor 14B, Etapa 2 ((S)-2-amino-N-((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)propanamida) (280 mg, 0,393 mmol) foi adicionado à mistura. A reação foi agitada a 25 °C durante 2 horas e, em seguida, purificado por meio de HPLC prep (Método AA5) para se obter o composto do título (85 mg, rendimento de 26%). LCMS (Método

AA4) Rt = 3,10 min, m/z 834,3 (M+H)⁺. RMN de ¹H (metanol-*d*₄, 400 MHz) δ 0,98 (s, 3H), 1,02 (br s, 1H), 1,12 (br d, J = 10,5 Hz, 1H), 1,40 (br dd, J = 7,0, 10,5 Hz, 6H), 1,48 (s, 3H), 1,89 - 1,66 (m, 4H), 1,98 - 1,89 (m, 1H), 2,12 (br d, J = 12,7 Hz, 1H), 2,24 (br d, J = 10,5 Hz, 1H), 2,37 (br d, J = 11,0 Hz, 1H), 2,70 - 2,58 (m, 1H), 3,93 - 3,80 (m, 4H), 4,46 - 4,24 (m, 4H), 4,61 (d, J = 19,3 Hz, 1H), 5,04 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 5,43 (s, 1H), 6,01 (s, 1H), 6,24 (br d, J = 8,8 Hz, 1H), 6,90 (br d, J = 7,0 Hz, 1H), 7,23 - 7,12 (m, 3H), 7,47 - 7,30 (m, 5H).

EXEMPLO 21B DO PRECURSOR: (S)-2-((2-(2-BROMOACETAMIDO)ETIL)AMINO)-N-((S)-1-((3-(4-((2S,6AS,6BR,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-2,6B-DIFLUORO-7-HIDROXI-8B-(2-HIDROXIACETIL)-6A,8A-DIMETIL-4-OXO-2,4,6A,6B,7,8,8A,8B,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-1H-NAFTO[2',1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-10-IL)BENZIL)FENIL)AMINO)-1-OXOPROPAN-2-IL)PROPANAMIDA

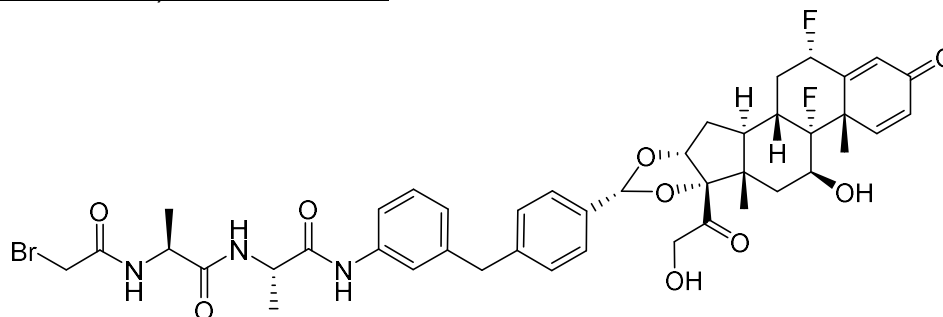


[0201]Preparado usando uma rota semelhante ao Exemplo 14B do precursor usando (2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobenzil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona.

[0202]LCMS (Método AA4) Rt = 2,942 min, m/z 940,3 (M+H)⁺. RMN de ¹H (dimetilsulfóxido-*d*₆) δ = 9,81-9,68 (m, 1H), 8,31-8,17 (m, 2H), 8,15-8,04 (m, 1H), 7,56-7,39 (m, 2H), 7,35 (d, J = 7,9 Hz, 2H), 7,30 - 7,16 (m, 4H), 6,91 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 6,30 (dd, J = 2,0, 10,3 Hz, 1H), 6,13 (s, 1H), 5,74 - 5,49 (m, 2H), 5,45 (s, 1H), 5,46 -

5,43 (m, 1H), 4,94 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 4,51 (d, J = 19,7 Hz, 1H), 4,40 - 4,15 (m, 4H), 3,88 (s, 2H), 3,82 (d, J = 3,9 Hz, 2H), 3,32 - 3,22 (m, 2H), 2,72 - 2,57 (m, 1H), 2,36 - 2,19 (m, 4H), 2,09 - 2,00 (m, 1H), 1,78 - 1,62 (m, 3H), 1,57 - 1,45 (m, 4H), 1,27 (dd, J = 2,4, 7,2 Hz, 3H), 1,20 (d, J = 7,0 Hz, 3H), 0,86 (s, 3H).

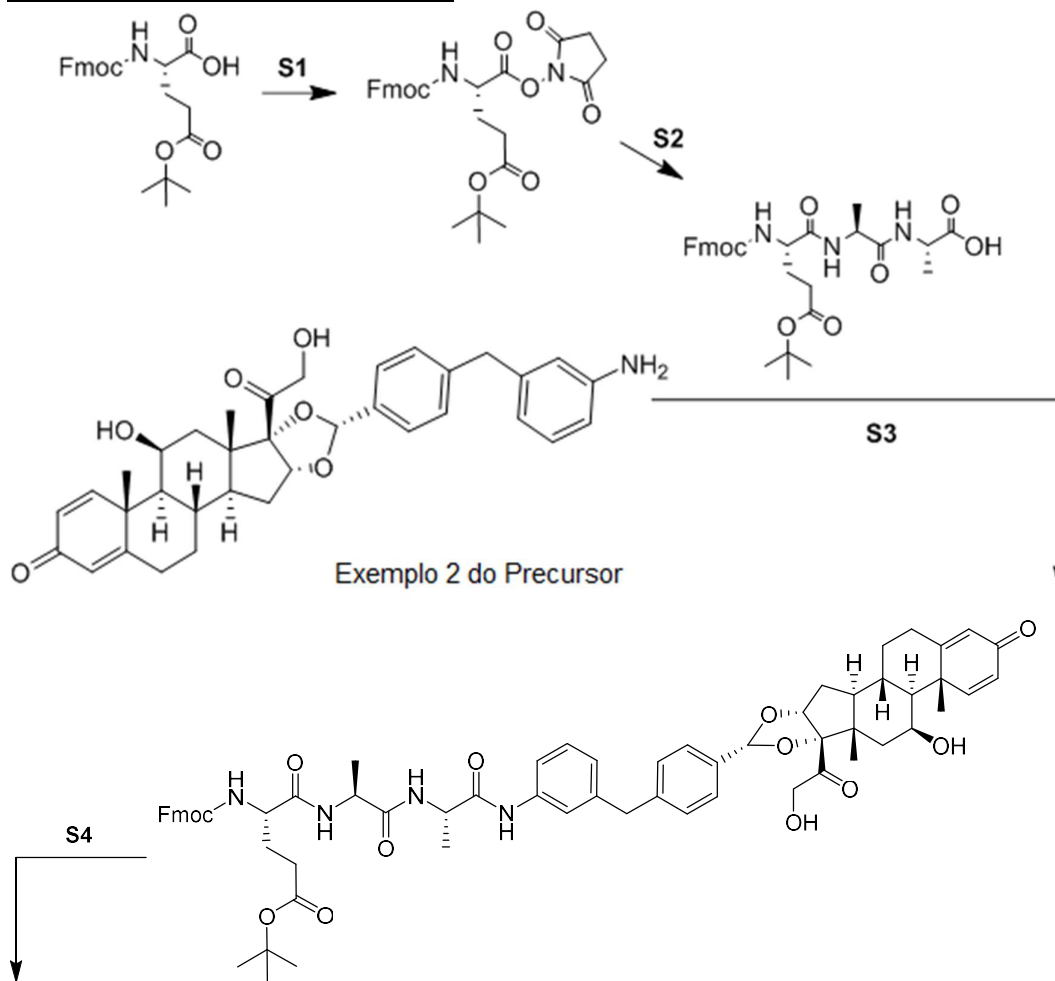
EXEMPLO 22 DO PRECURSOR: (S)-2-(2-BROMOACETAMIDO)-N-((S)-1-((3-(4-((2S,6AS,6BR,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-2,6B-DIFLUORO-7-HIDROXI-8B-(2-HIDROXIACETIL)-6A,8A-DIMETIL-4-OXO-2,4,6A,6B,7,8,8A,8B,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-1H-NAFTO[2',1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-10-IL)BENZIL)FENIL)AMINO)-1-OXOPROPAN-2-IL)PROPANAMIDA

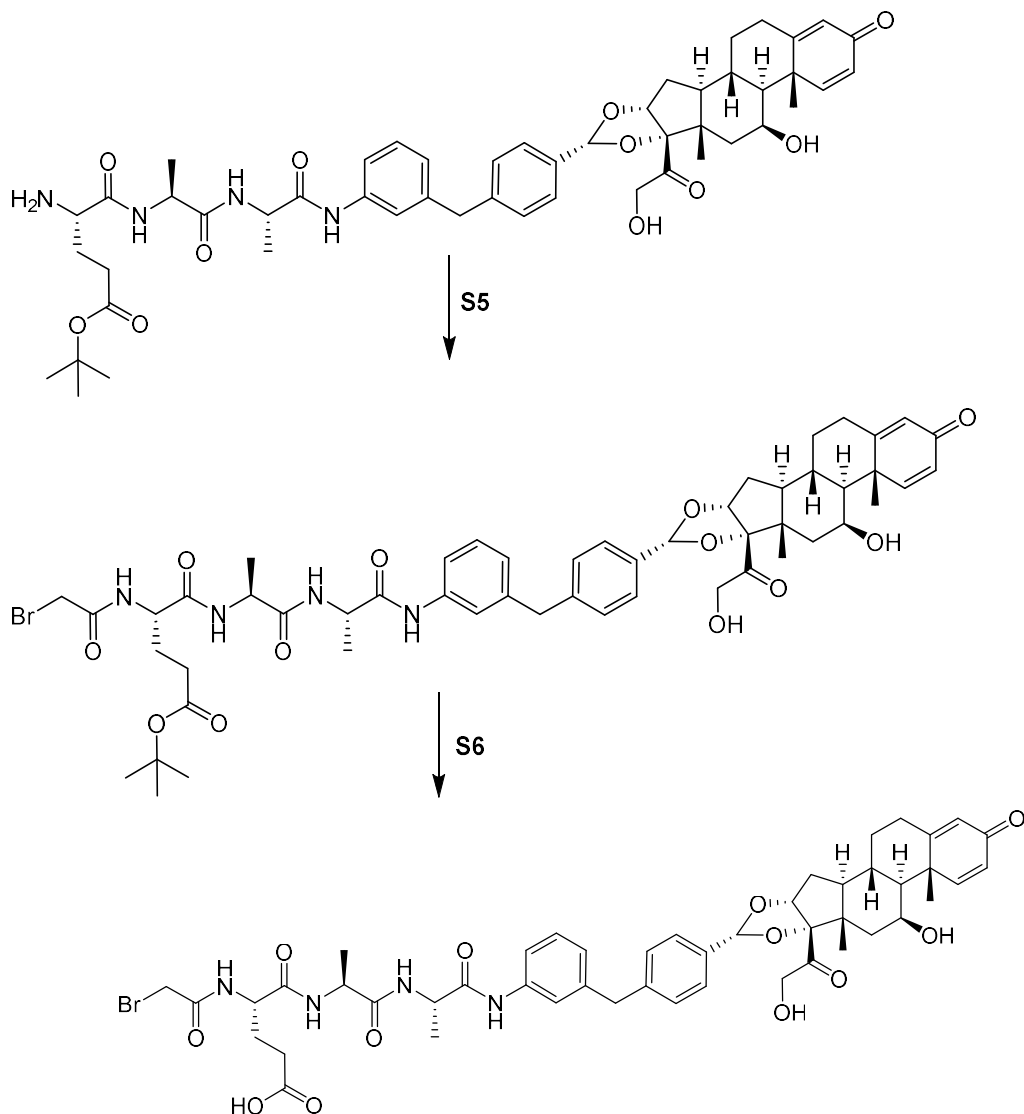


[0203]Preparado usando rota semelhante ao Exemplo 15 do Precursor usando (2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobenzil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona.

[0204]LCMS (Método AA4) Rt = 3,089 min, m/z 869,3 (M+H)⁺. RMN de ¹H (metanol-d₄) δ 7,29-7,57 (m, 5H), 7,15-7,26 (m, 3H), 6,93 (br d, J = 7,02 Hz, 1H), 6,30-6,38 (m, 2H), 5,47-5,68 (m, 1H), 5,43-5,45 (m, 1H), 5,04 (br d, J = 3,95 Hz, 1H), 4,62 (br d, J = 19,29 Hz, 1H), 4,25-4,46 (m, 4H), 3,93 (br s, 2H), 3,77-3,90 (m, 2H), 2,60-2,78 (m, 1H), 2,21-2,49 (m, 3H), 1,63-1,85 (m, 4H), 1,58 (s, 3H), 1,35-1,46 (m, 6H), 0,98 (s, 3H).

EXEMPLO 42 DO PRECURSOR: ÁCIDO (S)-4-(2-BROMOACETAMIDO)-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6AR,6BS,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-7-HIDROXI-8B-(2-HIDROXIACETIL)-6A,8A-DIMETIL-4-OXO-2,4,6A,6B,7,8,8A,8B,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-1H-NAFTO[2',1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-10-IL)BENZIL)FENIL)AMINO)-1-OXOPROPAN-2-IL)AMINO)-1-OXOPROPAN-2-IL)AMINO)-5-OXOPENTANOICO





[0205]Etapa 1: Síntese de 5-(terc-butil) 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) (((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)-L-glutamato. A uma solução de ácido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-5-(terc-butoxi)-5-oxopentanoico (50 g, 118 mmol) e 1 hidroxipirrolidina-2,5-diona (13,52 g, 118 mmol) em diclorometano (600 ml) foi adicionada *N,N'*-metanodi-ilidenodiclohexanamina (DCC) (24,25 mg, 118 mmol) a 0 °C e a mistura agitado a 25 °C por 4 horas. A mistura foi filtrada através de um funil de vidro sinterizado, lavada com diclorometano (100 ml). O solvente foi removido sob vácuo para proporcionar o composto do título (60 g, 96% de rendimento). LCMS (Método AA13) Rt = 1,663 min, m/z 545,0 (M+Na)⁺. RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ

1,40-1,54 (m, 9 H) 2,15 (dq, J = 14,53, 7,36 Hz, 1 H) 2,25-2,38 (m, 1 H) 2,39-2,53 (m, 2 H) 2,82 (s, 4 H) 4,17 - 4,27 (m, 1 H) 4,30 - 4,49 (m, 2 H) 4,72 - 4,83 (m, 1 H) 5,71 (br d, J = 8,16 Hz, 1 H) 7,24 - 7,34 (m, 2 H) 7,36 - 7,44 (m, 2 H) 7,55 - 7,63 (m, 2 H) 7,76 (d, J = 7,50 Hz, 2 H). Fmoc = Fluorenilmetiloxycarbonila

[0206]Etapa 2: Síntese de ((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-5-(terc-butoxi)-5-oxopentanoil)-L-alanil-L-alanina. A uma solução de ácido (S)-2-((S)-2-aminopropanamido)propanoico (6,13 g, 38,3 mmol) em 1,2-dimetoxietano (200 ml) e água (133 ml) foi adicionada de NaHCO₃ (12,86 g, 153 mmol) e 5-(terc-butil)brometo de 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-il)(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)-L-glutamato (20 g, 38,3 mmol). A mistura foi agitada a 25 °C durante 4 horas. A mistura foi concentrada sob pressão reduzida para remover o solvente. Solução saturada de NaHCO₃ (250 ml) e acetato de etila (250 ml) foram adicionados e as camadas foram separadas. HCl aquosa (1M, 250 ml) foi adicionado à camada aquosa e extraiu-se com acetato de etila (300 ml). A camada orgânica foi seca (Na₂SO₄), filtrada e o solvente foi removido sob vácuo para dar o composto do título (15 g, 69% de rendimento). LCMS (Método AA13) Rt = 1,170 min, m/z 568,4 (M+H)⁺. RMN de ¹H (dimetilsulfóxido-d₆, 400 MHz) δ 1,15 (t, J = 7,06 Hz, 1 H) 1,21 (br d, J = 7,06 Hz, 3 H) 1,26 (br d, J = 7,28 Hz, 3 H) 1,37 (s, 9 H) 1,65 - 1,78 (m, 1 H) 1,81 - 1,93 (m, 1 H) 1,96 (s, 1 H) 2,23 (br t, J = 7,83 Hz, 2 H) 4,01 (quin, J = 7,11 Hz, 2 H) 4,15 - 4,23 (m, 2 H) 4,23 - 4,32 (m, 2 H) 7,26 - 7,34 (m, 2 H) 7,36 - 7,43 (m, 2 H) 7,53 (br d, J = 8,16 Hz, 1 H) 7,71 (br t, J = 6,73 Hz, 2 H) 7,86 (d, J = 7,50 Hz, 2 H) 7,99 (br d, J = 7,28 Hz, 1 H) 8,14 (br d, J = 7,28 Hz, 1 H) 12,53 (br s, 1 H).

[0207]Etapa 3: Síntese de (S)-4-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoato de terc-butila. A uma solução de

((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-5-(terc-butoxi)-5-oxopentanoil)-L-alanil-L-alanina (1,495 g, 2,63 mmol) em dimetilformamida (5 ml) foi adicionado 2,4,6-tripropil-1,3,5,2,4,6-trioxatrilfosfinano 2,4,6-trióxido (2,234 g, 3,51 mmol) e trietilamina (0,533 g, 5,27 mmol) a 0 °C. A mistura foi agitada a 25 °C durante 30 minutos. Exemplo 2 do precursor ((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-Aminobenzil)fenil)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona) (1 g, 1,755 mmol) foi adicionado à mistura a 25 °C e a reação foi agitada por 12 horas. A mistura foi adicionada a água gelada (50 ml) e o precipitado recolhido por filtração de forma a proporcionar o composto do título (1,68 g, rendimento de 86%). LCMS (Método AA13) Rt = 1,344 min, m/z 1119,5 (M+H)⁺.

[0208]Etapa 4: Síntese de (S)-4-amino-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoato de terc-butila. A uma solução de (S)-4-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoato de *terc*-butila (1,68 g, 1,501 mmol) em acetonitrila (3 ml) foi adicionada piperidina (0,6 ml, 1,501 mmol) a 0 °C. A mistura foi agitada a 0 °C durante 10 minutos. Foi adicionado ácido trifluoroacético (0,5 ml) e a mistura purificada por Prep-HPLC (Método AA6) para proporcionar o composto do título (1,03 g, 76% de rendimento). LCMS (Método AA13) Rt = 1,080 min, m/z 897,5 (M+H)⁺.

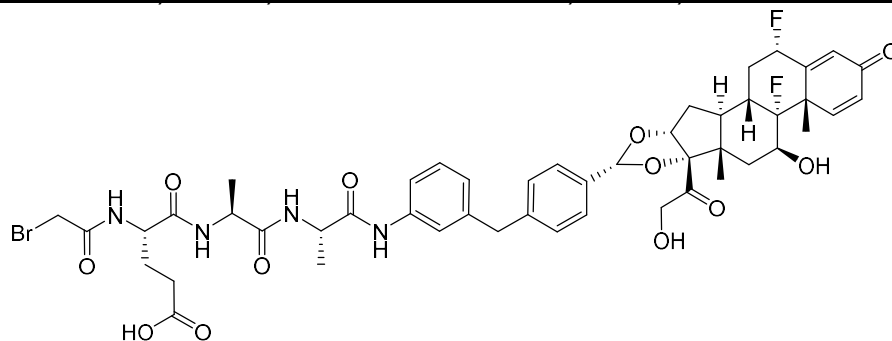
[0209]Etapa 5: Síntese de (S)-4-(2-bromoacetamido)-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-

((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoato de *terc*-butila. A uma solução de (S)-4-amino-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoato de *terc*-butila (160 mg, 0,178 mmol) em dimetilformamida (3 ml) foi adicionado ácido 2-bromoacético (37,2 mg, 0,268 mmol) e 2-etoxiquinolina-1(2H)-carboxilato de etila (52,9 mg, 0,214 mmol). A mistura foi agitada a 25 °C durante 2 horas. A reação foi diluída com acetato de etila (50 ml), lavou-se com HBr aquoso (1 M, 2 x 40 ml), NaHCO₃ aquoso saturado (30 ml) e salmoura (30 ml). A camada orgânica foi seca (Na₂SO₄), filtrou-se e concentrou-se para se obter o composto do título (140 mg, 77% de rendimento). LCMS (Método AA13) Rt = 1,232 min, m/z 1019,4 (M+H)⁺.

[0210]Etapa 6: Síntese de ácido (S)-4-(2-bromoacetamido)-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoico. A uma solução de (S)-4-(2-bromoacetamido)-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoato de *terc*-butila (140 mg, 0,138 mmol) em diclorometano (3 ml) foi adicionado ácido trifluoroacético (1 ml). A mistura foi agitada a 20 °C durante 1 hora. O solvente foi removido sob vácuo e o produto em

bruto foi purificado por Prep-HPLC (Método AA5) para proporcionar o composto do título (36 mg, 26% de rendimento). LCMS (Método AA4) Rt = 2,975 min, m/z 961,9 (M+H)⁺. RMN de ¹H (dimetilsulfóxido-d₆, 400 MHz). δ 0,84 (s, 3 H) 0,95 - 1,13 (m, 2 H) 1,18 - 1,28 (m, 6 H) 1,38 (s, 3 H) 1,56 - 1,82 (m, 6 H) 1,83 - 1,95 (m, 1 H) 2,00 (br d, J = 12,13 Hz, 1 H) 2,06 - 2,16 (m, 1 H) 2,18 - 2,34 (m, 4 H) 2,52 - 2,72 (m, 1 H) 3,82 - 3,94 (m, 4 H) 4,09 - 4,39 (m, 5 H) 4,48 (d, J = 19,40 Hz, 1 H) 4,78 (br s, 1 H) 4,90 (d, J = 5,07 Hz, 1 H) 5,38 (s, 1 H) 5,92 (s, 1 H) 6,15 (dd, J = 10,03, 1,65 Hz, 1 H) 6,89 (d, J = 7,72 Hz, 1 H) 7,15 - 7,24 (m, 3 H) 7,30 (d, J = 9,92 Hz, 1 H) 7,37 (d, J = 7,94 Hz, 2 H) 7,39 - 7,49 (m, 2 H) 8,00 - 8,31 (m, 2 H) 8,47 (dd, J = 7,50, 4,19 Hz, 1 H) 9,62 - 9,90 (m, 1H).

EXEMPLO 23 DO PRECURSOR: ÁCIDO (S)-4-(2-BROMOACETAMIDO)-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((2S,6AS,6BR,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-2,6B-DIFLUORO-7-HIDROXI-8B-(2-HIDROXIACETIL)-6A,8A-DIMETIL-4-OXO-2,4,6A,6B,7,8,8A,8B,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-1H-NAFTO[2',1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-10-IL)BENZIL)FENIL)AMINO)-1-OXOPROPAN-2-IL)AMINO)-1-OXOPROPAN-2-IL)AMINO)-5-OXOPENTANOICO

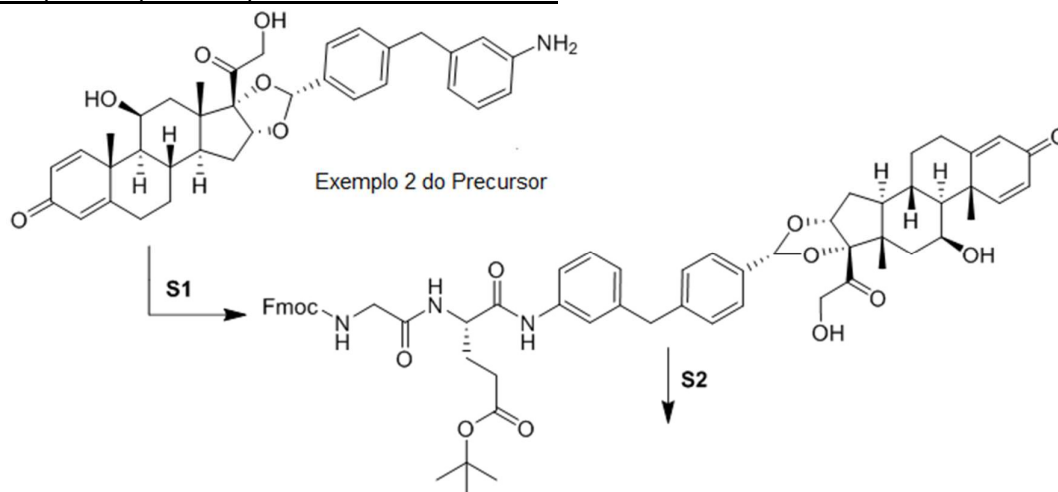


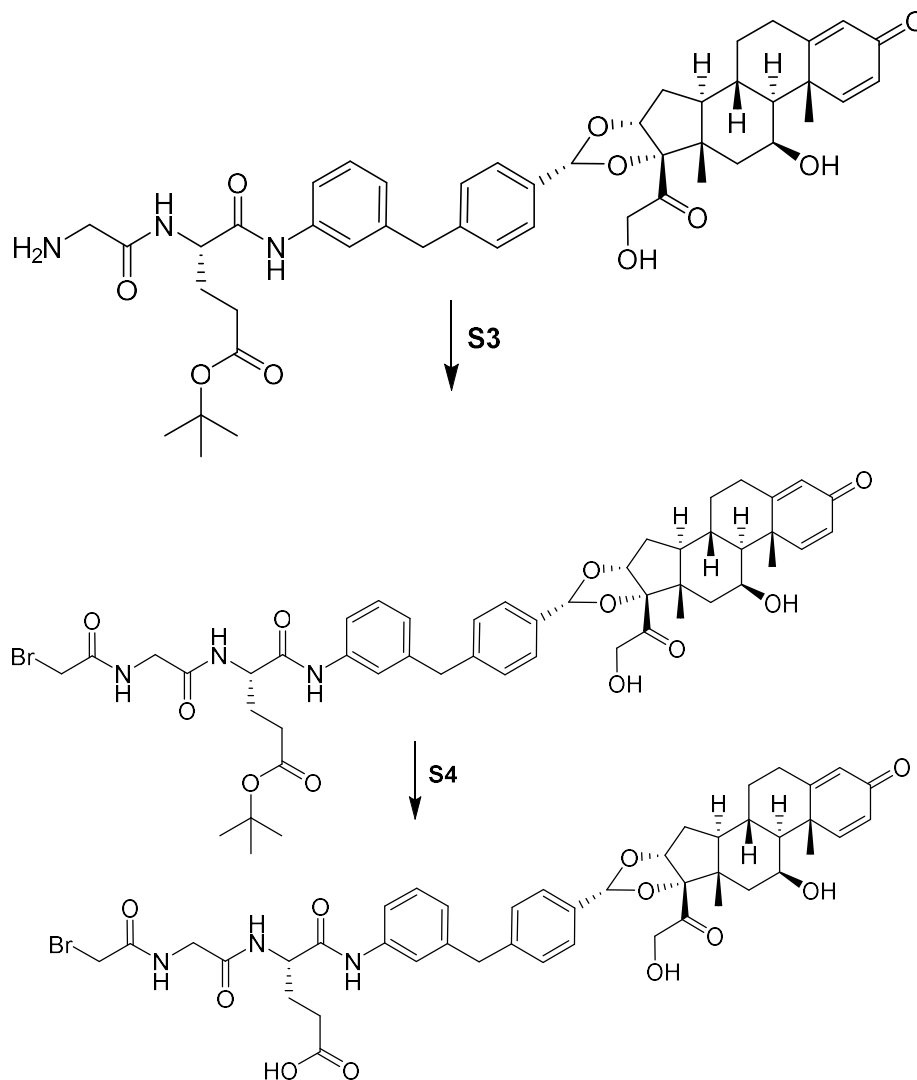
[0211]Preparado usando uma rota similar ao Precursor Exemplo 42 usando (2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobenzil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona.

[0212]LCMS (Método AA4) Rt = 2,668 min, m/z 999,3 (M+H)⁺. RMN de ¹H

(dimetilsulfóxido-*d*6) δ = 12,12 (br s, 1H), 9,89-9,72 (m, 1H), 8,50-8,45 (m, 1H), 8,40-8,24 (m, 1H), 8,18 (br d, J = 7,1 Hz, 1H), 8,07 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,49 - 7,40 (m, 2H), 7,36 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 7,29 - 7,17 (m, 4H), 6,91 (br d, J = 7,3 Hz, 1H), 6,30 (d, J = 10,3 Hz, 1H), 6,13 (s, 1H), 5,75 - 5,56 (m, 1H), 5,53 (br d, J = 3,1 Hz, 1H), 5,45 (s, 1H), 4,95 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 4,51 (d, J = 19,6 Hz, 1H), 4,40 - 4,09 (m, 6H), 3,96 - 3,85 (m, 4H), 2,27 - 2,20 (m, 3H), 2,09 - 2,01 (m, 2H), 1,90 (br d, J = 7,5 Hz, 2H), 1,78 - 1,65 (m, 4H), 1,63 - 1,63 (m, 1H), 1,50 (s, 4H), 1,30 - 1,19 (m, 6H), 0,86 (s, 3H).

EXEMPLO 43 DO PRECURSOR: ÁCIDO (S)-4-(2-(2-BROMOACETAMIDO)ACETAMIDO)-5-((3-(4-((6AR,6BS,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-7-HIDROXI-8B-(2-HIDROXIACETIL)-6A,8A-DIMETIL-4-OXO-2,4,6A,6B,7,8,8A,8B,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-1H-NAFTO[2',1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-10-IL)BENZIL)FENIL)AMINO)-5-OXOPENTANOICO





[0213]Etapa 1: Síntese de (S)-4-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-5-oxopentanoato de terc-butila. A uma solução de ácido (S)-2-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-5-(terc-butoxi)-5-oxopentanoico (508 mg, 1,053 mmol) em dimetilformamida (5 ml) foi adicionado 2,4,6-tripropil-1,3,5,2,4,6-trioxatrfosfinano 2,4,6-trióxido (1117 mg, 1,775 mmol) e trietilamina (0,367 ml, 2,63

mmol) a 0 °C. A reação foi agitada a 25 °C por 30 minutos. Exemplo 2 do precursor ((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-Aminobenzil)fenil)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona) (500 mg, 0,878 mmol) foi adicionado a 25 °C e a reação foi agitada por 2 horas a 25 °C. Seis frascos adicionais foram configurados como descrito acima. Todas as sete misturas de reação foram combinadas e purificadas por Prep-HPLC (Método AA7) para fornecer o composto do título (2 g, 31% de rendimento). LCMS (Método AA13) Rt = 1,370 min, m/z 1016,5 (M+H-18)⁺. Fmoc = Fluorenilmetiloxycarbonila.

[0214]Etapa 2: Síntese de (S)-4-(2-aminoacetamido)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-5-oxopentanoato de terc-butila. A uma solução de (S)-4-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-5-oxopentanoato de terc-butila (350 mg, 0,338 mmol) em acetonitrila (4 ml) foi adicionada piperidina (1 ml, 5,05 mmol) a 25 °C. A reação foi agitada a 25 °C por 15 minutos e então o ácido trifluoroacético foi adicionado a pH = 5. Um frasco adicional foi montado como descrito acima. Ambas as misturas de reação foram combinadas e purificadas por Prep-HPLC (Método AA8) e a fase móvel liofilizada diretamente para proporcionar o composto do título (200 mg, 13% de rendimento). LCMS (Método AA13) Rt = 1,063 min, m/z 812,4 (M+H)⁺.

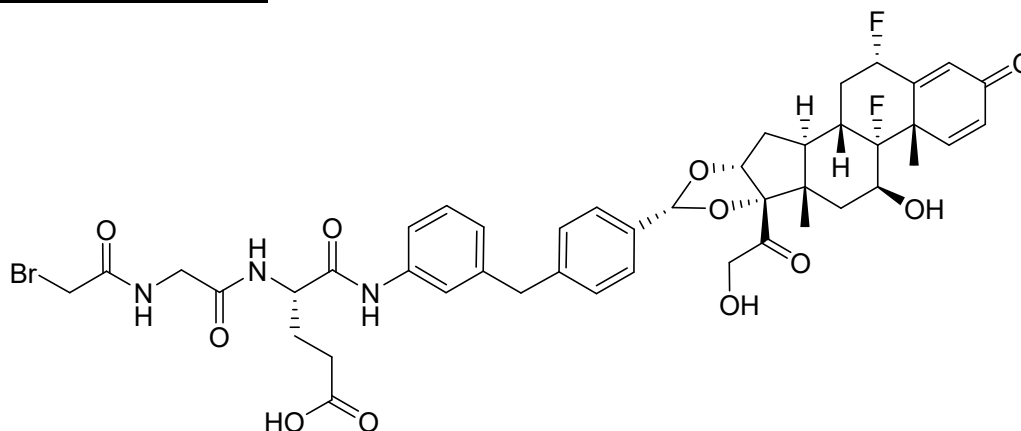
[0215]Etapa 3: Síntese de (S)-4-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-

dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-5-oxopentanoato de terc-butila. A uma solução de ácido 2-bromoacético (68,5 mg, 0,493 mmol) em dimetilformamida (2 ml) foi adicionada 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-di-hidroquinolina (122 mg, 0,493 mmol) a 25 °C. A mistura foi agitada a 25 °C por 30 minutos e depois (S)-4-(2-aminoacetamido)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-5-oxopentanoato de terc-butila (200 mg, 0,246 mmol) foi adicionado. A reação foi agitada a 25 °C por 1,5 horas. A reação foi diluída com acetato de etila (100 ml), lavou-se com HBr aquoso (1 M, 2 x 150 ml), NaHCO₃ aquoso (200 ml) e salmoura (200 ml). A camada orgânica foi (Na₂SO₄), filtrou-se e concentrou-se para se obter o composto do título (200 mg, 87% de rendimento). LCMS (Método AA13) Rt = 1201 min, m/z 934,3 (M+H)⁺.

[0216]Etapa 4: Síntese de ácido (S)-4-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-5-oxopentanoico. Para uma solução de (S)-4-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)-5-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-5-oxopentanoato de terc-butila (200 mg, 0,214 mmol) em diclorometano (2 ml) foi adicionado ácido trifluoroacético (0,7 ml, 9,09 mmol) a 25 °C. A reação foi agitada a 25 °C por 1 hora. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o resíduo resultante purificado por Prep-HPLP (Método AA2). A fase móvel foi liofilizada para proporcionar o composto do título (44 mg, 23% de rendimento). LCMS (Método AA4) Rt = 2,976 min, m/z 876,1

(M+H)⁺. RMN de ¹H (dimetilsulfóxido-d₆, 400 MHz). δ 9,88 (br s, 1H), 8,52 (br s, 1H), 8,24 (br d, J = 7,3 Hz, 1H), 7,51 - 7,14 (m, 9H), 6,92 (br d, J = 7,1 Hz, 1H), 6,16 (br d, J = 9,9 Hz, 1H), 5,93 (br s, 1H), 5,39 (s, 1H), 4,91 (br d, J = 4,2 Hz, 1H), 4,77 (br s, 1H), 4,49 (br d, J = 19,6 Hz, 1H), 4,38 (br d, J = 5,7 Hz, 1H), 4,29 (br s, 1H), 4,17 (br d, J = 19,4 Hz, 1H), 3,91 (br d, J = 16,8 Hz, 3H), 3,79 (br s, 2H), 2,37 - 2,18 (m, 4H), 2,15 - 1,92 (m, 4H), 1,87 - 1,65 (m, 6H), 1,39 (br s, 3H), 1,13 - 0,96 (m, 2H), 0,86 (br s, 3H).

EXEMPLO 24 DO PRECURSOR: (S)-4-(2-(2-BROMOACETAMIDO)ACETAMIDO)-5-((3-(4-((2S,6AS,6BR,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-2,6B-DIFLUORO-7-HIDROXI-8B-(2-HIDROXIACETIL)-6A,8A-DIMETIL-4-OXO-2,4,6A,6B,7,8,8A,8B,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-1H-NAFTO[2',1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-10-IL)BENZIL)FENIL)AMINO)-5-OXOPENTANOICO ÁCIDO

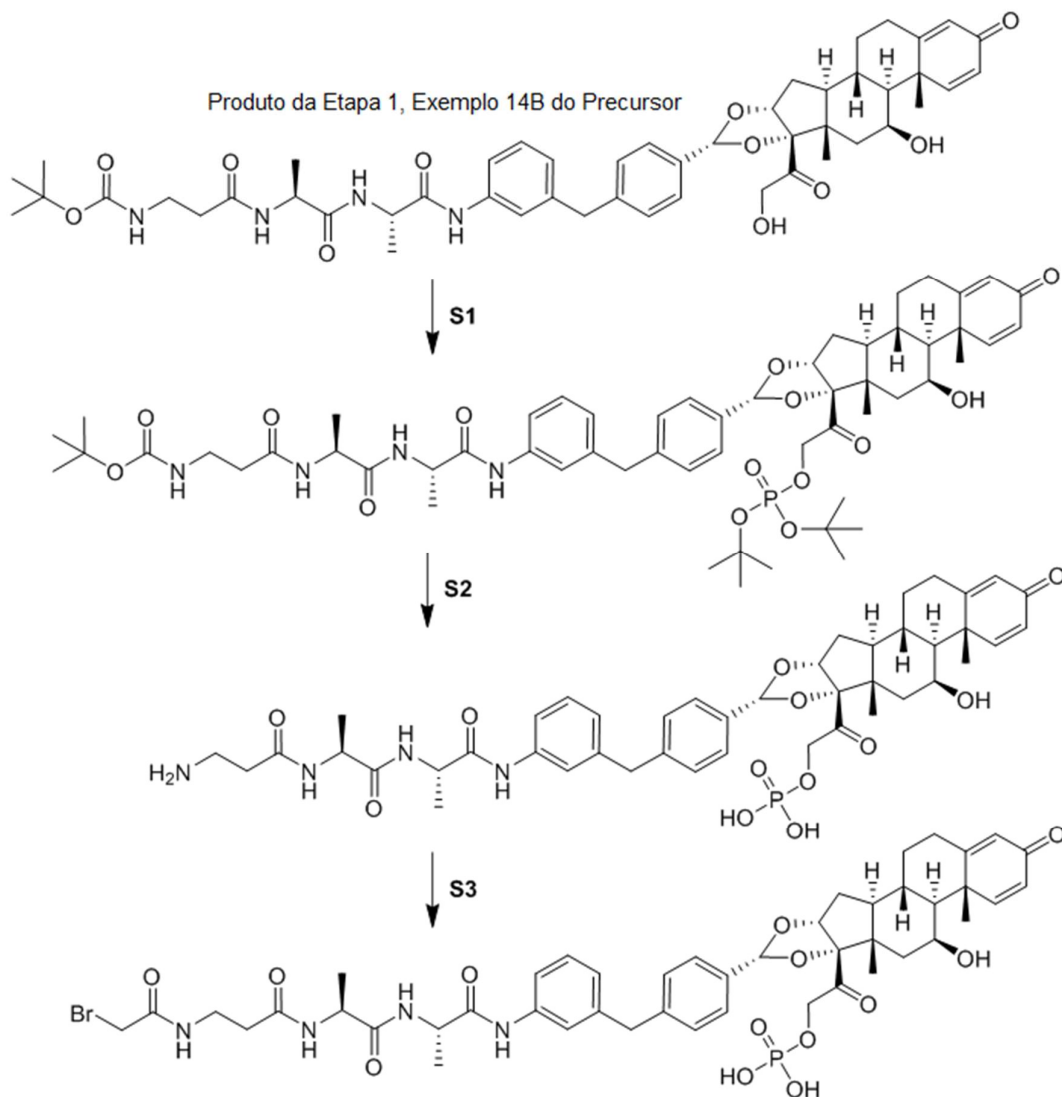


[0217]Preparado usando uma rota semelhante ao Exemplo 43 do Precursor usando (2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobenzil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4-ona.

[0218]LCMS (Método AA4) Rt = 2,948 min, m/z 914,2 (M+H)⁺. RMN de ¹H

(dimetilsulfóxido-d6, 400 MHz) δ = 9,89 (s, 1H), 8,53 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 8,25 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,47 (br d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,41 (s, 1H), 7,36 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,29 - 7,23 (m, 3H), 7,20 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,02 - 6,86 (m, 1H), 6,30 (dd, J = 1,9, 10,3 Hz, 1H), 6,13 (s, 1H), 5,76 - 5,60 (m, 1H), 5,63 - 5,56 (m, 1H), 5,54 - 5,47 (m, 1H), 5,45 (s, 1H), 4,94 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 4,51 (d, J = 19,6 Hz, 1H), 4,42 - 4,35 (m, 1H), 4,25 - 4,11 (m, 2H), 3,93 (s, 2H), 3,89 (s, 2H), 3,85 - 3,74 (m, 3H), 2,63 - 2,52 (m, 2H), 2,42 (br d, J = 1,8 Hz, 1H), 2,30 - 2,16 (m, 4H), 2,07 - 1,90 (m, 2H), 1,87 - 1,61 (m, 4H), 1,55 (br s, 1H), 1,49 (s, 3H), 0,86 (s, 3H).

EXEMPLO 44 DO PRECURSOR: FOSFATO DE 2-((6AR,6BS,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-(3-(2-BROMOACETAMIDO)PROPANAMIDO)PROPANAMIDO)PROPANAMIDO)BENZIL)FENIL)-7-HIDROXI-6A,8A-DIMETIL-4-OXO-1,2,4,6A,6B,7,8,8A,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-8BH-NAFTO[2',1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-8B-IL)-2-OXOETIL DI-HIDROGÊNIO



[0219]Etapa 1: Síntese de (3-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-terc-butoxifosforil)oxi)acetil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-oxopropil)carbamato de terc-butila. A uma solução do produto do Exemplo 14B do Precursor, Etapa 1 ((3-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-

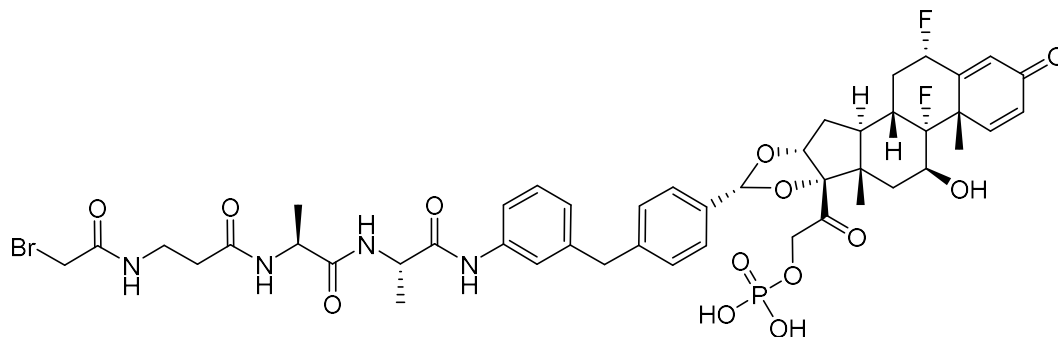
nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-oxopropil)carbamato de *terc*-butila) (500 mg, 0,566 mmol) em diclorometano (5 ml) foi adicionado 1H-tetrazol (397 5,66 mmol) e dietilfosforamidita de di-*terc*-butila (1,694 g, 6,79 mmol) a 25 °C. A reação foi agitada a 25 °C por 1 hora e depois foi adicionado peróxido de hidrogênio (353 mg, 3,11 mmol). A reação foi agitada por 2 horas. Um frasco adicional foi montado como descrito acima. Ambas as misturas de reação foram combinadas e purificadas por Prep-HPLC (Método AA7) para fornecer o composto do título (1 g, 82% de rendimento). LCMS (Método AA13) Rt = 1,300 min, m/z 1075,8 (M+H)⁺.

[0220]Etapa 2: Síntese de fosfato de 2-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-(3-aminopropanamido)propanamido)propanamido)benzil)fenil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil di-hidrogênio. Para uma solução de (3-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-*terc*-butoxifosforil)oxi)acetil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-oxopropil)carbamato de *terc*-butila (600 mg, 0,558 mmol) em diclorometano (6 ml) foi adicionado ácido trifluoroacético (2 ml, 26,0 mmol) a 25 °C e a reação foi agitada a 25 °C por 1 hora. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o resíduo resultante foi purificado por meio de HPLC prep (Método AA6). A fase móvel foi liofilizada para produzir o composto do título (350 mg, 73% de rendimento). LCMS (Método AA13) Rt = 0,986 min, m/z 863,3 (M+H)⁺.

[0221]Etapa 3: Síntese de fosfato de 2-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-(3-(2-bromoacetamido)propanamido)propanamido)propanamido)benzil)fenil)-7-hidroxi-

6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil-di-hidrogênio. A uma solução de ácido 2-bromoacético (16,1 mg, 0,116 mmol) em dimetilformamida (1 ml) foi adicionado fosfato de 2-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-(3-aminopropanamido)propanamido)propanamido)benzil)fenil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil-di-hidrogênio (100 mg, 0,116 mmol), tetrafluorobocamundongo de 2-bromo-1-etilpiridin-1-io (34,9 mg, 0,127 mmol) e N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (30,0 mg, 0,232 mmol) a 25 °C e a mistura foi agitada a 25 °C durante 2 horas. O resíduo resultante foi purificado por Prep-HPLC (Método AA2). A fase móvel foi liofilizada para proporcionar o composto do título (65 mg, 30% de rendimento). LCMS (Método AA4) Rt = 2,932 min, m/z 985,2 (M+H)⁺. RMN de ¹H (dimetilsulfóxido-d₆, 400 MHz). δ 9,79 - 9,63 (m, 1H), 8,31 - 8,24 (m, 1H), 8,21 - 8,04 (m, 2H), 7,51 - 7,41 (m, 2H), 7,36 (d, J = 7,9 Hz, 2H), 7,29 (d, J = 10,1 Hz, 1H), 7,24 - 7,12 (m, 3H), 6,89 (br d, J = 7,7 Hz, 1H), 6,14 (dd, J = 1,5, 10,1 Hz, 1H), 5,91 (s, 1H), 5,46 (s, 1H), 4,95 - 4,78 (m, 3H), 4,54 (br dd, J = 8,0, 18,2 Hz, 1H), 4,38 - 4,12 (m, 4H), 3,87 (s, 2H), 3,80 (d, J = 3,3 Hz, 2H), 3,25 (br d, J = 6,8 Hz, 2H), 2,60 - 2,50 (m, 2H), 2,13 - 1,96 (m, 2H), 1,84 - 1,58 (m, 6H), 1,37 (s, 3H), 1,25 (dd, J = 2,1, 7,2 Hz, 3H), 1,19 (s, 3H), 1,06 - 0,98 (m, 2H), 0,85 (s, 3H).

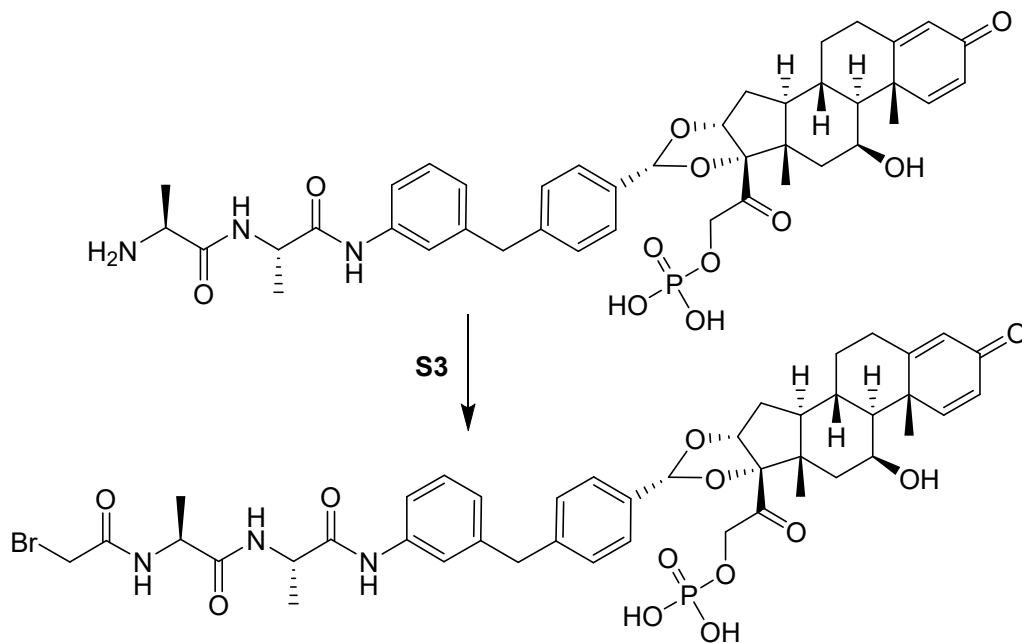
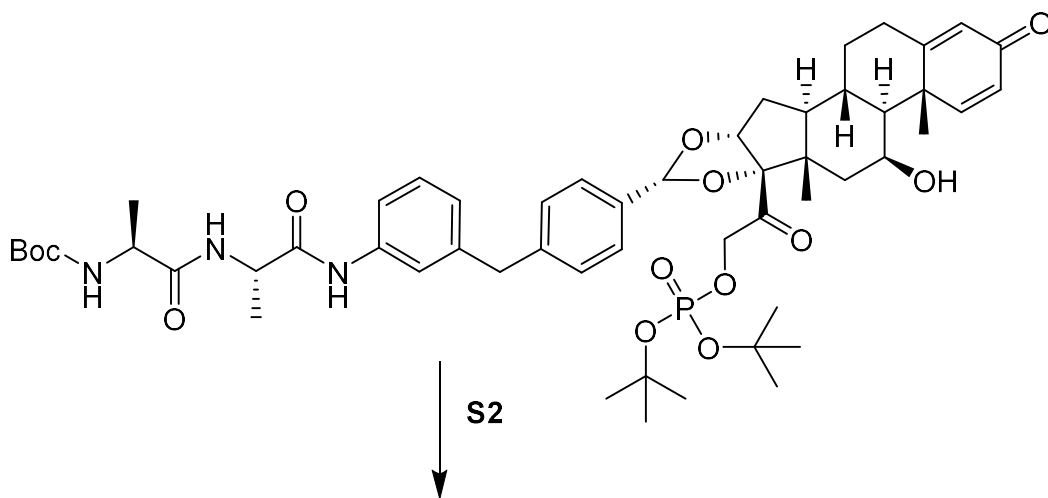
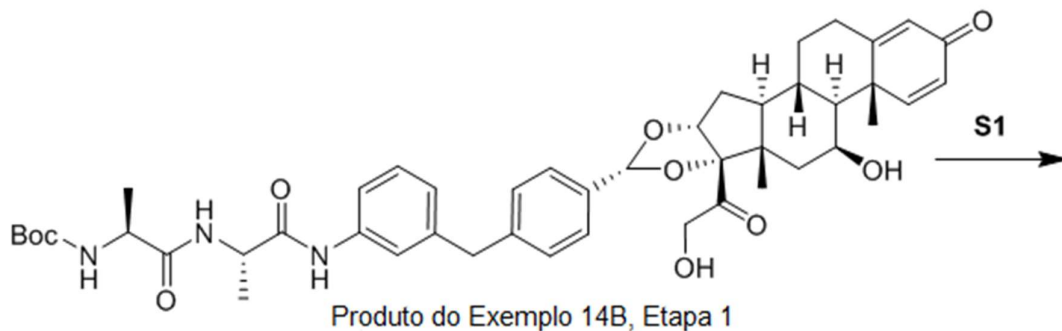
EXEMPLO 25B: FOSFATO DE 2-
((2S,6AS,6BR,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-(3-(2-
BROMOACETAMIDO)PROPANAMIDO)PROPANAMIDO)PROPANAMIDO)BENZIL)
FENIL)-2,6B-DIFLUORO-7-HIDROXI-6A,8A-DIMETIL-4-OXO-
1,2,4,6A,6B,7,8,8A,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-8BH-
NAFTO[2',1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-8B-IL)-2-OXOETIL DI-HIDROGÊNIO



[0222]Preparado usando uma rota semelhante ao Exemplo 44 do Precursor usando fosfato de 2-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobenzil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil di-hidrogênio.

[0223]LCMS (Método AA4) Rt = 2,958 min, m/z 1021,3 (M+H)⁺. ¹H (dimetilsulfóxido-d₆, 400 MHz) δ = 9,83-9,70 (m, 1H), 8,34-8,16 (m, 2H), 8,15-8,06 (m, 1H), 7,56-7,40 (m, 2H), 7,36 (d, J = 7,9 Hz, 2H), 7,30 - 7,16 (m, 4H), 6,91 (br d, J = 7,3 Hz, 1H), 6,30 (dd, J = 1,5, 10,1 Hz, 1H), 6,12 (s, 1H), 5,75 - 5,56 (m, 2H), 5,53 (s, 1H), 4,99 - 4,87 (m, 2H), 4,59 (dd, J = 8,4, 18,1 Hz, 1H), 4,43 - 4,15 (m, 4H), 3,89 (s, 2H), 3,82 (d, J = 3,5 Hz, 2H), 3,33 - 3,21 (m, 2H), 2,73 - 2,60 (m, 1H), 2,39 - 2,14 (m, 5H), 2,11 - 2,00 (m, 1H), 1,78 - 1,63 (m, 3H), 1,57 - 1,45 (m, 4H), 1,27 (dd, J = 2,3, 6,9 Hz, 3H), 1,19 (d, J = 7,1 Hz, 3H), 0,88 (s, 3H).

EXEMPLO	45	DO	PRECURSOR:	2-
<u>((6AR,6BS,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-(2-BROMOACETAMIDO)PROPANAMIDO)PROPANAMIDO)BENZIL)FENIL)-7-HIDROXI-6A,8A-DIMETIL-4-OXO-1,2,4,6A,6B,7,8,8A,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-8BH-NAFTO[2',1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-8B-IL)-2-OXOETIL DI-HIDROGÊNIO</u>				



[0224]Etapa 1: Síntese de ((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-terc-butoxifosforil)oxi)acetil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-

2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)carbamato de *terc*-butila. Para uma solução do produto do Exemplo 14B, Etapa 1 (((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropano-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)carbamato de *terc*-butila) (400 mg, 0,493 mmol) em dimetilformamida (4 ml) foi adicionado 1H-tetrazol (345 mg, 4,93 mmol) e di-*terc*-butil-dietilfosforamidita (1474 mg, 5,91 mmol) a 25 °C. A mistura foi agitada a 25 °C durante 2 horas e depois foi adicionado peróxido de hidrogênio (307 mg, 2,71 mmol) à mistura a 0 °C. A reação foi agitada a 25 °C por 2 horas. Quatro frascos adicionais foram montados como descrito acima. Todas as cinco misturas de reação foram combinadas, vazadas em água gelada (1 l) e filtradas para proporcionar o composto do título (1,6 g, 65% de rendimento). LCMS (Método AA13) Rt = 1,344 min, m/z 1004,5 (M+H)⁺. Boc = *terc*-butoxicarbonila.

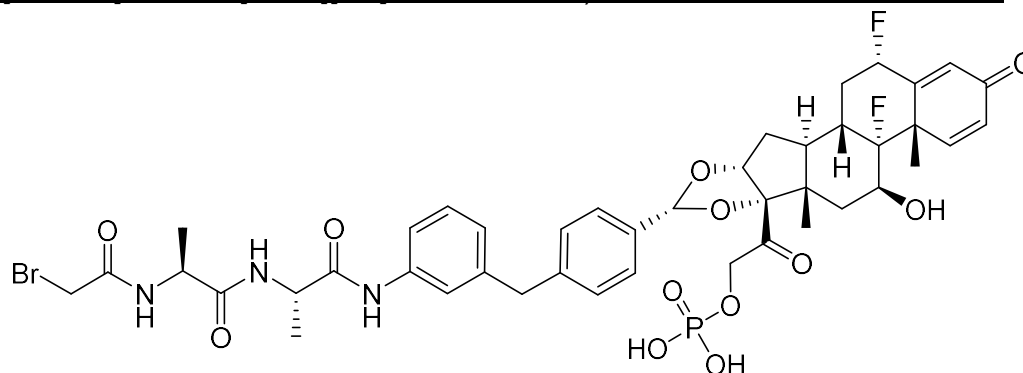
[0225]Etapa 2: Síntese de fosfato de 2-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-aminopropanamido)propanamido)benzil)fenil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a, 12b-dodeca-hidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil di-hidrogênio. Para uma solução de ((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-*terc*-butoxifosforil)oxi)acetil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)carbamato de *terc*-butila (1,5 g, 1,494 mmol) em diclorometano (10 ml) foi adicionado ácido trifluoroacético (3 ml, 38,9 mmol) a 25 °C. A reação foi agitada a 25 °C por 2 horas. A mistura foi purificada por Prep-HPLC (Método AA10) para proporcionar o

composto do título (400 mg, 34% de rendimento). LCMS (Método AA13) Rt 1,602 min, m/z 792,4 (M+H)⁺.

[0226]Etapa 3: Síntese de fosfato de 2-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-(2-bromoacetamido)propanamido)propanamido)benzil)fenil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil di-hidrogênio. A uma solução de ácido 2-bromoacético (63,2 mg, 0,455 mmol) em dimetilformamida (1,5 ml) foi adicionado tetrafluorobocamundongo de 2-bromo-1-etilpiridin-1-io (125 mg, 0,455 mmol), N,N-diisopropiletilamina (0,159 ml, 0,909 mmol) e 2-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-aminopropanamido)propanamido)benzil)fenil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil-di-hidrogenofosfato (240 mg, 0,303 mmol) a 25 °C e a mistura foi agitada a 25 °C durante 2 horas. A mistura resultante foi purificada por Pré-HPLC (Método AA9) para proporcionar o composto do título (100 mg, rendimento 36,0% de rendimento). LCMS (Método AA4) Rt = 2,890 min, m/z 914,2 (M+H)⁺. RMN de ¹H (dimetilsulfóxido-*d*₆, 400 MHz) δ 0,84-0,90 (m, 3H), 0,98-1,11 (m, 2H), 1,18-1,23 (m, 3H), 1,28 (d, J = 7,09 Hz, 3H), 1,39 (s, 3H), 1,60-1,86 (m, 5H), 1,96-2,17 (m, 2H), 2,32 (br d, J = 1,71 Hz, 1H), 2,52-2,59 (m, 2H), 3,86 -3,94 (m, 4H), 4,26-4,40 (m, 3H), 4,56 (dd, J = 18,22, 8,07 Hz, 1H), 4,82-4,96 (m, 3H), 5,48 (s, 1H), 5,93 (s, 1H), 6,16 (dd, J = 10,15, 1,71 Hz, 1H), 6,91 (br d, J = 7,58 Hz, 1H), 7,17-7,26 (m, 3H), 7,31 (d, J = 10,03 Hz, 1H), 7,35-7,52 (m, 4H), 8,19-8,42 (m, 1H), 8,45-8,57 (m, 1H), 9,71-9,88 (m, 1H).

EXEMPLO 26 DO PRECURSOR: SÍNTESE DE FOSFATO DE 2-((2S,6AS,6BR,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-10-(4-(3-((S)-2-((S)-2-(2-BROMOACETAMIDO)PROPANAMIDO)PROPANAMIDO)BENZIL)FENIL)-2,6B-

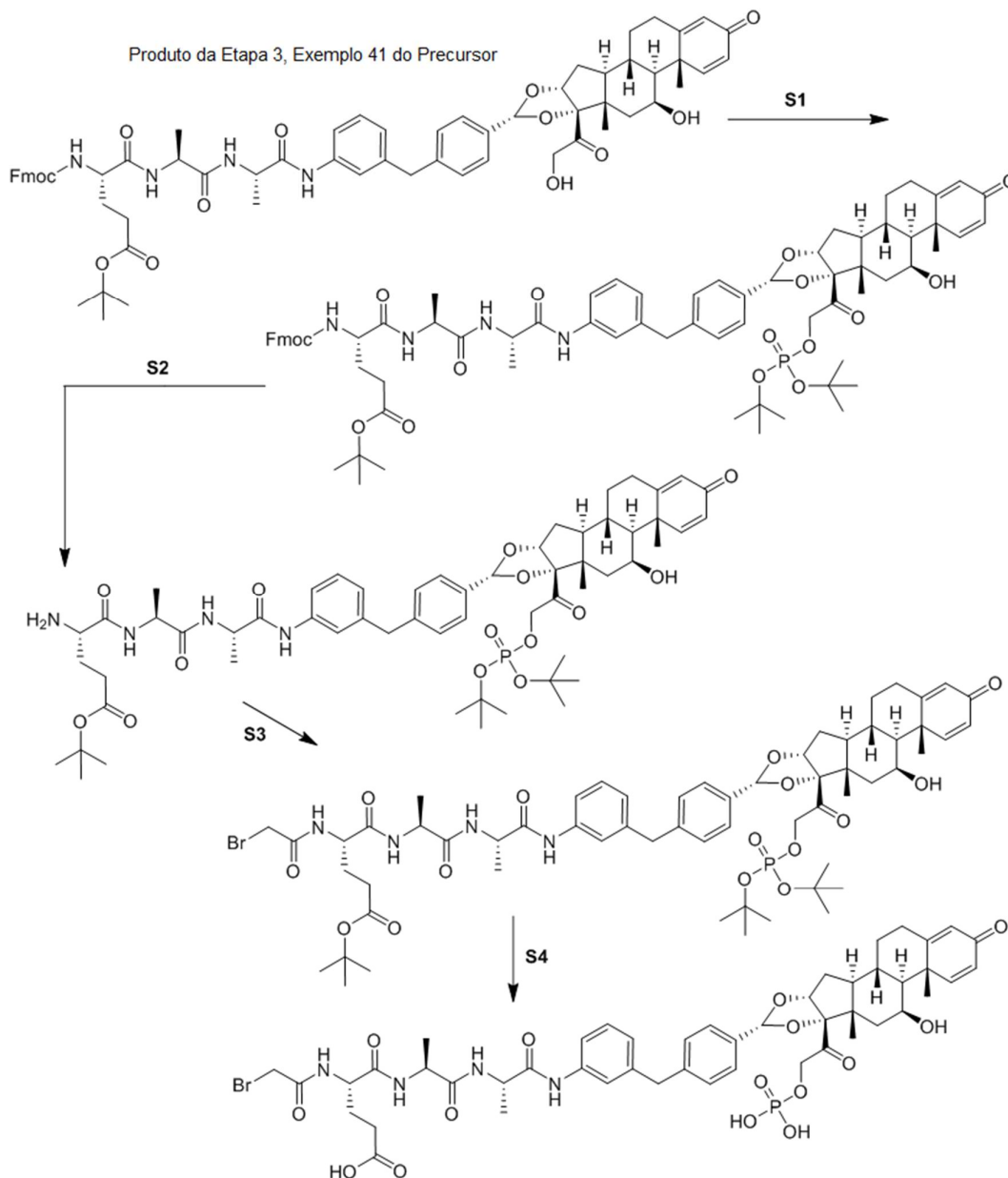
DIFLUORO-7-HIDROXI-6A,8A-DIMETIL-4-OXO-
1,2,4,6A,6B,7,8,8A,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-8BH-
NAFTO[2',1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-8B-IL)-2-OXOETIL DI-HIDROGÊNIO



[0227]Preparado usando uma rota semelhante ao Exemplo 45 do Precursor usando fosfato de 2-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobenzil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil di-hidrogênio.

[0228]LCMS (Método AA4) Rt = 2,924 min, m/z 950,3 (M+H)⁺. RMN de ¹H (metanol-*d*₄, 400 MHz) δ = 7,44-7,38 (m, 1H), 7,36-7,31 (m, 4H), 7,23-7,17 (m, 3H), 6,93 (br d, J = 7,6 Hz, 1H), 6,35 - 6,33 (m, 2H), 5,61 - 5,47 (m, 2H), 5,03 (s, 1H), 5,01-4,97 (m, 1H), 4,80 - 4,76 (m, 1H), 4,43 - 4,30 (m, 3H), 3,94 (s, 2H), 3,88 - 3,81 (m, 2H), 2,76 - 2,66 (m, 1H), 2,42 - 2,38 (m, 3H), 1,81 - 1,79 (m, 3H), 1,78 - 1,75 (m, 1H), 1,58 (s, 3H), 1,42 - 1,37 (m, 6H), 1,01 (s, 3H).

EXEMPLO 46 DO PRECURSOR: ÁCIDO (S)-4-(2-BROMOACETAMIDO)-5-
(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6AR,6BS,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-7-HIDROXI-
6A,8A-DIMETIL-4-OXO-8B-(2-(FOSFONOOXI)ACETIL)-
2,4,6A,6B,7,8,8A,8B,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-1H-
NAFTO[2',1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-10-IL)BENZIL)FENIL)AMINO)-1-
OXOPROPAN-2-IL)AMINO)-1-OXOPROPAN-2-IL)AMINO)-5-OXOPENTANOICO



[0229]Etapa 1: Síntese de (S)-4-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-terc-butoxifosforil)oxi)acetil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoato de terc-butila. Para uma solução do produto do Exemplo 42 do precursor, Etapa 3 ((S)-4-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-5-(((S)-1-

(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoato de *terc*-butila) (500 mg, 0,447 mmol) em dimetilformamida (2 ml) foi adicionado 1H-tetrazol (313 mg, 4,47 mmol) e di-*terc*-butil-dietilfosforamidita (1,337 g, 5,36 mmol) a 20 °C. A reação foi agitada a 20 °C por 1 hora, em seguida, foi adicionado peróxido de hidrogênio (279 mg, 2,457 mmol) e a reação foi agitada por mais 1 hora. A reação foi purificada por Prep-HPLC (Método AA6) para proporcionar o composto do título (450 mg, 77% de rendimento). LCMS (Método AA13) Rt = 1,524 min, m/z 1311,6 (M+H)⁺.

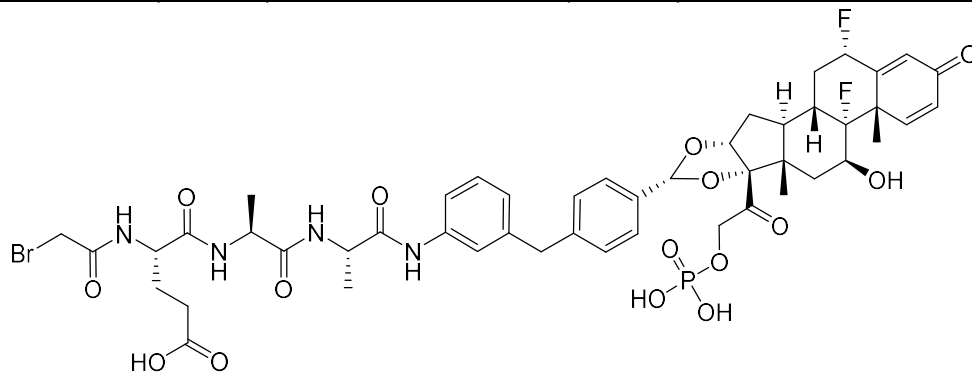
[0230]Etapa 2. Síntese de (S)-4-amino-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-*terc*-butoxifosforil)oxi)acetil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoato de *terc*-butila. A uma solução de (S)-4-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-*terc*-butoxifosforil)oxi)acetil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoato de *terc*-butila (450 mg, 0,343 mmol) em acetonitrila (2 ml) foi adicionada piperidina (0,4 ml) a 0 °C. A reação foi agitada a 0 °C por 20 minutos e depois concentrada para proporcionar um produto em bruto, o qual foi agitado em éter de petróleo (20 ml) por 1 hora. O sólido foi recolhido por filtração e seco sob pressão reduzida para dar o composto do título (250 mg, 67% de rendimento). LCMS (Método AA13) Rt = 1,244 min, m/z 1089,5 (M+H)⁺.

[0231]Etapa 3: Síntese de (S)-4-(2-bromoacetamido)-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-*terc*-butoxifosforil)oxi)acetil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoato de *terc*-butila. A uma solução de (S)-4-amino-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-*terc*-butoxifosforil)oxi)acetil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoato de *terc*-butila (250 mg, 0,23 mmol) em dimetilformamida (3 ml) foi adicionado 2 ácido bromoacético (47,8 mg, 0,344 mmol) e 2-etoxiquinolina-1(2H)-carboxilato de etila (68,1 mg, 0,275 mmol). A mistura foi agitada a 25 °C durante 2 horas e depois purificada por Prep-HPLC (Método AA11) para proporcionar o composto do título (120 mg, 43% de rendimento). LCMS (Método AA13) Rt = 1,351 min, m/z 1211,4 (M+H)⁺.

[0232]Etapa 4: Síntese de ácido (S)-4-(2-bromoacetamido)-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-8b-(2-(fosfonooxi)acetil)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoico. A uma solução de (S)-4-(2-bromoacetamido)-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((6aR,6bS,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-*terc*-butoxifosforil)oxi)acetil)-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoato de *terc*-butila (120 mg, 0,099 mmol) em diclorometano (3

ml) foi adicionado ácido trifluoroacético (1 ml) e a mistura foi agitada a 20 °C por 2 horas. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o produto em bruto foi purificado por Prep-HPLC (Método AA12) para proporcionar o composto do título (32 mg, 30% de rendimento). LCMS (Método AA4) Rt = 2,909 min, m/z = 1041,9 (M+H)⁺. RMN de ¹H (dimetilsulfóxido-*d*₆, 400 MHz) δ 9,88-9,67 (m, 2H), 8,47 (dd, J = 4,3, 7,6 Hz, 2H), 8,26 (d, J = 7,1 Hz, 1H), 8,21 - 8,12 (m, 1H), 8,28 - 8,03 (m, 1H), 8,06 (d, J = 7,1 Hz, 1H), 7,49 - 7,39 (m, 5H), 7,36 (d, J = 8,2 Hz, 5H), 7,30 (d, J = 10,1 Hz, 2H), 7,22 (br d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,24 - 7,15 (m, 1H), 7,19 - 7,14 (m, 1H), 6,88 (d, J = 7,7 Hz, 2H), 6,15 (d, J = 11,7 Hz, 2H), 5,91 (s, 2H), 5,46 (s, 2H), 4,95 - 4,80 (m, 7H), 4,55 (dd, J = 8,0, 18,0 Hz, 2H), 4,38 - 4,31 (m, 1H), 4,31 - 4,19 (m, 3H), 3,93 - 3,85 (m, 4H), 2,66 (s, 2H), 2,31 (br s, 1H), 2,24 (br t, J = 8,2 Hz, 2H), 2,33 - 2,18 (m, 1H), 2,17 - 1,94 (m, 5H), 1,87 (br s, 2H), 1,83 - 1,59 (m, 14H), 1,37 (s, 7H), 1,28-1,17 (m, 15H), 1,00 (br d, J = 11,2 Hz, 5H), 0,86 (s, 7H).

EXEMPLO 27 DO PRECURSOR: ÁCIDO (S)-4-(2-BROMOACETAMIDO)-5-(((S)-1-(((S)-1-((3-(4-((2S,6AS,6BR,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-2,6B-DIFLUORO-7-HIDROXI-6A,8A-DIMETIL-4-OXO-8B-(2-(FOSFONOOXI)ACETIL)-2,4,6A,6B,7,8,8A,8B,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-1H-NAFTO[2',1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-10-IL)BENZIL)FENIL)AMINO)-1-OXOPROPAN-2-IL)AMINO)-1-OXOPROPAN-2-IL)AMINO)-5-OXOPENTANOICO

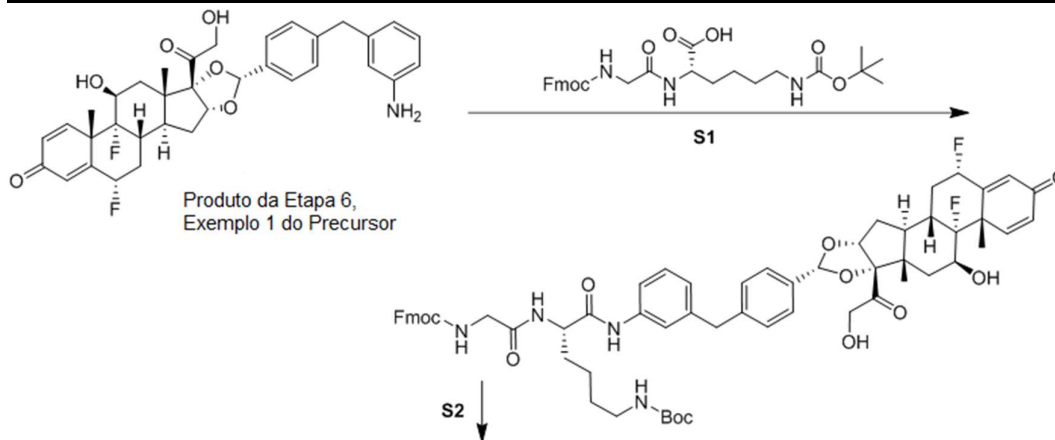


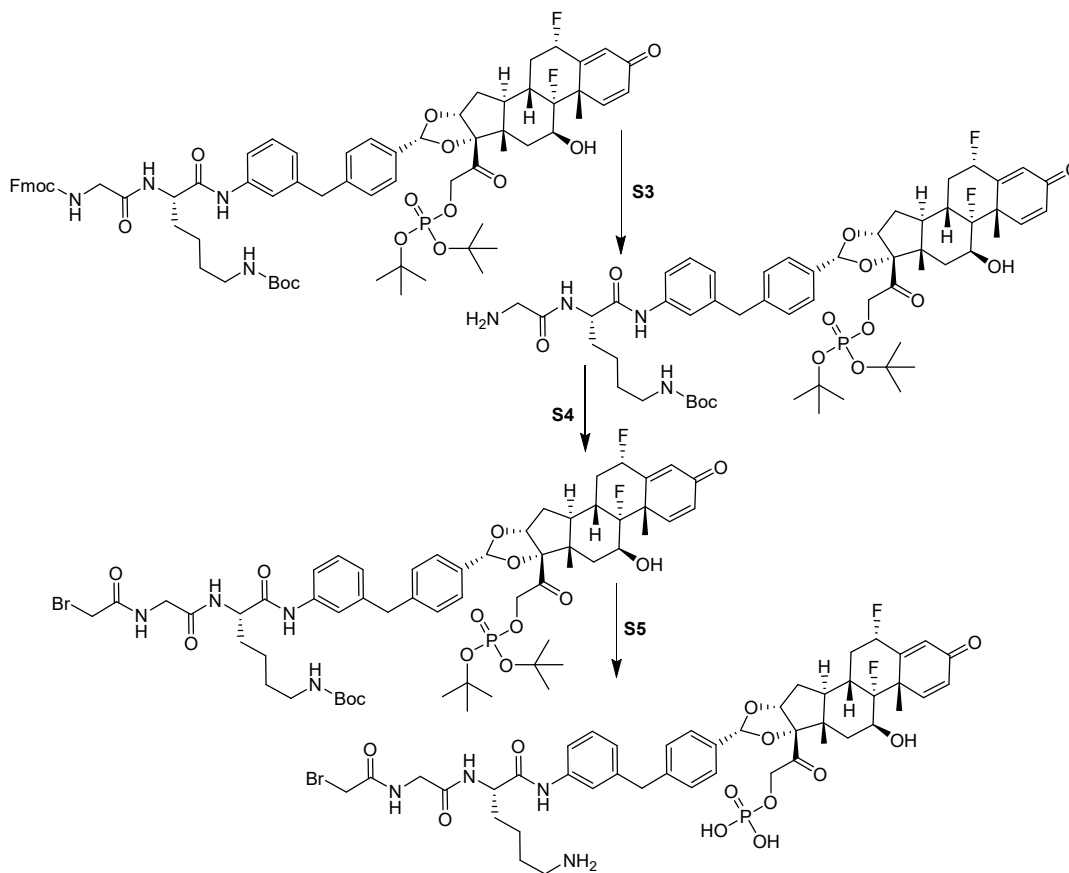
[0233]Preparado usando uma rota semelhante ao Exemplo 46 do Precursor usando (2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobenzil)fenil)-

2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-
1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-
d][1,3]dioxol-4-ona.

[0234]LCMS (Método AA4) Rt = 2,905 min, m/z 1079,1 (M+H)⁺. RMN de ¹H (metanol-*d*4, 400 MHz) δ = 7,48-7,44 (m, 1H), 7,40-7,30 (m, 4H), 7,25-7,16 (m, 3H), 6,93 (br d, J = 7,6 Hz, 1H), 6,37 - 6,30 (m, 2H), 5,64 - 5,52 (m, 2H), 5,04 (br d, J = 4,4 Hz, 1H), 5,01 - 4,95 (m, 1H), 4,81 - 4,72 (m, 1H), 4,43 - 4,25 (m, 4H), 4,13 - 3,99 (m, 1H), 3,97 - 3,91 (m, 2H), 3,91 - 3,77 (m, 2H), 2,79 - 2,61 (m, 1H), 2,45 - 2,33 (m, 4H), 2,27 (br d, J = 13,7 Hz, 1H), 2,16 - 2,03 (m, 1H), 2,00 - 1,88 (m, 1H), 1,83 - 1,74 (m, 3H), 1,68 - 1,54 (m, 4H), 1,46 - 1,36 (m, 6H), 1,01 (s, 3H).

EXEMPLO 39 DO PRECURSOR: FOSFATO DE 2-((2S,6AS,6BR,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-10-(4-(3-((S)-6-AMINO-2-(2-(2-BROMOACETAMIDO)ACETAMIDO)HEXANAMIDO)BENZIL)FENIL)-2,6B-DIFLUORO-7-HIDROXI-6A,8A-DIMETIL-4-OXO-1,2,4,6A,6B,7,8,8A,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-8BH-NAFTO[2',1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-8B-IL)-2-OXOETIL DI-HIDROGÊNIO





[0235] Etapa 1: Síntese de ((S)-5-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-6-oxo-hexil)carbamato de terc-butila. Para uma solução de N²-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)glicil)-N⁶-(terc-butoxicarbonil)-L-lisina (5,58 g, 8,26 mmol) em dimetilformamida (60 ml) foi adicionado 2,4,6-tripropil-1,3,5,2,4,6-trioxatrisfosfinano 2,4,6-trióxido (10,51 g, 16,51 mmol) e trietilamina (3,45 ml, 24,77 mmol) a 0 °C. A reação foi agitada a 25 °C por 1 hora, em seguida, o produto do Exemplo 1 do Precursor, Etapa 6 ((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobenzil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-1,2,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-4H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-

d][1,3]dioxol-4-ona) (5 g, 8,26 mmol) foram adicionados à reação a 25 °C. A reação foi agitada durante 5 horas a 25 °C. Seis frascos adicionais foram configurados como descrito acima. Todas as sete reações foram combinadas e purificadas por Prep-HPLC (Método AA14) para proporcionar o composto do título (24 g, 25% de rendimento). LCMS (Método AA13) Rt = 1,295 min, m/z 1095,6 (M+H-18)⁺.

[0236]Etapa 2: Síntese de ((S)-5-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-terc-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-6-oxo-hexil)carbamato de terc-butila. A uma solução de ((S)-5-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-6-oxo-hexil)carbamato de terc-butila (3 g, 2,69 mmol) em dimetil formamida (30 ml) foi adicionado 1H-tetrazol (1,888 g, 26,9 mmol) e di-terc-butila dietilfosforamidita (8,06 g, 32,3 mmol) a 25 °C. A reação foi agitada a 25 °C por 3,5 horas, em seguida, foi adicionado peróxido de hidrogênio (224 mg, 1,976 mmol) e a mistura foi agitada por 30 minutos. Seis frascos adicionais foram configurados como descrito acima. Todas as sete reações foram combinadas e purificadas por Prep-HPLC (Método AA7) para proporcionar o composto do título (10 g, 37% de rendimento). LCMS (Método AA13) Rt = 1,421 min, m/z 1305,7 (M+H)⁺.

[0237]Etapa 3: Síntese de ((S)-5-(2-aminoacetamido)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-terc-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-

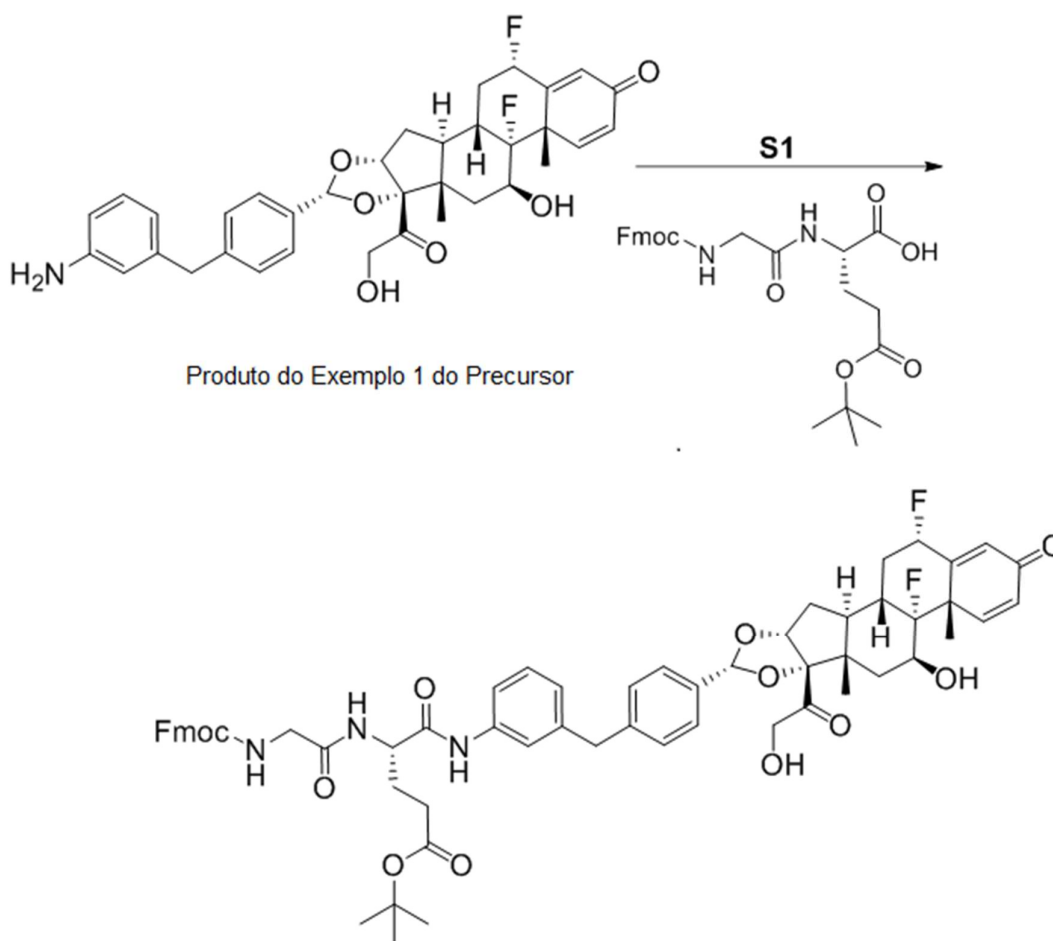
d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-6-oxo-hexil)carbamato de terc-butila. A uma solução de ((S)-5-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-terc-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-6-oxo-hexil)carbamato de terc-butila (2,5 g, 1,969 mmol) em acetonitrila (10 ml) foi adicionada piperidina (2 ml, 1,969 mmol) a 25 °C. A reação foi agitada a 25 °C por 1 hora. Três frascos adicionais foram montados como descrito acima. Todas as quatro reações foram combinadas e concentradas para proporcionar um resíduo que foi agitado em éter de petróleo (30 ml) por 2 horas. O sólido foi recolhido por filtração e seco sob pressão reduzida para dar o composto do título (7 g, 70% de rendimento). LCMS para a reação (ESI +): m/z 1083,5 (M+H)⁺, Rt: 1,175 min.

[0238]Etapa 4: Síntese de ((S)-5-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-terc-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-6-oxo-hexil)carbamato de terc-butila. A uma solução de ácido 2-bromoacético (0,929 g, 6,68 mmol) em dimetil formamida (35 ml) foi adicionada 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-di-hidroquinolina (1,653 g, 6,68 mmol) a 25 °C. A mistura foi agitada a 25 °C durante 1 hora. Em seguida, ((S)-5-(2-aminoacetamido)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-terc-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-6-oxo-hexil)carbamato de terc-butila (3,5 g, 3,34 mmol) foi adicionado à reação. A reação foi agitada a 25 °C por 2 horas. LCMS mostrou que a reação foi concluída. A reação foi diluída com diclorometano (100 ml),

lavou-se com HBr aquoso (1 M, 2 x 80 ml), NaHCO₃ aquoso (60 ml) e salmoura (60 ml). A camada orgânica foi seca (Na₂SO₄) e concentrou-se para se obter o composto do título (2 g, 51% de rendimento) que foi utilizado para a etapa seguinte diretamente. LCMS (Método AA13) Rt = 1,318 min, m/z 1205,5 (M+H)⁺.

[0239]Etapa 5: Síntese de fosfato de 2-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-((S)-6-amino-2-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)hexanamido)benzil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil di-hidrogênio. Para uma solução de ((S)-5-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-terc-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-6-oxo-hexil)carbamato de terc-butila (2 g, 1,661 mmol) em diclorometano (10 ml) foi adicionado ácido trifluoroacético (5 ml, 64,9 mmol) a 25 °C. A reação foi agitada a 25 °C por 40 minutos e depois evaporada até a secura para proporcionar um resíduo que foi purificado por Prep-HPLC (Método AA17) para proporcionar o composto do título (550 mg, 32% de rendimento). LCMS (Método AA13) Rt = 2,313 min, m/z 993,1 (M+H)⁺. RMN de ¹H (dimetilsulfóxido-*d*₆, 400 MHz) ppm δ 0,90 (s, 3 H) 1,19-1,41 (m, 2 H) 1,43-1,62 (m, 7 H) 1,64-1,77 (m, 3 H) 1,84 (br d, J = 14,55 Hz, 1 H) 1,95 - 2,07 (m, 1 H) 2,18 - 2,36 (m, 3 H) 2,65 - 2,78 (m, 3 H) 3,71 - 3,86 (m, 3 H) 3,89 (s, 2 H) 3,93 (s, 2 H) 4,20 (br d, J = 9,48 Hz, 1 H) 4,33 - 4,41 (m, 1 H) 4,59 (br dd, J = 18,41, 8,05 Hz, 1 H) 4,81 (br dd, J = 18,52, 8,60 Hz, 1 H) 4,94 (d, J = 4,63 Hz, 1 H) 5,50 (s, 1 H) 5,54 - 5,76 (m, 1 H) 6,13 (s, 1 H) 6,29 (dd, J = 10,14, 1,32 Hz, 1 H) 6,95 (d, J = 7,72 Hz, 1 H) 7,15 - 7,28 (m, 4 H) 7,30 - 7,41 (m, 3 H) 7,51 (br d, J = 7,94 Hz, 1 H) 7,72 (br s, 3 H) 8,21 (br d, J = 7,72 Hz, 1 H) 8,54 (t, J = 5,62 Hz, 1 H) 9,93 (br d, J = 2,65 Hz, 1 H).

EXEMPLO 28 DO PRECURSOR: ÁCIDO (S)-4-(2-(2-BROMOACETAMIDO)ACETAMIDO)-5-((3-(4-((2S,6AS,6BR,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-2,6B-DIFLUORO-7-HIDROXI-6A,8A-DIMETIL-4-OXO-8B-(2-(FOSFONOXI)ACETIL)-2,4,6A,6B,7,8,8A,8B,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-1H-NAFTO[2',1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-10-IL)BENZIL)FENIL)AMINO)-5-OXOPENTANOICO



[0240]Etapa 1: Síntese de (S)-4-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-5-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-5-oxopentanoato de terc-butila. A uma solução do produto do Exemplo 1 do Precursor ((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobenzil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-decahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4(2H)-ona) (500 mg, 0,826 mmol) em dimetilformamida (10 ml) foi adicionada ácido (S)-2-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-5-(terc-butoxi)-5-oxopentanoico (500 mg, 1,036 mmol), 2,4,6-tripropil-1,3,5,2,4,6-trioxatrisfosfinano 2,4,6-trióxido (1800 mg, 2,83 mmol) e trietilamina (0,689 ml, 4,94 mmol) a 0 °C. A mistura de reação foi agitada por 30 minutos a 20 °C e, em seguida, foi adicionado produto adicional do Exemplo 1 do Precursor (500 mg, 0,826 mmol). A reação foi agitada durante 12 horas a 25 °C. 16 reações idênticas foram realizadas e as reações combinadas. A mistura foi adicionada a água (3 l) e extraída com acetato de etila (3 x 500 ml). As camadas foram separadas e a camada orgânica secou-se sobre (Na₂SO₄), filtrou-se e concentrou-se sob pressão reduzida para se obter o composto do título (12 g, 11,21 mmol, 48,0% de rendimento) como um sólido amarelo. TLC (acetato de etila) R_f 0,48.

[0241]Etapa 2: Síntese de (S)-4-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-5-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-terc-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-5-oxopentanoato de terc-butila. A uma solução de 4-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-5-((3-(4-

((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-5-oxopentanoato de (S)-terc-butila (1 g, 0,934 mmol) em dimetilformamida (5 ml) foi adicionado 1H-tetrazol (0,655 g, 9,34 mmol) e dietilfosforamidita de di-terc-butila (1,864 g, 7,48 mmol) a 25 °C. A reação foi agitada a 25 °C por 2,5 horas e depois foi adicionado peróxido de hidrogênio (0,583 g, 5,14 mmol) a 0 °C. A mistura foi agitada a 25 °C durante 1 hora. 19 reações idênticas foram realizadas e combinadas. A mistura foi adicionada a água e o sólido foi recolhido por filtração e purificado por HPLC preparativa para proporcionar o composto do título (10 g, 85% de rendimento). LCMS (Método AA18) Rt = 1,434 min, m/z 1262,5 (M+H)⁺.

[0242]Etapa 3: Síntese de (S)-4-(2-aminoacetamido)-5-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-terc-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-5-oxopentanoato de terc-butila. A 4-(2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)acetamido)-5-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-terc-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-5-oxopentanoato de (S)-terc-butila (10g, 7,92 mmol) em acetonitrila (20 ml) foi adicionada piperidina (4 ml, 7,92 mmol) a 25 °C. A mistura foi agitada por 20 minutos, concentrada e lavada com éter de petróleo (2 x 300 ml) e seca sob pressão reduzida para proporcionar o composto do título (5 g, 61% de rendimento). LCMS (Método AA19) Rt = 1,604 min, m/z 1040,7 (M+H)⁺.

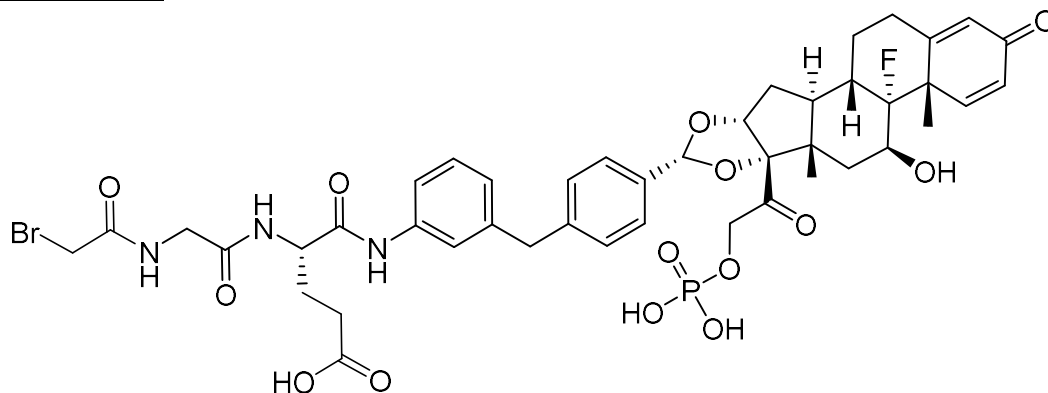
[0243]Etapa 4: Síntese de (S)-4-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)-5-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-terc-

butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-5-oxopentanoato de terc-butila. A uma solução de ácido 2-bromoacético (0,134 g, 0,961 mmol) em dimetilformamida (4 ml) foi adicionada *N*-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-di-hidroquinolina (0,238 g, 0,961 mmol) a 25 °C. A mistura foi agitada a 25 °C por 1 hora e depois 4-(2-aminoacetamido)-5-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-terc-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-5-oxopentanoato de (S)-terc-butila (0,5 g, 0,481 mmol) foi adicionado e a mistura foi agitada a 25 °C por 2,5 horas. 9 reações idênticas foram realizadas e combinadas. A mistura foi concentrada e lavada com 1 M de HBr em água (200 ml), solução aquosa de NaHCO₃ (200 ml), salmoura (200 ml), secou-se (Na₂SO₄), filtrou-se e concentrou-se para se obter o composto do título (5 g, 90% de rendimento). LCMS (Método AA18) Rt = 1,32 min, m/z 1162 (M+H)⁺.

[0244]Etapa 5: Síntese de ácido (S)-4-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)-5-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-8b-(2-(fosfonooxi)acetil)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-5-oxopentanoico. A 4-(2-(2-bromoacetamido)acetamido)-5-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-terc-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-5-oxopentanoato de (S)-terc-butila (3 g, 2,58 mmol) em diclorometano (20 ml) foi adicionado ácido trifluoroacético (10 ml) a 25 °C e a mistura foi agitada por 2 horas. A mistura de reação foi concentrada e purificada por HPLC prep (Método AA20) para fornecer o composto do título (1,09 g, 42% de

rendimento). LCMS (Método AA4) Rt = 2,919 min, m/z 994,2 (M+H)⁺. RMN de ¹H (metanol-*d*₄, 400 MHz) δ = 7,45 (br d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,40-7,29 (m, 4H), 7,25-7,16 (m, 3H), 6,95 (br d, J = 7,5 Hz, 1H), 6,38 - 6,30 (m, 2H), 5,66 - 5,57 (m, 1H), 5,55 - 5,44 (m, 1H), 5,08 - 4,94 (m, 2H), 4,81 - 4,72 (m, 1H), 4,49 (br dd, J = 5,0, 9,0 Hz, 1H), 4,32 (br d, J = 8,6 Hz, 1H), 3,96 - 3,90 (m, 5H), 2,79 - 2,60 (m, 1H), 2,48 - 2,32 (m, 4H), 2,28 (br d, J = 13,3 Hz, 1H), 2,17 (dt, J = 7,6, 13,4 Hz, 1H), 2,04 - 1,92 (m, 1H), 1,85 - 1,72 (m, 3H), 1,70 - 1,53 (m, 4H), 1,01 (s, 3H).

EXEMPLO 36 DO PRECURSOR: ÁCIDO (S)-4-(2-(2-BROMOACETAMIDO)ACETAMIDO)-5-((3-(4-((6AS,6BR,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-6B-FLUORO-7-HIDROXI-6A,8A-DIMETIL-4-OXO-8B-(2-(FOSFONOOXI)ACETIL)-2,4,6A,6B,7,8,8A,8B,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-1H-NAFTO[2',1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-10-IL)BENZIL)FENIL)AMINO)-5-OXOPENTANOICO

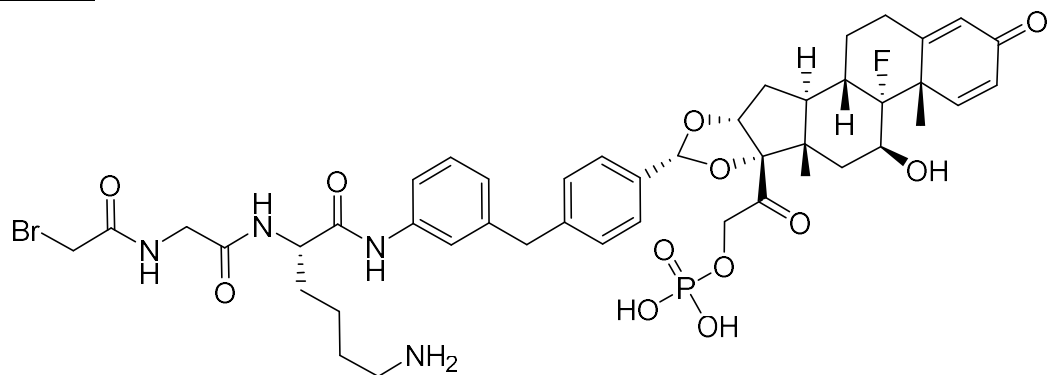


[0245]Preparado usando uma rota semelhante à do precursor Exemplo 4 usando 2-((6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobenzil)fenil)-6b-fluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodecahidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil-di-hidrogenofosfato.

[0246]LCMS (Método AA15) Rt = 1,690 min, m/z 976,1 (M+H)⁺. RMN de ¹H (metanol-*d*₄, 400 MHz) δ = 7,47 (br d, J = 8,6 Hz, 1H), 7,44-7,36 (m, 4H), 7,28-7,19 (m, 3H), 6,97 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 6,33 (dd, J = 1,7, 10,1 Hz, 1H), 6,14 (s, 1H), 5,53 (s,

1H), 5,07 - 4,96 (m, 2H), 4,83- 4,73 (m, 1H), 4,50 (dd, J = 4,8, 9,0 Hz, 1H), 4,34 (br d, J = 8,7 Hz, 1H), 4,00- 3,91 (m, 6H), 2,83- 2,71 (m, 1H), 2,68 - 2,54 (m, 1H), 2,45 (br t, J = 7,6 Hz, 3H), 2,40- 2,26 (m, 2H), 2,25 - 2,13 (m, 1H), 2,06 - 1,91 (m, 2H), 1,84- 1,72 (m, 3H), 1,65 - 1,50 (m, 4H), 1,04 (s, 3H).

EXEMPLO 37 DO PRECURSOR: FOSFATO DE 2-((6AS,6BR,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-10-(4-(3-((S)-6-AMINO-2-(2-(2-BROMOACETAMIDO)ACETAMIDO)HEXANAMIDO)BENZIL)FENIL)-6B-FLUORO-7-HIDROXI-6A,8A-DIMETIL-4-OXO-1,2,4,6A,6B,7,8,8A,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-8BH-NAFTO[2',1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-8B-IL)-2-OXOETIL-DI-HIDROGÊNIO

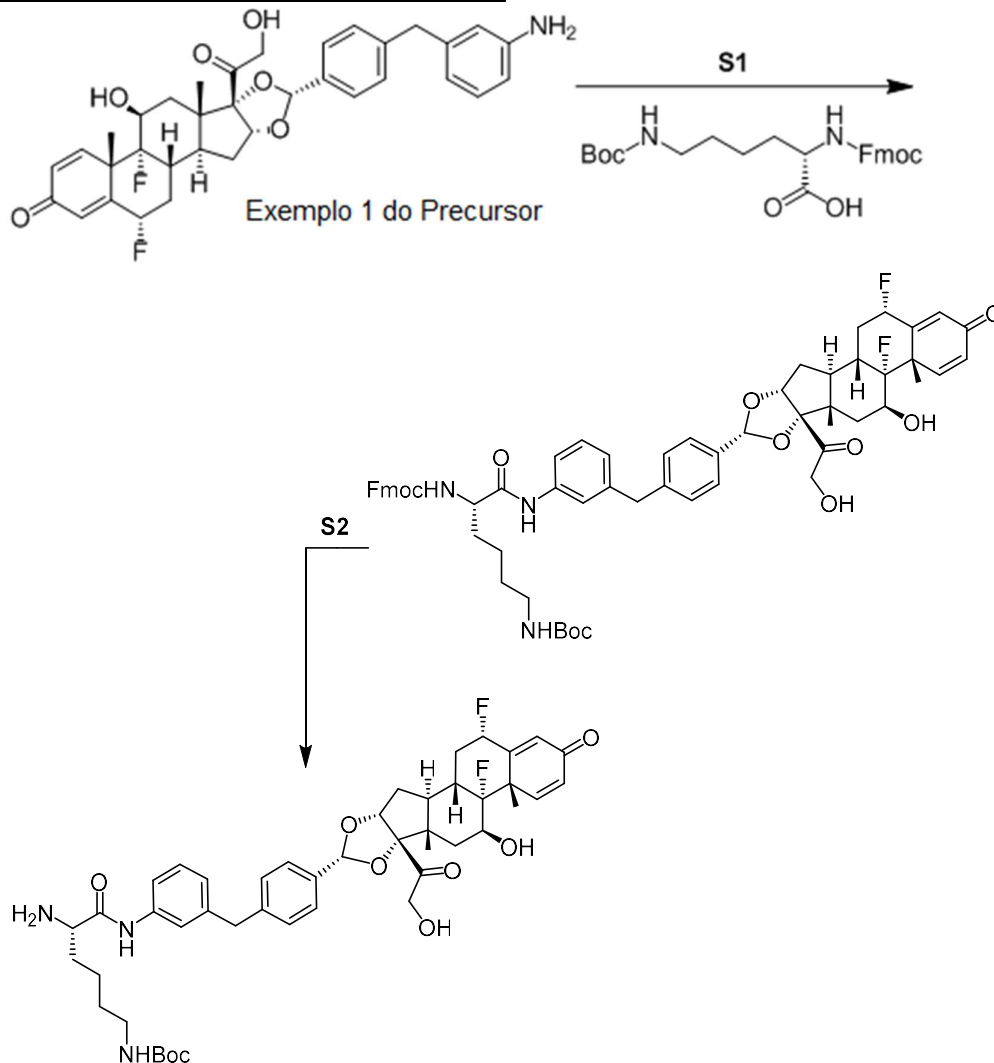


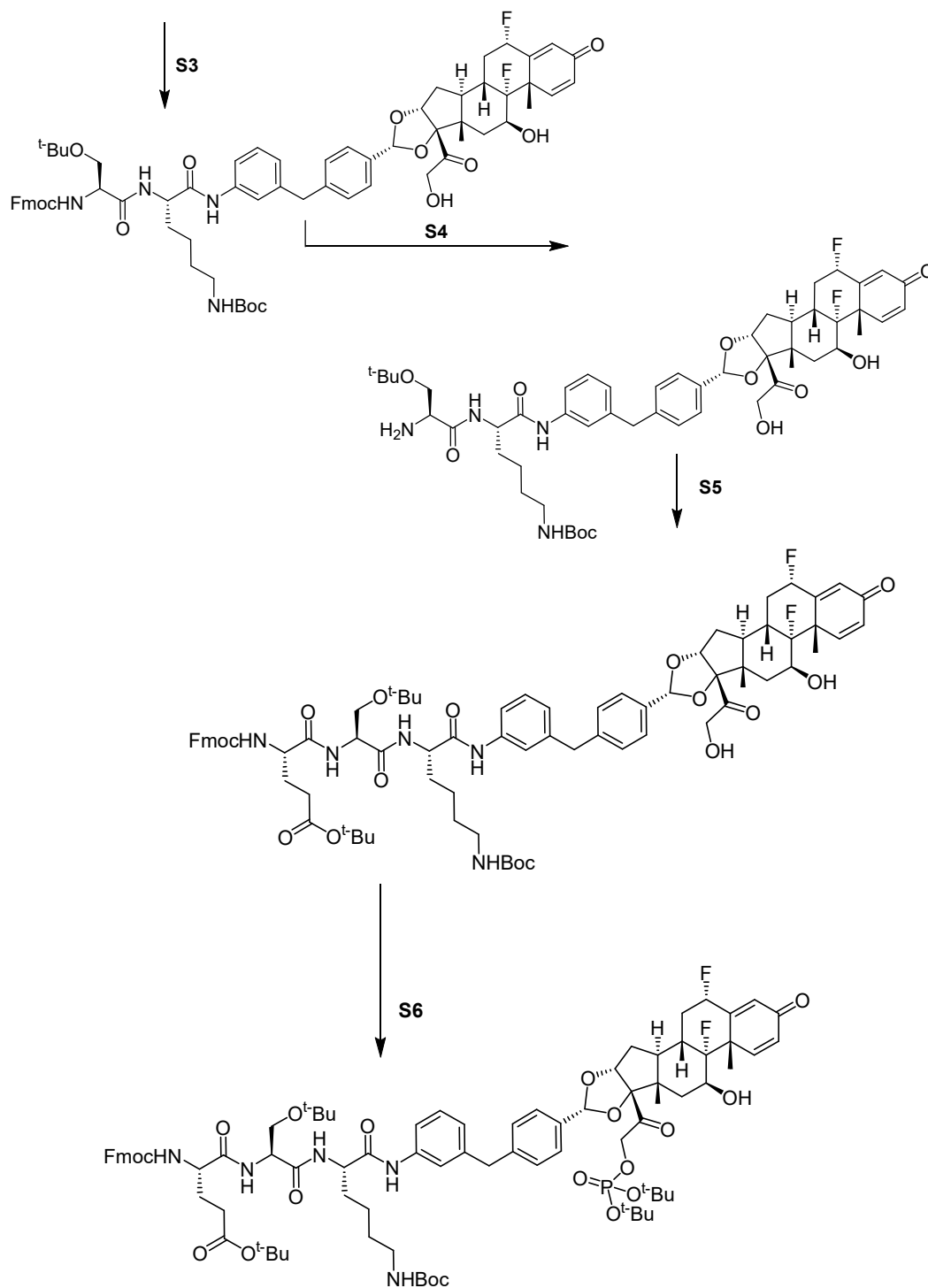
[0247]Preparado usando uma rota semelhante à do precursor Exemplo 5 usando fosfato de 2-((6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobenzil)fenil)-6b-fluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil di-hidrogênio.

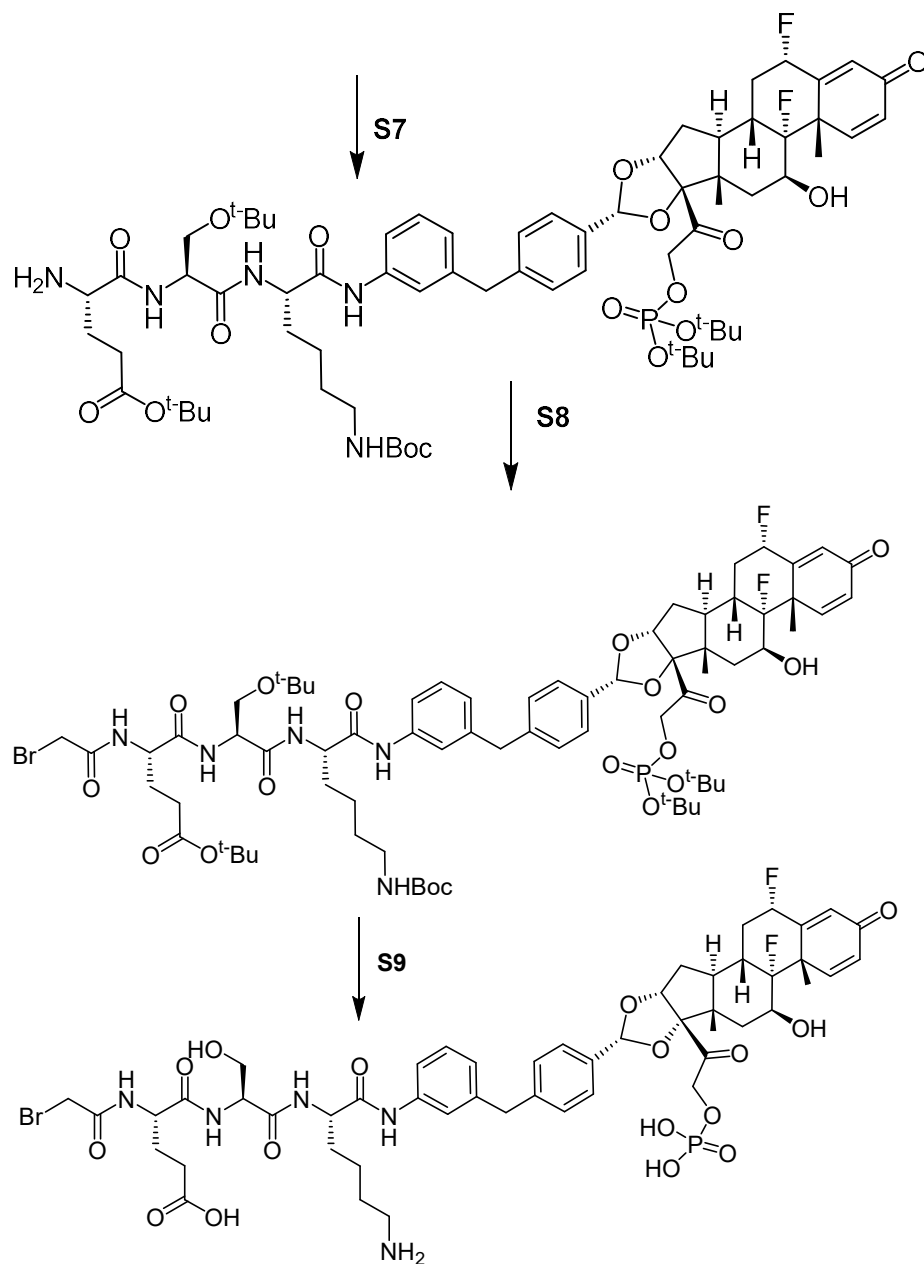
[0248]LCMS (Método AA16) Rt = 2,437 min, m/z 975,2 (M+H)⁺. RMN de ¹H (dimetilsulfóxido-d₆, 400 MHz) δ = 9,94 (br s, 1H), 8,54 (br t, J = 5,4 Hz, 1H), 8,21 (br d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,75 (br s, 3H), 7,51 (br d, J = 7,3 Hz, 1H), 7,39 - 7,30 (m, 3H), 7,30 - 7,17 (m, 4H), 6,95 (br d, J = 7,5 Hz, 1H), 6,22 (br d, J = 10,1 Hz, 1H), 6,03 (s, 1H), 5,49 (s, 1H), 4,92 (br s, 1H), 4,79 (br dd, J = 8,3, 18,2 Hz, 1H), 4,58 (br dd, J = 8,0, 18,4 Hz, 1H), 4,42 - 4,32 (m, 1H), 4,19 (br d, J = 9,0 Hz, 1H), 3,94 (s, 2H), 3,89 (br s,

2H), 3,86 - 3,71 (m, 3H), 2,74 (br s, 2H), 2,33 (br s, 1H), 2,23 - 1,96 (m, 2H), 1,83 (br d, J = 10,6 Hz, 2H), 1,76 - 1,46 (m, 10H), 1,45 - 1,22 (m, 3H), 0,90 (s, 3H).

EXEMPLO 47 DO PRECURSOR: (S)-5-(((S)-1-(((S)-6-AMINO-1-((3-(4-((2S,6AS,6BR,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-2,6B-DIFLUORO-7-HIDROXI-6A,8A-DIMETIL-4-OXO-8B-(2-(FOSFONOOXI)ACETIL)-2,4,6A,6B,7,8,8A,8B,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-1H-NAFTO[2',1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-10-IL)BENZIL)FENIL)AMINO)-1-OXOHEXAN-2-IL)AMINO)-3-HIDROXI-1-OXOPROPAN-2-IL)AMINO)-4-(2-BROMOACETAMIDO)-5-OXOPENTANOICO







[0249]Etapa 1: Síntese de ((S)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-6-oxohexano-1,5-di-il)dicarbamato de (9H-fluoren-9-il)metil terc-butila. Uma mistura de ácido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-((terc-butoxicarbonil)amino)hexanoico

(0,390 g, 0,832 mmol), o produto Exemplo 1 do precursor ((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobenzil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-decahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-4(2H)-ona) (0,504 g, 0,832 mmol), hexafluorofosfato de 3-oxidação de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridínio (HATU) (0,380 g, 0,999 mmol) e 2,6-dimetilpiridina (0,291 ml, 2,496 mmol) em dimetilformamida (4 ml) foi agitado à temperatura ambiente por 30 horas. A mistura de reação foi diluída com acetato de etila (100 ml), lavou-se com uma solução aquosa 1 N de HCl (50 ml), uma solução aquosa saturada de NaHCO₃ (50 ml) e solução salina saturada (50 ml). A fase orgânica foi seca (Na₂SO₄), filtrada e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi purificado por cromatografia (sílica) eluindo com um gradiente de 0 a 70% de acetato de etila/heptanos para dar o composto do título (0,780 g, 89% de rendimento). LCMS (Método AA17): Rt = 1,10 min, m/z 1056,9 (M+H)⁺. RMN de ¹H (dimetilsulfóxido-*d*₆, 400 MHz) δ 9,87 (s, 1H), 7,85 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,69 (dd, J = 7,6, 4,8 Hz, 2H), 7,52 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,44 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,41 - 7,24 (m, 7H), 7,24 - 7,12 (m, 4H), 6,88 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 6,71 (s, 1H), 6,24 (dd, J = 10,1, 1,9 Hz, 1H), 6,09 (s, 1H), 5,61 (ddd, J = 48,9, 11,0, 6,6 Hz, 1H), 5,48 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 5,41 (s, 1H), 5,06 (t, J = 5,9 Hz, 1H), 4,91 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 4,47 (dd, J = 19,4, 6,3 Hz, 1H), 4,27 - 4,11 (m, 4H), 4,07 - 3,95 (m, 1H), 3,85 (s, 2H), 2,89 - 2,83 (m, 2H), 2,66 - 2,51 (m, 1H), 2,28 - 2,23 (m, 2H), 2,20 (dt, J = 12,2, 6,3 Hz, 1H), 2,01 (d, J = 13,9 Hz, 1H), 1,74-1,62 (m, 2H), 1,66-1,49 (m, 4H), 1,46 (s, 3H), 1,31 (s, 9H), 1,22 (d, J = 9,3 Hz, 1H), 0,83 (s, 3H).

[0250]Etapa 2: Síntese de ((S)-5-amino-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-6-oxo-hexil)carbamato de terc-butila. Foi adicionada dietilamina (0,540 g, 7,39 mmol) a uma

solução desgasificada de ((S)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-6-oxo-hexano-1,5-di-il)dicarbamato de (9H-fluoren-9-il)metil *terc*-butila (0,780 g, 0,739 mmol) em tetra-hidrofurano (10 ml). A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente por 2 horas, após o que o solvente foi removido sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi tratado com tolueno (3 x 50 ml), o qual foi removido sob pressão reduzida para eliminar o máximo possível de dietilamina. O composto do título em bruto foi utilizado imediatamente sem mais purificação. LCMS (Método AA17): Rt = 0,86 min, m/z 834,0 (M+H)⁺.

[0251]Etapa 3: Síntese de ((S)-5-((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-(*terc*-butoxi)propanamido)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-6-oxo-hexil)carbamato de *terc*-butila. Uma mistura de ácido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-(*terc*-butoxi)propanoico (0,283 g, 0,739 mmol), ((S)-5-amino-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-6-oxo-hexil)carbamato de *terc*-butila (0,616 g, 0,739 mmol), 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]hexafluorofosfato de 3-oxidação de piridínio (HATU) (0,337 g, 0,887 mmol) e 2,6-dimetilpiridina (0,258 ml, 2,217 mmol) em dimetilformamida (4 ml) foi agitada a 0 °C por 0,5 hora. A mistura de reação foi diluída com acetato de etila (100 ml), lavou-se com uma solução aquosa 1N de HCl (50 ml), uma solução aquosa saturada de NaHCO₃ (50 ml) e solução salina saturada

(50 ml). A fase orgânica foi seca (Na_2SO_4), filtrada e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi purificado por cromatografia (sílica) eluindo com um gradiente de 0 a 70% de acetato de etila/heptanos para proporcionar o composto do título (0,500 g, 56% de rendimento). LCMS (Método AA17): $R_t = 1,18$ min, m/z 1199,2 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. RMN de ^1H (dimetilsulfóxido- d_6 , 500 MHz) δ 9,84 (s, 1H), 7,95 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,86 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H), 7,70 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H), 7,46 - 7,26 (m, 7H), 7,26 - 7,13 (m, 5H), 6,89 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 6,67 (s, 1H), 6,27 (dd, $J = 10,2, 1,9$ Hz, 1H), 6,11 (s, 1H), 5,62 (dt, $J = 48,6, 9,1$ Hz, 1H), 5,50 (s, 1H), 5,41 (s, 1H), 5,08 (t, $J = 5,9$ Hz, 1H), 4,92 (d, $J = 4,9$ Hz, 1H), 4,48 (dd, $J = 19,4, 5,8$ Hz, 1H), 4,36 (d, $J = 6,9$ Hz, 1H), 4,33 - 4,07 (m, 5H), 3,84 (s, 2H), 3,44 (d, $J = 6,1$ Hz, 2H), 2,85 (q, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,68 - 2,53 (m, 1H), 2,32 - 2,16 (m, 2H), 2,02 (d, $J = 13,7$ Hz, 1H), 1,67 (d, $J = 13,5$ Hz, 3H), 1,60 - 1,48 (m, 1H), 1,47 (s, 3H), 1,31 (s, 10H), 1,25 - 1,16 (m, 1H), 1,05 (s, 9H), 0,84 (s, 3H).

[0252]Etapa 4: Síntese de ((S)-5-((S)-2-amino-3-(terc-butoxi)propanamido)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-6-oxo-hexil)carbamato de terc-butila. Foi adicionada dietilamina (0,305 g, 4,17 mmol) a uma solução desgaseificada de ((S)-5-((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-(terc-butoxi)propanamido)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-6-oxo-hexil)carbamato de *terc*-butila (0,500 g, 0,417 mmol) em tetra-hidrofurano (10 ml). A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente por 2 horas, após o que o solvente foi removido sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi tratado com tolueno (3 x 50 ml), o qual foi removido sob pressão reduzida para eliminar o máximo

possível de dietilamina. O composto do título em bruto foi utilizado imediatamente sem mais purificação. LCMS (Método AA17): Rt = 0,92 min, m/z 976,9 (M+H)⁺.

[0253]Etapa 5: Síntese de 16-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-13-(terc-butoximetil)-10-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)carbamoil)-2,2-dimetil-4,12,15-trioxo-3-oxa-5,11,14-triazanonadecan-19-oato de (10S,13S,16S)-terc-butila. Uma mistura de ácido (S)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-5-(terc-butoxi)-5-oxopentanoico (0,177 g, 0,417 mmol), ((S)-5-((S)-2-amino-3-(terc-butoxi)propanamido)-6-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-6-oxohexil)carbamato de *terc*-butila (0,407 g, 0,417 mmol), (1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]hexafluorofosfato de 3-oxidação de piridínio) (HATU) (0,190 g, 0,500 mmol) e 2,6-dimetilpiridina (0,146 ml, 1,251 mmol) em dimetilformamida (4 ml) foi agitada a 0 °C por 0,5 hora. A mistura de reação foi diluída com acetato de etila (100 ml), lavou-se com uma solução aquosa 1 M de HCl (50 ml), uma solução aquosa saturada de NaHCO₃ (50 ml) e solução salina saturada (50 ml). A fase orgânica foi seca (Na₂SO₄), filtrada e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi purificado por cromatografia (sílica) eluindo com um gradiente de 0 a 70% de acetato de etila/heptanos para proporcionar o composto do título (0,455 g, 79% de rendimento). LCMS (Método AA17): Rt = 1,03 min, m/z não observado. RMN de ¹H (dimetilsulfóxido-*d*6, 500 MHz) δ 9,77 (s, 1H), 7,91 (s, 1H), 7,85 (d, *J* = 7,6 Hz, 3H), 7,77 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,68 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H), 7,58 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,44 - 7,34 (m, 4H), 7,34 - 7,22 (m, 4H), 7,16 (dd, *J* = 22,5, 8,0 Hz, 3H), 6,87 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 6,65 (s, 1H), 6,25 (dd, *J* = 10,1, 1,9 Hz, 1H), 6,09

(s, 1H), 5,70 - 5,50 (m, 1H), 5,48 (d, $J = 3,8$ Hz, 1H), 5,40 (s, 1H), 5,06 (t, $J = 6,0$ Hz, 1H), 4,90 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H), 4,47 (dd, $J = 19,4, 6,2$ Hz, 1H), 4,29 (dt, $J = 19,5, 6,5$ Hz, 3H), 4,23 - 4,10 (m, 3H), 4,03 (d, $J = 6,3$ Hz, 1H), 3,84 (s, 2H), 3,53 (s, 0H), 3,52 - 3,36 (m, 1H), 2,84 - 2,78 (m, 2H), 2,67 - 2,50 (m, 1H), 2,22 (t, $J = 8,4$ Hz, 3H), 2,01 (d, $J = 13,6$ Hz, 1H), 1,88 (s, 1H), 1,80-1,58 (m, 6H), 1,56-1,48 (m, 1H), 1,46 (s, 3H), 1,34 (s, 9H), 1,29 (s, 9H), 1,20 (s, 1H), 1,00 (s, 9H), 0,93 (s, 1H), 0,82 (s, 3H).

[0254]Etapa 6: Síntese de 16-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-13-(*terc*-butoximetil)-10-(((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-*terc*-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)carbamoil)-2,2-dimetil-4,12,15-trioxo-3-oxa-5,11,14-triazanonadecan-19-oato de (10S,13S,16S)-*terc*-butila. Uma mistura de 16-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-13-(*terc*-butoximetil)-10-(((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-8b-(2-hidroxiacetil)-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)carbamoil)-2,2-dimetil-4,12,15-trioxo-3-oxa-5,11,14-triazanonadecan-19-oato de (10S,13S,16S)-*terc*-butila (0,452 g, 0,326 mmol) e 1H-tetrazol (0,105 g, 1,502 mmol) em dimetilformamida (1,5 ml) foi tratado com di-*terc*-butil-dietilfosforamidita (0,291 ml, 1,045 mmol). A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente durante 4 h, após o que foi adicionada uma solução aquosa de H₂O₂ (50% em peso, 0,3 ml) e a agitação continuou durante 1 h. A purificação por HPLC preparativa eluindo com um gradiente de acetonitrila e acetato de amônio aquoso a 10 mM produziu o composto do título (0,455 g, 79% de rendimento). LCMS (Método AA17): Rt = 1,35 min, m/z 1575,8 (M+H)⁺. RMN de ¹H (dimetilsulfóxido-*d*₆, 400 MHz) δ 9,76 (s, 1H), 7,85 (d, $J = 7,7$ Hz, 3H), 7,77 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H), 7,67 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 7,58 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,44 - 7,18 (m, 10H), 7,14 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H), 6,88 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 6,65 (s, 1H), 6,25 (dd, $J = 10,1, 1,9$ Hz, 1H),

6,09 (s, 1H), 5,70 - 5,48 (m, 3H), 4,98 - 4,87 (m, 2H), 4,61 (dd, $J = 17,9, 9,3$ Hz, 1H), 4,29 (dt, $J = 19,4, 6,8$ Hz, 2H), 4,19 (d, $J = 7,0$ Hz, 2H), 4,03 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H), 3,84 (s, 2H), 3,54 - 3,32 (m, 1H), 2,82 (d, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,74 - 2,50 (m, 1H), 2,22 (t, $J = 7,9$ Hz, 3H), 2,03 (d, $J = 13,1$ Hz, 1H), 1,94-1,80 (m, 1H), 1,76-1,60 (m, 5H), 1,55-1,41 (m, 2H), 1,45 (s, 3H), 1,39 (s, 9H), 1,38 (s, 9H), 1,34 (s, 9H), 1,29 (s, 9H), 1,25 - 1,12 (m, 1H), 0,99 (s, 9H), 0,91 (s, 1H), 0,85 (s, 3H).

[0255]Etapa 7: Síntese de 16-amino-13-(*terc*-butoximetil)-10-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-*terc*-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)carbamoil)-2,2-dimetil-4,12,15-trioxo-3-oxa-5,11,14-triazanonadecan-19-oato de (10S,13S, 16S)-*terc*-butila. Foi adicionada dietilamina (0,100 g, 1,364 mmol) a uma solução desgaseificada de 16-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-13-(*terc*-butoximetil)-10-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-*terc*-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)carbamoil)-2,2-dimetil-4,12,15-trioxo-3-oxa-5,11,14-triazanonadecan-19-oato de (10S,13S,16S)-*terc*-butila (0,215 g, 0,136 mmol) em THF (8 ml). A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente por 2 horas, após o que o solvente foi removido sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi tratado com tolueno (3 x 50 ml), o qual foi removido sob pressão reduzida para eliminar o máximo possível de dietilamina. O composto do título em bruto foi utilizado imediatamente sem mais purificação. LCMS (Método AA17): $R_t = 1,11$ min, m/z 1354,8 (M+H)⁺.

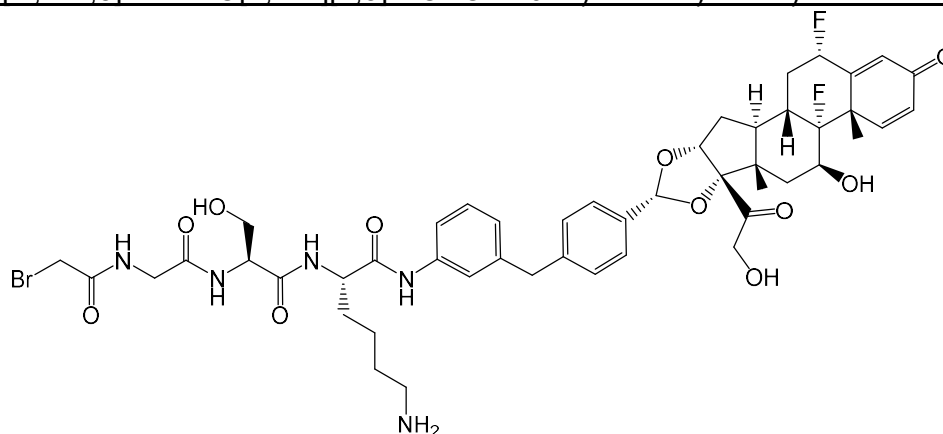
[0256]Etapa 8: Síntese de 16-(2-bromoacetamido)-13-(*terc*-butoximetil)-10-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-*terc*-

butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)carbamoil)-2,2-dimetil-4,12,15-trioxo-3-oxa-5,11,14-triazanonadecan-19-oato de (10S,13S,16S)-*terc*-butila. Uma mistura de ácido bromoacético (0,0347 g, 0,250 mmol) e 2-etoxiquinolina-1 (2H)-carboxilato de etila (0,07736 g, 0,298 mmol) em dimetilformamida (0,2 ml) foi agitada à temperatura ambiente por 30 minutos, após o que uma solução de 16-amino-13-(*terc*-butoximetil)-10-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-*terc*-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)carbamoil)-2,2-dimetil-4,12,15-trioxo-3-oxa-5,11,14-triazanonadecan-19-oato de (10S,13S,16S)-*terc*-butila (0,130 g, 0,096 mmol) em dimetilformamida (0,3 ml) foi adicionado à solução de ácido bromoacético. A reação foi agitada à temperatura ambiente durante 20 minutos. A purificação por HPLC preparativa eluindo com um gradiente de acetonitrila e ácido trifluoroacético a 0,1% (v/v) em água produziu o composto do título (0,103 g, 73% de rendimento). LCMS (Método AA17): Rt = 1,20 min, m/z 1474,4, 1476,5 (M+H)⁺. RMN de ¹H (dimetilsulfóxido-*d*6, 400 MHz) δ 9,77 (s, 1H), 8,46 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,94 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,85 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,41 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 7,35 (s, 1H), 7,31 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,22 (dd, J = 14,0, 9,0 Hz, 3H), 7,15 (t, J = 7,9 Hz, 1H), 6,88 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 6,66 (s, 1H), 6,26 (d, J = 10,2, 1,9 Hz, 1H), 6,09 (s, 1H), 5,58 (d, J = 51,4 Hz, 3H), 4,98 - 4,87 (m, 2H), 4,61 (dd, J = 18,0, 9,2 Hz, 1H), 4,33 (s, 1H), 4,17 (s, 1H), 3,93 - 3,86 (m, 2H), 3,85 (s, 2H), 3,63 (s, 10H), 2,87 - 2,79 (m, 2H), 2,28 - 2,16 (m, 4H), 2,04 (d, J = 13,2 Hz, 1H), 1,87 (s, 1H), 1,69 (s, 3H), 1,63 (d, J = 13,6 Hz, 2H), 1,46 (s, 3H), 1,39 (s, 9H), 1,38 (s, 9H), 1,33 (s, 9H), 1,30 (s, 9H), 1,19 (d, J = 9,7 Hz, 1H), 1,02 (s, 9H), 0,85 (s, 3H).

[0257]Etapa 9: Síntese de ácido (S)-5-(((S)-1-(((S)-6-amino-1-((3-(4-

((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-8b-(2-(fosfonooxi)acetil)-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)amino)-1-oxo-hexan-2-il)amino)-3-hidroxi-1-oxopropan-2-il)amino)-4-(2-bromoacetamido)-5-oxopentanoico. Foi adicionado ácido trifluoroacético (2 ml, 0,068 mmol) a uma solução a 0 °C de 16-(2-bromoacetamido)-13-(*terc*-butoximetil)-10-((3-(4-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-8b-(2-((di-*terc*-butoxifosforil)oxi)acetil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-2,4,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-dodecahidro-1H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-10-il)benzil)fenil)carbamoil)-2,2-dimetil-4,12,15-trioxo-3-oxa-5,11,14-triazanonadecan-19-oato de (10S,13S,16S)- *terc*-butila (0,100 g, 0,068 mmol) em diclorometano (2 ml). A reação foi agitada a 0 °C por 10 minutos, após o que o banho de gelo foi removido e a agitação foi mantida à temperatura ambiente por mais 90 minutos. A purificação por HPLC preparativa eluindo com um gradiente de acetonitrila e ácido trifluoroacético a 0,1% (v/v) em água produziu o composto do título (0,056 g, rendimento de 72%). LCMS (Método AA17) Isômero acetal maior: Rt = 0,75 min, m/z 1149,7, 1151,8 (M+H)⁺; isômero acetal menor Rt = 0,78 min, m/z 1149,7, 1151,7 (M + H⁺). RMN de ¹H (dimetilsulfóxido-*d*6, 500 MHz) δ 9,70 (s, 1H), 8,61 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 8,13 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 8,06 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,81 (s, 3H), 7,51 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,35 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H), 7,23 (t, *J* = 8,7 Hz, 3H), 7,18 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,13 (s, 1H), 6,97 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 6,27 (dd, *J* = 10,1, 1,9 Hz, 1H), 6,11 (s, 1H), 5,77 - 5,53 (m, 1H), 5,43 (s, 1H), 4,92 (d, *J* = 4,7 Hz, 1H), 4,70 (dd, *J* = 19,0, 8,1 Hz, 1H), 4,53 (dd, *J* = 19,0, 7,9 Hz, 1H), 4,27 (q, *J* = 6,6 Hz, 3H), 4,19 (d, *J* = 9,6 Hz, 1H), 3,96 - 3,86 (m, 4H), 3,58 (qd, *J* = 10,9, 5,9 Hz, 2H), 2,77 - 2,52 (m, 3H), 2,68 - 2,54 (m, 0H), 2,49 (s, 2H), 2,23 (q, *J* = 8,3 Hz, 3H), 2,00 (d, *J* = 13,2 Hz, 1H), 1,93-1,85 (m, 2H), 1,77-1,69 (m, 1H), 1,72-1,65 (m, 3H), 1,57 (s, 1H), 1,49 (s, 4H), 1,54-1,44 (m, 2H), 1,30 (s, 2H), 0,88 (s, 3H).

EXEMPLO 48 DO PRECURSOR: (S)-6-AMINO-2-((S)-2-(2-(2-BROMOACETAMIDO)ACETAMIDO)-3-HIDROXIPROPANAMIDO)-N-(3-(4-((2S,6AS,6BR,7S,8AS,8BS,10R,11AR,12AS,12BS)-2,6B-DIFLUORO-7-HIDROXI-8B-(2-HIDROXIACETIL)-6A,8A-DIMETIL-4-OXO-2,4,6A,6B,7,8,8A,8B,11A,12,12A,12B-DODECA-HIDRO-1H-NAFTO[2',1':4,5]INDENO[1,2-D][1,3]DIOXOL-10-IL)BENZIL)FENIL)HEXANAMIDA



[0258]Preparado usando rota semelhante ao Exemplo 47 do Precursor usando fosfato de 2-((2S,6aS,6bR,7S,8aS,8bS,10R,11aR,12aS,12bS)-10-(4-(3-aminobenzil)fenil)-2,6b-difluoro-7-hidroxi-6a,8a-dimetil-4-oxo-1,2,4,6a,6b,7,8,8a,11a,12,12a,12b-dodeca-hidro-8bH-nafto[2',1':4,5]indeno[1,2-d][1,3]dioxol-8b-il)-2-oxoetil di-hidrogênio.

[0259]LCMS (Método AA17) Rt = 0,79 min, m/z 998,7, 1000,9 (M+H)⁺. RMN de ¹H (dimetilsulfóxido-*d*6, 500 MHz) δ 9,66 (s, 1H), 8,55 (t, J = 5,7 Hz, 1H), 8,16 (dd, J = 12,8, 7,7 Hz, 2H), 7,62 (s, 3H), 7,48 - 7,40 (m, 2H), 7,40 - 7,32 (m, 2H), 7,31 - 7,23 (m, 3H), 7,23 - 7,17 (m, 2H), 6,92 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 6,54 (s, 1H), 6,30 (dd, J = 10,2, 1,9 Hz, 1H), 6,13 (s, 1H), 5,66 (dt, J = 48,7, 10,2 Hz, 1H), 5,54 (dd, J = 4,5, 1,7 Hz, 1H), 5,45 (s, 1H), 5,21 (s, 1H), 5,13 (s, 1H), 4,95 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 4,51 (d, J = 19,4 Hz, 1H), 4,36 (td, J = 12,8, 7,2 Hz, 2H), 4,20 (d, J = 19,2 Hz, 1H), 3,92 (d, J = 1,7 Hz, 2H), 3,89 (d, J = 2,4 Hz, 2H), 3,82 (qd, J = 16,7, 5,7 Hz, 2H), 3,65 (t, J = 8,2 Hz, 1H), 3,58 (dd, J = 10,5, 5,9 Hz, 1H), 2,78 (q, J = 6,7 Hz, 2H), 2,73 - 2,58 (m, 1H), 2,35 -

2,28 (m, 1H), 2,24 (td, J = 12,3, 6,8 Hz, 1H), 2,04 (d, J = 13,3 Hz, 1H), 1,85 - 1,50 (m, 4H), 1,50 (s, 3H), 1,36 (dq, J = 16,0, 8,3 Hz, 2H), 0,87 (s, 3H).

EXEMPLO 1 DE ADC. CONJUGAÇÃO COM PRODUTOS DERIVADOS DE MALEIMIDA (MÉTODO GERAL)

1. PROTOCOLO DE CONJUGAÇÃO DE CISTEÍNA COM MALEIMIDA

[0260] Uma solução aproximada de 10 mg/ml do anticorpo foi preparada em tampão fosfato salino (PBS), pH 7,4, assim como uma solução de (tris(2-carboxietil)fosfina) TCEP a 10 mM em PBS (Pierce Bond-Breaker, cat. 77720). O anticorpo anti-CD40 (Tabela 3) foi então parcialmente reduzido adicionando aproximadamente dois equivalentes molares (eq) de TCEP a 10 mM, misturando brevemente e incubando por 60 minutos a 37 °C. Adicionou-se então dimetilsulfóxido (DMSO) aos anticorpos parcialmente reduzidos em quantidade suficiente para 15% de DMSO total. Para as conjugações, 8 equivalentes (eq) molares dos produtos de maleimida dos Exemplos 6 a 13 (10 mM em PBS) foram então adicionados e incubados por 30 min à temperatura ambiente com os anticorpos parcialmente reduzidos. O excesso de produto maleimida e DMSO foram então removidos usando colunas de dessalinização NAP-5 (GE Healthcare, cat. 17-0853-02) previamente equilibrada com tampão salino de tampão fosfato, pH 7,4. As amostras dessalinizadas foram então analisadas por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC), cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) e espectrometria de massa reduzida.

2. HIDRÓLISE DE TIOSUCCINIMIDA

[0261] A hidrólise do anel tiosuccinimida do ADC foi realizada incubando o ADC a um pH elevado. Resumidamente, uma solução de arginina a 0,7 M, pH 9,0 foi preparada e adicionada a cada ADC em tampão solução salina tampão fosfato (PBS) para trazer a concentração total de arginina para 50 mM (pH aproximadamente 8,9). O material foi então incubado a 25 °C por 72 horas. A hidrólise do anel succinimida foi então confirmada por espectrometria de massa reduzida, após o que a hidrólise foi

extinta com a adição de uma solução de ácido acético a 0,1 M a ácido acético total a 12,5 mM (pH aproximadamente 7,1).

[0262]A Tabela 11 fornece conjugados ADC sintetizados seguindo este método geral (dados de agregação fornecidos para um número exemplar dos conjugados ADC). A Tabela 12 fornece conjugados ADC que podem ser sintetizados seguindo este Método Geral. A variável (A) corresponde ao anticorpo anti-CD40; n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10. O anticorpo anti-CD40 humano corresponde a Ab102 (Tabela 3). O anticorpo anti-CD40 de camundongo corresponde ao Anticorpo 138 descrito em US 20160347850, incorporado neste documento a título de referência. P = Exemplo de precursor. O anticorpo 138 tem características semelhantes ao Ab102, por exemplo, o anticorpo 138 é um anticorpo antagonista sem atividade agonista substancial como o Ab102. Assim, o anticorpo 138 é representativo da atividade Ab102 em modelos de camundongo.

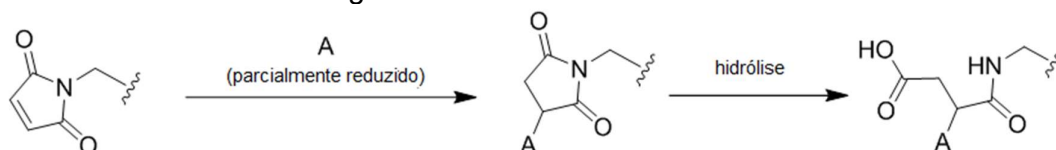
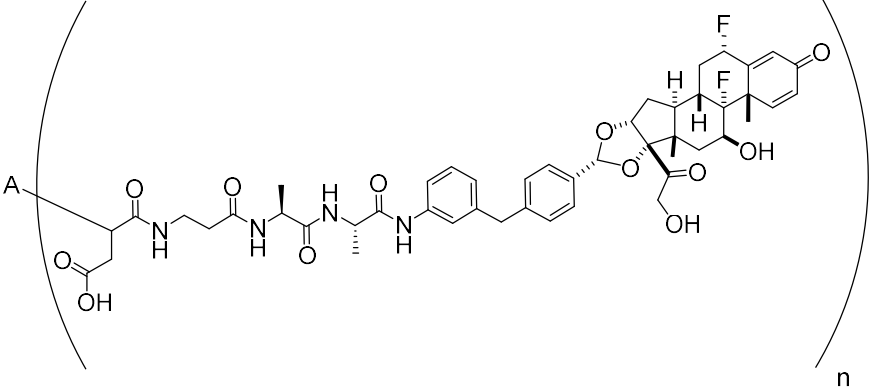
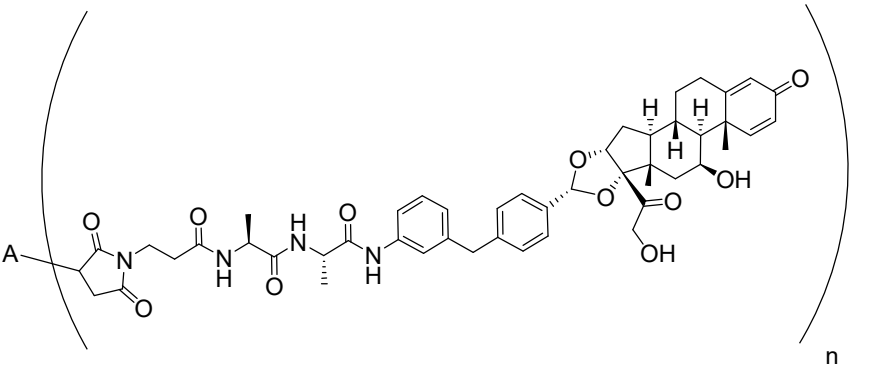
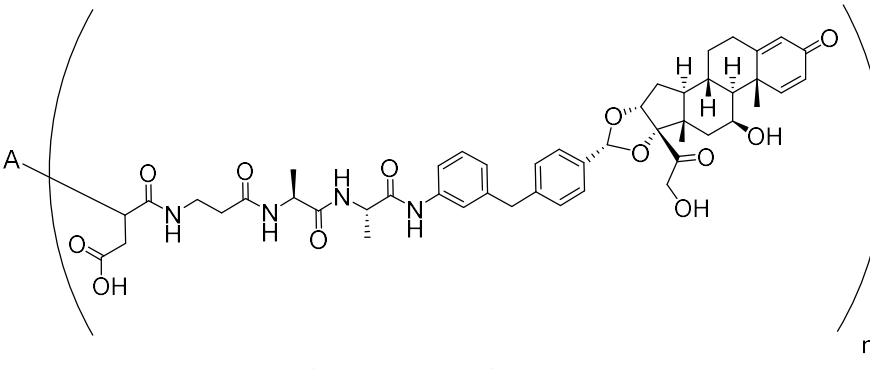
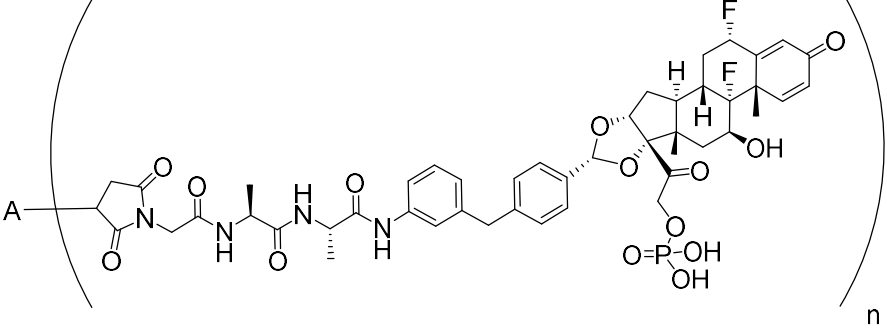
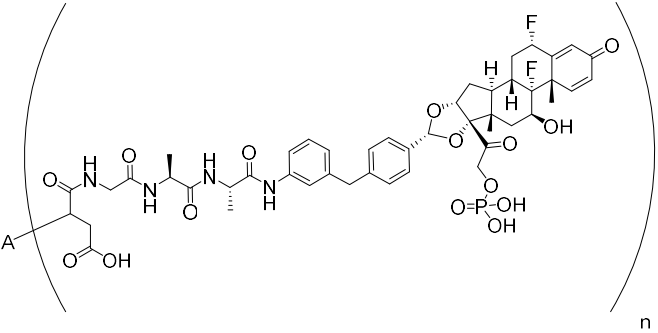
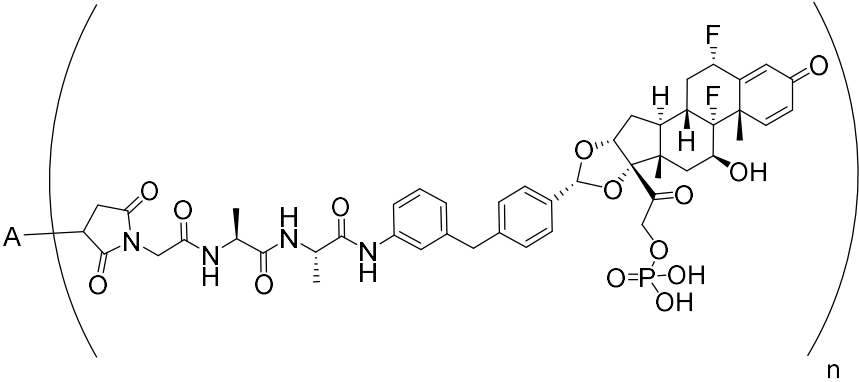
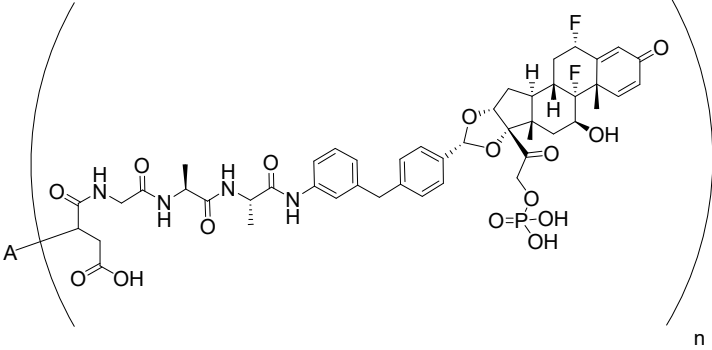


Tabela 11. ADCs sintetizados derivados de maleimida		
P	Produto ADC	n
6	<p>Exemplo 6 - conjugado (camundongo)</p>	4

6	 <p>Exemplo 6-hidrolisado (camundongo) Agregação (%) = 0,6</p>	4
7	 <p>Exemplo 7 - conjugado (camundongo)</p>	4
7	 <p>Exemplo 7-hidrolisado (camundongo) Agregação (%) = 0</p>	4

12	 <p>Exemplo 12- conjugado (camundongo)</p>	2
12	 <p>Exemplo 12- hidrolisado (camundongo) n = 2, Agregação (%) = 1,5; n = 4, Agregação (%) = 0</p>	2 4
12	 <p>Exemplo 12- conjugado (humano)</p>	4
12	 <p>Exemplo 12- hidrolisado (humano)</p>	4

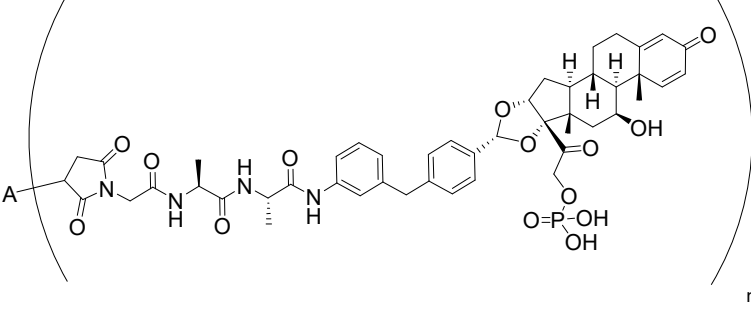
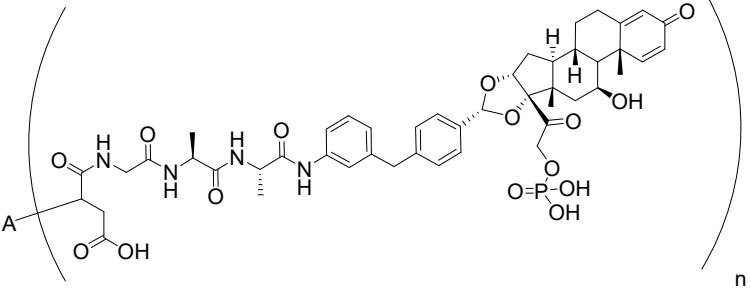
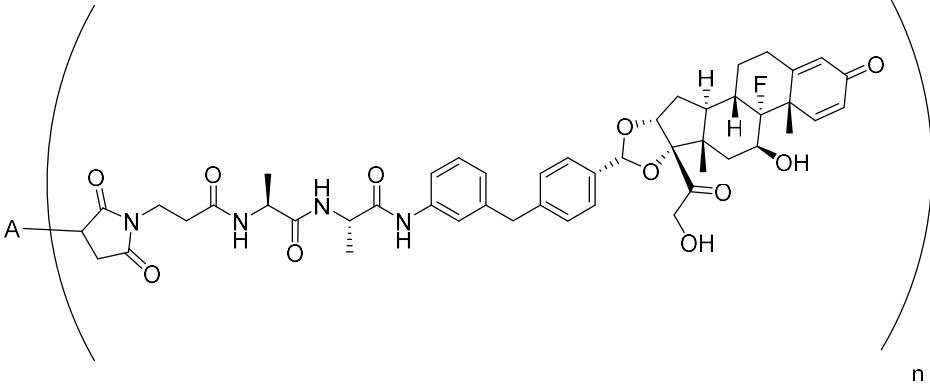
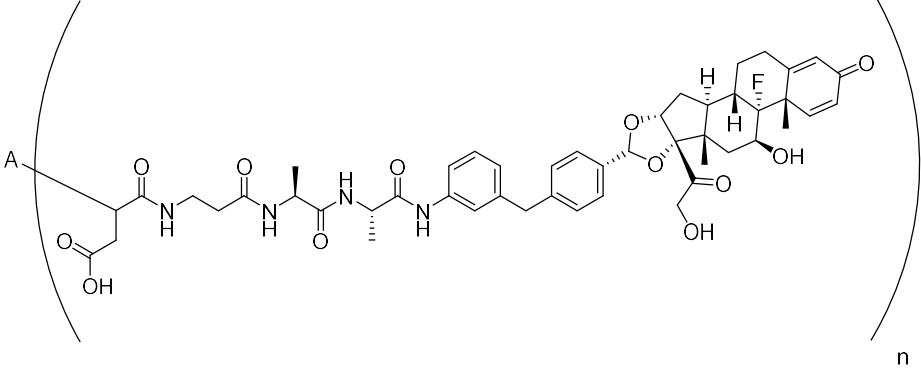
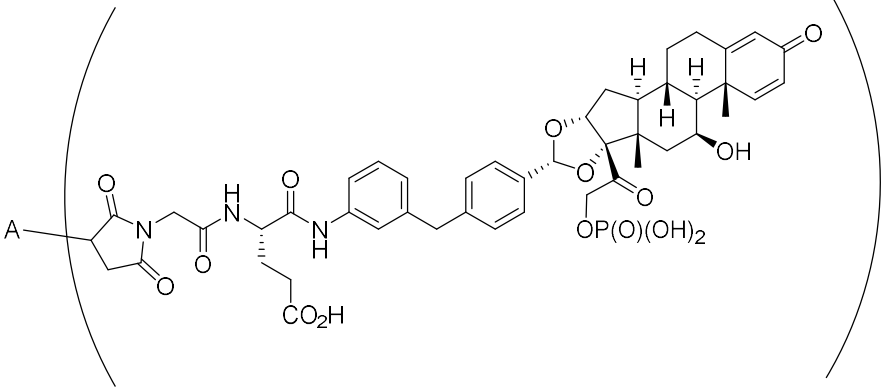
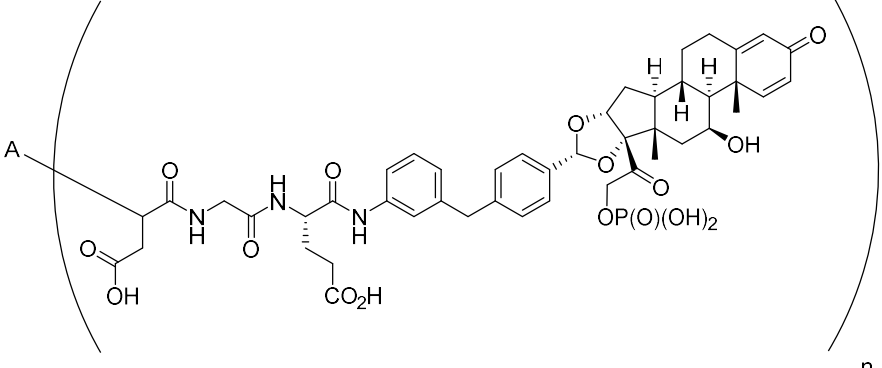
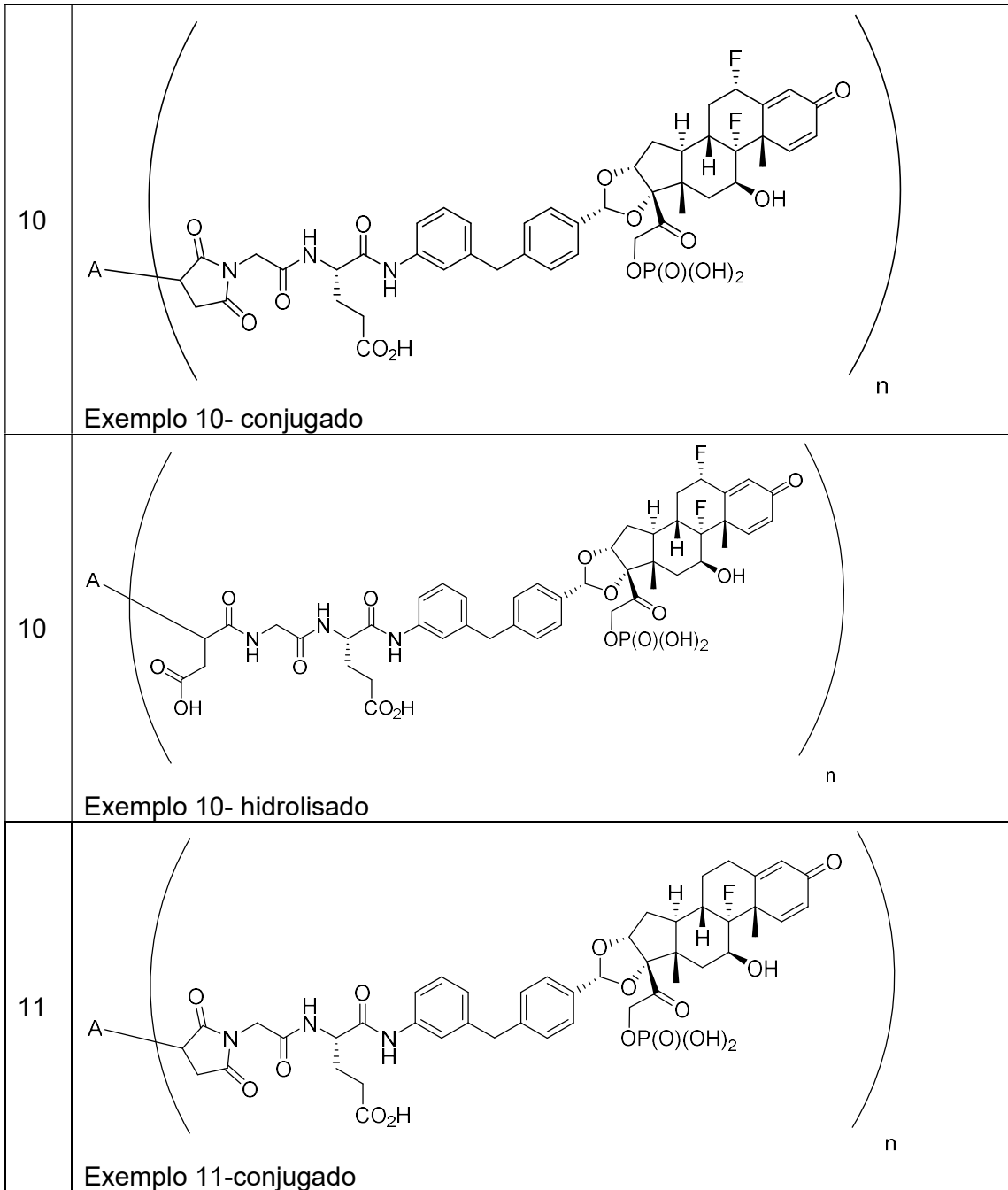
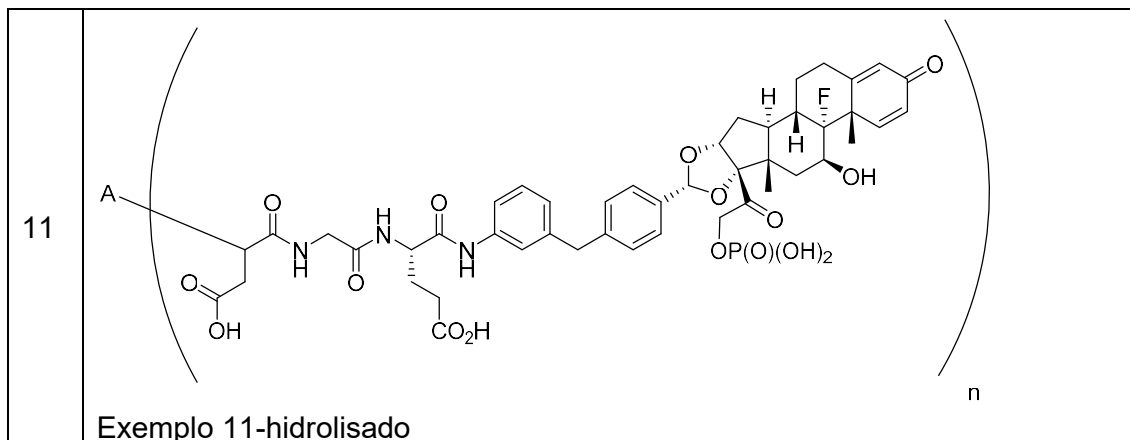
13	 <p>Exemplo 13- conjugado (humano)</p>	4
13	 <p>Exemplo 13- hidrolisado (humano)</p>	4

Tabela 12. ADCs adicionais derivados de maleimida

P	Produto ADC
8	 <p>Exemplo 8-conjugado</p>

8	 <p>Exemplo 8-hidrolisado</p>
9	 <p>Exemplo 9-conjugado</p>
9	 <p>Exemplo 9-hidrolisado</p>



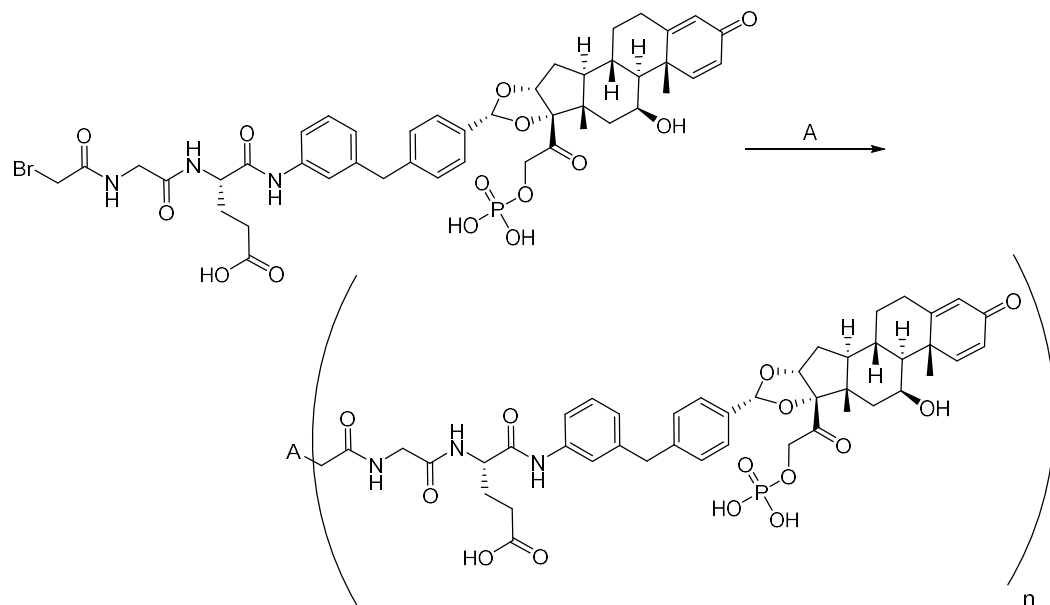


EXEMPLO 2 DE ADC. CONJUGAÇÃO COM PRODUTOS PRECURSORES DE BROMOACETAMIDA (MÉTODO GERAL)

1. PROCEDIMENTO GERAL

[0263] Uma solução aproximada de 5 a 20 mg/ml do anticorpo desejado foi preparada em solução salina tampão fosfato (PBS), pH 6 a 7,4. Um agente de redução de escolha, tal como TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina), foi diluído ou dissolvido em solventes tais como H₂O, dimetil sulfóxido (DMSO), dimetil acetamida (DMA) ou dimetilformamida (DMF) para dar uma solução com intervalo de concentração entre 1 e 25 mM. O anticorpo anti-CD40 foi então parcialmente reduzido adicionando cerca de 2 a 3,5 eq de agente redutor, misturando brevemente e incubando durante a noite a 0 a 4 °C. Foi adicionado tampão Tris, pH 8 a 8,5 (a 20 a 50 mM), seguido pelo produto de bromo acetamida dos Exemplos 4 a 5 em dimetilsulfóxido (DMSO) ou dimetil acetamida (DMA) (menos de 15% do total) e a mistura foi incubada por 2 a 3 horas à temperatura ambiente. Excesso de produto bromo acetamida e solvente orgânico foram então removidos por purificação. As amostras de ADC purificadas foram então analisadas por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC), cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) e espectrometria de massa reduzida.

2. PREPARAÇÃO DO ADC HUMANO DO EXEMPLO 4 DO PRECURSOR



[0264] 100 mg de anticorpo anti-CD40 humano (Ab102, Tabela 3) em uma concentração de 20 mg/ml foi reduzido com ácido difenilfosfinoacético (2,9 a 3,0 equivalentes (eq)), a 0 °C durante a noite. O CD40 Ab parcialmente reduzido foi então conjugado com o Exemplo 4 produto de bromo acetamida (10 equivalentes (eq)) em dimetilsulfóxido (DMSO) durante 3 horas à temperatura ambiente. A mistura de conjugação foi trocada primeiro tampão em tampão Tris 20 a mM, NaCl a 50 mM, pH 7,8 usando várias colunas de dessalinização NAP 25. A solução dessalinizada de ADC foi purificada por AEC para fornecer os componentes DAR2 (n = 2) e DAR4 (n = 4) do ADC (o número de moléculas ligadas a fármacos depende do número de ligações dissulfeto inter-cadeia reduzidas).

CONDIÇÕES DE AEC

[0265] As condições de AEC utilizadas foram: A coluna era Propac™ WAX-10, 4 X 250 mm (Thermo Fisher Scientific, cat. 054999) e a temperatura da coluna era de 37 °C. O comprimento de onda foi de 280 nm, o tempo de execução foi de 18 minutos, a quantidade de injeção foi de 20 µg e a taxa de fluxo foi de 1,0 ml/minuto. Fase móvel A: MES a 20 mM, pH 6,7, Fase Móvel B: MES a 20 mM, NaCl 500 a mM, pH 6,7. O DAR2 ADC teve um tempo de retenção de 7,70 minutos com 0% de agregação e o

DAR4 um tempo de retenção de 10,88 minutos com 0% de agregação.

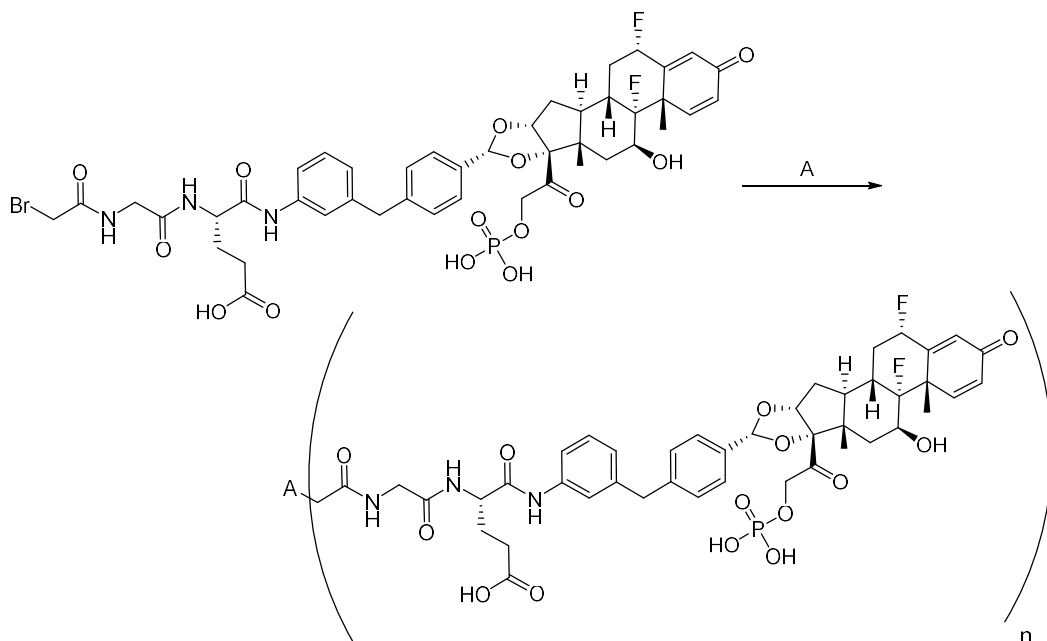
Tabela 13A. Perfil de gradiente		
Tempo (min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0	100	0
16	0	100
18	0	100
18,1	0	10

ESPECTROSCOPIA DE MASSA

[0266]As amostras de ADC foram totalmente reduzidas antes da análise de MS. As condições de espectrometria de massa utilizadas são as seguintes: coluna HPLC = água BEH300 C4, 2,1 x 50 mm, tamanho de partícula de 3,5 microns; Fase móvel A: ácido fórmico a 0,1% em água; Fase móvel B: ácido fórmico a 0,1% em acetonitrila; Taxa de fluxo: 450 µl/min; Gradiente: 0 a 0,6 min, 5% B, 0,6 a 1,1 min 5 a 90% B, 1,1 a 2,2 min 90% B, 2,2 a 2,4 min, 90 a 5% B, 2,4 a 3,5 min 5% B; Temperatura da coluna: 40 °C; Fonte de ionização MS: ESI

[0267]Os dados de espectroscopia de massa não dissolvida do Exemplo 4-conjugado (humano) são mostrados na Figura 1A (n = 4). O pico 25.140,73 corresponde à cadeia leve (SEQ ID NO: 2) com uma molécula ligante de fármaco conjugada. O pico 50.917,59 corresponde à da cadeia pesada (SEQ ID NO: 1) com um fármaco ligante molécula conjugada.

3. PREPARAÇÃO DE ADC DE CAMUNDONGO E HUMANO DO EXEMPLO 28 DO PRECURSOR



CAMUNDONGO ADC

[0268]O Exemplo 28 - ADC conjugado (camundongo) foi sintetizado seguindo o Exemplo 4 ADC, usando o anticorpo anti-CD40 de camundongo (Anticorpo 138). O DAR2 ADC teve um tempo de retenção de 7,17 minutos com 0% de agregação e o DAR4 um tempo de retenção de 10,50 minutos com 0% de agregação.

ADC HUMANO

[0269]410 mg de anticorpo anti-CD40 humano (Ab102, Tabela 3) na concentração de aproximadamente 20 mg/ml foram reduzidos com ácido difenilfosfinoacético (2,7 eq) a aproximadamente 4 °C durante a noite. Foi adicionado 2% (v/v) de tampão Tris 2 M (pH 8,5) ao anticorpo parcialmente reduzido, seguido pela adição de 10 eq do produto do Exemplo 28 do Precursor em dimetilsulfóxido. Após conjugação à temperatura ambiente por 3 horas, a mistura foi trocada por tampão em Tris a 20 mM, NaCl a 50 mM, pH 8,0 usando colunas de dessalinização NAP25 e foi ainda purificada por AEC para fornecer o DAR2 (n = 2) e DAR4 (n = 4) componentes do ADC (o número de moléculas ligadas a fármacos depende do número de ligações dissulfeto inter-cadeia reduzidas). Instrumento: AKTA puro; Coluna: 4X Hitrap Q HP 5 ml; Fase móvel: A para Tampão Tris a 20 mM, pH 8,0; B

para tampão Tris 20 a mM, NaCl a 500 mM, pH 8,0; Gradiente: B de 10% a 40% acima de 45 CV; Taxa de fluxo: 5 ml/min; Comprimento de onda: 280 e 260 nm.

CONDIÇÕES DE AEC

[0270]ProPac™ SAX-10, 4 x 250 mm, 10 µm (Thermo Fisher Scientific, Cat nº 054997) à temperatura ambiente; comprimento de onda = 280 nm; tempo de execução = 20 minutos; quantidade de injeção = aproximadamente 20 µg; taxa de fluxo = 1,0 ml/minuto; Fase Móvel A: Tris a 20 mM, pH 8,0; Fase móvel B: Tris a 20 mM, NaCl a 1 M, pH 8,0.

Tabela 13B. Perfil de gradiente		
Tempo (min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0	100	0
16,0	50	50
16,1	0	100
18,0	0	100
18,1	100	0
20,0	100	0

[0271]Os dados de AEC do Exemplo 28 conjugado (humano) são mostrados na Figura 1B (n = 2) e Figura 1D (n = 4), com um tempo de retenção de cerca de 7,5 minutos com agregação de 0% e cerca de 13 minutos com 0 % de agregação, respectivamente.

ESPECTROSCOPIA DE MASSA

[0272]As amostras de ADC foram totalmente reduzidas antes da análise de MS. As condições de espectrometria de massa utilizadas são as seguintes: coluna HPLC = água BEH300 C4, 2,1 x 50 mm, tamanho de partícula de 3,5 microns; Fase móvel A: ácido fórmico a 0,1% em água; Fase móvel B: ácido fórmico a 0,1% em acetonitrila; Taxa de fluxo: 450 µl/min; Gradiente: 0 a 0,6 min, 5% B, 0,6 a 1,1 min 5-90% B, 1,1 a 2,2 min 90% B, 2,2 a 2,4 min, 90-5% B, 2,4 a 3,5 min 5% B; Temperatura

da coluna: 40 °C; Fonte de ionização de MS: ESI.

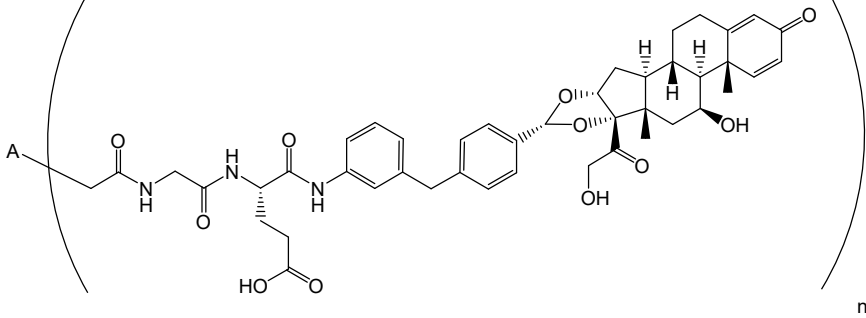
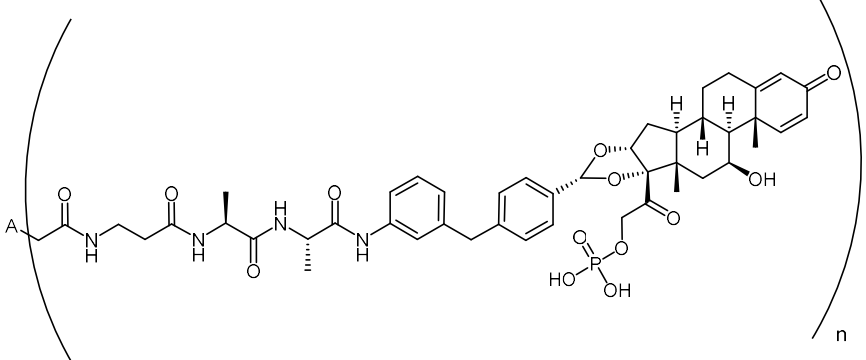
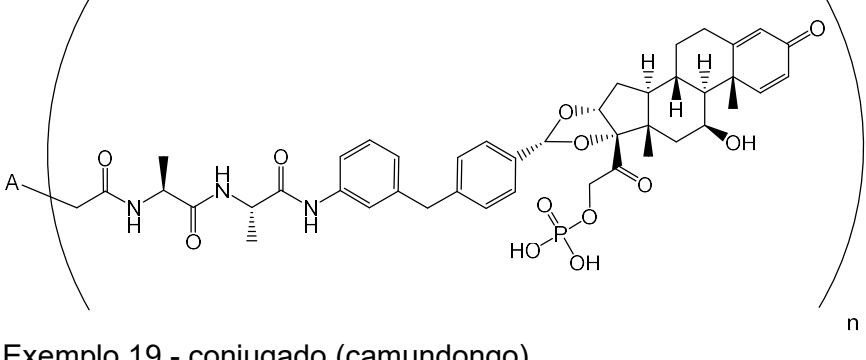
[0273]Os dados de espectroscopia de massa não dissolvida do Exemplo 28-conjugado (humano) são mostrados na Figura 1C (n = 2) e Figura 1E (n = 4).

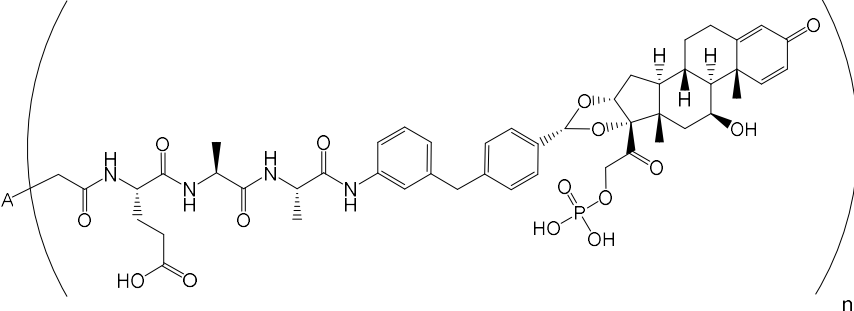
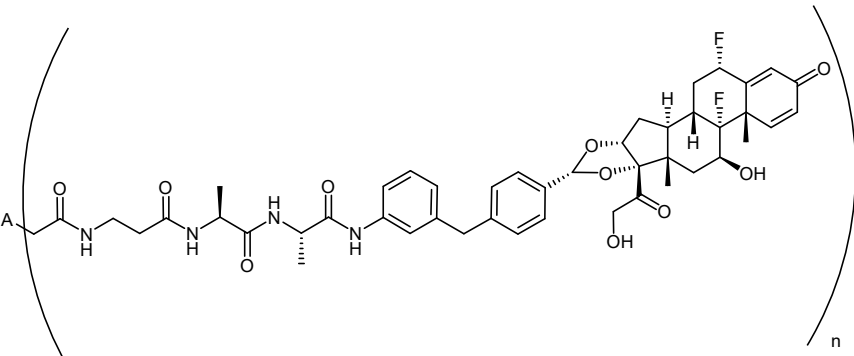
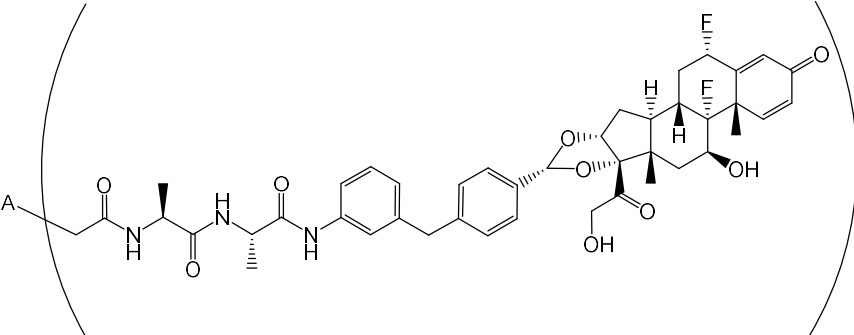
[0274]Para a Figura 1C (n = 2), o pico 25176,72 corresponde à cadeia leve (SEQ ID NO: 2) com uma molécula ligante de fármaco conjugada. O pico 50954,63 corresponde pico para a cadeia pesada (SEQ ID NO: 1) com uma molécula ligante de fármaco conjugada.

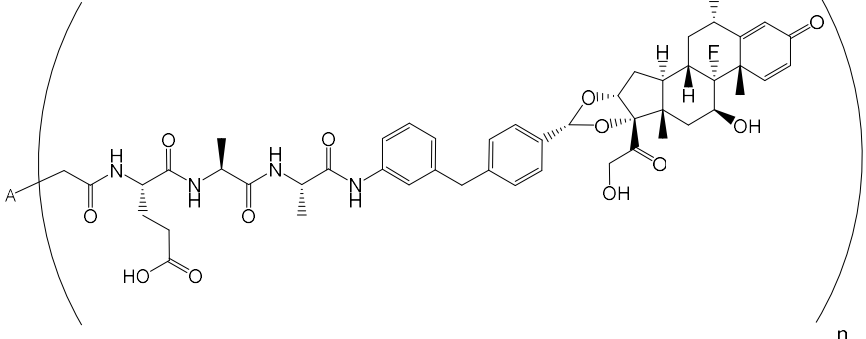
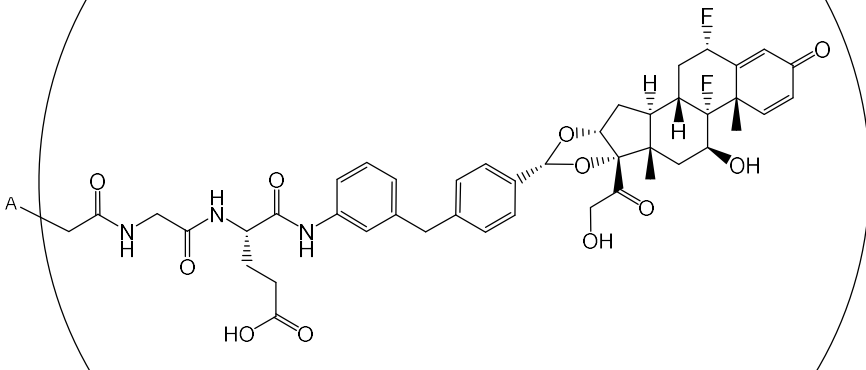
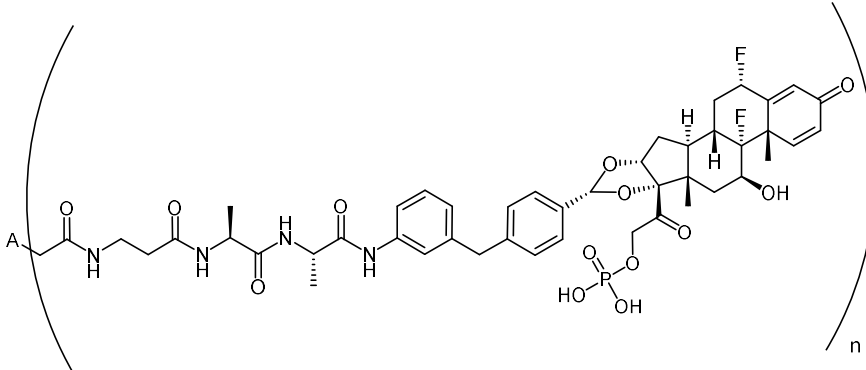
[0275]Para a Figura 1E (n = 4), o pico 25176,88 corresponde à cadeia leve (SEQ ID NO: 2) com uma molécula ligante de fármaco conjugada. O pico 50.954,80 corresponde à cadeia pesada (SEQ ID NO: 1) com um conjugado de molécula ligante de fármaco.

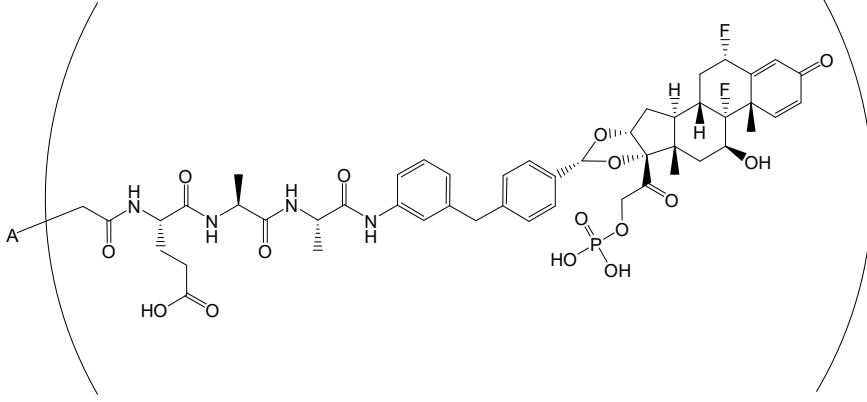
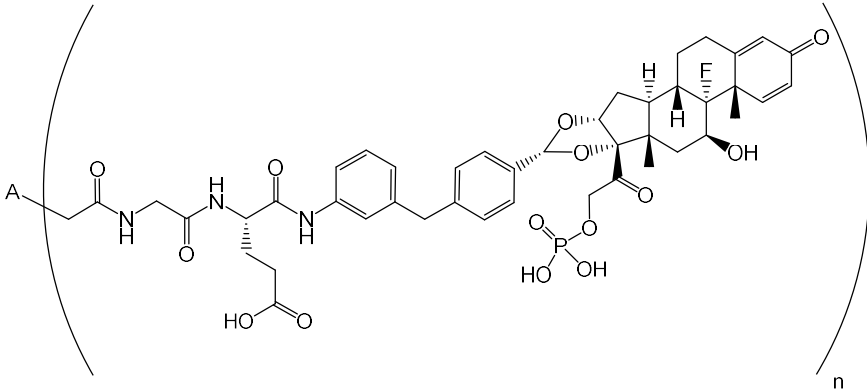
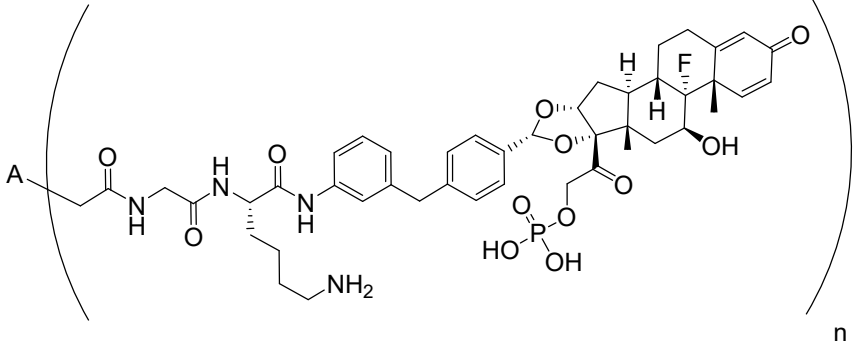
4. PREPARAÇÃO DE ADCS SEGUINDO O PROCEDIMENTO GERAL E OS EXEMPLOS 4 E 28 DE ADCS

[0276]A Tabela 14A fornece conjugados ADC sintetizados de acordo com este método geral, testados a partir de frações de uma população de conjugados ADC (valor DAR fornecido; população compreendendo uma mistura de ADCs, por exemplo, mistura de n = 2, 4 e/ou 6; dados de agregação também). A Tabela 14B fornece conjugados ADC que podem ser sintetizados a partir dos Produtos de Bromo Acetamida dos Exemplos Precursores 14A e vários Precursores listados na Tabela 10, seguindo o Método Geral acima. A variável (A) corresponde ao anticorpo anti-CD40 (humano ou camundongo); n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10. O anticorpo anti-CD40 humano corresponde a Ab102 (Tabela 3). O anticorpo anti-CD40 de camundongo corresponde ao Anticorpo 138 descrito em US 20160347850, incorporado neste documento a título de referência. P = Exemplo de precursor. O anticorpo 138 tem características semelhantes ao Ab102, por exemplo, o anticorpo 138 é um anticorpo antagonista sem atividade agonista substancial como o Ab102. Assim, o anticorpo 138 é representativo da atividade Ab102 em modelos de

17	 <p>Exemplo 17 - conjugado (camundongo) Agregação (%) = <1</p>	3,19
18B	 <p>Exemplo 18B - conjugado (camundongo) Agregação (%) = <1</p>	3,65
19	 <p>Exemplo 19 - conjugado (camundongo) Agregação (%) = <1</p>	3,44

20	 <p>Exemplo 20- conjugado (camundongo) Agregação (%) = <1</p>	3,23
21B	 <p>Exemplo 21B - conjugado (camundongo) Agregação (%) = <1</p>	3,59
22	 <p>Exemplo 22- conjugado (camundongo) Agregação (%) = <1</p>	3,50

23	 <p>Exemplo 23- conjugado (camundongo) Agregação (%) = <1</p>	3,56
24	 <p>Exemplo 24- conjugado (camundongo) Agregação (%) = <1</p>	3,59
25B	 <p>Exemplo 25B - conjugado (camundongo) Agregação (%) = <1</p>	3,31

27	 <p>Exemplo 27 - conjugado (camundongo) Agregação (%) = <1</p>	3,10
36	 <p>Exemplo 36 - conjugado (camundongo) Agregação (%) = <1</p>	3,62
37	 <p>Exemplo 37 - conjugado (camundongo) Agregação (%) = <1</p>	3,44

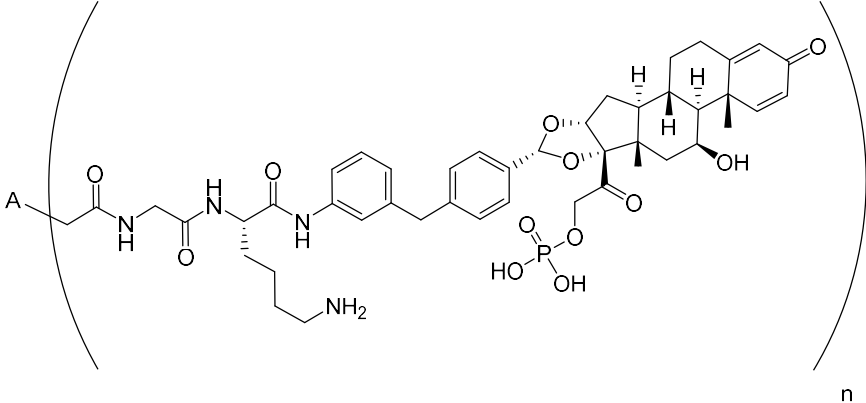
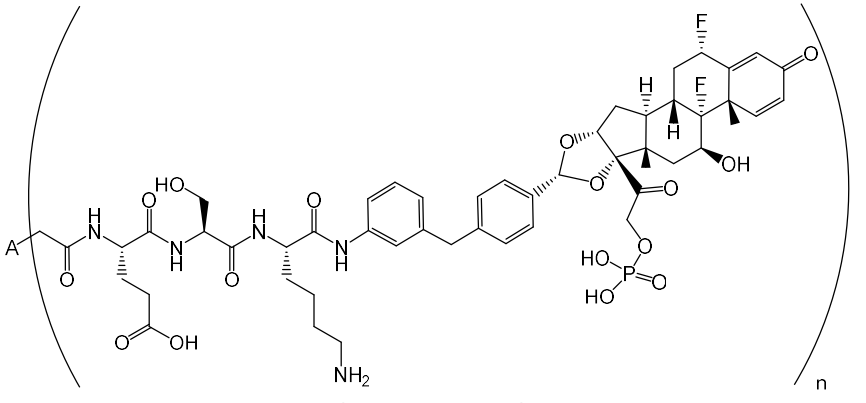
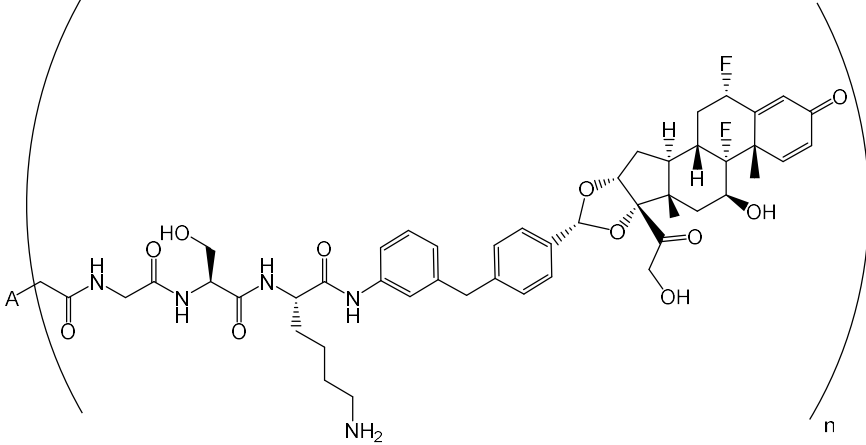
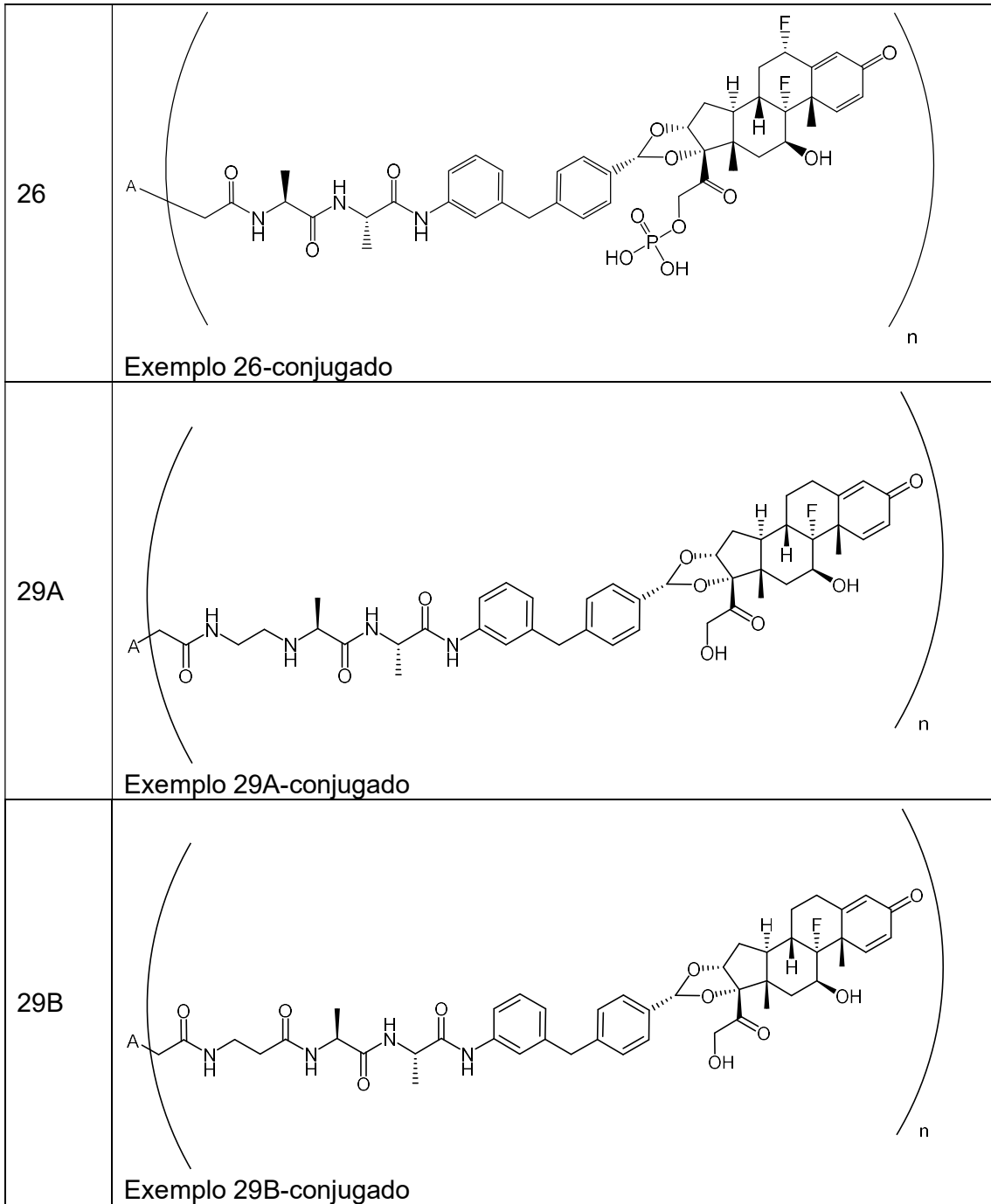
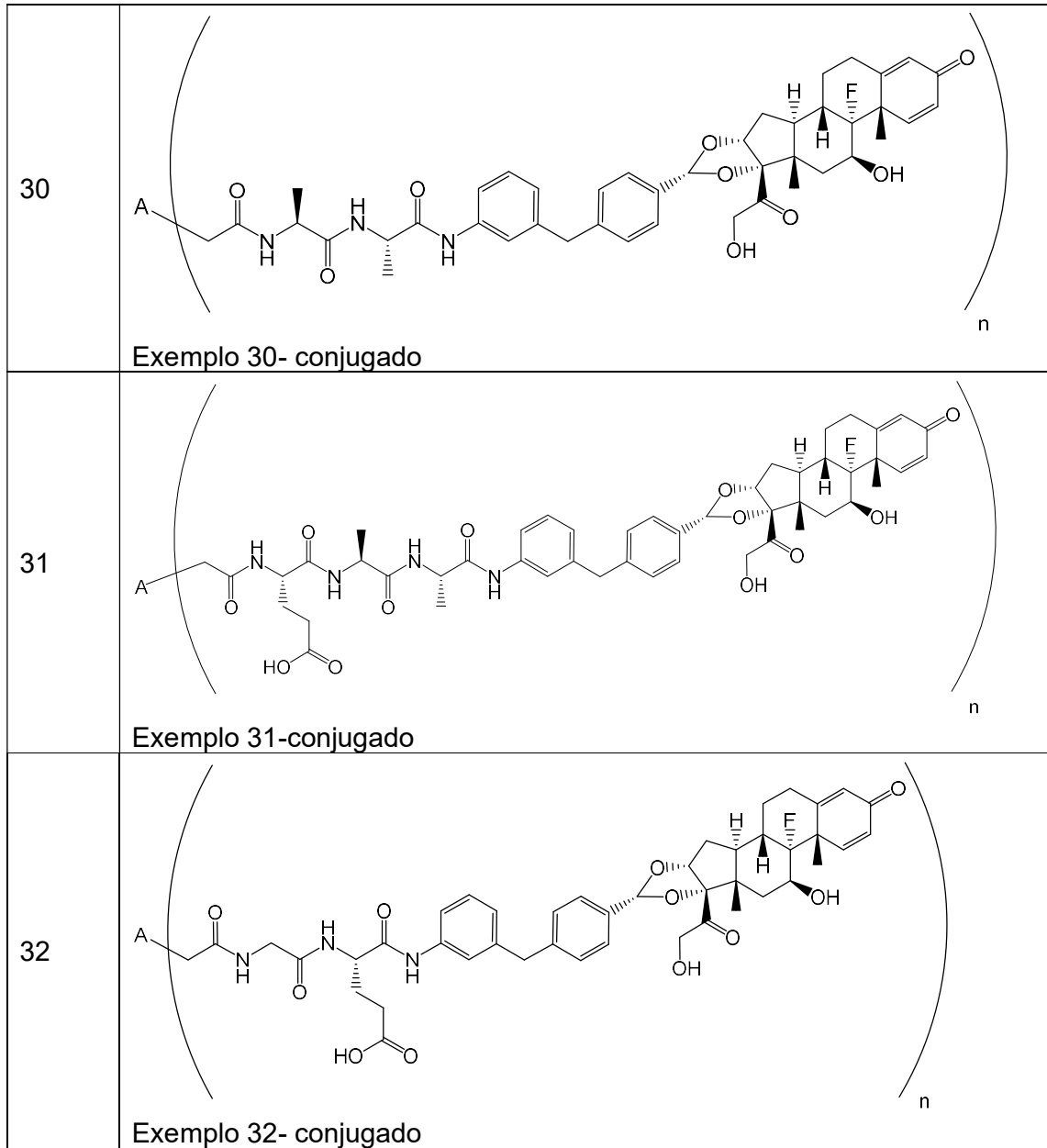
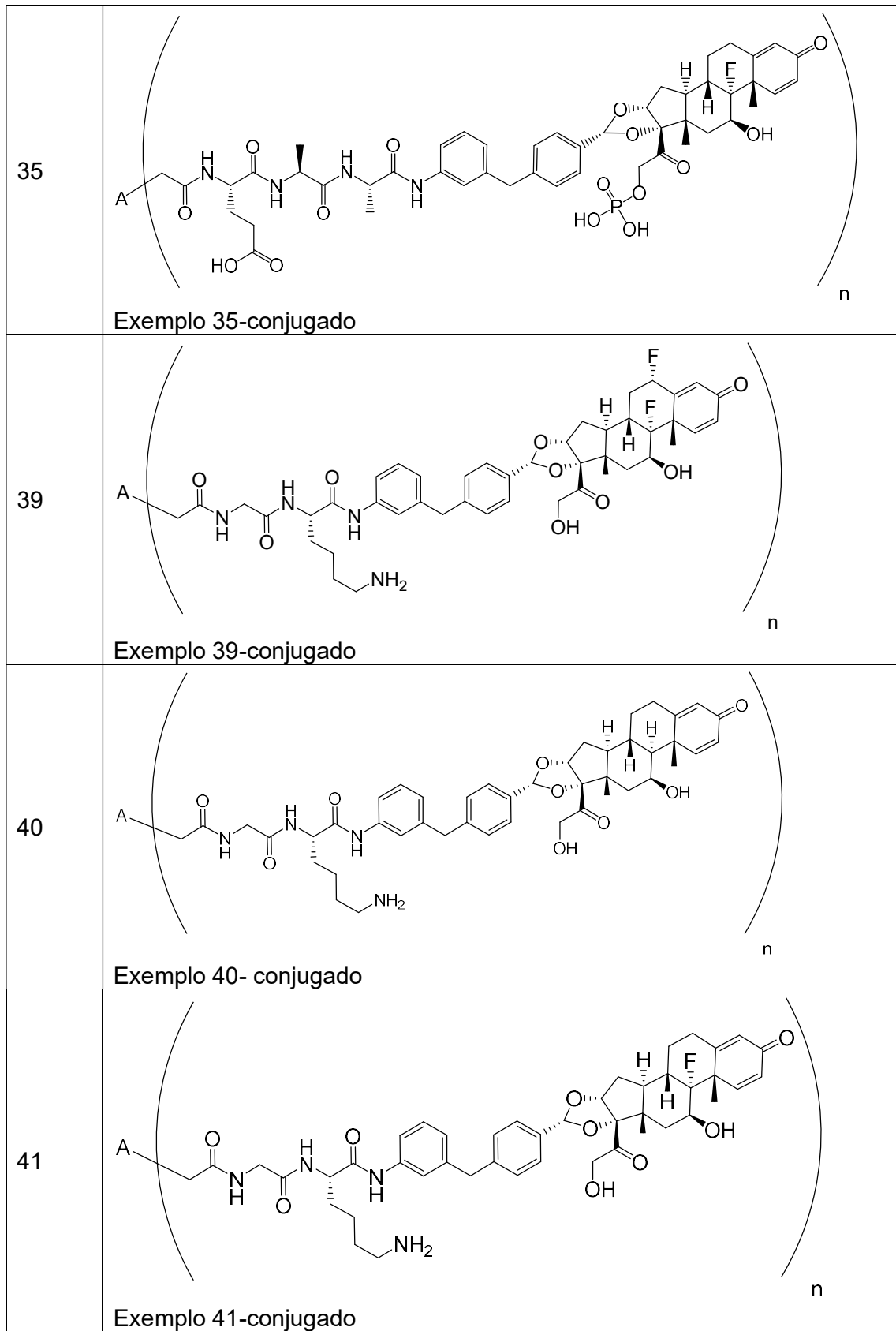
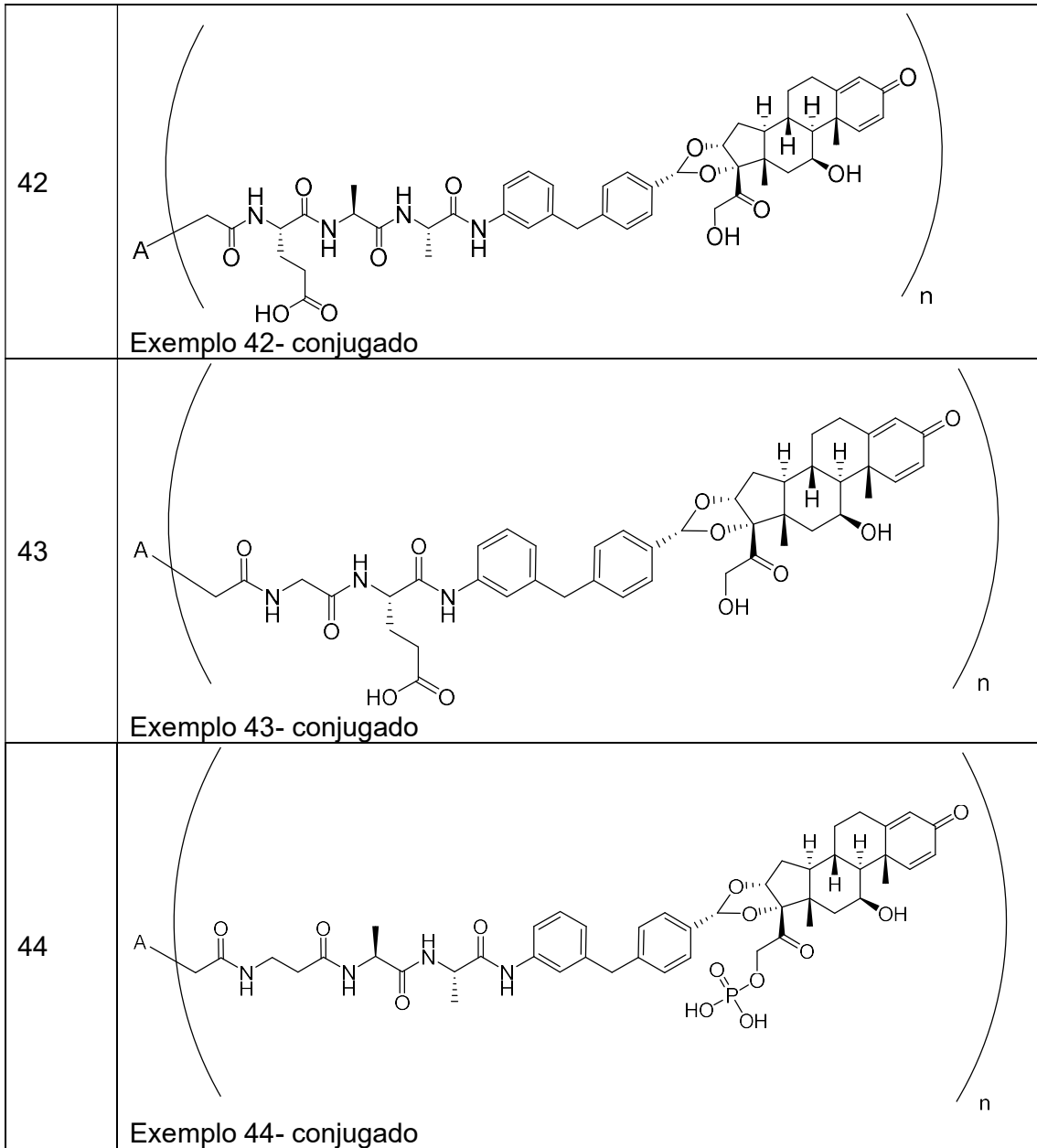
38	 <p>Exemplo 38 - conjugado (camundongo) Agregação (%) = <1</p>	3,45
47	 <p>Exemplo 47 - conjugado (camundongo) Agregação (%) = <1</p>	3,47
48	 <p>Exemplo 48 - conjugado (camundongo) Agregação (%) = 1,7</p>	2,12

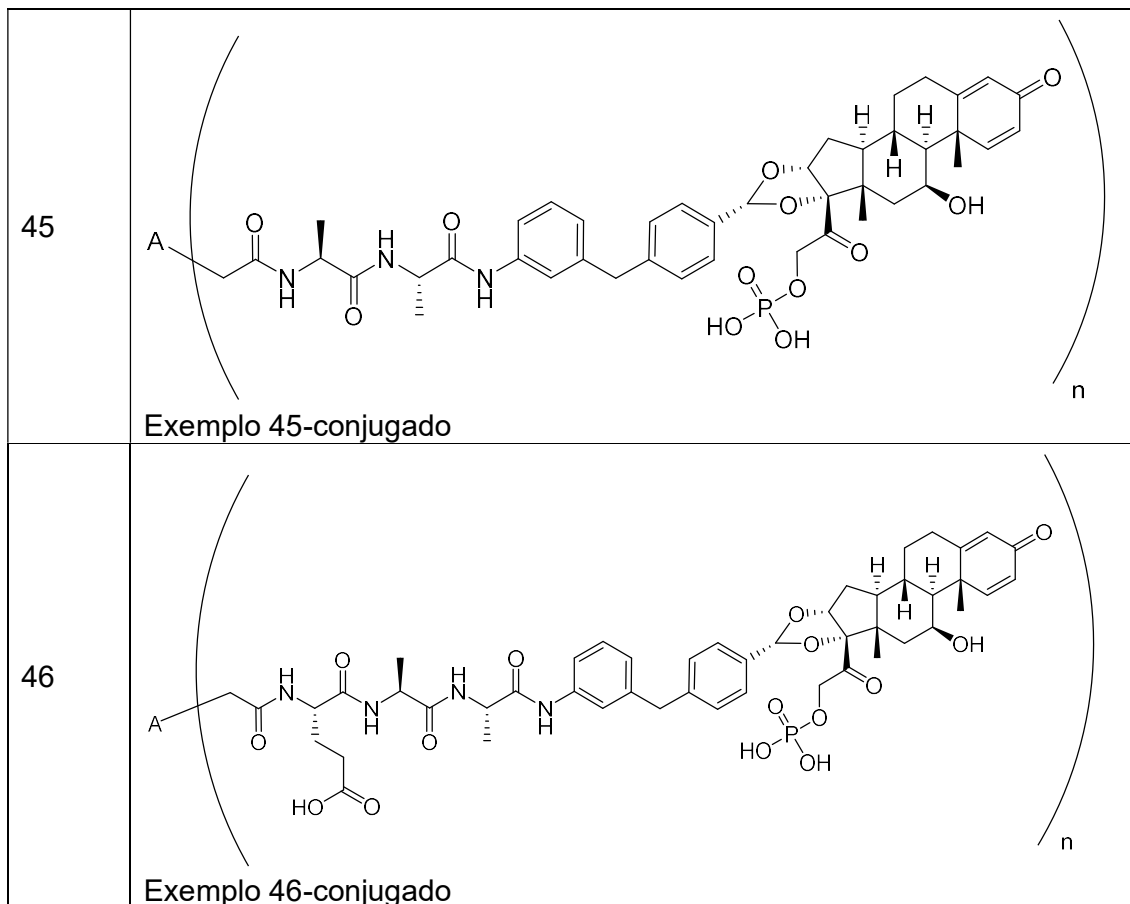
Tabela 14B. ADCs adicionais de bromoacetamida	
14A	
18A	<p>Exemplo 18A-conjugado</p>
21A	<p>Exemplo 21A-conjugado</p>
25A	<p>Exemplo 25A-conjugado</p>











ENSAIOS BIOLÓGICOS

Tabela 15. Abreviações			
MEM	Meios essenciais mínimos	CS FBS	Soro Fetal Bovino Despojado em Carvão
NEAA	Aminoácidos essenciais não	FBS	Soro fetal bovino
RPMI	Roswell Park Memorial Institute	DBP	Ftalato de dibutila
DTT	Ditiotreitol	HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos	CFA	Adjuvante completo de Freund
P1NP	Procolágeno tipo 1 propeptídeo amino-terminal	ACTH	Hormônio adrenocorticotrópico
DBP	Ftalato de dibutila	DTT	Ditiotreitol

EXEMPLO A. GERAÇÃO DE LINHAS DE CÉLULAS REPÓRTERES CD40
GRE HUMANAS E DE CAMUNDONGOS

[0277] Para criar uma linhagem parental, as células HEK293 foram semeadas em uma placa de 6 cavidades (Costar: 3516) com 2 ml de meio de crescimento completo (RPMI, 10% FBS, 1% L-glutamina, 1% Na Piruvato e 1% MEM NEAA) a 250.000 células por cavidade durante 24 horas a 37 °C, 5% de CO₂. No dia seguinte, 3 µg de pGL4.36 [Luc2P/MMTV/Hygro] (Promega: E316) e 3 µl de reagente PLUS (Invitrogen: 10964-021) foram diluídos em 244 µl Opti-MEM (Gibco: 31985-070) e incubados em temperatura ambiente por 15 minutos. O vetor pGL4.36 [Luc2P/MMTV/Hygro] contém MMTV LTR (Repetição Longa do Terminal do Vírus do Tumor Mamário de Murino) que aciona a transcrição do gene repórter luciferase luc2P em resposta à ativação de vários receptores nucleares, como o receptor glicocorticoide e o receptor androgênico. Após a incubação, a solução diluída de DNA foi pré-incubada com solução 1:1 de lipofectamina LTX (Invitrogen: 94756) (13,2 µl + 256,8 µl de Opti-MEM) e incubada à temperatura ambiente por 25 minutos para formar complexos de DNA-lipofectamina LTX. Após a incubação, 500 µl de complexos de DNA-Lipofectamina foram adicionados diretamente às células que contêm a cavidade. Células HEK293 foram transfectadas durante 24 horas a 37 °C, CO₂ a 5%. Após a incubação, as células foram lavadas com 3 ml de solução salina tampão de fosfato (PBS) e selecionadas com meio de crescimento completo contendo 100 µg/ml de higromicina B (Invitrogen: 10687-010) durante duas semanas. As células "HEK293 GRE pGL4.36 [Luc2P/MMTV/Hygro]" foram produzidas.

[0278] Para criar uma linha celular transfectada com CD40 murino, as células HEK293 foram semeadas em uma placa de 6 cavidades (Costar: 3516) com 2 ml de meio de crescimento completo (RPMI, 10% de FBS, 1% de L-glutamina, 1% de piruvato de Na e 1 % MEM NEAA) a 250.000 células por cavidade por 24 h a 37 °, CO₂ a 5%. No dia seguinte, 3 µl de reagente de transfecção FuGENE 6 (Promega:

E2311) foram diluídos em 96 µl de meio RPMI não suplementado e incubados à temperatura ambiente por 5 minutos. Após a incubação, 1 µg de NEF39 muCD40 HA ICD4 (PDL/FACET Biopharma) foi adicionado à mistura de transfecção e incubado à temperatura ambiente por 30 minutos. Após a incubação, a solução diluída de DNA foi adicionada gota a gota à cavidade contendo células a 100 µl por cavidade. Células HEK293 foram transfectadas durante 24 h a 37 °C, CO₂ a 5%. Após a incubação, as células foram lavadas com 3 ml de PBS e selecionadas com meio de crescimento completo contendo 500 µg/ml de G418 (Gibco: 10131-027) por duas semanas. A linha de células resultante foi designada "mCD40_HEK293".

[0279]Para criar uma linha celular repórter CD40 GRE murina, as células HEK293 transfectadas de maneira estável com mCD40 foram semeadas em uma placa de 6 cavidades (Costar: 3516) com 2 ml de meio de crescimento completo (RPMI, 10% FBS, 1% L-glutamina, 1% De piruvato de Na e 1% de MEM NEAA) a 250.000 células por cavidade por 24 h a 37 °, CO₂ a 5%. No dia seguinte, 3 µg de pGL4.36 [Luc2P/MMTV/Hygro] (Promega: E316) e 3 µl de reagente PLUS (Invitrogen: 10964-021) foram diluídos em 244 µl de Opti-MEM (Gibco: 31985-070) e incubados em temperatura ambiente por 15 minutos. Após a incubação, a solução diluída de DNA foi pré-incubada com solução 1:1 de lipofectamina LTX (Invitrogen: 94756) (13,2 µl + 256,8 µl Opti-MEM) e incubada à temperatura ambiente por 25 minutos para formar complexos de DNA-lipofectamina LTX. Após a incubação, 500 µl de complexos de DNA-Lipofectamina foram adicionados diretamente às células contendo a cavidade. Células HEK293 foram transfectadas, durante 24 h a 37 °, CO₂ a 5%. Após a incubação, as células foram lavadas com 3 ml de PBS e selecionadas com meio de crescimento completo contendo 100 µg/ml de higromicina B (Invitrogen: 10687-010) e 500 µg/ml de G418 (Gibco: 10131-027) por duas semanas. A linha celular resultante foi designada "mCD40_HEK293 GRE pGL4.36 [Luc2P/MMTV/Hygro]".

[0280]Para criar uma linha celular repórter CD40 GRE humana, as células

HEK293 pGL4.36 [Luc2P/MMTV/Hygro] foram semeadas em placa de 6 cavidades (Costar: 3516) com 1 ml de meio de crescimento completo (RPMI, 10% FBS, 1 % de L-glutamina, 1% de piruvato de Na e 1% de MEM NEAA) a 250.000 células por cavidade. Em seguida, 3 µg de Transcrição 1 de CD40 humano (marcado com Myc-DDK) (código Origene Cat RC201977) e 3 µl de reagente PLUS (Invitrogen: 10964-021) foram diluídos em 500 µl de Opti-MEM (Gibco: 31985-070). A solução de ADN foi pré-incubada com 1:1 de Lipofectamina solução LTX (Invitrogen: 94756) (11 µl + 500 µl de Opti-MEM) e incubou-se à temperatura ambiente durante 15 minutos, para formar complexos de ADN-lipofectamina LTX. Após a incubação, 1.000 µl de complexos de DNA-lipofectamina foram adicionados diretamente às células contendo a cavidade. HEK293 pGL4.36 [Luc2P/MMTV/Hygro] células foram transfectadas durante 24 h a 37 °, CO₂ a 5%. Após a incubação, as células foram lavadas com 3 ml de PBS e selecionadas com meio de crescimento completo contendo 100 µg/ml de higromicina B (Invitrogen: 10687-010) e 500 µg/ml de G418 (Gibco: 10131-027) por duas semanas. A linha celular resultante foi designada "transcrito hCD40 1_HEK293 GRE pGL4.36 [Luc2P/MMTV/Hygro]".

EXEMPLO B. ATIVIDADE DE ADCS ANTI-CD40 EM ENSAIOS DE REPÓRTER GRE

[0281]As células GRE parentais HEK293 (pGL4.36 [luc2P/MMTV/Hygro]) e as células HEK293 mCD40 ou hCD40 GRE (pGL4.36 [luc2P/MMTV/Hygro]) foram plaqueadas em placas brancas tratadas com cultura de tecidos de 96 cavidades (Costar: 3917) a 20.000 células por cavidade em 75 µl de meio de ensaio (RPMI, 1% CSFBS, 1% L-glutamina, 1% de piruvato de Na e 1% de MEAA) e incubadas por 24h a 37°C, 5% de CO₂. No dia seguinte, as células foram tratadas com 25 µl de 4x de murino diluída em série ou anti-CD40 conjugados de medicamentos anticorpo humanos em meio de ensaio, o composto esteroide, ou meio sozinho e incubaram-se durante 72 horas a 37 °C, 5% de CO₂. Após 72 horas de incubação, as células foram

tratadas com 100 ml de Sistema de Ensaio de Luciferase Dual Glo (Promega-E2920) por 10 minutos e analisadas quanto à luminescência usando o Microbeta (PerkinElmer). Os dados foram analisados usando uma curva de quatro parâmetros ajustada para gerar valores de EC₅₀. A porcentagem (%) de ativação máxima foi normalizada para 100 nM de dexametasona, que foi considerada ativação máxima. Valores de EC₅₀ para cada ADC de CD40 anti-camundongo e CD40 CDC anti-humano fornecidos nas Tabelas 16 e 17, respectivamente.

ADC	n	% de monômero (SEC)	mCD40 GRE EC ₅₀ (µg/ml)	mCD40 GRE (% máx)	HEK293 GRE EC ₅₀ (µg/ml)	HEK293 GRE (% máx)
Exemplo 6 hidrolisado (camundongo)	4	99,4	0,11	84,2	5,7	100
Exemplo 7- hidrolisado (camundongo)	4	100	0,42	82,2	> 50	52,3
Exemplo 12 hidrolisado (camundongo)	2	100	0,15	104	9,79	93
Exemplo 12 hidrolisado (camundongo)	4	100	0,14	108	6,6	96
Exemplo 28 (camundongo)	4	99,8	0,23	118	19,15	83

ADC	n	% de monômero	hCD40 GRE EC ₅₀ (µg/ml)	hCD40 GRE (% máx)	HEK293 GRE EC ₅₀ (µg/ml)	HEK293 GRE (% máx)
Exemplo 12- hidrolisado (humano)	4	98,2	0,19	163	> 17	117
Exemplo 13- hidrolisado (humano)	4	99,8	0,29	67	> 50	27
Exemplo 28 (humano)	2	100	16,5	90	> 50	82

Tabela 17. Atividade <i>in vitro</i> de ADCs anti-CD40 humano no ensaio de repórter de CD40 humano GRE						
ADC	n	% de monômero	hCD40 GRE EC ₅₀ (µg/ml)	hCD40 GRE (% máx)	HEK293 GRE EC ₅₀ (µg/ml)	HEK293 GRE (% máx)
Exemplo 28 (humano)	4	100	0,53	77	> 50	64
Exemplo 4 (humano)	4	100	6,57	88	> 50	21

SEC = medido por cromatografia de exclusão por tamanho

EXEMPLO C. ATIVIDADE DE ANTI-ADC de CD40S EM LIPOPOLISSACARÍDEO E ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE CITOCINA DC DERIVADA DE MONÓCITOS HUMANOS SOLÚVEL E ESTIMULADA POR LIGANTE DE CD40

[0282]As células mononucleares de sangue periférico primárias humanas (PBMC) foram adquiridos a partir de Sanguinária Biosciences, lavou-se em 50 ml de tampão fosfato salino (PBS) (pH 7,2), ressuspensas em 100% de FBS com 5% de DMSO, aliquotadas e criopreservadas em azoto líquido até o uso. As PBMCs foram descongeladas e lavadas em PBS (pH 7,2) com 0,5% de FBS e EDTA a 2 mM. Os monócitos das PBMCs foram enriquecidos por seleção positiva de células CD14 + usando o kit Miltenyi Whole Blood CD14 MicroBeads (Cat nº 130-090-879) e o Miltenyi autoMACS Pro Sepacamundongor de acordo com o protocolo do fabricante. Os monócitos purificados foram lavados e ressuspensos em RPMI suplementado com 10% de FBS, L-glutamina (Gibco Cat nº 25030081), piruvato de sódio (Gibco Cat nº 11360070), solução de aminoácidos não essenciais MEM (Gibco Cat nº 11140050), penicilina -Estreptomicina (Gibco Cat nº 15140122), tampão HEPES (Gibco Cat nº 15630080), 2-mercaptoetanol (Gibco Cat nº 21985023). As células foram transferidas para placas de 6 cavidades (Corning Cat nº 3506) a 1,00E + 06 células por ml e 3 ml por cavidade, e incubadas com 100 ng/ml de rhGM-CSF (R&D Systems, Cat nº 215-GM-010/CF) e 100 ng/ml de rhIL-4 (R & D Systems, Cat nº 204-IL-010/CF) a 37 °C e 5% de CO₂ durante 5 dias para induzir a diferenciação de monócitos em células dendríticas (DC). No dia 5, as DCs derivadas de monócitos semiaderentes (MoDCs)

foram reunidas e a eficiência de sua diferenciação foi confirmada por fenotipagem para células CD14 negativas a CD1a positivas (Biolegend Cat nº 300106, Cat nº 325628) usando citometria de fluxo. Os MoDCs foram lavados e ressuspensos em meio RPMI suplementado e semeados em uma placa de ensaio de células (Costar Cat nº 3799) a $1,0E + 05$ células por cavidade. As células foram estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) (Sigma Cat nº L4391-1MG) a 0,1 ng/ml por 2 horas para induzir a regulação positiva da expressão de CD40 da superfície celular em MoDCs. Após a estimulação, o sobrenadante da cultura foi lavado e as células foram incubadas com concentrações variáveis de anticorpo CD40 anti-humano ou anti-CD40 humanos ADCs a 37 °C e 5% de CO₂ durante 2 horas. As células foram então estimuladas com 0,2 ng/ml de LPS e 0,5 µg/ml de ligante CD40 solúvel (CD40L) (Adipogen Cat nº AG-40B-0010) por 20 horas. Após a incubação, a placa foi centrifugada por cinco minutos a 1200 rpm e 150 µl de meio sobrenadante foram transferidos diretamente para uma placa adicional de 96 cavidades e analisados quanto às concentrações de IL-6 (MSD, nº K151AKB). Os dados de resposta de dose foram ajustadas com uma curva sigmoidal usando regressão não linear, e os valores de IC₅₀ calculado com o auxílio de GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.). Os resultados mostrados na Tabela 18 demonstram que o CD40 anti-humano ADC tem atividade potente na inibição da liberação de citocina pró-inflamatória IL-6 a partir de células imunes primárias ativadas e a diferença de potência entre o Exemplo 13 hidrolisado (humano) e o Exemplo 12-ADCs (humanos) hidrolisadas, em que n é 4, corresponde às diferenças de potência entre os dois compostos de carga útil. A Tabela 18 também fornece resultados semelhantes para ADC conjugado (humano) do Exemplo 28 em que n é 2 e ADC conjugado (humano) do Exemplo 28 em que n é 4. Um exemplo representativo dos resultados mostrados na Figura 2 demonstra que a capacidade máxima de inibir a ativação de células imunes por qualquer um dos Exemplos 13 hidrolisados (humanos) e Exemplo 12 hidrolisados (humanos), em que n é 4, excede a inibição fornecida pelo

anticorpo antagonista parental.

Tabela 18. A atividade <i>in vitro</i> de ADC de CD40 anti-humano em LPS e CD40L humano estimulado ensaio MoDC liberação de citocinas (N = 3)				
Controle ou ADC	% de monômero (SEC)	IL-6 de liberação IC ₅₀ (µg/ml)	Inibição máxima (%)	n
CONTROLE 1 hCD40 mAb	100	0,18	44,5	NA
CONTROLE 2 * Exemplo 12- isótipo hidrolisado (Ab = toxoide antitetânico, isótipo humano) *	97,7	3,3	18,2	4
Exemplo 13- hidrolisado (humano)	99,8	0,14	83,3	4
Exemplo 12- hidrolisado (humano)	98,2	0,04	99,5	4
Exemplo 28 conjugado (humano)	100	0,03	81,8	2
Exemplo 28 conjugado (humano)	100	0,05	87,6	4

* Anticorpos isotípicos são anticorpos que têm como alvo o toxoide tetânico e são usados como controle para o efeito da administração de IgG que não reconhece um antígeno presente no modelo xenoenxerto. Ver, por exemplo, US 20170182179. O acima descrito ADC isótipo humano foi obtido a partir dos domínios variáveis clonadas de um anticorpo humano que reconhece a vacina do toxoide do tétano. Não se espera que este antígeno seja expresso por células humanas *in vitro* ou *in vivo*.

SEC = medido por cromatografia de exclusão por tamanho

EXEMPLO D. ATIVIDADE DE ADCs de CD40 ANTI-CAMUNDONGO NO ENSAIO DE ATIVAÇÃO DE DC DERIVADO DA MEDULA ÓSSEA

[0283]As células da medula óssea de murino (BM) foram extrudidas dos fêmures e tíbias de camundongos C57BL/6 e ressuspensas em meio RPMI suplementado. As células foram transferidas para placas de 6 cavidades (Corning Cat

nº 3506) a $1,00E + 06$ células por ml e 5 ml por cavidade e incubadas com 10 ng/ml de GM-CSF murino (R&D Systems Cat nº 415-ML-010) a 37 °C e 5% de CO₂ por 8 dias. Nos dias 3 e 5 de cultura, 2/3 dos meios de cultura foram substituídos por GM-CSF fresco contendo meio suplementado com 20 ng/ml de IL-4 para induzir diferenciação de células BM em células dendríticas (DCs). Após a incubação, essas DCs derivadas de BM (BMDCs) foram lavadas e ressuspensas em meio RPMI suplementado e plaqueadas em uma placa de ensaio celular (Costar Cat nº 3799). As células foram estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) (Sigma Cat nº L4391-1MG) a 0,1 ng/ml por 2 horas para induzir a regulação positiva da expressão de CD40 da superfície celular em BMDCs. Após a estimulação, o sobrenadante da cultura foi lavado e as células foram incubadas com concentrações variáveis de anticorpo anti-camundongo de CD40 ou Exemplo 6-hidrolisado (camundongo) a 37 °C e 5% de CO₂ durante 2 horas. As células foram então estimuladas com 0,1 ng/ml de LPS e 0,5 µg/ml de ligante CD40 solúvel (CD40L) (Enzo Life Sciences, Inc. Cat nº ALX-522-120-C010) por 20 horas. Em algumas experiências, o tratamento com LPS foi testado em concentrações variáveis (0,1, 1,0, 10 ng/ml), enquanto o CD40L solúvel permaneceu em 0,5 µg/ml. Após a incubação, a placa foi centrifugada por cinco minutos a 1200 rpm e 150 µl de meio sobrenadante foram transferidos diretamente para uma placa adicional de 96 cavidades e analisados quanto às concentrações de IL-6 (MSD, Cat nº K152TXK). Para quantificar a regulação positiva dos marcadores de ativação de DC, as células cultivadas restantes na placa de ensaio foram lavadas, coradas com anticorpo CD86 anti-camundongo (GL-1, Biolegend Cat nº 105018) e avaliadas por citometria de fluxo. Os dados de resposta à dose foram ajustados a uma curva sigmoideal usando regressão não linear, e os valores de IC₅₀ calculados com o auxílio do GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.). Experiências adicionais foram realizadas com o Exemplo 12-hidrolisado (camundongo) e Exemplo 28 (camundongo). Os resultados mostrados na Tabela 19 demonstram que os CDC anti-camundongo

CD40 exibem atividade potente na supressão da regulação positiva da expressão da molécula coestimulante em células imunes primárias ativadas e as diferenças de potência entre os CDM correspondem às diferenças de potência entre as cargas úteis de fármaco ligante. Os resultados mostrados na Figura 3 demonstram que a capacidade máxima para inibir a ativação de células imunes pelo Exemplo 6-hidrolisado (camundongo) excede a inibição fornecida pelo anticorpo antagonista parental.

Tabela 19. Atividade <i>in vitro</i> de anti-camundongo de ADC de CD40 em LPS e CD40L-estimuladas camundongo ensaio de ativação BMDC (N = 3)				
CONTROLE OU ADC	% de monômero (SEC)	Expressão de CD86 IC ₅₀ (µg/ml)	Inibição máxima (%)	n
CONTROLE 1 mCD40 mAb	100	0,13	35,6	NA
CONTROLE 2 * Exemplo 6 - isótipo hidrolisado (Ab = toxoide antitetânico, isótipo de camundongo)	100	1,06	37,5	4
Exemplo 6 hidrolisado (camundongo)	100	0,15	118,4	4
Exemplo 12 hidrolisado (camundongo)	100	0,06	94,2	4
Exemplo 28 (camundongo)	99,8	0,10	90,8	4

* Anticorpos isotípicos são anticorpos que têm como alvo o toxoide tetânico e são usados como controle para o efeito da administração de IgG que não reconhece um antígeno presente no modelo xenoenxerto. Ver, por exemplo, US 20170182179. O ADC isótipo de camundongo acima descrito foi derivado a partir dos domínios variáveis clonadas de um anticorpo de camundongo que reconhece a vacina do toxoide do tétano. Não se espera que este antígeno seja expresso por células de camundongo *in vitro* ou *in vivo*.

SEC = medido por cromatografia de exclusão por tamanho

EXEMPLO E. ATIVIDADE DE ADC DE CD40 ANTI-CAMUNDONGO NO MODELO DE INFLAMAÇÃO AGUDA INDUZIDA POR LPS IN VIVO

[0284]C57BL seis camundongos fêmea/(n = 3) foram doseados por via intraperitoneal com 100 µl de tampão fosfato salino (PBS) (pH 7,2) contendo 1 ug de LPS e ou (1) anticorpo antagonista parental (mCD40 mAb) como controle 1, (2) Exemplo 6-isótipo hidrolisado (Ab = toxoide antitetânico, isótipo de camundongo) (n = 4) ou (3) Exemplo 6-hidrolisado (camundongo) como o ADC (10 mg/kg) (n = 4). Ao fim de 24 horas após a injeção, os baços foram colhidos a partir de camundongos tratados e processados para obter a suspensão de uma só célula a partir de cada camundongo individual. As células foram coradas com os seguintes anticorpos marcados com fluorocromo para populações de células apresentadoras de antígenos específicos para fenótipo usando citometria de fluxo: CD4 PE anti-camundongo (Biolegend Cat nº 100408), CD8 BUV395 anti-camundongo (BD Cat nº 563786), CD19 anti-camundongo PE-Cy7, CD11c anti-camundongo PerCp-Cy5.5, CD11b anti-camundongo BV510, IAIE Pacífico azul de camundongo, IAIE Pacific Blue, CD40 APC de camundongo, CD86 anti-camundongo Alexa-488. As células foram coradas a $1,0E + 07$ células por ml em PBS (pH 7,2) contendo 1% de FBS e reagente de bloqueio de FcR (BD, Cat nº 553142). A frequência total de células dendríticas ativadas (CD) por baço foi calculada e plotada com o auxílio do GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.). Os resultados mostrados na Figura 4 demonstram que o ADC de CD40 exibe maior eficácia na supressão da ativação de DC *in vivo* do que o anticorpo antagonista parental ou isótipo ADC.

EXEMPLO F. ATIVIDADE DE CDC ANTI-CAMUNDONGO CD40 NO MODELO DE HIPERSENSIBILIDADE RETARDADA DO TIPO IV

[0285]As CDC anti-CD40 de camundongo foram avaliadas em um modelo de hipersensibilidade aguda tardia tipo IV (DTH). Resposta inflamatória aguda da pele

provocada por células da pele provocada pela reexposição ao antígeno de proteína sensibilizada (BSA). A eficácia dos CDC anti-CD40 de camundongo foi medida pela capacidade de inibir o inchaço da pata.

[0286]Camundongos fêmeas C57BL/6 foram doseados por via intraperitoneal no Dia -1 com (1) mAb mCD40 como Controle 1; (2) Exemplo 12- isótipo hidrolisado (Ab = antitoxoide do tétano, isótipo camundongo) como controlo 2 (n = 4); ou (3) Exemplo 12 hidrolisado (camundongo) como ADC (n = 4). No dia 0, os camundongos foram sensibilizados via imunização usando 200 µg de BSA metilado (Sigma-Aldrich, Cat nº 1009) emulsionado em CFA H37Ra (Becton Dickenson, Cat nº 231131). No dia 7, a espessura da linha de base de ambas as patas traseiras foi medida. Almofada da pata direita foi desafiada com 100 µg mBSA em tampão fosfato salino (PBS), enquanto que a almofada da pata esquerda foi tratado com PBS sozinho. 24 horas após o desafio, as patas traseiras foram avaliadas quanto ao edema das patas usando pinças de mola Dyer (Dyer 310-115) e as alterações na espessura em relação à linha de base são plotadas na Figura 5A. Após a medição do inchaço da pata, os camundongos foram injetados com ACTH a 1 mpk IP e sangrados terminalmente 30 minutos após o ACTH. O plasma foi coletado e analisado quanto aos níveis de P1NP, corticosterona, esteroide livre e moléculas grandes. Os dados na Figura 5A demonstram a eficácia aprimorada do ADC de CD40 para inibir mais potentemente a inflamação mediada por células T *in vivo* do que o anticorpo antagonista parental ou o ADC não direcionado sozinho.

[0287]A atividade do ADC de CD40 anti-camundongo consistindo no Exemplo 28 conjugado (camundongo) com CD40 anti-camundongo ou isótipo (Ab = antioalbumina, isótipo camundongo) também foi avaliada no ensaio DTH seguindo o procedimento descrito acima. A Figura 5B demonstra uma eficácia melhorada do ADC de CD40 para inibir *in vivo* a inflamação mediada por células T do que o anticorpo antagonista parental ou o ADC não alvo sozinho.

EXEMPLO G. BIOMARCADORES ESTEROIDES NO MODELO DE INFLAMAÇÃO DTH

1. PLASMA P1NP

[0288]A quantificação do P1NP plasmático foi realizada em uma plataforma de LC/MS baseada em digestão de proteína

tripsina. As amostras de plasma foram parcialmente precipitadas e completamente reduzidas adicionando-se a mistura MeCN/bicarbonato de amônio 0,1 M/DTT. O sobrenadante foi coletado e alquilado por adição de ácido iodoacético. As proteínas alquiladas foram digeridas por tripsina e os peptídeos trípticos resultantes foram analisados por LC/MS.

[0289]As curvas de calibração foram geradas usando peptídeo sintético tríptico cravado no soro de cavalo (matriz substituta não interferente). O peptídeo flanqueador marcado com isótopo estável (extensão de 3-6 aminoácidos em ambos os terminais do peptídeo tríptico) foi usado como padrão interno adicionado à mistura de precipitação de proteínas MeCN/DTT para normalizar a eficiência da digestão e a injeção de LC/MS. Foi utilizada a coluna Columnex Chromenta BB-C18, coluna de 2,1 x 150 mm, 5 µm para a separação por cromatografia. A fase móvel A foi de ácido fórmico a 0,1% em água Milli Q HPLC e a fase móvel B foi de ácido fórmico a 0,1% em MeCN. Um gradiente linear de 2% da fase móvel B a 65% da fase móvel B foi aplicado de 0,6 a 3 min. O tempo total de execução foi de 8 minutos a uma taxa de fluxo de 0,45 ml/min,. Um espectrômetro de massa AB Sciex 4000Qtrap foi usado no modo MRM positivo para quantificar peptídeos P1NP, na temperatura da fonte de 700 °C.

2. ESTEROIDE LIVRE LIBERADO E CORTICOSTERONA ENDÓGENA

[0290]A curva de calibração do esteroide foi preparada no plasma de camundongo com concentrações finais de

0,03 nM a 0,1 µM em 8 níveis de concentração diferentes. Curva de calibração

de corticosterona variando de 0,3

nM a 1 uM final de concentrações de corticosterona foi preparado em 70 mg/ml de albumina de soro bovino em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Uma solução de 160 µl de MeCN com ácido fórmico a 0,1% foi adicionada a 40 µl de amostras de plasma ou padrões de calibração. Os sobrenadantes foram diluídos com água destilada e 30 µl de solução final da amostra foram injetados para análise por LC/MS

[0291]A quantificação do esteroide livre liberado e da corticosterona foi realizada em um espectrômetro de massa triplo quádruplo AB Sciex 5500 conectado a um sistema HPLC Shimadzu AC20 em interface com uma fonte de ionização por eletropulverização operando no modo positivo. A Waters XBridge BEH C18, 2,1 x 30mm, coluna de 3,5 µm foi usada para a separação por cromatografia. A fase móvel A foi de ácido fórmico a 0,1% em Milli A água de HPLC Q e a fase móvel B eram ácido fórmico a 0,1% em MeCN. Um gradiente linear de 2% de fase móvel B a 98% da fase móvel B foi aplicada de 0,6 a 1,2 minuto. O tempo total de execução foi de 2,6 min. a uma taxa de fluxo de 0,8 ml/min. O espectrômetro de massa foi operado no modo MRM positivo na temperatura fonte de 700 °C. Os dados da Tabela 20 demonstram que o tratamento com ADC no modelo DTH não afeta significativamente os níveis séricos de biomarcadores esteroides, P1NP e corticosterona.

Tabela 20. Efeito da atividade de ADC de CD40 anti-camundongo ADC em biomarcadores de esteroides			
Controle/ADC	n	P1NP (ng/ml ± DP)	Corticosterona (ng/ml ± DP)
Veículo	4	1.294 ± 183	292,832 ± 40
Exemplo 12 hidrolisado (camundongo), 10 mpk	4	1.096,4 ± 306	312,526 ± 46
Exemplo 12 hidrolisado (camundongo), 3 mpk	4	1.486,6 ± 313	332,304 ± 27
Exemplo 12 hidrolisado (camundongo), 1 mpk	4	1.255,4 ± 318	303,742 ± 40
Exemplo 12 hidrolisado (camundongo), 0,3 mpk	4	1.736 ± 197	271,182 ± 83

Tabela 20. Efeito da atividade de ADC de CD40 anti-camundongo ADC em biomarcadores de esteroides					
Controle/ADC			n	P1NP (ng/ml \pm DP)	Corticosterona (ng/ml \pm DP)
Exemplo	12	hidrolisado	4	1.311,2 \pm 418	282,856 \pm 43
(camundongo), 0,1 mpk					

EXEMPLO H. ATIVIDADE DO IMUNOCONJUGADO CD40 ANTI-CAMUNDONGO NA ARTRITE INDUZIDA POR COLÁGENO (CIA)

[0292]A capacidade do ADC Exemplo 6-hidrolisado (camundongo) de impactar a doença foi avaliada no modelo de artrite induzida por artrite induzida por colágeno (CIA).

[0293]Nestas experiências, os camundongos machos DBA/1J foram obtidos da Jackson Labs (Bar Harbor, ME). Os camundongos foram utilizados com 6 a 12 semanas de idade. Todos os animais foram mantidos em temperatura e umidade constantes sob um ciclo claro/escuro de 12 horas e alimentados com ração para roedores (Lab Diet 5010 PharmaServ, Framingham, MA) e água ad libitum. A AbbVie é credenciada pela AAALAC (Associação para Avaliação e Acreditação de Cuidados com Animais de Laboratório) e todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê Institucional de Uso e Cuidados com Animais (IACUC) e monitorados por um veterinário assistente. O peso e a condição corporal foram monitorados e os animais foram sacrificados se exibissem > 20% de perda de peso.

[0294]Os camundongos machos DBA/J foram imunizados por via intradérmica (id) na base da cauda com 100 μ l de emulsão contendo 100 μ g de colágeno bovino tipo II (MD Biosciences) dissolvido em ácido acético 0,1 N e 200 μ g de Mycobacterium tuberculosis inativado pelo calor H37Ra (Adjuvante completo de Freund, Disco, Laurence, KS). Vinte e um dias após a imunização com colágeno, os camundongos foram reforçados IP com 1 mg de Zymosan A (Sigma, St. Louis, MO) em solução salina tampão de fosfato (PBS). Após o aumento, os camundongos foram monitorados 3 a 5 vezes por semana em busca de artrite. As patas traseiras foram avaliadas quanto ao inchaço das patas usando pinças de mola Dyer (Dyer 310-115).

[0295]Os camundongos foram matriculados entre os dias 24 e 28 nos primeiros sinais clínicos da doença e distribuídos em grupos de gravidade artrítica equivalente. O tratamento terapêutico precoce começou no momento da inscrição.

[0296]Os animais foram doseados intraperitonealmente com anticorpo antagonista CD40 anti-camundongo a 10 mg/kg ou ADC Exemplo 6-hidrolisado (camundongo) (n = 4) em solução salina a 0,9%. O sangue foi coletado para a exposição do anticorpo pelo rabo da cauda às 24 e 72 horas após a dose. As patas foram coletadas no ponto terminal do tempo para histopatologia. O sangue foi coletado no momento terminal por punção cardíaca para hemogramas completos (Sysmex XT-2000iV). A significância estatística foi determinada pela ANOVA. Exemplo 6- isótipo hidrolisado (Ab = antitoxoide do tétano, isótipo camundongo) (n = 4) e anti-mCD40 mAb parental foram utilizados como controles 1 e 2. Os resultados mostrados na Figura 6 demonstram que uma dose única de ADC esteroide CD40 anti-camundongo pode exibir uma duração de ação prolongada através da melhoria do inchaço da pata por aproximadamente 6 semanas em comparação com os controles 1 e 2.

INCORPORAÇÃO POR REFERÊNCIA

[0297]Todas as publicações, incluindo patentes e aplicativos publicados, mencionados na Descrição Detalhada e nos Exemplos, são incorporados neste documento a título de referência em sua totalidade.

OUTRAS MODALIDADES

[0298]O precedente foi descrito de certas modalidades não limitativas da presente divulgação. Aqueles versados na técnica observarão que várias alterações e modificações nesta descrição podem ser feitas sem se afastar do espírito ou do escopo da presente divulgação, conforme definido nas reivindicações a seguir.

AA1, AA2 e AA3 são selecionados independentemente a partir do grupo que consiste em Alanina (Ala), Glicina (Gly), Isoleucina (Ile), Leucina (Leu), Prolina (Pro), Valina (Val), Fenilalanina (Phe), Triptofano (Trp), Tirosina (Tyr), Ácido aspártico (Asp), Ácido glutâmico (Glu), Arginina (Arg), Histidina (His), Lisina (Lys), Serina (Ser), Treonina (Thr), Cisteína (Cys), Metionina (Met), Asparagina (Asn) e Glutamina (Gln);

m é 0 ou 1;

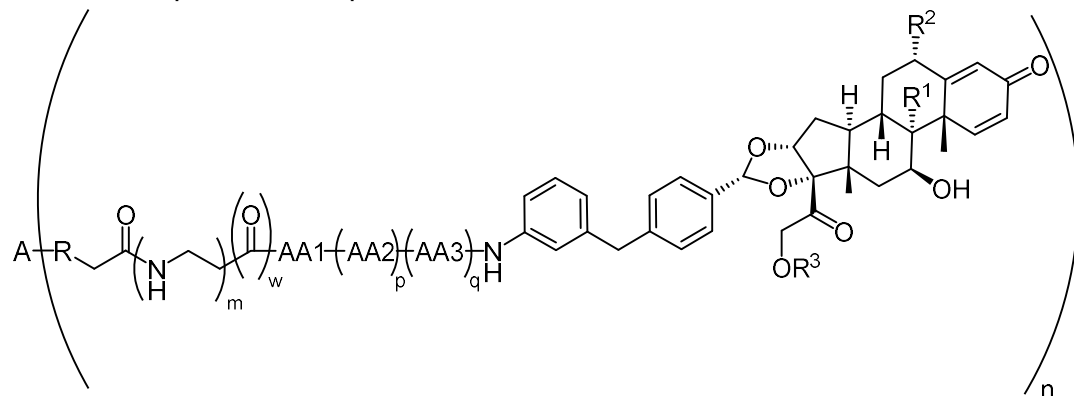
w é 0 ou 1;

p é 0 ou 1; e

q é 0 ou 1.

2. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com a reivindicação 1,

CHARACTERIZADO pelo fato de que é de acordo com a fórmula:



em que A é o anticorpo anti-CD40 e n é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10.

3. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com a reivindicação 1 ou 2,

CHARACTERIZADO pelo fato de que R¹ é hidrogênio e R² é hidrogênio.

4. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com a reivindicação 1 ou 2,

CHARACTERIZADO pelo fato de que R¹ é flúor e R² é hidrogênio.

5. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com a reivindicação 1 ou 2,

CHARACTERIZADO pelo fato de que R¹ é flúor e R² é flúor.

6. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que R³ é -P(=O)(OH)₂.

7. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que R³ é hidrogênio.

8. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- é selecionado a partir do grupo que consiste em -Gly-Glu-; -Ala-Ala-; -Glu-Ala-Ala-; -Gly-Lys-; -Glu-; -Glu-Ser-Lys-; e -Gly-Ser-Lys-.

9. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- é selecionado a partir do grupo que consiste em -Gly-Glu-; -Gly-Lys-; -Glu-Ser-Lys-; e -Gly-Ser-Lys-.

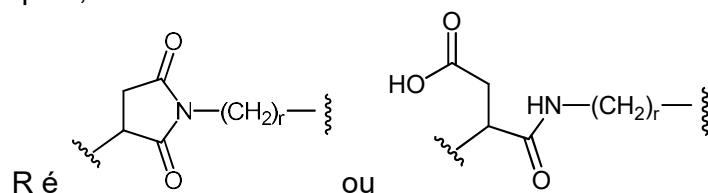
10. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com a reivindicação 9, **CARACTERIZADO** pelo fato de que -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- é -Gly-Glu- ou -Gly-Lys-.

11. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com a reivindicação 9, **CARACTERIZADO** pelo fato de que -AA1-(AA2)_p-(AA3)_q- é -Glu-Ser-Lys- ou -Gly-Ser-Lys-.

12. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que:

m é 0;

q é 0; e



13. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que:

m é 0 ou 1;

p é 1; e

R é uma ligação.

14. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8 ou 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que R é uma ligação, p é

1, m é 0, W é 0, e q é 0.

15. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8 ou 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que R é uma ligação, p é 1, m é 0, w é 0 e q é 1.

16. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que m é 1; w é 1; e q é 0.

17. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que m é 0.

18. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é selecionado a partir do grupo que consiste em compostos listados na Tabela 5, em que n é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10.

19. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é selecionado a partir do grupo que consiste no Exemplo 4-conjugado, Exemplo 28-conjugado e Exemplo 47-conjugado.

20. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é selecionado a partir do grupo que consiste em compostos listados na Tabela 6A, em que n é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10.

21. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é selecionado a partir do grupo que consiste no Exemplo 6-conjugado, Exemplo 7-conjugado, Exemplo 12-conjugado e Exemplo 13-conjugado.

22. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é selecionado a partir do grupo que consiste em compostos listados na Tabela 6B, em que n é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10.

23. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é selecionado a partir do grupo que consiste no Exemplo 6-hidrolisado, Exemplo 7-hidrolisado, Exemplo 12-hidrolisado e Exemplo 13-

hidrolisado.

24. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com a reivindicação 23, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é selecionado a partir do grupo que consiste no Exemplo 12-hidrolisado e no Exemplo 13-hidrolisado.

25. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, **CARACTERIZADO** pelo fato de que n é 2, 4, 6 ou 8.

26. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com a reivindicação 25, **CARACTERIZADO** pelo fato de que n é 2.

27. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com a reivindicação 25, **CARACTERIZADO** pelo fato de que n é 4.

28. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é o Exemplo 47-conjugado em que n é 2.

29. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é o Exemplo 47-conjugado em que n é 4.

30. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é o Exemplo 28-conjugado em que n é 2.

31. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é o Exemplo 28-conjugado em que n é 4.

32. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 31, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada apresentada como SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia leve apresentada como SEQ ID NO: 6.

33. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 31, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo compreende uma cadeia pesada apresentada como SEQ ID NO: 3.

34. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 31, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo compreende

uma cadeia leve apresentada como SEQ ID NO: 4.

35. Conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 31, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo compreende uma cadeia pesada apresentada como SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve apresentada como SEQ ID NO: 4.

36. Composição farmacêutica **CHARACTERIZADA** pelo fato de que compreende o conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 35, e um carreador farmacêuticamente aceitável.

37. Método para tratar uma afecção selecionada a partir do grupo que consiste em doença inflamatória do intestino (DII), lúpus eritematoso sistêmico (LES), esclerose múltipla, artrite reumatoide, síndrome de Sjogren e hidradenite supurativa (HS), em um sujeito em necessidade da mesma, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar uma quantidade eficaz do conjugado de anticorpo-fármaco, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 35, ou composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 36, ao sujeito.

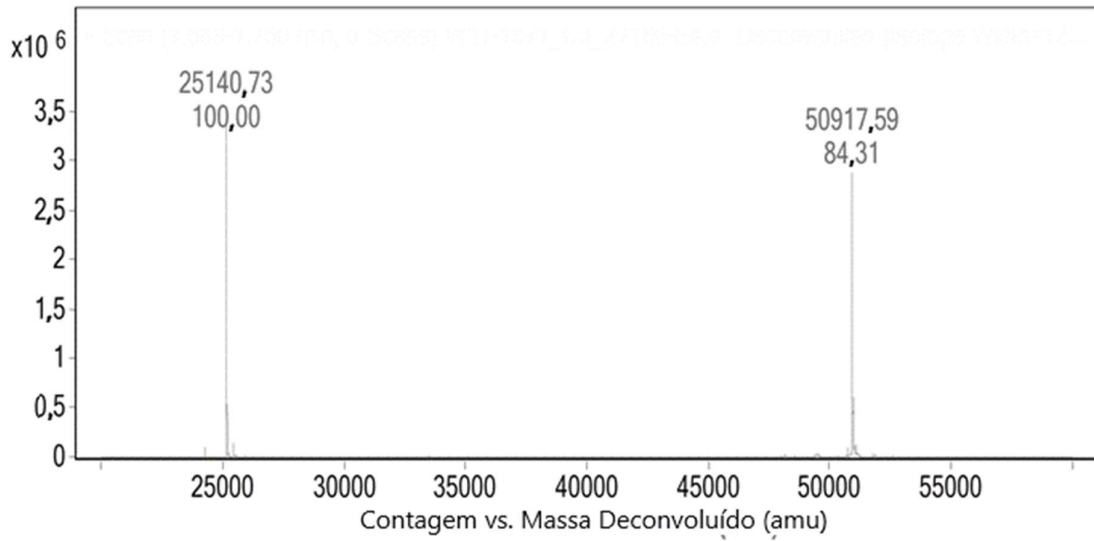


FIG. 1A

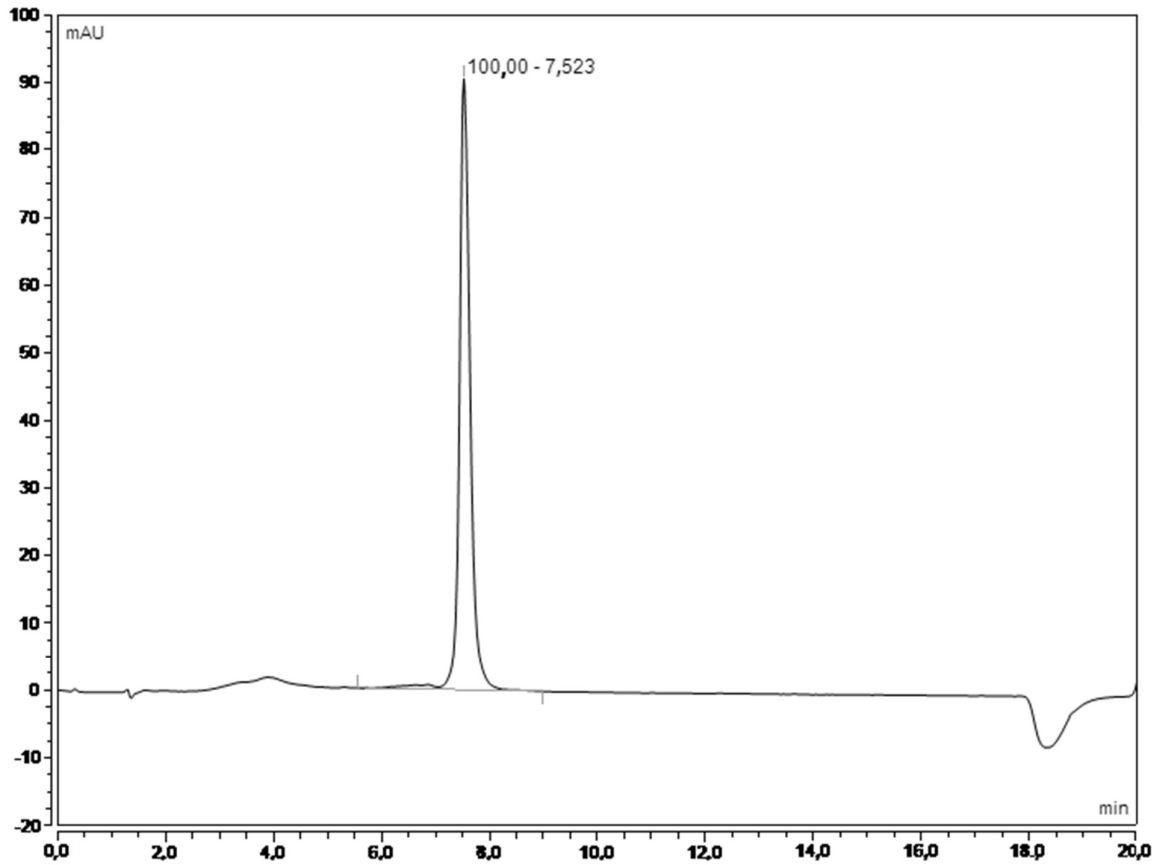


FIG. 1B

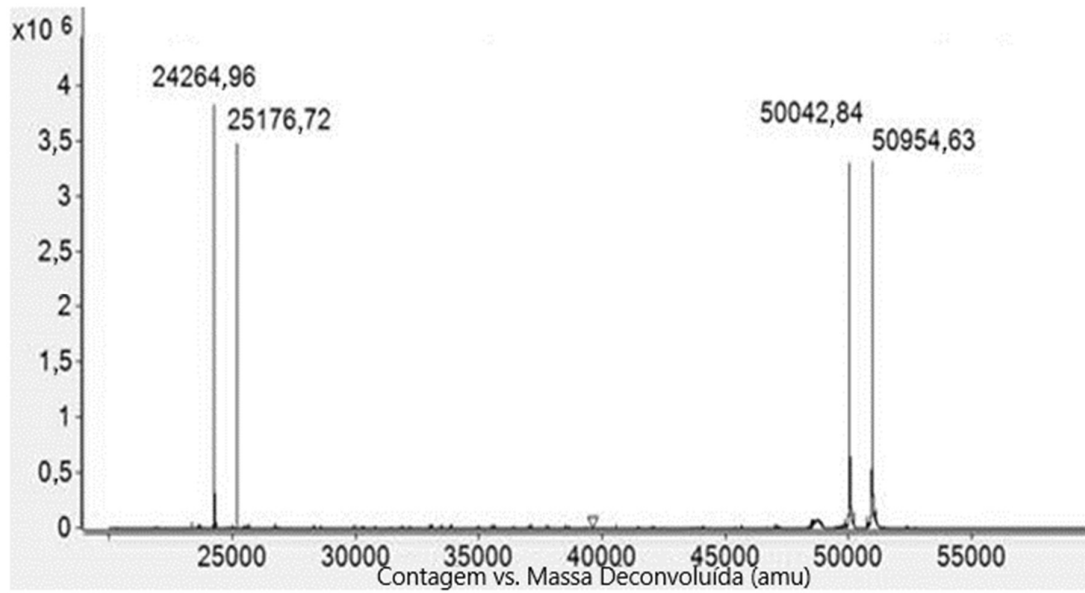


FIG. 1C

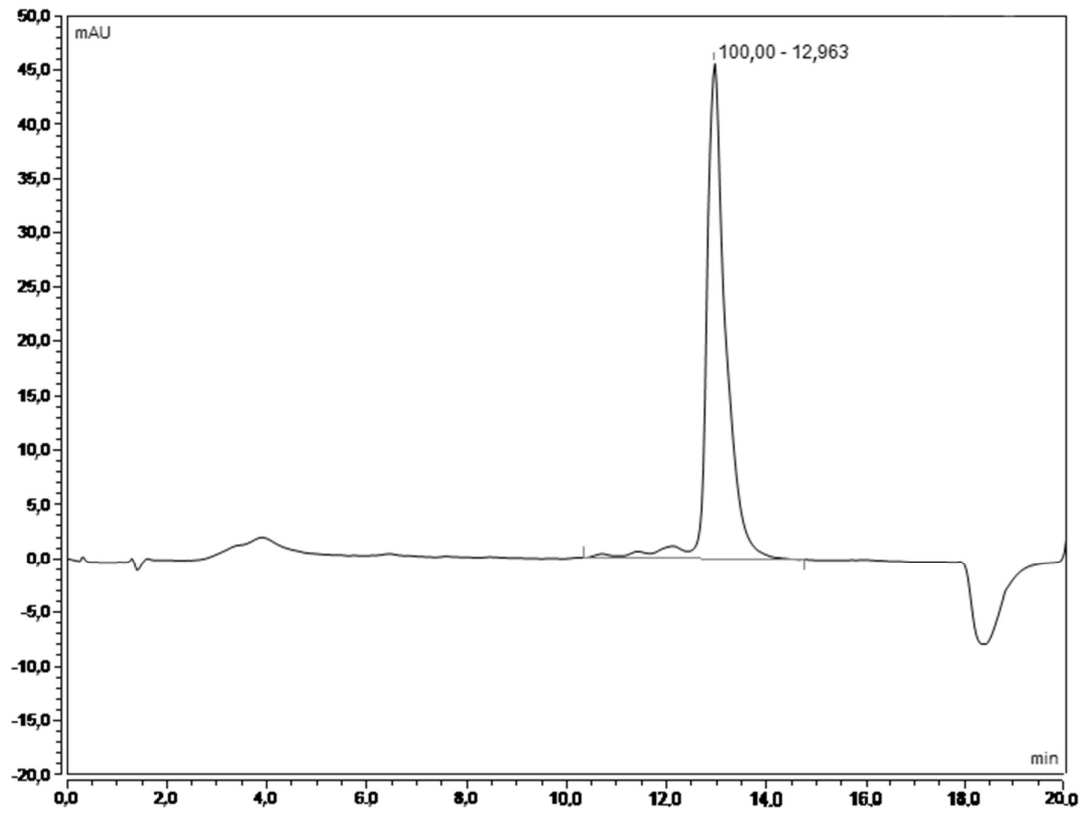


FIG. 1D

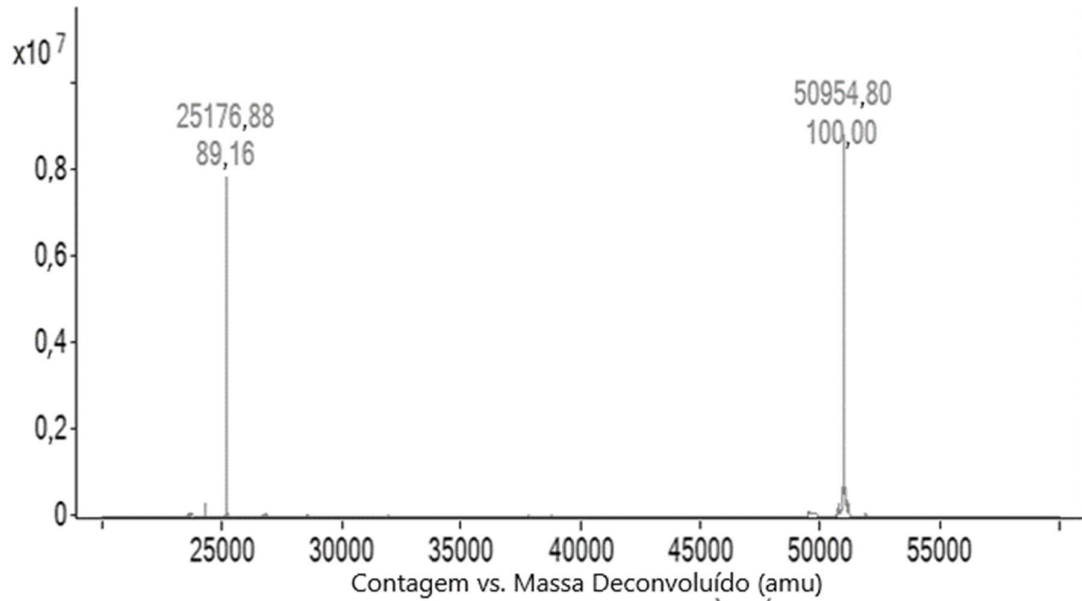


FIG. 1E

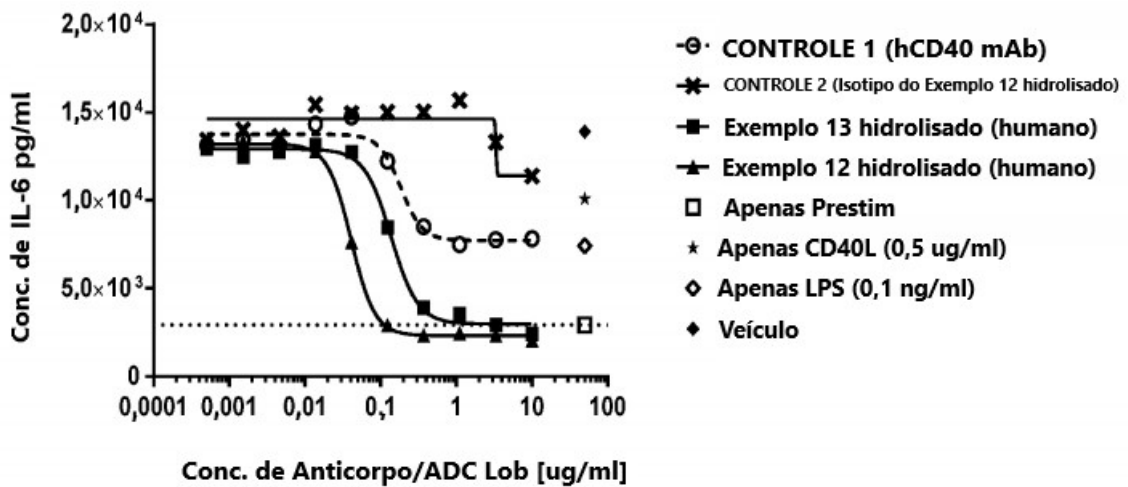


FIG. 2

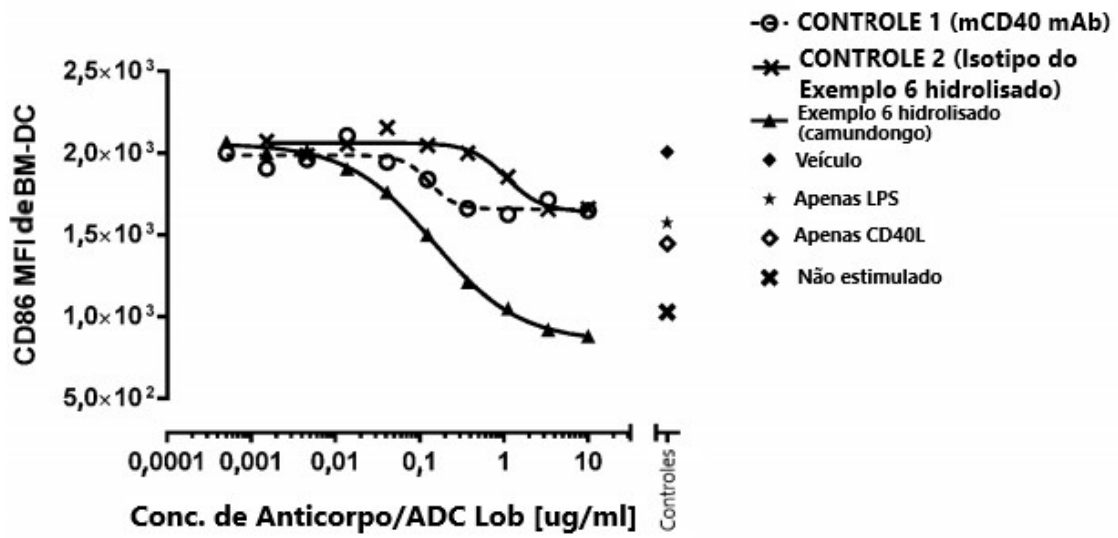


FIG. 3

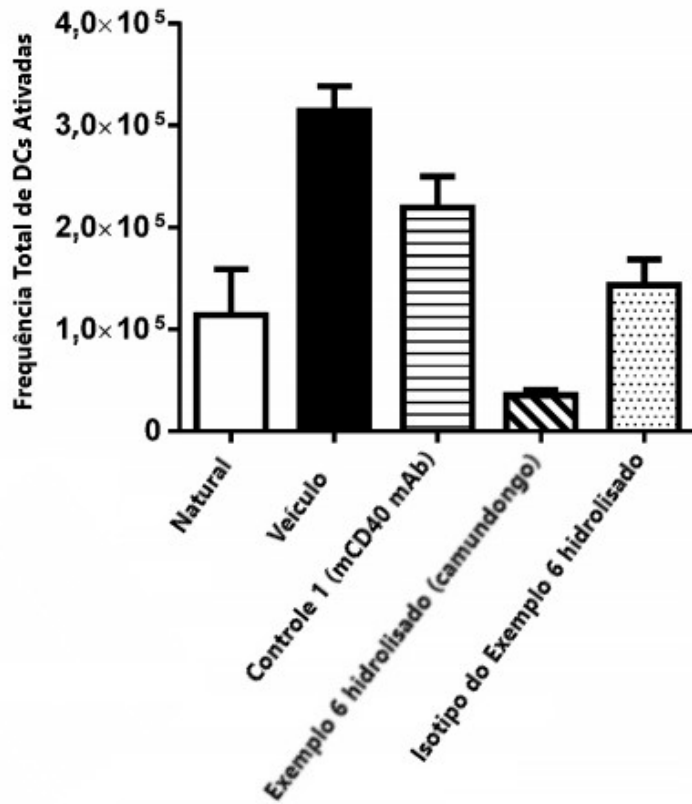


FIG. 4

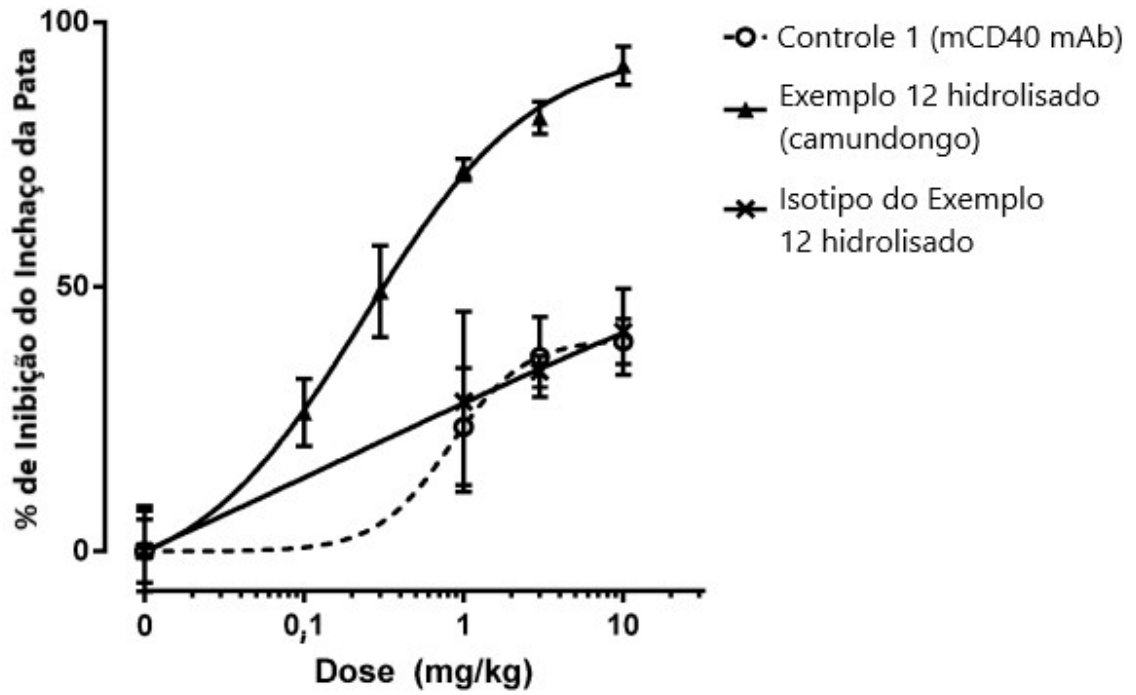


FIG. 5A

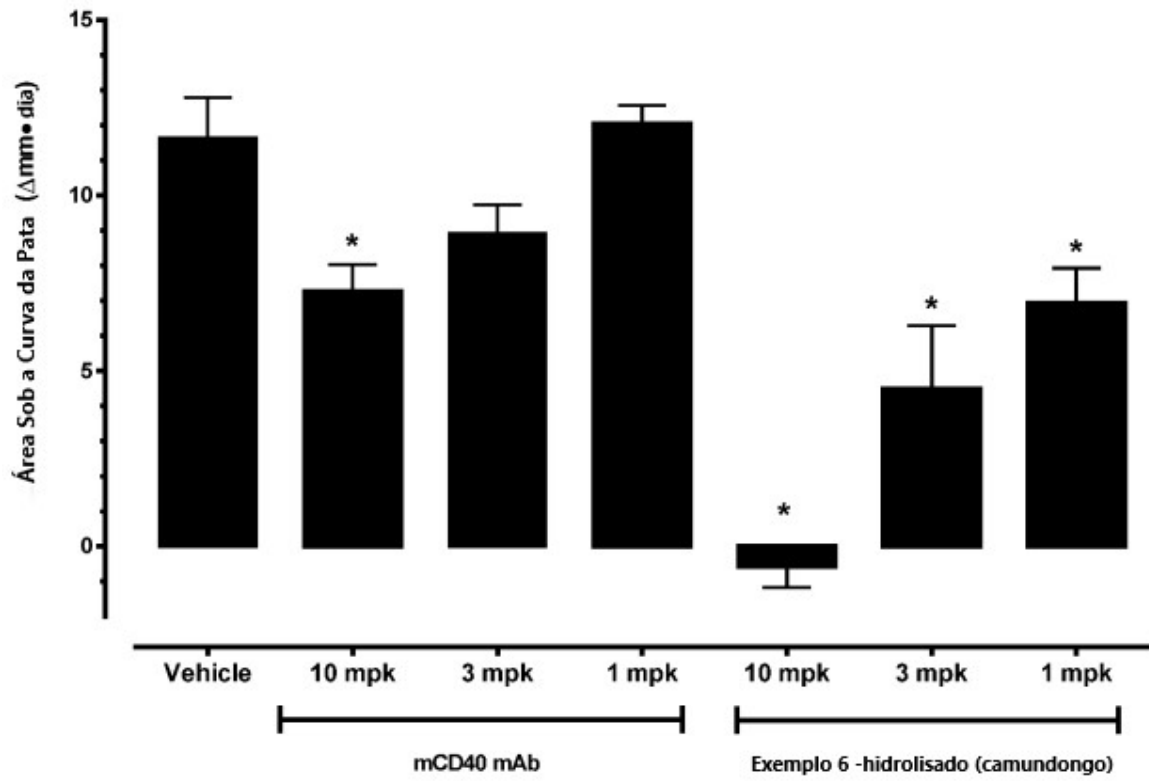


FIG. 6

RESUMO

“CONJUGADOS DE FÁRMACO-ANTICORPO ANTI-CD40”

Trata-se de conjugados de fármaco-anticorpo anti-CD40 que compreendem um radical de Fórmula (I), em que R^1 , R^2 e R^3 são como definidos neste documento. São ainda fornecidos conjugados de fármaco-anticorpo anti-CD40 de Fórmula (II), em que Z, R, AA1, AA2, AA3, m, p, q, n, w, R^1 , R^2 e R^3 são como definidos neste documento. Além disso, são fornecidas composições farmacêuticas e kits das mesmas, e métodos para usar as mesmas.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: listagemdesequencia.txt
- Data de Geração do Código: 27/05/2020
- Hora de Geração do Código: 21:09:17
- Código de Controle:
 - Campo 1: C0FFF75EDD766B96
 - Campo 2: 81398498D8141184