



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

(21) BR 112019020967-0 A2



* B R 1 1 2 0 1 9 0 2 0 9 6 7 A 2 *

(22) Data do Depósito: 04/04/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 05/05/2020

(54) Título: MÉTODOS E REAGENTES PARA ANALISAR INTERFACES DE PROTEÍNA-PROTEÍNA

(51) Int. Cl.: G01N 33/68; G01N 33/566; C12Q 1/533; A61K 47/42.

(30) Prioridade Unionista: 05/04/2017 US 62/482,018.

(71) Depositante(es): REVOLUTION MEDICINES, INC..

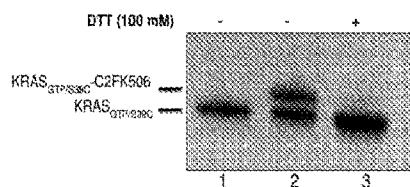
(72) Inventor(es): MARK JOSEPH MULVIHILL; MEIZHONG JIN; NICHOLAS PERL.

(86) Pedido PCT: PCT US2018026014 de 04/04/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/187423 de 11/10/2018

(85) Data da Fase Nacional: 04/10/2019

(57) Resumo: A presente revelação fornece métodos e reagentes úteis para analisar interfaces de proteína-proteína como interfaces entre uma proteína apresentadora (por exemplo, um membro da família de FKBP, um membro da família de ciclofilina, ou PIN1) e uma proteína-alvo. Em algumas modalidades, as proteínas-alvo e/ou apresentadoras são proteínas intracelulares. Em algumas modalidades, as proteínas-alvo e/ou apresentadoras são proteínas mamíferas.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MÉTODOS E REAGENTES PARA ANALISAR INTERFACES DE PROTEÍNA-PROTEÍNA".

ANTECEDENTES

[001] A grande maioria de fármacos de molécula pequena atua ligando-se um bolso funcionalmente importante numa proteína-alvo, modulando, assim, atividade daquela proteína. Por exemplo, os fármacos estatinas de redução de colesterol ligam o sítio ativo de enzima da HMG-CoA redutase, evitando assim que a enzima engaje com seus substratos. O fato de que muitos destes pares de interação de fármaco/alvo são conhecidos pode ter induzido alguns ao erro de acreditar que um modulador de molécula pequena poderia ser descoberto para a maioria, se não todas, as proteínas com uma quantidade razoável de tempo, esforço e recursos. Isto está longe de ser o caso. As estimativas atuais sustentam que apenas cerca de 10% de todas as proteínas humanas são alvejáveis por moléculas pequenas. As outras 90% são atualmente consideradas refratárias ou intratáveis para a descoberta de fármaco de molécula pequena. Estes alvos são comumente referidos como "não susceptíveis a modulação por fármaco" ("undruggable"). Estes alvos não susceptíveis a modulação por fármaco incluem um reservatório vasto e em grande parte não explorado de proteínas humanas medicamente importantes. Portanto, existe bastante interesse na descoberta de novas modalidades moleculares com capacidade para modular a função destes alvos não susceptíveis a modulação por fármaco.

SUMÁRIO

[002] As moléculas pequenas são limitadas em suas habilidades de alvejamento devido ao fato de que suas interações com o alvo são acionadas por forças adesivas, cuja intensidade é aproximadamente proporcional à área de superfície de contato. Devido ao seu tamanho

pequeno, a única forma para uma molécula pequena acumular área de superfície de contato intermolecular suficiente para interagir de modo eficaz com uma proteína-alvo é ser literalmente engolida por aquela proteína. De fato, um corpo grande de dados tanto experimentais quanto computacionais suporta aquela visão de que apenas aquelas proteínas que têm um "bolso" hidrofóbico sobre sua superfície têm capacidade para ligar moléculas pequenas. Naqueles casos, a ligação é habilitada pela imersão.

[003] A natureza evoluiu uma estratégia que permite que uma molécula pequena interaja com proteínas-alvo em sítios além de bolsos hidrofóbicos. Esta estratégia é exemplificada por fármacos imunossupressores de ocorrência natural ciclosporina A, rapamicina e FK506. A atividade biológica destes fármacos envolve a formação de um complexo de alta afinidade da molécula pequena com uma proteína de apresentação pequena. A superfície compósita da molécula pequena e a proteína de apresentação engajam o alvo. Portanto, por exemplo, o complexo binário formado entre a ciclosporina A e ciclofilina A alveja calcineurina com alta afinidade e especificidade, mas nem ciclosporina A ou ciclofilina A sozinha liga calcineurina com afinidade mensurável.

[004] Os presentes inventores desenvolveram compostos e conjugados úteis para identificar pares de proteínas apresentadoras e proteína-alvo, e sondando as interfaces entre as mesmas para uso no desenvolvimento de moléculas pequenas com capacidade para modular estas interações.

[005] Consequentemente, a presente descrição fornece métodos e reagentes úteis para analisar interfaces de proteína-proteína como interfaces entre uma proteína apresentadora (por exemplo, um membro da família FKBP, um membro da família ciclofilina, ou PIN1) e uma proteína-alvo. Esta análise é útil no auxílio do design das moléculas

pequenas que têm capacidade para se ligar simultaneamente tanto a uma proteína apresentadora quanto a uma proteína-alvo, de modo que os complexos de molécula pequena-proteína resultantes possam se ligar e modular a atividade da proteína-alvo. Em algumas modalidades, as proteínas-alvo e/ou apresentadoras são proteínas intracelulares. Em algumas modalidades, as proteínas-alvo e/ou apresentadoras são proteínas mamíferas.

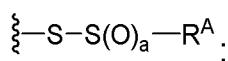
[006] Em alguns aspectos, a divulgação fornece compostos que podem ser usados como substratos de reticulação. Estes compostos podem incluir uma porção química de ligação de proteína com capacidade para ligação covalente ou não covalente a uma proteína (por exemplo, uma proteína-alvo ou uma proteína apresentadora) e pelo menos um grupo de reticulação com capacidade para uma reação quimiosseletiva com um aminoácido de uma proteína diferente daquela que se liga à porção química de ligação de proteína. Em algumas modalidades, os compostos incluem apenas um grupo de reticulação.

[007] Consequentemente, num aspecto, a divulgação fornece um composto que inclui uma porção química de ligação de proteína (por exemplo, uma porção química de ligação de proteína apresentadora ou uma porção química de ligação de proteína-alvo) e um grupo de reticulação (por exemplo, uma porção química com capacidade para a reação quimiosseletiva com um aminoácido de uma proteína diferente daquela que se liga à porção química de ligação de proteína). A porção química de ligação de proteína tem capacidade para se ligar (de modo covalente ou não covalente) a uma proteína (por exemplo, uma proteína apresentadora ou proteína-alvo, dependendo de se é uma porção química de ligação de proteína apresentadora ou uma porção química de ligação de proteína-alvo), enquanto o grupo de reticulação tem capacidade para formar uma ligação covalente com uma proteína (por exemplo, uma proteína apresentadora, uma proteína-alvo, ou ou-

tro composto que tem capacidade para ligar esta outra proteína). Em algumas modalidades, quando o composto incluir uma porção química de ligação de proteína apresentadora, o composto não inclui uma porção química de ligação de proteína-alvo. Em algumas modalidades, quando o composto incluir uma porção química de ligação de proteína-alvo, o composto não inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora.

[008] Em algumas modalidades, o grupo de reticulação é um grupo de reticulação reativo a sulfidrila (por exemplo, o grupo de reticulação inclui um dissulfeto misto, uma maleimida, vinil sulfona, vinil cetona, ou um haleto de alquila), um grupo de reticulação reativo a amino, um grupo de reticulação reativo a carboxila, um grupo de reticulação reativo a carbonila ou um grupo de reticulação formador de triazol.

[009] Em algumas modalidades, o grupo de reticulação inclui um dissulfeto misto, por exemplo, o grupo de reticulação inclui a estrutura da Fórmula Ia:



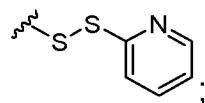
Fórmula Ia

[0010] em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto; e

[0011] a é 0, 1 ou 2;

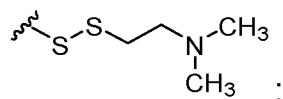
[0012] R^A é alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída ou heteroarila C₂-C₉ opcionalmente substituída.

[0013] Em algumas modalidades, R^A é heteroarila C₂-C₉ opcionalmente substituída (por exemplo, piridila). Em algumas modalidades, o grupo de reticulação inclui a estrutura:

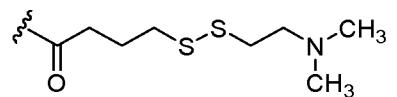


em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto.

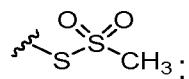
[0014] Em algumas modalidades, R^A é heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída (por exemplo, N, N-dimetiletila). Em algumas modalidades, o grupo de reticulação inclui a estrutura:



[0015] em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto. Em algumas modalidades, o grupo de reticulação inclui a estrutura:



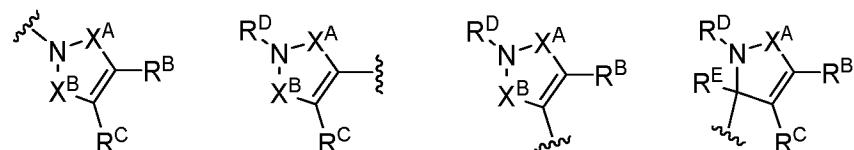
[0016] Em algumas modalidades, R^A é alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída (por exemplo, metila). Em algumas modalidades, o grupo de reticulação inclui a estrutura:



[0017] em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto.

[0018] Em algumas modalidades, o grupo de reticulação inclui um grupo de reticulação com base em carbono (por exemplo, um grupo de reticulação que forma uma ligação de carbono-sulfeto mediante reação com um tiol).

[0019] Em algumas modalidades, o grupo de reticulação inclui uma maleimida, por exemplo, o grupo de reticulação inclui a estrutura da fórmula Ib, Ic, Id, ou Ie:



i. Fórmula Ib Fórmula Ic Fórmula Id Fórmula Ie

[0020] em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo

de reticulação ao restante do composto;

[0021] X^A é $-C(O)-$ ou $-SO_2-$;

[0022] X^B é $-C(O)-$ ou $CR^E R^F$;

[0023] R^B e R^C são, independentemente, hidrogênio, halogênio, hidroxila opcionalmente substituída, amino opcionalmente substituída, alquila C_1-C_6 opcionalmente substituída, alquenila C_2-C_6 opcionalmente substituída, alquinila C_2-C_6 opcionalmente substituída, carbociclila C_3-C_{10} opcionalmente substituída, arila C_6-C_{10} opcionalmente substituída, C_6-C_{10} aril C_1-C_6 alquila opcionalmente substituída, heteroarila C_2-C_9 opcionalmente substituída, C_2-C_9 heteroarila C_1-C_6 alquila opcionalmente substituída, heterociclila C_2-C_9 opcionalmente substituída, ou C_2-C_9 heterociclila C_1-C_6 alquila opcionalmente substituída;

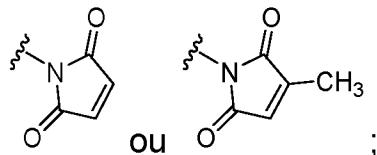
[0024] R^D é hidrogênio, hidroxila, alquila C_1-C_6 opcionalmente substituída, alquenila C_2-C_6 opcionalmente substituída, alquinila C_2-C_6 opcionalmente substituída, heteroalquila C_1-C_6 opcionalmente substituída, heteroalquenila C_2-C_6 opcionalmente substituída, heteroalquinila C_2-C_6 opcionalmente substituída, carbociclila C_3-C_{10} opcionalmente substituída, arila C_6-C_{10} opcionalmente substituída, C_6-C_{10} aril C_1-C_6 alquila opcionalmente substituída, heteroarila C_2-C_9 opcionalmente substituída, C_2-C_9 heteroaril C_1-C_6 alquila opcionalmente substituída, heterociclila C_2-C_9 opcionalmente substituída, ou C_2-C_9 heterociclil C_1-C_6 alquila opcionalmente substituída; e

[0025] R^E e R^F são, independentemente, hidrogênio, hidroxila, amino opcionalmente substituído, halogênio, tiol, alquila C_1-C_6 opcionalmente substituída, alquenila C_2-C_6 opcionalmente substituída, alquinila C_2-C_6 opcionalmente substituída, heteroalquila C_1-C_6 opcionalmente substituída, heteroalquenila C_2-C_6 opcionalmente substituída, heteroalquinila C_2-C_6 opcionalmente substituída, carbociclila C_3-C_{10} opcionalmente substituída, arila C_6-C_{10} opcionalmente substituída, C_6-C_{10} aril C_1-C_6 alquila opcionalmente substituída, heteroarila C_2-C_9 op-

cionalmente substituída, C₂-C₉ heteroaril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heterociclila C₂-C₉ opcionalmente substituída, ou C₂-C₉ heterociclil C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída.

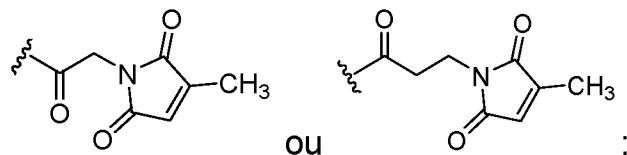
[0026] Em algumas modalidades, o grupo de reticulação inclui a estrutura da Fórmula Ib. Em algumas modalidades, X^A é –C(O)–. Em algumas modalidades, X^B é –C(O)–. Em algumas modalidades, R^B e R^C são hidrogênio ou alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída (por exemplo, metila).

[0027] Em algumas modalidades, o grupo de reticulação inclui a estrutura:



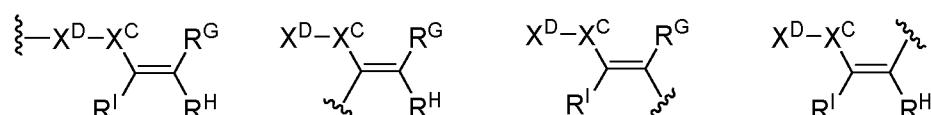
[0028] em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto.

[0029] Em algumas modalidades, o grupo de reticulação inclui a estrutura:



[0030] em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto.

[0031] Em algumas modalidades, o grupo de reticulação inclui a estrutura da fórmula If, Ig, Ih ou Ii:



Fórmula If

Fórmula Ig

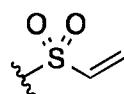
Fórmula Ih

Fórmula Ii

[0032] em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto;

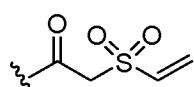
[0033] X^C é –C(O)– ou –SO₂–;

- [0034] X^D está ausente, $NR^J R^K$, ou OR^L ;
- [0035] R^G , R^H , e R^I são, independentemente, hidrogênio, nitrila, halogênio, hidroxila opcionalmente substituída, amino opcionalmente substituída, alquila C_1 - C_6 opcionalmente substituída, alquenila C_2 - C_6 opcionalmente substituída, alquinila C_2 - C_6 opcionalmente substituída, carbociclica C_3 - C_{10} opcionalmente substituída, arila C_6 - C_{10} opcionalmente substituída, C_6 - C_{10} aril C_1 - C_6 alquila opcionalmente substituída, heteroarila C_2 - C_9 opcionalmente substituída, C_2 - C_9 heteroaril C_1 - C_6 alquila opcionalmente substituída, heterociclica C_2 - C_9 opcionalmente substituída, ou C_2 - C_9 heterociclico C_1 - C_6 alquila opcionalmente substituída; e
- [0036] R^J , R^K , e R^L são, independentemente, ausente, hidrogênio, hidroxila, amino opcionalmente substituído, halogênio, tiol, alquila C_1 - C_6 opcionalmente substituída, alquenila C_2 - C_6 opcionalmente substituída, alquinila C_2 - C_6 opcionalmente substituída, heteroalquila C_1 - C_6 opcionalmente substituída, heteroalquenila C_2 - C_6 opcionalmente substituída, heteroalquinila C_2 - C_6 opcionalmente substituída, carbociclica C_3 - C_{10} opcionalmente substituída, arila C_6 - C_{10} opcionalmente substituída, C_6 - C_{10} aril C_1 - C_6 alquila opcionalmente substituída, heteroarila C_2 - C_9 opcionalmente substituída, C_2 - C_9 heteroaril C_1 - C_6 alquila opcionalmente substituída, heterociclica C_2 - C_9 opcionalmente substituída, ou C_2 - C_9 heterociclico C_1 - C_6 alquila opcionalmente substituída.
- [0037] Em algumas modalidades, o grupo de reticulação inclui a estrutura da Fórmula If. Em algumas modalidades, X^D está ausente. Em algumas modalidades, R^G , R^H e R^I são hidrogênio. Em algumas modalidades, X^C é $-C(O)-$. Em algumas modalidades, X^C é $-SO_2-$.
- [0038] Em algumas modalidades, o grupo de reticulação inclui uma vinil sulfona, por exemplo, o grupo de reticulação inclui a estrutura:



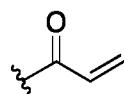
[0039] em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto.

[0040] Em algumas modalidades, o grupo de reticulação inclui uma vinil sulfona, por exemplo, o grupo de reticulação inclui a estrutura:



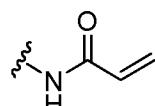
[0041] em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto.

[0042] Em algumas modalidades, o grupo de reticulação inclui uma vinil cetona, por exemplo, o grupo de reticulação inclui as estruturas:



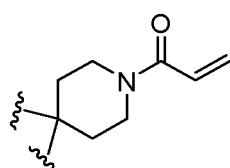
[0043] em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto.

[0044] Em algumas modalidades, o grupo de reticulação inclui a vinil cetona, por exemplo, o grupo de reticulação inclui a estrutura:



[0045] em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto.

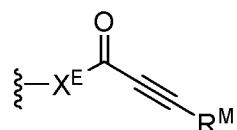
[0046] Em algumas modalidades, o grupo de reticulação inclui a vinil cetona, por exemplo, o grupo de reticulação inclui a estrutura:



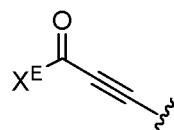
[0047] em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo

de reticulação ao restante do composto.

[0048] Em algumas modalidades, o grupo de reticulação inclui uma inona como uma estrutura da fórmula Ij ou Ik:



Fórmula Ij



Fórmula Ik

[0049] em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto;

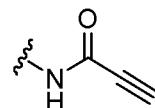
[0050] X^{E} é ausente, $\text{NR}^{\text{N}}\text{R}^{\text{O}}$, ou OR^{P} ;

[0051] R^{M} é hidrogênio, halogênio, hidroxila opcionalmente substituída, amino opcionalmente substituída, alquila $\text{C}_1\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, alquenila $\text{C}_2\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, alquinila $\text{C}_2\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, carbociclica $\text{C}_3\text{-C}_{10}$ opcionalmente substituída, arila $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ opcionalmente substituída, $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ aril $\text{C}_1\text{-C}_6$ alquila opcionalmente substituída, heteroarila $\text{C}_2\text{-C}_9$ opcionalmente substituída, $\text{C}_2\text{-C}_9$ heteroaril $\text{C}_1\text{-C}_6$ alquila opcionalmente substituída, heterociclica $\text{C}_2\text{-C}_9$ opcionalmente substituída, ou $\text{C}_2\text{-C}_9$ heterociclico $\text{C}_1\text{-C}_6$ alquila opcionalmente substituída; e

[0052] R^{N} , R^{O} , e R^{P} são, independentemente, hidrogênio, hidroxila, amino opcionalmente substituído, halogênio, tiol, alquila $\text{C}_1\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, alquenila $\text{C}_2\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, alquinila $\text{C}_2\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, heteroalquila $\text{C}_1\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, heteroalquenila $\text{C}_2\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, heteroalquinila $\text{C}_2\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, carbociclica $\text{C}_3\text{-C}_{10}$ opcionalmente substituída, arila $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ opcionalmente substituída, $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ aril $\text{C}_1\text{-C}_6$ alquila opcionalmente substituída, heteroarila $\text{C}_2\text{-C}_9$ opcionalmente substituída, $\text{C}_2\text{-C}_9$ heteroaril $\text{C}_1\text{-C}_6$ alquila opcionalmente substituída, heterociclica $\text{C}_2\text{-C}_9$ opcionalmente substituída, ou $\text{C}_2\text{-C}_9$ heterociclico $\text{C}_1\text{-C}_6$ alquila opcionalmente substituída.

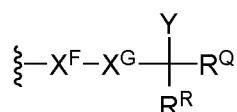
[0053] Em algumas modalidades, o grupo de reticulação inclui a

vinil cetona, por exemplo, o grupo de reticulação inclui a estrutura:

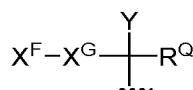


[0054] em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto.

[0055] Em algumas modalidades, o grupo de reticulação inclui uma estrutura da fórmula Im ou In:



Fórmula Im



Fórmula In

[0056] em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto;

[0057] X^{F} é ausente, $\text{NR}^{\text{S}}\text{R}^{\text{T}}$, ou OR^{U} ;

[0058] X^{G} é ausente ou $-\text{C}(\text{O})-$;

[0059] Y é um grupo de saída;

[0060] R^{Q} e R^{R} são, independentemente, hidrogênio, hidroxila, amino opcionalmente substituído, halogênio, tiol, alquila $\text{C}_1\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, alquenila $\text{C}_2\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, alquinila $\text{C}_2\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, heteroalquila $\text{C}_1\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, heteroalquenila $\text{C}_2\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, heteroalquinila $\text{C}_2\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, carbociclila $\text{C}_3\text{-C}_{10}$ opcionalmente substituída, arila $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ opcionalmente substituída, $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ aril $\text{C}_1\text{-C}_6$ alquila opcionalmente substituída, heteroarila $\text{C}_2\text{-C}_9$ opcionalmente substituída, $\text{C}_2\text{-C}_9$ heteroaril $\text{C}_1\text{-C}_6$ alquila opcionalmente substituída, heterociclila $\text{C}_2\text{-C}_9$ opcionalmente substituída, ou $\text{C}_2\text{-C}_9$ heterocicil $\text{C}_1\text{-C}_6$ alquila opcionalmente substituída; e

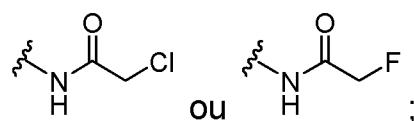
[0061] R^{S} , R^{T} , e R^{U} são, independentemente, ausente, hidrogênio, hidroxila, amino opcionalmente substituído, halogênio, tiol, alquila $\text{C}_1\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, alquenila $\text{C}_2\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, alquinila $\text{C}_2\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, heteroalquila $\text{C}_1\text{-C}_6$ op-

cialmente substituída, heteroalquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, carbociclica C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heteroarila C₂-C₉ opcionalmente substituída, C₂-C₉ heteroaril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heterociclica C₂-C₉ opcionalmente substituída, ou C₂-C₉ heterociclico C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída.

[0062] Em algumas modalidades, Y é um halogênio (por exemplo, fluoro, cloro, bromo, ou iodo), um mesilato, um tosilato ou um triflato. Em algumas modalidades, Y é uma nitrila. Em algumas modalidades, X^F e X^G estão ausentes. Em algumas modalidades, R^Q e R^R são hidrogênio. Em algumas modalidades, o grupo de reticulação inclui um haleto de alquila como um cloreto de alquila, por exemplo, o grupo de reticulação inclui a estrutura:

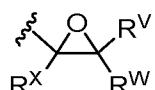


[0063] em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto. Em algumas modalidades, o grupo de reticulação inclui um haleto de alquila como um cloreto de alquila ou fluoreto de alquila, por exemplo, o grupo de reticulação inclui a estrutura:



[0064] em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto.

[0065] Em algumas modalidades, o grupo de reticulação inclui um epóxido, por exemplo, o grupo de reticulação inclui uma estrutura da fórmula I:

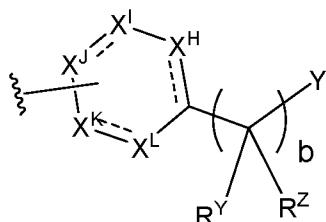


Fórmula I

[0066] em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto;

[0067] R^V , R^W , e R^X são, independentemente, hidrogênio, hidroxila, amino opcionalmente substituído, halogênio, tiol, alquila C_1-C_6 opcionalmente substituída, alquenila C_2-C_6 opcionalmente substituída, alquinila C_2-C_6 opcionalmente substituída, heteroalquila C_1-C_6 opcionalmente substituída, heteroalquinila C_2-C_6 opcionalmente substituída, heteroalquenila C_2-C_6 opcionalmente substituída, heteroalquinila C_2-C_6 opcionalmente substituída, carbociclila C_3-C_{10} opcionalmente substituída, arila C_6-C_{10} opcionalmente substituída, C_6-C_{10} aril C_1-C_6 alquila opcionalmente substituída, heteroarila C_2-C_9 opcionalmente substituída, C_2-C_9 heteroaril C_1-C_6 alquila opcionalmente substituída, heterociclila C_2-C_9 opcionalmente substituída, C_2-C_9 heterociclil C_1-C_6 alquila opcionalmente substituída.

[0068] Em algumas modalidades, o grupo de reticulação inclui uma estrutura da fórmula Ip:



Fórmula Ip

[0069] em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto;

[0070] as linhas pontilhadas representam ligações duplas opcionais inclusas como necessário para a estrutura ser aromática;

[0071] b é 0, 1, ou 2;

[0072] Y é um grupo de saída;

[0073] R^Y e R^Z são, independentemente, hidrogênio, hidroxila, amino opcionalmente substituído, halogênio, tiol, alquila C_1-C_6 opcionalmente substituída, alquenila C_2-C_6 opcionalmente substituída, alquinila C_2-C_6 opcionalmente substituída, heteroalquila C_1-C_6 opcional-

mente substituída, heteroalquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, carbociclica C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heteroarila C₂-C₉ opcionalmente substituída, C₂-C₉ heterociclica C₂-C₉ opcionalmente substituída, C₂-C₉ heterociclico C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída;

[0074] cada dentre X^H, X^I, X^J, X^K e X^L são, independentemente, ausentes, NR^{AA}, ou CR^{AB}, em que pelo menos cinco dentre X^H, X^I, X^J, X^K e X^L são NR^{AA}, ou CR^{AB};

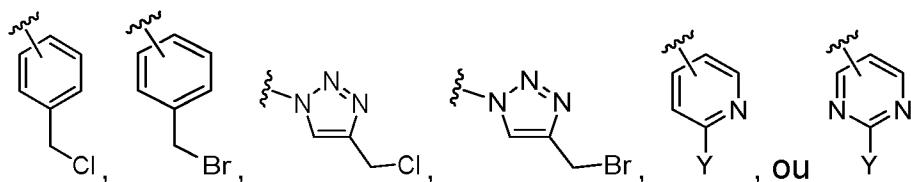
[0075] R^{AA} é ausente ou hidrogênio, hidroxila, amino opcionalmente substituído, halogênio, tiol, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, carbociclica C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heteroarila C₂-C₉ opcionalmente substituída, C₂-C₉ heteroaril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heterociclica C₂-C₉ opcionalmente substituída, ou C₂-C₉ heterociclico C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída; e

[0076] R^{AB} é hidrogênio, nitrila, halogênio, hidroxila opcionalmente substituída, amino opcionalmente substituída, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, carbociclica C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heteroarila C₂-C₉ opcionalmente substituída, C₂-C₉ heteroaril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heterociclica C₂-C₉ opcionalmente substituída, ou C₂-C₉ heterociclico C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída.

[0077] Em algumas modalidades, pelo menos um R^{AB} é um grupo removedor de elétrons. Em algumas modalidades, um a três R^{AB} consistem em grupos removedores de elétrons.

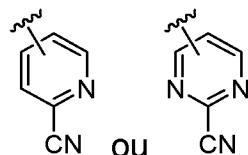
[0078] Em algumas modalidades, Y é uma nitrila. Em algumas modalidades, Y é um halogênio (por exemplo, fluoro, cloro, bromo, ou iodo), um mesilato, um tosilato ou um triflato.

[0079] Em algumas modalidades, o grupo de reticulação inclui a estrutura:



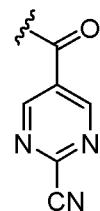
[0080] em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto.

[0081] Em algumas modalidades, o grupo de reticulação inclui a estrutura:



[0082] em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto.

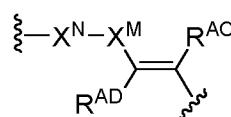
[0083] Em algumas modalidades, o grupo de reticulação inclui a estrutura:



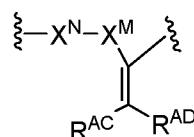
[0084] em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto.

[0085] Em algumas modalidades, o grupo de reticulação é um grupo de reticulação interno, por exemplo, o grupo de reticulação inclui

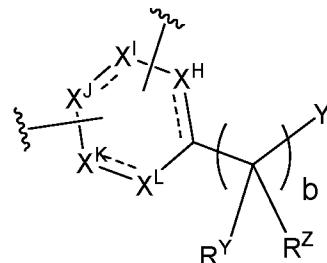
uma estrutura da fórmula Iq, Ir ou Is:



Fórmula Iq



Fórmula Ir



Fórmula Is

[0086] em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto;

[0087] X^M é $-\text{C}(\text{O})-$ ou $-\text{SO}_2^-$;

[0088] X^N é ausente, NR^{AE} ou O ;

[0089] R^{AC} e R^{AD} são, independentemente, hidrogênio, nitrila, halogênio, hidroxila opcionalmente substituída, amino opcionalmente substituída, alquila $\text{C}_1\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, alquenila $\text{C}_2\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, carbociclila $\text{C}_3\text{-C}_{10}$ opcionalmente substituída, arila $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ opcionalmente substituída, $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ aril $\text{C}_1\text{-C}_6$ alquila opcionalmente substituída, heteroarila $\text{C}_2\text{-C}_9$ opcionalmente substituída, $\text{C}_2\text{-C}_9$ heteroaril $\text{C}_1\text{-C}_6$ alquila opcionalmente substituída, heterociclila $\text{C}_2\text{-C}_9$ opcionalmente substituída, ou $\text{C}_2\text{-C}_9$ heterocicil $\text{C}_1\text{-C}_6$ alquila opcionalmente substituída; e

[0090] R^{AE} é hidrogênio, hidroxila, amino opcionalmente substituído, halogênio, tiol, alquila $\text{C}_1\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, alquenila $\text{C}_2\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, alquinila $\text{C}_2\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, heteroalquila $\text{C}_1\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, heteroalquenila $\text{C}_2\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, heteroalquinila $\text{C}_2\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, carbociclila $\text{C}_3\text{-C}_{10}$ opcionalmente substituída, arila $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ opcionalmente substituída, $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ aril $\text{C}_1\text{-C}_6$ alquila opcionalmente substituída, heteroarila $\text{C}_2\text{-C}_9$ opcionalmente substituída, $\text{C}_2\text{-C}_9$ heteroaril $\text{C}_1\text{-C}_6$ alquila opcionalmente substituída, heterociclila $\text{C}_2\text{-C}_9$ opcionalmente substituída, ou $\text{C}_2\text{-C}_9$ heterocicil $\text{C}_1\text{-C}_6$ alquila opcionalmente

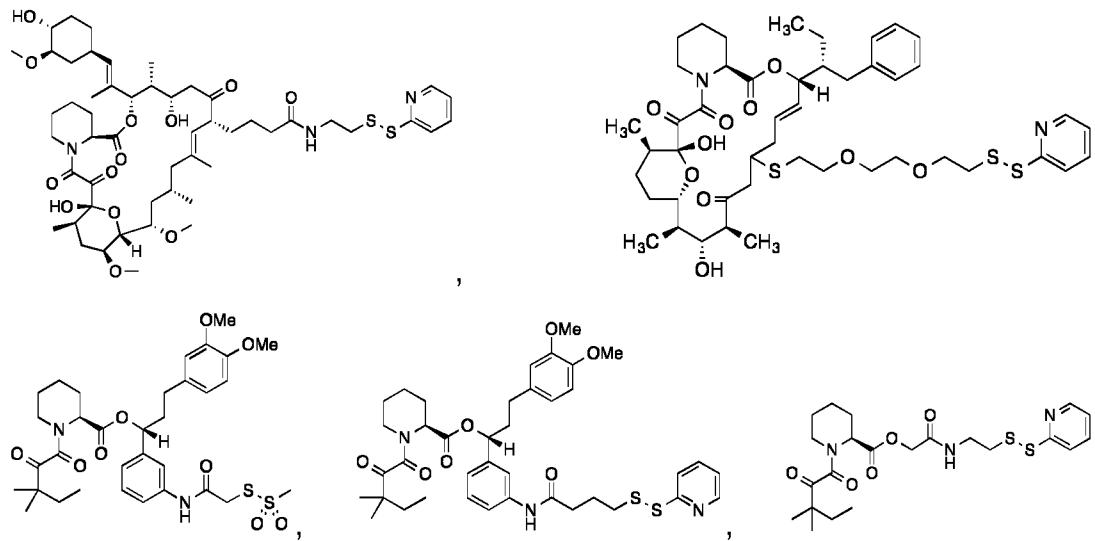
substituída;

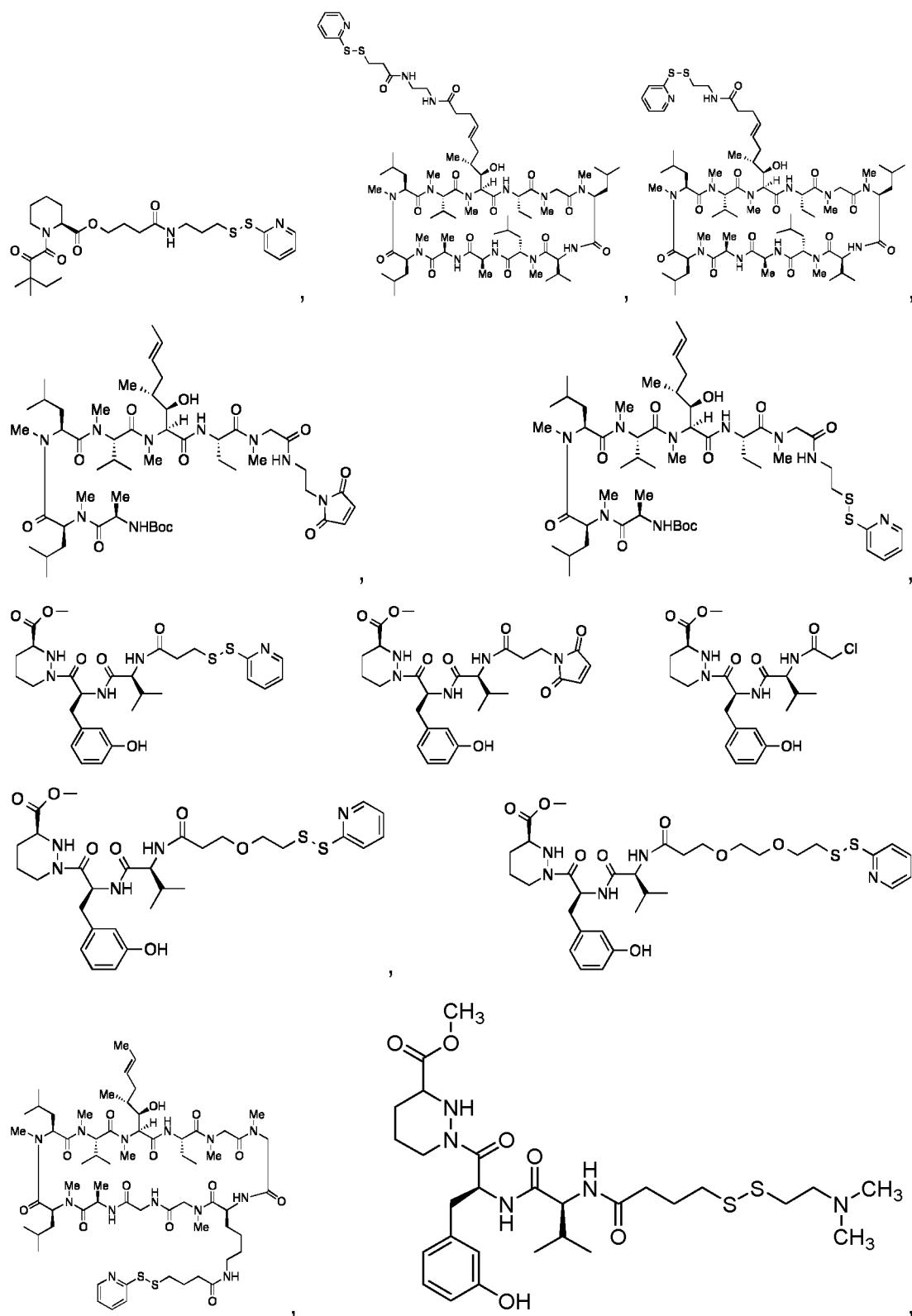
[0091] Em algumas modalidades, X^N é NR^{AE} , em que R^{AE} é hidrogênio. Em algumas modalidades, R^{AC} e R^{AD} são hidrogênio. Em algumas modalidades, X^M é $-C(O)-$. Em algumas modalidades, X^M é $-SO_2-$.

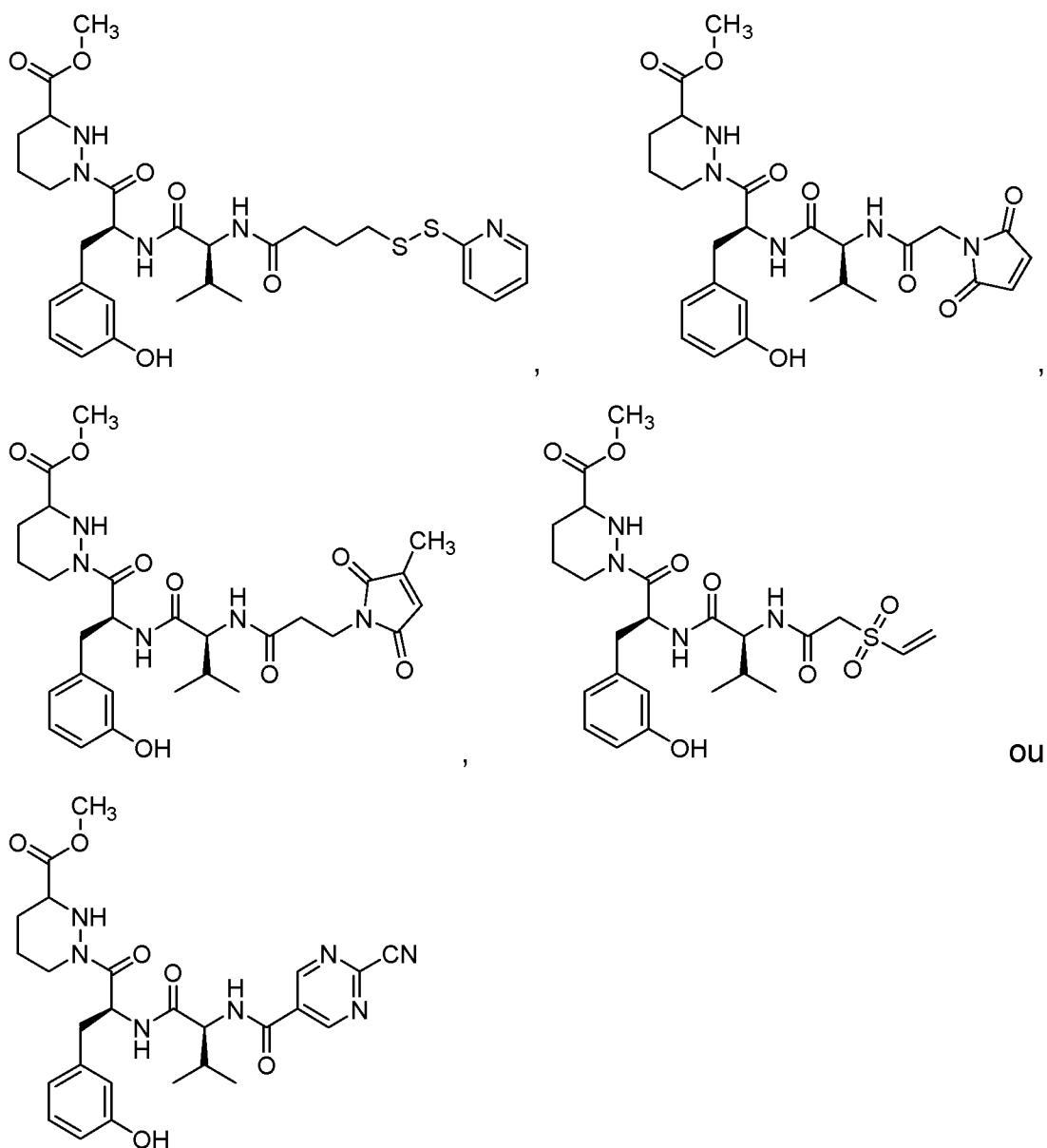
[0092] Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos anteriores, a porção química de ligação de proteína tem capacidade para interação não covalente com uma proteína. Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos anteriores, a porção química de ligação de proteína tem capacidade para interação covalente com uma proteína.

[0093] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um composto que inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora e um grupo de reticulação. Em algumas modalidades, a porção química de ligação de proteína e o grupo de reticulação são fixados através de um ligante.

[0094] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um composto que tem a estrutura:







[0095] Em alguns aspectos, a divulgação fornece conjugados, métodos para sua síntese, e usos dos mesmos, incluindo uma porção química de ligação de proteína apresentadora com capacidade para ligação covalente ou não covalente a uma proteína apresentadora conjugada a uma proteína-alvo através de um ligante.

[0096] Consequentemente, em outro aspecto, a divulgação fornece um conjugado que inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada a uma proteína-alvo. Em algumas modalidades, a porção química de ligação de proteína apresentadora do conjugado tem capacidade para interação não covalente com uma pro-

teína apresentadora. Em algumas modalidades, a porção química de ligação de proteína apresentadora do conjugado tem capacidade para interação covalente com uma proteína apresentadora.

[0097] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para produzir um conjugado que inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada a uma proteína-alvo. Este método inclui reagir (a) um composto que inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora e um grupo de reticulação com (b) uma proteína-alvo sob condições que permitam a produção do conjugado.

[0098] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para produzir um conjugado que inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada a uma proteína-alvo. Este método inclui fornecer (a) um composto que inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora e um grupo de reticulação; (b) uma proteína-alvo; e (c) uma proteína apresentadora; e reagir o composto com a proteína-alvo sob condições que permitam a produção do conjugado.

[0099] Em alguns aspectos, a divulgação fornece complexos, métodos para sua produção e usos dos mesmos, incluindo uma proteína apresentadora e um conjugado que inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora e uma proteína-alvo.

[00100] Consequentemente, em outro aspecto, a divulgação fornece um complexo que inclui (i) um conjugado que inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada a uma proteína-alvo e (ii) uma proteína apresentadora.

[00101] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para produzir um complexo que inclui (i) um conjugado que inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada a uma proteína-alvo e (ii) uma proteína apresentadora. Este método inclui combinar um conjugado que inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada a uma proteína-alvo e uma proteína

apresentadora sob condições que permitam a produção do complexo.

[00102] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para produzir um complexo que inclui (i) um conjugado que inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada a uma proteína-alvo e (ii) uma proteína apresentadora. Este método inclui fornecer (a) um composto que inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora e um grupo de reticulação; (b) uma proteína-alvo; e (c) uma proteína apresentadora; e reagir o composto com a proteína-alvo sob condições que permitam a produção do complexo.

[00103] Em algumas modalidades dos métodos anteriores, a proteína apresentadora se liga ao composto na ausência da proteína-alvo. Em algumas modalidades dos métodos anteriores, a proteína apresentadora não se liga substancialmente ao composto na ausência da proteína-alvo. Em algumas modalidades dos métodos anteriores, o composto e a proteína-alvo não reagem substancialmente na ausência da proteína apresentadora. Em algumas modalidades dos métodos anteriores, o composto e a proteína-alvo reagem na ausência da proteína apresentadora. Em algumas modalidades dos métodos anteriores, as condições não incluem um agente de redução. Em algumas modalidades dos métodos anteriores, as condições incluem um excesso de proteína apresentadora.

[00104] Em algumas modalidades, ligação detectável entre o composto e a proteína apresentadora é observada na ausência da proteína-alvo. Em algumas modalidades, entretanto, a ligação detectável entre o composto e a proteína apresentadora não é observada (por exemplo, a proteína apresentadora não se liga substancialmente ao composto) na ausência da proteína-alvo. Em algumas modalidades, reação significativa entre o grupo de reticulação e a proteína-alvo (por exemplo, formação de conjugado significativa) não é observada na ausência da proteína apresentadora. Em algumas modalidades, entretan-

to, reação significativa entre o grupo de reticulação e a proteína-alvo pode ser observada até mesmo na ausência da proteína apresentadora. Em algumas modalidades, a taxa e/ou extensão desta reação (por exemplo, taxa e/ou quantidade de formação de conjugado) podem diferir num dado ensaio quando a proteína apresentadora estiver presente em comparação a quando a mesma estiver ausente (por exemplo, a taxa e/ou quantidade de formação de conjugado é 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 10 vezes, ou 100 vezes maior na presença da proteína apresentadora).

[00105] Em algumas modalidades, a produção de conjugado conforme descrito no presente documento é realizada sob condições que não incluem (por exemplo, são substancialmente isentas de) um reagente de redução.

[00106] Em algumas modalidades, a presente invenção fornece um complexo compreendendo (i) uma proteína apresentadora; (ii) um composto conforme descrito no presente documento (por exemplo, composto cuja estrutura inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora e um grupo de reticulação); e (iii) uma proteína-alvo. Em algumas modalidades, este complexo é exposto a e/ou mantido sob condições que permitam a reação da porção química de reticulação com a proteína-alvo, de modo que uma reticulação entre os mesmos seja formada. Em algumas modalidades, a reticulação é com um heteroátomo num aminoácido (por exemplo, numa cadeia lateral de aminoácido) da proteína-alvo. Em algumas modalidades, a reticulação é com um átomo –S- numa cisteína na proteína-alvo. Em algumas modalidades, a proteína-alvo é uma variante de uma proteína-alvo natural; em algumas destas modalidades, a variante tem uma sequência de aminoácidos que mostra um alto grau (por exemplo, 80%, 81%, 82%; 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou maior) com a proteína-alvo natural,

mas difere por substituição ou adição de pelo menos um aminoácido suscetível à participação numa reticulação com o grupo de reticulação (por exemplo, cuja cadeia lateral de aminoácido inclui um heteroátomo que pode participar nesta reticulação).

[00107] Em alguns aspectos, a divulgação fornece conjugados, métodos para sua síntese, e usos dos mesmos, incluindo uma porção química de ligação de proteína-alvo com capacidade para ligação covalente ou não covalente a uma proteína-alvo conjugada a uma proteína apresentadora através de um ligante.

[00108] Consequentemente, em outro aspecto, a divulgação fornece um conjugado que inclui uma porção química de ligação de proteína-alvo conjugada a uma proteína apresentadora. Em algumas modalidades, a porção química de ligação de proteína-alvo do conjugado tem capacidade para interação não covalente com uma proteína-alvo. Em algumas modalidades, a porção química de ligação de proteína-alvo do conjugado tem capacidade para interação não covalente com a proteína-alvo. Em algumas modalidades, a porção química de ligação de proteína-alvo e a proteína apresentadora são conjugados através de um ligante.

[00109] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para produzir um conjugado que inclui uma porção química de ligação de proteína-alvo conjugada a uma proteína apresentadora. Este método inclui reagir (a) um composto que inclui uma porção química de ligação de proteína-alvo e um grupo de reticulação com (b) uma proteína apresentadora sob condições que permitam a produção do conjugado.

[00110] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para produzir um conjugado que inclui uma porção química de ligação de proteína-alvo conjugada a uma proteína apresentadora. Este método inclui fornecer (a) um composto que inclui uma porção química de ligação de proteína-alvo e um grupo de reticulação; (b) uma proteína

apresentadora; e (c) uma proteína-alvo; e reagir o composto com a proteína apresentadora sob condições que permitam produção do conjugado.

[00111] Em algumas modalidades, a ligação detectável entre o composto e a proteína-alvo é observada na presença da proteína apresentadora. Em algumas modalidades, entretanto, a ligação detectável entre o composto e a proteína-alvo não é observada (por exemplo, a proteína apresentadora não se liga substancialmente ao composto) na ausência da proteína apresentadora. Em algumas modalidades, a reação significativa entre o grupo de reticulação e a proteína apresentadora (por exemplo, formação de conjugado significativa) não é observada na ausência da proteína-alvo. Em algumas modalidades, entretanto, a reação significativa entre o grupo de reticulação e a proteína apresentadora pode ser observada até mesmo na ausência da proteína-alvo. Em algumas modalidades, a taxa e/ou extensão desta reação (por exemplo, a taxa e/ou quantidade da formação de conjugado) pode diferir num dado ensaio quando a proteína apresentadora estiver presente em comparação a quanto a mesma estiver ausente (por exemplo, a taxa e/ou quantidade de formação de conjugado é 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 100 vezes maior na presença da proteína apresentadora).

[00112] Em algumas modalidades, a proteína-alvo se liga ao composto na ausência da proteína apresentadora. Em algumas modalidades, a proteína-alvo não se liga substancialmente ao composto na ausência da proteína apresentadora. Em algumas modalidades, a proteína apresentadora não se liga substancialmente ao composto na ausência da proteína-alvo. Em algumas modalidades, a reação entre o grupo de reticulação e a proteína-alvo (por exemplo, formação de conjugado) não é observada na ausência da proteína apresentadora. Em algumas modalidades, entretanto, a reação entre o grupo de reticula-

ção e a proteína-alvo é observada até mesmo na ausência da proteína apresentadora. Em algumas modalidades, a produção de conjugado conforme descrito no presente documento é realizada sob condições que não incluem (por exemplo, são substancialmente isentas de) um agente de redução.

[00113] Em algumas modalidades, a presente invenção fornece um complexo compreendendo (i) uma proteína apresentadora; (ii) um composto conforme descrito no presente documento (por exemplo, composto cuja estrutura inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora e um grupo de reticulação); e (iii) uma proteína-alvo. Em algumas modalidades, este complexo é exposto a e/ou mantido sob condições que permitam a reação da porção química de reticulação com a proteína-alvo, de modo que uma reticulação entre os mesmos seja formada. Em algumas modalidades, a reticulação é com um heteroátomo num aminoácido (por exemplo, numa cadeia lateral de aminoácido) da proteína-alvo. Em algumas modalidades, a reticulação é com um átomo –S- numa cisteína na proteína-alvo. Em algumas modalidades, a proteína-alvo é uma variante de uma proteína-alvo natural; em algumas destas modalidades, a variante tem uma sequência de aminoácidos que mostra um alto grau (por exemplo, 80%, 81%, 82%; 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou maior) com a proteína-alvo natural, mas difere por substituição ou adição de pelo menos um aminoácido suscetível à participação numa reticulação com o grupo de reticulação (por exemplo, cuja cadeia lateral de aminoácido inclui um heteroátomo que pode participar nesta reticulação).

[00114] Em alguns aspectos, a divulgação fornece complexos, métodos para sua produção, e usos dos mesmos, incluindo uma proteína-alvo e um conjugado que inclui uma porção química de ligação de proteína-alvo conjugada a uma proteína apresentadora através de um li-

gante.

[00115] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um complexo que inclui (i) um conjugado que inclui uma porção química de ligação de proteína-alvo conjugada a uma proteína apresentadora; (ii) uma proteína-alvo; e (iii) uma proteína apresentadora. Em algumas modalidades, este complexo é exposto e/ou mantido sob condições que permitam a reação da porção química de reticulação com a proteína apresentadora, de modo que uma reticulação entre os mesmos seja formada. Em algumas modalidades, a reticulação é com um heteroátomo num aminoácido (por exemplo, numa cadeia lateral de aminoácido) da proteína apresentadora. Em algumas modalidades, a reticulação é com um átomo –S- numa cisteína na proteína apresentadora. Em algumas modalidades, a proteína apresentadora é uma variante de uma proteína apresentadora natural; em algumas destas modalidades, a variante tem uma sequência de aminoácidos que mostra um alto grau (por exemplo, 80%, 81%, 82%; 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou maior) com a proteína apresentadora natural, mas difere por substituição ou adição de pelo menos um aminoácido susceptível à participação numa reticulação com o grupo de reticulação (por exemplo, cuja cadeia lateral de aminoácido inclui um heteroátomo que pode participar nesta reticulação).

[00116] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para produzir um complexo que inclui (i) um conjugado que inclui uma porção química de ligação de proteína-alvo conjugada a uma proteína apresentadora e (ii) uma proteína-alvo. Este método inclui combinar um conjugado que inclui uma porção química de ligação de proteína-alvo conjugada a uma proteína apresentadora e uma proteína-alvo sob condições que permitam a produção do complexo.

[00117] Em alguns aspectos, a invenção apresenta um método para

produzir um complexo que inclui (i) um conjugado conforme descrito no presente documento (por exemplo, um conjugado que inclui uma porção química de ligação de proteína-alvo e uma proteína apresentadora) e (ii) uma proteína-alvo. Em algumas destas modalidades, um método fornecido inclui combinar o conjugado e proteína-alvo sob condições que permitam a produção do complexo. Alternativa ou adicionalmente, em algumas modalidades, estes métodos incluem, por exemplo, (i) combinar (a) um composto (por exemplo, um composto cuja estrutura inclui uma porção química de ligação de proteína-alvo e um grupo de reticulação); (b) uma proteína-alvo; e (c) uma proteína apresentadora entre si; e (ii) expor a combinação e/ou manter a combinação sob condições que permitam a produção do complexo. Em algumas destas modalidades, as condições permitem a reação do grupo de reticulação com a proteína apresentadora de modo que um conjugado seja produzido.

[00118] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para produzir um complexo que inclui (i) um conjugado que inclui uma porção química de ligação de proteína-alvo conjugada a uma proteína apresentadora e (ii) uma proteína-alvo. Este método inclui fornecer (a) um composto que inclui uma porção química de ligação de proteína-alvo e um grupo de reticulação; (b) uma proteína apresentadora; e (c) uma proteína-alvo; e reagir o composto com a proteína apresentadora sob condições que permitam a produção do complexo.

[00119] Em algumas destas modalidades, as condições são tais que o composto, proteína apresentadora e/ou proteína-alvo são caracterizadas pelo fato de que a ligação detectável entre o composto e a proteína-alvo é observada na ausência da proteína apresentadora. Em algumas modalidades, entretanto, a ligação detectável entre o composto e a proteína-alvo não é observada (por exemplo, a proteína-alvo não se liga substancialmente ao composto) sob as condições na au-

sência da proteína apresentadora. Em algumas modalidades, reação significativa entre o grupo de reticulação e a proteína apresentadora não é observada na ausência da proteína-alvo sob as condições. Em algumas modalidades, entretanto, a reação significativa entre o grupo de reticulação e a proteína apresentadora pode ser observada até mesmo na ausência da proteína-alvo sob as condições. Em algumas modalidades, as condições não incluem um reagente de redução. Em algumas modalidades, as condições incluem um excesso de proteína apresentadora.

[00120] Em algumas modalidades, a proteína-alvo se liga ao composto na ausência da proteína apresentadora. Em algumas modalidades, a proteína-alvo não se liga substancialmente ao composto na ausência da proteína apresentadora. Em algumas modalidades, o composto e a proteína apresentadora não reagem substancialmente na ausência da proteína-alvo. Em algumas modalidades, o composto e a proteína apresentadora reagem na ausência da proteína-alvo. Em algumas modalidades, as condições não incluem um reagente de redução. Em algumas modalidades, as condições incluem um excesso de proteína-alvo.

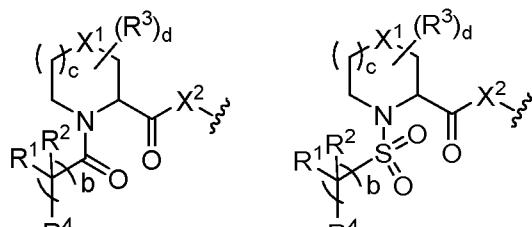
[00121] Em alguns aspectos, a divulgação fornece compostos que incluem uma porção química de ligação de proteína apresentadora com capacidade na interação não covalente com uma proteína apresentadora e uma porção química de ligação de proteína-alvo com capacidade para interação covalente ou não covalente com uma proteína-alvo. Em algumas modalidades, a porção química de ligação de proteína apresentadora e a porção química de ligação de proteína-alvo são fixadas por meio de um ligante.

[00122] Consequentemente, em alguns aspectos, a divulgação fornece um composto que tem a estrutura da Fórmula VII:

A-L-B

Fórmula VII

[00123] em que A inclui a estrutura da Fórmula VIIIa ou VIIIb:



Fórmula VIIIa

Fórmula VIIIb

[00124] em que b e c são independentemente 0, 1, ou 2;

[00125] d é 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7;

[00126] X¹ e X² são, cada um, independentemente, ausente, CH₂, O, S, SO, SO₂ ou NR¹³;

[00127] cada R¹ e R² é, independentemente, hidrogênio, hidroxila, amino opcionalmente substituído, halogênio, tiol, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, carbociclica C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heterociclica C₂-C₉ opcionalmente substituída (por exemplo, heteroarila C₂-C₉ opcionalmente substituída), C₂-C₉ heterociclic C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída (por exemplo, C₂-C₉ heteroaril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída), ou R¹ e R² combinados com o átomo de carbono aos quais os mesmos são ligados para formar C=O ou R¹ e R² combinados para formar uma carbociclica C₃-C₁₀ opcionalmente substituída ou heterociclica C₂-C₉ opcionalmente substituída;

[00128] cada R³ é, independentemente, hidroxila, amino opcionalmente substituído, halogênio, tiol, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opci-

onalmente substituída, heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, carbociclila C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heterociclila C₂-C₉ opcionalmente substituída (por exemplo, heteroarila C₂-C₉ opcionalmente substituída), ou C₂-C₉ heterociclil C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída (por exemplo, C₂-C₉ heteroaril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída) ou dois R⁸ combinados para formar uma carbociclila C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, heterociclila C₂-C₉ opcionalmente substituída, por exemplo, heteroarila C₂-C₉ opcionalmente substituída;

[00129] R⁴ é alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída;

[00130] L é um ligante opcional; e

[00131] B é uma porção química de ligação de proteína-alvo.

[00132] Em algumas modalidades de um composto da Fórmula VII, a porção química de ligação de proteína-alvo, B, tem capacidade para interação não covalente com uma proteína-alvo. Em algumas modalidades de um composto da Fórmula VII, a porção química de ligação de proteína-alvo, B, tem capacidade para interação covalente com uma proteína-alvo. Em algumas modalidades de um composto da Fórmula VII, o ligante, L, está presente. Em algumas modalidades de um composto da Fórmula VII, o ligante, L, está ausente.

[00133] Em alguns aspectos, a divulgação fornece complexos ternários, métodos para sua produção, e usos dos mesmos, incluindo uma proteína apresentadora, uma proteína-alvo e um composto que inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora e uma porção química de ligação de proteína-alvo.

[00134] Consequentemente, em outro aspecto, a divulgação fornece um complexo que inclui (i) um composto da Fórmula VII; (ii) uma

proteína-alvo; e (iii) uma proteína apresentadora.

[00135] Em algumas modalidades, os compostos, conjugados e complexos da presente invenção podem ser úteis para a identificação de conjugados que incluem uma porção química de ligação de proteína apresentadora e uma proteína-alvo que têm capacidade para formar complexos com proteínas apresentadoras.

[00136] Em alguns aspectos, a invenção apresenta um método para identificar e/ou caracterizar um conjugado conforme descrito no presente documento (por exemplo, em que um composto cuja estrutura inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora e um grupo de reticulação, é conjugado a uma proteína-alvo) que tem capacidade para formar um complexo com uma proteína apresentadora. Em algumas modalidades, este método inclui as etapas de: (a) fornecer (i) este conjugado (por exemplo, em que um composto cuja estrutura inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora e um grupo de reticulação, conjugado a uma proteína-alvo) e (ii) uma proteína apresentadora; (b) combinar o conjugado e a proteína apresentadora sob condições adequadas para permitir a formação de complexo se o conjugado tiver capacidade para formar um complexo com a proteína apresentadora; e (c) determinar se um complexo compreendendo o conjugado e a proteína apresentadora é formada, em que a formação do complexo indica que o conjugado é um que tem capacidade para formar um complexo com uma proteína apresentadora.

[00137] Consequentemente, em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para identificar e/ou caracterizar um conjugado que tem capacidade para formar um complexo com uma proteína apresentadora. Este método inclui as etapas de: (a) fornecer (i) um conjugado incluindo uma porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada a uma proteína-alvo e (ii) uma proteína apresentadora; (b)

combinar o conjugado e a proteína apresentadora sob condições adequadas para permitir a formação de complexo se o conjugado tiver capacidade para formar um complexo com a proteína apresentadora; e (c) determinar se um complexo compreendendo o conjugado e a proteína apresentadora é formada, em que formação do complexo indica que o conjugado é um que tem capacidade para formar um complexo com uma proteína apresentadora.

[00138] Em algumas modalidades, os compostos, conjugados e complexos da presente invenção podem ser úteis para a identificação de proteínas-alvo com capacidade para formar ligações covalentes aos compostos na presença de uma proteína apresentadora.

[00139] Consequentemente, em outro aspecto, a divulgação fornece um método para identificar e/ou caracterizar a proteína-alvo com capacidade para reagir com um composto na presença de uma proteína apresentadora, em que o composto inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora e uma porção química de reticulação. Este método inclui as etapas de: (a) fornecer (i) um composto que inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora e uma porção química de reticulação; (ii) uma proteína-alvo; e (iii) uma proteína apresentadora; (b) combinar o composto, a proteína-alvo, e a proteína apresentadora sob condições adequadas para permitir a formação de complexo se o conjugado tiver capacidade para formar um complexo com a proteína apresentadora; e (c) determinar se a proteína-alvo e o composto reage durante a formação do complexo para formar um conjugado, em que se a proteína-alvo e o composto formam um conjugado, a proteína-alvo é identificada como com capacidade para reagir com o composto na presença de uma proteína apresentadora.

[00140] Em algumas modalidades, os compostos, conjugados e complexos da invenção podem ser úteis para a identificação de proteí-

nas-alvo com capacidade para formar complexos com proteínas apresentadoras.

[00141] Consequentemente, em outro aspecto, a divulgação fornece um método para identificar e/ou caracterizar uma proteína-alvo que se liga a uma proteína apresentadora. Este método inclui as etapas de: (a) fornecer (i) um conjugado que inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada a uma proteína-alvo e (ii) uma proteína apresentadora; (b) combinar o conjugado e a proteína apresentadora sob condições adequadas para permitir a formação de complexo se o conjugado tiver capacidade para formar um complexo com a proteína apresentadora; e (c) determinar se a proteína-alvo se liga à proteína apresentadora no complexo, em que se a proteína-alvo se ligar à proteína apresentadora, a proteína-alvo é identificada como se ligando à proteína apresentadora.

[00142] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para identificar e/ou caracterizar uma proteína-alvo que se liga a uma proteína apresentadora. Este método inclui as etapas de: (a) fornecer (i) um composto que inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora e uma porção química de reticulação; (ii) uma proteína-alvo; e (iii) uma proteína apresentadora; (b) combinar o composto, a proteína-alvo, e a proteína apresentadora sob condições adequada para permitir a formação de complexo se o conjugado tiver capacidade para formar um complexo com a proteína apresentadora; e (c) determinar se a proteína-alvo se liga à proteína apresentadora no complexo, em que se a proteína-alvo se ligar à proteína apresentadora, a proteína-alvo é identificada como uma proteína-alvo que se liga a uma proteína apresentadora.

[00143] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para identificar e/ou caracterizar a proteína-alvo com capacidade para formar um complexo com uma proteína apresentadora. Este método in-

clui as etapas de: (a) fornecer (i) um composto da Fórmula VII; (ii) uma proteína-alvo; e (iii) uma proteína apresentadora; (b) combinar o composto, a proteína-alvo, e a proteína apresentadora sob condições adequadas para permitir uma formação de complexo se o conjugado tiver capacidade para formar um complexo com a proteína apresentadora; e (c) determinar se o composto, a proteína-alvo e a proteína apresentadora formam um complexo, em que se o composto, a proteína-alvo e a proteína apresentadora formassem um complexo, a proteína-alvo é identificada como uma proteína-alvo com capacidade para formar um complexo com uma proteína apresentadora.

[00144] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para identificar e/ou caracterizar uma proteína-alvo que se liga a uma proteína apresentadora. Este método inclui as etapas de: (a) fornecer (i) um composto da Fórmula VII; (ii) uma proteína-alvo; e (iii) uma proteína apresentadora; (b) combinar o composto, a proteína-alvo e a proteína apresentadora sob condições adequadas para permitir a formação de complexo se o composto tiver capacidade para formar um complexo com a proteína apresentadora; e (c) determinar se a proteína-alvo se liga à proteína apresentadora no complexo, em que se a proteína-alvo se liga à proteína apresentadora, a proteína-alvo é identificada como uma proteína-alvo que se liga a uma proteína apresentadora.

[00145] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para identificar uma proteína-alvo com capacidade para formar um complexo com uma proteína apresentadora (a) fornecendo-se (i) uma ou mais proteínas-alvo, (ii) qualquer um dos compostos anteriores; e (iii) uma proteína apresentadora que um inclui uma etiqueta (por exemplo, uma etiqueta de afinidade); (b) combinar a uma ou mais proteínas-alvo, o composto, e a proteína apresentadora sob condições adequadas para permitir a formação de complexo se uma ou mais das proteínas-alvo tiverem capacidade para formar um complexo com a proteína apresen-

tadora; e (c) determinar se uma ou mais proteínas-alvo formam um complexo com o composto e a proteína apresentadora; em que proteínas-alvo que formam um complexo com a proteína apresentadora são identificadas como uma proteína-alvo com capacidade para formar um complexo com uma proteína apresentadora.

[00146] Em algumas modalidades, a etapa de determinação compreende utilizar a etiqueta da referida proteína apresentadora para isolar seletivamente as proteínas-alvo que formaram um complexo com a proteína apresentadora (por exemplo, pelo uso num experimento de pulldown). Em algumas modalidades, o complexo inclui uma proteína-alvo, uma proteína apresentadora e um composto da invenção. Em algumas modalidades, o complexo inclui um conjugado que inclui uma proteína-alvo e uma porção química de ligação de proteína apresentadora (por exemplo, um conjugado formado pela reação entre um grupo de reticulação de um composto da invenção e um aminoácido reativo de uma proteína-alvo) e uma proteína apresentadora. Em algumas modalidades, o método compreende adicionalmente (d) identificar a proteína-alvo (por exemplo, determinar a estrutura da proteína-alvo) num complexo formado entre uma ou mais proteínas-alvo, o composto e a proteína apresentadora. Em algumas modalidades, a identificação da estrutura da proteína-alvo compreende realizar espectrometria de massa no complexo. Em algumas modalidades, a determinação de a proteína-alvo e proteína apresentadora formam um complexo e/ou proteína-alvo se liga à proteína apresentadora no complexo pode ser executado usando-se experimentos de pulldown em que a proteína-alvo ou a proteína apresentadora é rotulada (por exemplo, em que um complexo pode ser submetido a pulldown seletivamente na presença de proteínas-alvo e/ou proteínas apresentadoras que não estão num complexo).

[00147] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para

identificar uma proteína-alvo com capacidade para formar um complexo com uma proteína apresentadora, (a) fornecendo-se (i) duas ou mais proteínas-alvo; (ii) qualquer um dos compostos anteriores; e (iii) uma proteína apresentadora que inclui uma etiqueta de afinidade; (b) combinar as duas ou mais proteínas-alvo, o composto e a proteína apresentadora sob condições adequadas para permitir uma formação de complexo se a referida proteína-alvo tiver capacidade para formar um complexo com a proteína apresentadora; (c) isolar seletivamente um ou mais complexos de uma proteína-alvo, o composto e a proteína apresentadora formados na etapa (b); e (d) identificar a proteína-alvo (por exemplo, determinar a estrutura da proteína-alvo) no um ou mais complexos isolados na etapa (c) por espectrometria de massa; identificar, assim, uma proteína-alvo com capacidade para formar um complexo com uma proteína apresentadora.

[00148] Em algumas modalidades, a etapa de determinação compreende utilizar a etiqueta da referida proteína apresentadora para isolar seletivamente as proteínas-alvo que formaram um complexo com a proteína apresentadora (por exemplo, pelo uso num experimento de pulldown). Em algumas modalidades, o complexo inclui uma proteína-alvo, uma proteína apresentadora e um composto da invenção. Em algumas modalidades, o complexo inclui um conjugado que inclui uma proteína-alvo e uma porção química de ligação de proteína apresentadora (por exemplo, um conjugado formado pela reação entre um grupo de reticulação de um composto da invenção e um aminoácido reativo de uma proteína-alvo) e uma proteína apresentadora. Em algumas modalidades, a determinação de a proteína-alvo e proteína apresentadora formam um complexo e/ou proteína-alvo se liga à proteína apresentadora no complexo pode ser executado usando-se experimentos de pulldown em que a proteína-alvo ou a proteína apresentadora é rotulada (por exemplo, em que um complexo pode ser submetido a pull-

down seletivamente na presença de proteínas-alvo e/ou proteínas apresentadoras que não estão num complexo).

[00149] Em algumas modalidades, os compostos, conjugados e complexos da presente invenção podem ser úteis para identificar localizações em proteínas-alvo para fixar porções químicas de ligação de proteína apresentadora, o que pode resultar em conjugados com capacidade para formar complexos com proteínas apresentadoras.

[00150] Consequentemente, em outro aspecto, a divulgação fornece um método para identificar e/ou caracterizar uma localização numa proteína-alvo para formar um conjugado com uma porção química de ligação de proteína apresentadora, qual conjugado tem capacidade para formar um complexo com uma proteína apresentadora. Este método inclui as etapas de: (a) fornecer (i) um conjugado que inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada a uma proteína-alvo numa localização e (ii) uma proteína apresentadora; (b) combinar o conjugado e a proteína apresentadora; (c) determinar se o conjugado e a proteína apresentadora formam um complexo; e (d) repetir opcionalmente as etapas (a) a (c) com a porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada em diferentes localizações na proteína-alvo até que um conjugado e a proteína apresentadora formem um complexo, em que uma localização numa proteína-alvo para formar um conjugado com uma porção química de ligação de proteína apresentadora, conjugado o qual tem capacidade para formar um complexo com uma proteína apresentadora é identificado se o conjugado e a proteína apresentadora formarem um complexo. Em algumas modalidades, a proteína apresentadora é uma variante de uma proteína-alvo de ocorrência natural.

[00151] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para identificar e/ou caracterizar uma localização numa proteína-alvo para formar um conjugado com uma porção química de ligação de proteína

apresentadora, conjugado o qual tem capacidade para formar um complexo com uma proteína apresentadora. Este método inclui as etapas de: (a) fornecer (i) um composto que inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora e um grupo de reticulação; (ii) uma proteína-alvo; e (iii) uma proteína apresentadora; (b) combinar o composto com a proteína-alvo na presença da proteína apresentadora sob condições que permitam a formação de um conjugado que inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada a uma proteína-alvo numa localização; (c) determinar se o conjugado e a proteína apresentadora formam um complexo; e (d) repetir opcionalmente as etapas (a) a (c) em que a porção química de ligação de proteína apresentadora é conjugada em diferentes localizações na proteína-alvo até que um conjugado e a proteína apresentadora formem um complexo; em que uma localização numa proteína-alvo para formar um conjugado com uma porção química de ligação de proteína apresentadora, conjugado o qual tem capacidade para formar um complexo com uma proteína apresentadora é identificado se o conjugado e a proteína apresentadora formarem um complexo, identificando, assim, uma localização numa proteína-alvo para formar um conjugado com capacidade para formar um complexo com uma proteína apresentadora. Em algumas modalidades, a proteína-alvo é uma variante de uma proteína-alvo de ocorrência natural.

[00152] Em algumas modalidades, os compostos, conjugados e complexos da presente invenção podem ser úteis para identificar compostos com capacidade para formar ligações covalentes a proteínas-alvo na presença de proteínas apresentadoras. Em algumas modalidades, os compostos identificados seletivamente formam ligações covalentes com proteínas-alvo na presença de proteínas apresentadoras.

[00153] Consequentemente, em outro aspecto, a divulgação forne-

ce um método para identificar e/ou caracterizar um composto com capacidade para se ligar de modo covalente a uma proteína-alvo na presença de uma proteína apresentadora. Este método inclui as etapas de: (a) fornecer uma amostra incluindo (i) um composto que inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora e um grupo de reticulação; (ii) uma proteína-alvo; e (iii) uma proteína apresentadora; e (b) determinar se o composto e a proteína-alvo formam uma ligação covalente por meio do grupo de reticulação no referido composto na amostra, em que um composto é identificado como se ligando de modo covalente a uma proteína-alvo na presença de uma proteína apresentadora se o composto e a proteína-alvo reagirem na amostra.

[00154] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para identificar e/ou caracterizar um composto com capacidade para ligação seletiva e covalente a uma proteína-alvo na presença de uma proteína apresentadora. Este método inclui as etapas de: (a) fornecer uma primeira amostra incluindo (i) um composto que inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora e um grupo de reticulação; (ii) uma proteína-alvo; e (iii) uma proteína apresentadora e uma segunda amostra que inclui (i) o mesmo composto que inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora e um grupo de reticulação como na primeira amostra e (ii) a mesma proteína-alvo que na primeira amostra; e (b) determinar a extensão até qual o composto e a proteína-alvo reagem na primeira amostra em comparação à segunda amostra, em que um composto é identificado como seletivamente se ligando de modo covalente a uma proteína-alvo na presença de uma proteína apresentadora se o composto e a proteína-alvo reagirem na primeira amostra mais do que na segunda amostra.

[00155] Em algumas modalidades, um composto é identificado como seletivamente se ligando de modo covalente a uma proteína-alvo na presença de uma proteína apresentadora se o composto e a proteína-

ína-alvo reagirem na primeira amostra pelo menos 5 vezes mais do que na segunda amostra. Em algumas modalidades, um composto é identificado como seletivamente se ligando de modo covalente a uma proteína-alvo na presença de uma proteína apresentadora se o composto e a proteína-alvo reagirem na primeira amostra, mas não reagem substancialmente na segunda amostra.

[00156] Em algumas modalidades, os compostos, conjugados, e complexos da presente invenção podem ser úteis na identificação de conjugados que incluem uma proteína-alvo e uma porção química de ligação de proteína apresentadora com capacidade para formar complexos com proteínas apresentadoras.

[00157] Consequentemente, em outro aspecto, a divulgação fornece um método para identificar e/ou caracterizar um conjugado com capacidade para formar um complexo com uma proteína apresentadora. Este método inclui as etapas de: (a) fornecer (i) um conjugado incluindo uma porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada a uma proteína-alvo e (ii) uma proteína apresentadora; e (b) combinar o conjugado e a proteína apresentadora sob condições adequadas para formar um complexo; (c) determinar se o conjugado e a proteína apresentadora formam um complexo, em que um conjugado é identificado como com capacidade para formar um complexo com uma proteína apresentadora se o conjugado e a proteína apresentadora formarem um complexo, identificando, assim, um conjugado com capacidade para formar um complexo com uma proteína apresentadora.

[00158] Em algumas modalidades, a ligação entre um conjugado e uma proteína pode ser determinada por um método que inclui um ensaio de transferência de energia de fluorescência resolvida em tempo ternário, um ensaio homogêneo de proximidade luminescente amplificada ternário, uma calorimetria de titulação isotérmica, ressonância de plasmon de superfície ou ressonância magnética nuclear.

[00159] Em algumas modalidades, os compostos, conjugados, e complexos da presente invenção podem ser úteis para a determinação da estrutura de interfaces de proteína-proteína entre proteínas apresentadoras e proteínas-alvo.

[00160] Consequentemente, em outro aspecto, a divulgação fornece um método para determinar a estrutura de e/ou avaliar uma ou mais particularidades estruturais de uma interface num complexo que inclui uma proteína apresentadora e uma proteína-alvo. Este método inclui as etapas de: (a) fornecer (i) um conjugado que inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada a uma proteína-alvo e (ii) uma proteína apresentadora; (b) contatar o conjugado com uma proteína apresentadora para formar um complexo (por exemplo, num frasco); e (c) determinar a estrutura de cristal do complexo, em que a estrutura da interface inclui pelo menos a porção da estrutura de cristal entre a proteína apresentadora e a proteína-alvo, determinando, assim, a estrutura de uma interface num complexo que inclui uma proteína apresentadora e uma proteína-alvo.

[00161] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para determinar a estrutura de e/ou avaliar uma ou mais particularidades estruturais de uma interface num complexo que inclui uma proteína apresentadora e uma proteína-alvo. Este método inclui as etapas de: (a) fornecer (i) um composto que inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora e uma porção química de reticulação; (ii) uma proteína-alvo; e (iii) uma proteína apresentadora; (b) combinar o composto, a proteína-alvo, e a proteína apresentadora sob condições adequadas para formar um conjugado entre o composto e a proteína-alvo e para a formação de um complexo entre o referido conjugado e a referida proteína apresentadora (por exemplo, num frasco); e (c) determinar a estrutura de cristal do complexo, em que a estrutura da interface inclui pelo menos a porção da estrutura de cristal entre a proteína apresentadora e a proteína-alvo.

ína apresentadora e a proteína-alvo, determinando, assim, a estrutura de uma interface num complexo que inclui uma proteína apresentadora e uma proteína-alvo.

[00162] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para determinar a estrutura de e/ou avaliar uma ou mais particularidades estruturais de uma interface num complexo que inclui uma proteína apresentadora e uma proteína-alvo. Este método inclui as etapas de: (a) fornecer (i) um composto da Fórmula VII; (ii) uma proteína-alvo; e (iii) uma proteína apresentadora; (b) formar um complexo que inclui o composto, a proteína-alvo e a proteína apresentadora (por exemplo, num frasco); e (c) determinar a estrutura de cristal do complexo, em que a estrutura da interface inclui pelo menos a porção da estrutura de cristal entre a proteína apresentadora e a proteína-alvo, determinando, assim, a estrutura de uma interface num complexo que inclui uma proteína apresentadora e uma proteína-alvo.

[00163] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para determinar a estrutura de e/ou avaliar uma ou mais particularidades estruturais de uma interface de proteína-proteína num complexo que inclui uma proteína apresentadora e uma proteína-alvo. Este método inclui as etapas de: (a) fornecer um cristal de qualquer um dos complexos anteriores; e (b) determinar a estrutura do cristal, em que a estrutura da interface inclui pelo menos a porção da estrutura de cristal entre a proteína apresentadora e a proteína-alvo, determinando, assim, a estrutura de uma interface de proteína-proteína num complexo que inclui uma proteína apresentadora e uma proteína-alvo.

[00164] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para identificar e/ou caracterizar compostos com capacidade para modular a atividade biológica de uma proteína-alvo. Este método inclui as etapas de: (a) fornecer a estrutura de uma interface de proteína-proteína num complexo que inclui uma proteína apresentadora e uma proteína-

alvo (por exemplo, uma estrutura determinada por qualquer um dos métodos anteriores); e (b) determinar a estrutura de compostos com capacidade para ligação na interface, identificar, assim, os compostos com capacidade para modular a atividade biológica de uma proteína-alvo. Em algumas modalidades, a estrutura de compostos com capacidade para ligação na interface é determinada usando-se métodos computacionais. Em algumas modalidades, a estrutura de compostos com capacidade para ligação na interface é determinada pela triagem de compostos que incluem uma porção química de ligação de proteína apresentadora descrita no presente documento para formação de complexo na presença de uma proteína-alvo e uma proteína apresentadora.

[00165] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para obter coordenadas de cristal de raios X para um complexo. Este método inclui as etapas de: (a) fornecer (i) um conjugado que inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada a uma proteína-alvo e (ii) uma proteína apresentadora; (b) combinar o conjugado e a proteína apresentadora sob condições adequadas para permitir a formação de complexo se o conjugado tiver capacidade para formar um complexo com a proteína apresentadora; e (c) determinar a estrutura de cristal do complexo, obtendo, assim, as coordenadas de cristal de raios X para o complexo.

[00166] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para obter coordenadas de cristal de raios X para um complexo. Este método inclui as etapas de: (a) fornecer (i) um composto que inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora e uma porção química de reticulação; (ii) uma proteína-alvo; e (iii) uma proteína apresentadora; (b) combinar o composto, a proteína-alvo, e a proteína apresentadora sob condições adequadas para permitir a formação de complexo se o composto tem capacidade para formar um complexo

com a proteína apresentadora; e (c) determinar a estrutura de cristal do complexo, obtendo, assim, coordenadas de cristal de raios X para o complexo.

[00167] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para obter coordenadas de cristal de raios X para um complexo. Este método inclui as etapas de: (a) fornecer (i) um composto da invenção; (ii) uma proteína-alvo; e (iii) uma proteína apresentadora; (b) combinar o composto, a proteína-alvo e a proteína apresentadora sob condições adequadas para permitir a formação de complexo se o composto tiver capacidade para formar um complexo com a proteína apresentadora; e (c) determinar a estrutura de cristal do complexo, obtendo, assim, as coordenadas de cristal de raios X para o complexo.

[00168] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para determinar os resíduos numa proteína-alvo que participa na ligação com uma proteína apresentadora. Este método inclui as etapas de: (a) fornecer coordenadas de cristal de raios X de um complexo obtido por um método para a invenção; (b) identificar os resíduos da proteína-alvo que incluem um átomo dentro de 4 Å de um átomo na proteína apresentadora; determinando, assim, os resíduos numa proteína-alvo que participa na ligação com uma proteína apresentadora. Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para determinar propriedades bioquímicas e/ou biofísicas de qualquer um dos complexos de proteína apresentadora/proteína-alvo descritos no presente documento. Este método inclui as etapas de: (a) fornecer coordenadas de cristal de raios X de um complexo descrito no presente documento obtidas por um método descrito no presente documento; (b) calcular uma propriedade bioquímica e/ou biofísica do complexo; determinando, assim, propriedades bioquímicas e/ou biofísicas de uma proteína apresentadora/proteína-alvo complexo.

[00169] Em algumas modalidades, as propriedades bioquímicas

e/ou biofísicas incluem a energia livre de ligação de um complexo, a K_d de um complexo, a K_i de um complexo, a K_{inata} de um complexo, e/ou a K_i/K_{inata} de um complexo. Em algumas modalidades, as propriedades bioquímicas e/ou biofísicas são determinadas por calorimetria de titulação isotérmica, ressonância de plasmon de superfície, e/ou espectrometria de massa.

[00170] Em algumas modalidades, a interface num complexo incluindo uma proteína apresentadora e uma proteína-alvo é ou compreende um bolso de ligação.

[00171] Em alguns aspectos, a divulgação fornece composições que incluem qualquer um dos compostos anteriores, uma proteína-alvo e uma proteína apresentadora em solução.

[00172] Em alguns aspectos, a divulgação fornece uma composição farmacêutica incluindo qualquer um dos compostos, conjugados ou complexos da invenção e um excipiente farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica está na forma de dosagem unitária.

[00173] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para modular uma proteína-alvo (por exemplo, uma proteína-alvo eucariótica como uma proteína-alvo de mamífero ou uma proteína-alvo fúngica ou uma proteína-alvo procariótica como uma proteína-alvo bacteriana). Em algumas modalidades, este método inclui as etapas de contatar a proteína-alvo com uma quantidade de modulação (por exemplo, modulação positiva ou negativa) de qualquer um dos compostos (por exemplo, na presença de uma proteína apresentadora), conjugados incluindo uma porção química de ligação de proteína-alvo, ou composições da invenção.

[00174] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para modular (por exemplo, modulação positivamente ou negativamente) uma proteína-alvo (por exemplo, uma proteína-alvo eucariótica como

uma proteína-alvo de mamífero ou uma proteína-alvo fúngica ou uma proteína-alvo procariótica como uma proteína-alvo bacteriana). Em algumas modalidades, este método inclui as etapas de contatar uma célula que expressa a proteína-alvo e uma proteína apresentadora com uma quantidade eficaz de um composto ou composição da invenção sob condições em que o composto pode formar um complexo com uma proteína apresentadora e o complexo resultante pode se ligar à proteína-alvo, modulando, assim, (por exemplo, modulação positivamente ou negativamente) a proteína-alvo.

[00175] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para modular (por exemplo, modulação positivamente ou negativamente) uma proteína-alvo (por exemplo, uma proteína-alvo eucariótica como uma proteína-alvo de mamífero ou uma proteína-alvo fúngica ou uma proteína-alvo procariótica como uma proteína-alvo bacteriana). Em algumas modalidades, este método inclui as etapas de contatar a proteína-alvo com conjugado da invenção incluindo uma porção química de ligação de proteína-alvo, modulando, assim, a proteína-alvo.

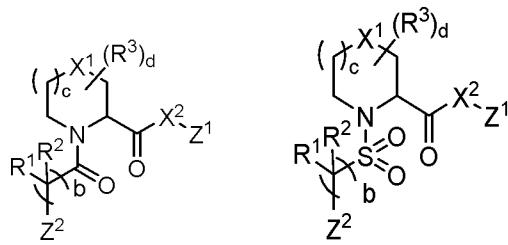
[00176] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para inibir atividade de prolil isomerase. Em algumas modalidades, este método inclui contatar uma célula que expressa a prolil isomerase com um composto ou composição da invenção sob condições que permitam a formação de um complexo entre o composto e a prolil isomerase, inibindo, assim, a atividade de prolil isomerase.

[00177] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para formar um complexo de proteína apresentadora/composto numa célula. Em algumas modalidades, este método inclui as etapas de contatar uma célula que expressa a proteína apresentadora com um composto ou composição da invenção sob condições que permitam a formação de um complexo entre o composto e a proteína apresentadora.

[00178] Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos

anteriores, conjugados, complexos, composições, ou métodos, a porção química de ligação de proteína apresentadora tem capacidade para ligar uma proteína codificada por qualquer um dos genes da Tabela 1. Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos anteriores, conjugados, complexos, composições, ou métodos, a porção química de ligação de proteína apresentadora é uma porção química de ligação de prolil isomerase. Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos anteriores, conjugados, complexos, composições, ou métodos, a porção química de ligação de proteína apresentadora é uma porção química de ligação de FKBP (por exemplo, a porção química de ligação de proteína apresentadora tem capacidade para ligar FKBP12, FKBP12.6, FKBP13, FKBP25, FKBP51, ou FKBP52), uma porção química de ligação de ciclofilina (por exemplo, a porção química de ligação de proteína apresentadora tem capacidade para ligar PP1A, CYPB, CYPC, CYP40, CYPE, CYPD, NKTR, SRCyp, CYPH, CWC27, CYPL1, CYP60, CYPJ, PPIL4, PPIL6, RANBP2, ou PPWD1), ou uma porção química de ligação de PIN1. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos anteriores, a proteína apresentadora é conhecida por se ligar à porção química de ligação de proteína apresentadora.

[00179] Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos anteriores, conjugados, complexos, composições, ou métodos, a porção química de ligação de proteína apresentadora é uma porção química de ligação de FKBP (por exemplo, uma porção química de ligação de FKBP seletiva ou a porção química de ligação de FKBP não seletiva). Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos anteriores, conjugados, complexos, composições, ou métodos, a porção química de ligação de FKBP inclui a estrutura da Fórmula IIa ou IIb:



Fórmula IIa

Fórmula IIb

[00180] em que Z^1 e Z^2 são, cada um, independentemente, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, ou Z^1 e Z^2 combinados para formar, com os átomos aos quais os mesmos são fixados, um macrociclo de 10 a 40 membros opcionalmente substituído; e em que pelo menos um dentre Z^1 ou Z^2 inclui um ponto de fixação ao grupo de reticulação;

[00181] b e c são, independentemente, 0, 1, ou 2;

[00182] d é 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7;

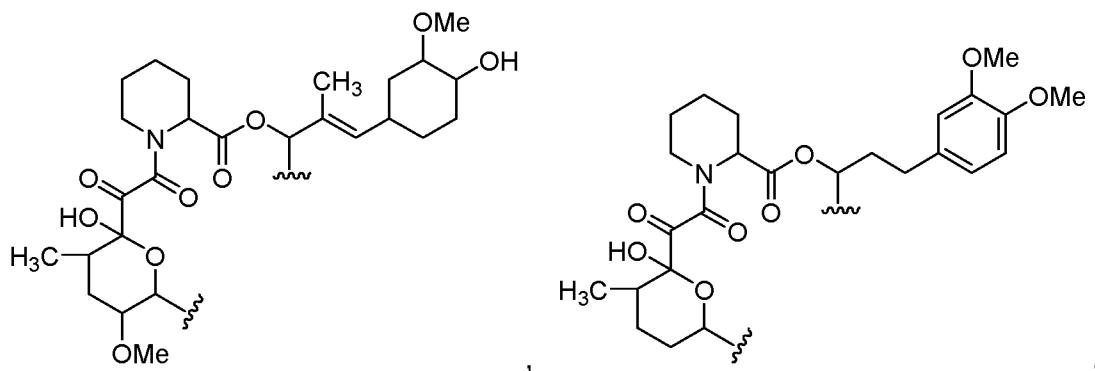
[00183] X^1 e X^2 são, cada um, independentemente, ausente, CH₂, O, S, SO, SO₂ ou NR⁴;

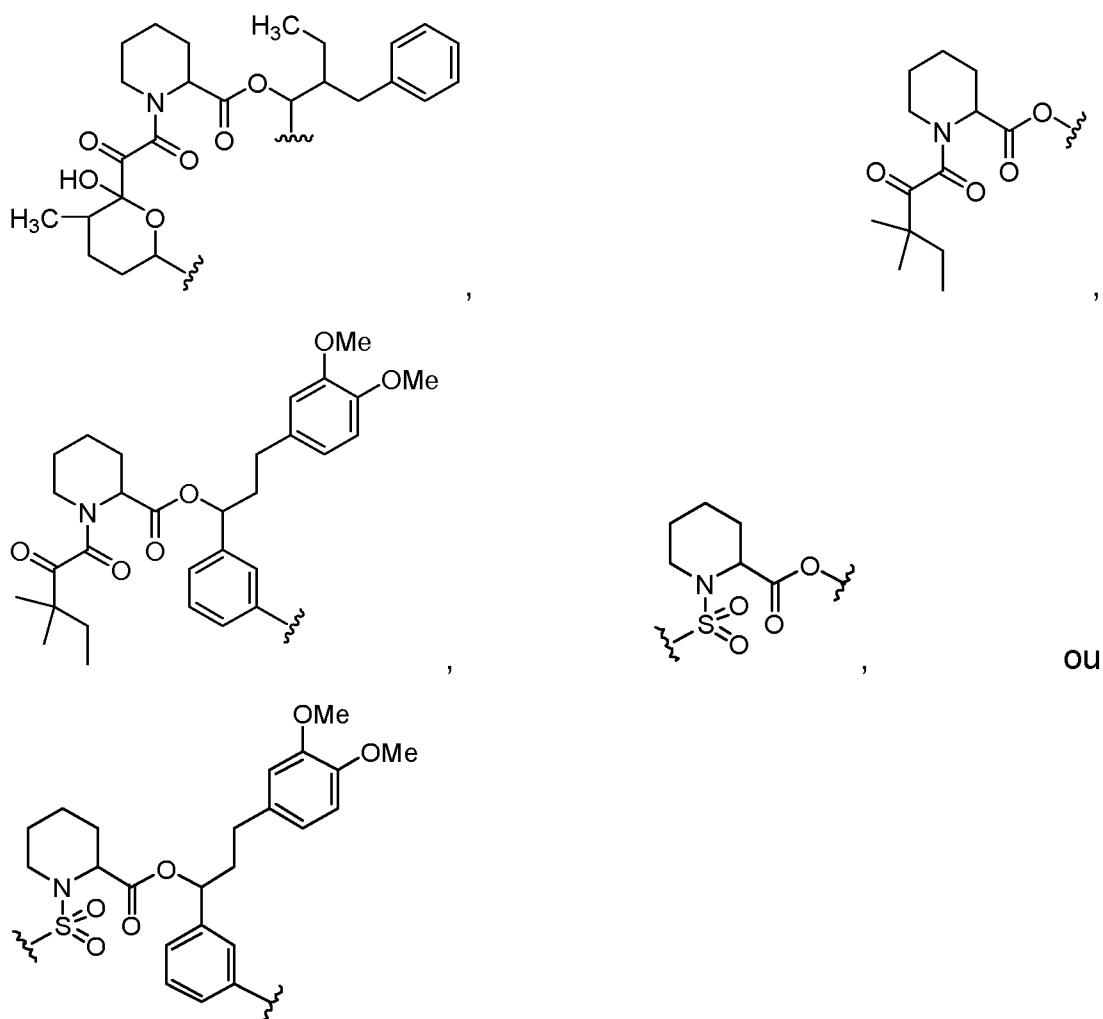
[00184] cada R¹ e R² é, independentemente, hidrogênio, hidroxila, amino opcionalmente substituído, halogênio, tiol, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, carbocyclila C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heterocyclila C₂-C₉ opcionalmente substituída (por exemplo, heteroarila C₂-C₉ opcionalmente substituída), C₂-C₉ heterociclitil C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída (por exemplo, C₂-C₉ heteroaril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída), ou R¹ e R² combinados com o átomo de carbono aos quais os mesmos são ligados para formar C=O ou R¹ e R² combinados para formar uma carbocyclila C₃-C₁₀ opcionalmente substituída ou heterocyclila C₂-C₉ opcionalmente substituída;

[00185] cada R³ é, independentemente, hidroxila, amino opcionalmente substituído, halogênio, tiol, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, carbociclila C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heterociclila C₂-C₉ opcionalmente substituída (por exemplo, heteroarila C₂-C₉ opcionalmente substituída), ou C₂-C₉ heterocicil C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída (por exemplo, C₂-C₉ heteroaril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída) ou dois R⁸ combinados para formar uma carbociclila C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, por exemplo, heteroarila C₂-C₉ opcionalmente substituída; e

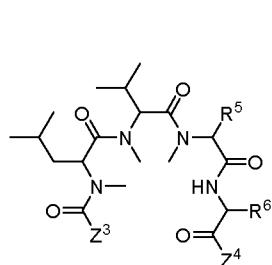
[00186] cada R⁴ é, independentemente, hidrogênio, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, arila opcionalmente substituída, carbociclila C₃-C₇, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, e C₃-C₇ carbocicil C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída.

[00187] Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos anteriores, conjugados, complexos, composições, ou métodos, a porção química de ligação de proteína apresentadora inclui a estrutura:

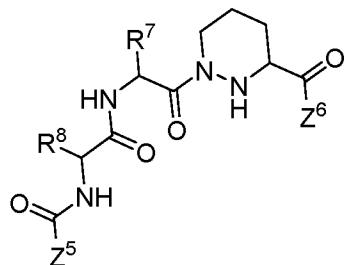




[00188] Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos anteriores, conjugados, complexos, composições, ou métodos, a porção química de ligação de proteína apresentadora é uma porção química de ligação de ciclofilina (por exemplo, uma porção química de ligação de ciclofilina seletiva ou uma porção química de ligação de ciclofilina não seletiva). Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos anteriores, conjugados, complexos, composições, ou métodos, a porção química de ligação de ciclofilina inclui a estrutura da Fórmula III ou IV:



Fórmula III



Fórmula IV

[00189] em que Z^3 , Z^4 , Z^5 , e Z^6 são, cada um, independentemente, hidroxila, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, ou Z^3 e Z^4 ou Z^5 e Z^6 se combinam para formar, com os átomos aos quais as mesmas são fixadas, um macrociclo de 10 a 40 membros opcionalmente substituído;

[00190] pelo menos um dentre Z^3 , Z^4 , Z^5 , Z^6 , ou R^5 inclui um ponto de fixação ao grupo de reticulação;

[00191] e é 0, 1, 2, 3, ou 4;

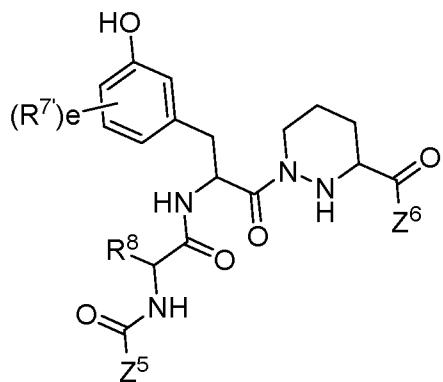
[00192] R^5 e R^7 são, independentemente, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, carbociclila C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heteroarila C₂-C₉ opcionalmente substituída, C₂-C₉ heteroaril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heterociclila C₂-C₉ opcionalmente substituída, ou C₂-C₉ heterocicil C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída;

[00193] R^6 é alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída; e

[00194] R^8 é hidrogênio, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, arila opcionalmente substituída, carbociclila C₃-C₇, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, e C₃-C₇ carbocicil C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída.

[00195] Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos

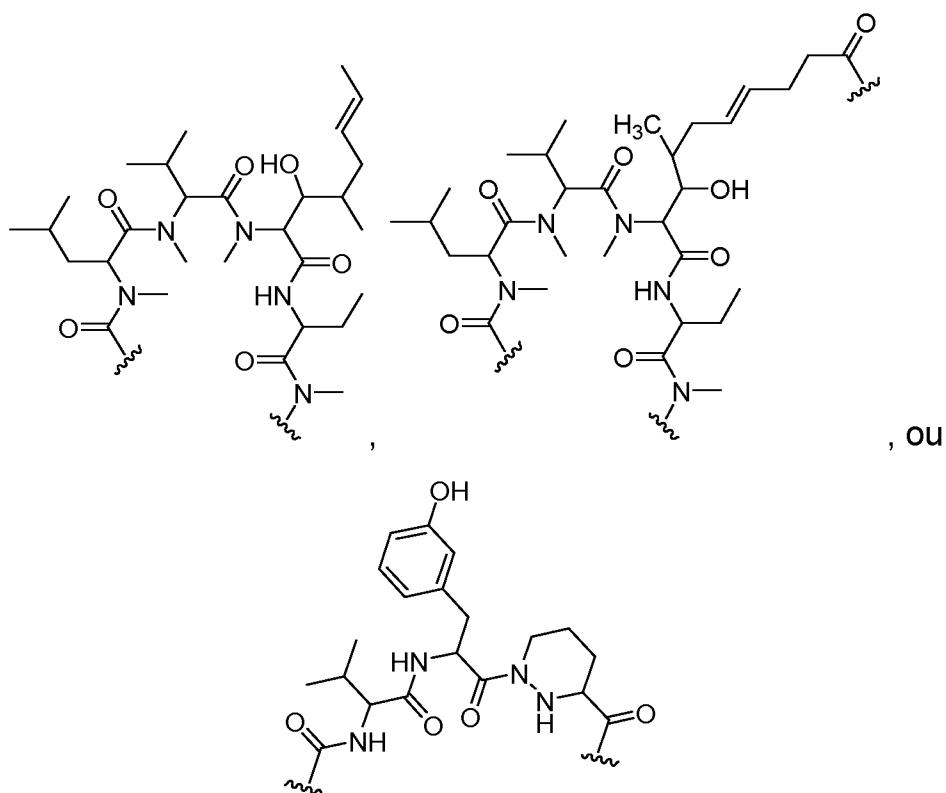
anteriores, conjugados, complexos, composições, ou métodos, a porção química de ligação de ciclofilina inclui a estrutura da Fórmula IVa:



Fórmula IVa

[00196] em que cada R^7' é, independentemente, hidroxila, ciano, amino opcionalmente substituída, halogênio, tiol, alquila C_1 - C_6 opcionalmente substituída, alquenila C_2 - C_6 opcionalmente substituída, alquinila C_2 - C_6 opcionalmente substituída, heteroalquila C_1 - C_6 opcionalmente substituída, heteroalquenila C_2 - C_6 opcionalmente substituída, heteroalquinila C_2 - C_6 opcionalmente substituída, carbociclila C_3 - C_{10} opcionalmente substituída, arila C_6 - C_{10} opcionalmente substituída, C_6 - C_{10} aril C_1 - C_6 alquila opcionalmente substituída, heterociclila C_2 - C_9 opcionalmente substituída (por exemplo, heteroarila C_2 - C_9 opcionalmente substituída), ou C_2 - C_9 heterocicil C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída (por exemplo, C₂-C₉ heteroaril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída).

[00197] Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos anteriores, conjugados, complexos, composições, ou métodos, a porção química de ligação de proteína apresentadora inclui a estrutura:



[00198] Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos anteriores, conjugados, complexos, composições, ou métodos, uma proteína-alvo é uma GTPase, proteína de ativação de GTPase, fator de troca de nucleotídeo de Guanina, uma proteína de choque térmico, um canal iônico, uma proteína de bobina em espiral, uma quinase, uma fosfatase, uma ubiquitina ligase, um fator de transcrição, um modificador/remodelador de cromatina, ou a proteína com motivos e domínio de interação de proteína-proteína clássicos. Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos anteriores, conjugados, complexos, composições, ou métodos, a proteína-alvo inclui uma superfície não alvejável por fármaco. Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos anteriores, conjugados, complexos, composições, ou métodos, a proteína-alvo não tem um bolso de ligação tradicional.

[00199] Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos anteriores, conjugados, complexos, composições, ou métodos, a sequência de aminoácidos da proteína-alvo foi modificada para substituir pelo menos um aminoácido nativo com um aminoácido reativo (por

exemplo, um aminoácido natural como a cisteína, lisina, tirosina, ácido aspártico, ácido glutâmico, ou serina, ou um aminoácido não natural). Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos anteriores, conjugados, complexos, composições, ou métodos, a sequência de aminoácidos da proteína-alvo foi modificada para substituir pelo menos um aminoácido reativo nativo (por exemplo, a cisteína, lisina, tirosina, ácido aspártico, ácido glutâmico, ou serina) com um aminoácido não reativo (por exemplo, um aminoácido natural como uma serina, valina, alanina, isoleucina, treonina, tirosina, ácido aspártico, ácido glutâmico, ou leucina ou um aminoácido não natural). Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos anteriores, conjugados, complexos, composições, ou métodos, o pelo menos um aminoácido reativo nativo é um aminoácido exposto a solvente. Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos anteriores, conjugados, complexos, composições, ou métodos, a sequência de aminoácidos da proteína-alvo é modificada para substituir todos os aminoácidos reativos com um aminoácido não reativo. Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos anteriores, conjugados, complexos, composições, ou métodos, a substituição é uma substituição conservativa. Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos anteriores, conjugados, complexos, composições, ou métodos, a proteína-alvo inclui apenas um aminoácido exposto a solvente reativo.

[00200] Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos anteriores, conjugados, complexos, composições, ou métodos, a proteína apresentadora é uma proteína codificada por qualquer um dos genes da Tabela 1. Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos anteriores, conjugados, complexos, composições, ou métodos, a proteína apresentadora é uma prolil isomerase. Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos anteriores, conjugados, complexos, composições, ou métodos, a prolil isomerase é um mem-

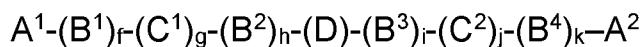
bro da família FKBP (por exemplo, FKBP12, FKBP12.6, FKBP13, FKBP25, FKBP51, ou FKBP52), um membro da família ciclofilina (por exemplo, PP1A, CYPB, CYPC, CYP40, CYPE, CYPD, NKTR, SRCyp, CYPH, CWC27, CYPL1, CYP60, CYPJ, PPIL4, PPIL6, RANBP2, ou PPWD1), ou PIN1.

[00201] Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos anteriores, conjugados, complexos, composições, ou métodos, a sequência de aminoácidos da proteína apresentadora foi modificada para substituir pelo menos um aminoácido nativo por um aminoácido reativo (por exemplo, um aminoácido natural como a cisteína, lisina, tirosina, ácido aspártico, ácido glutâmico, ou serina ou um aminoácido não natural). Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos anteriores, conjugados, complexos, composições, ou métodos, a sequência de aminoácidos da proteína apresentadora foi modificada para substituir pelo menos um aminoácido reativo nativo (por exemplo, uma cisteína, lisina, tirosina, ácido aspártico, ácido glutâmico ou serina) por um aminoácido não reativo (por exemplo, um aminoácido natural como uma serina, valina, alanina, isoleucina, treonina, tirosina, ácido aspártico, ácido glutâmico, ou leucina ou um aminoácido não natural). Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos anteriores, conjugados, complexos, composições, ou métodos, o pelo menos um aminoácido reativo nativo é um aminoácido exposto a solvente. Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos anteriores, conjugados, complexos, composições, ou métodos, a sequência de aminoácidos da proteína apresentadora é modificada para substituir todos os aminoácidos reativos por um aminoácido não reativo. Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos anteriores, conjugados, complexos, composições, ou métodos, a substituição é uma substituição conservativa.

[00202] Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos

anteriores, conjugados, complexos, composições, ou métodos, o ligante tem 1 a 20 átomos de comprimento. Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos anteriores, conjugados, complexos, composições, ou métodos, o ligante tem 1,5 a 30 angstroms de comprimento.

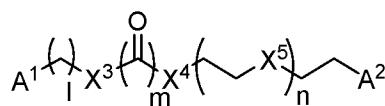
[00203] Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos anteriores, conjugados, complexos, composições, ou métodos, o ligante tem a estrutura da Fórmula V:



Fórmula V

[00204] em que A^1 é uma ligação entre o ligante e a porção química de ligação de proteína; A^2 é uma ligação entre o grupo de reticulação e o ligante; B^1 , B^2 , B^3 e B^4 são, cada um, independentemente selecionados a partir de alquila C_{1-2} opcionalmente substituída, heteroalquila C_{1-3} opcionalmente substituída, O, S, e NR^N ; R^N é hidrogênio, alquila C_{1-4} opcionalmente substituída, alquenila C_{2-4} opcionalmente substituída, alquinila C_{2-4} opcionalmente substituída, heterociclila C_{2-6} opcionalmente substituída, arila C_{6-12} opcionalmente substituída, ou heteroalquila C_{1-7} opcionalmente substituída; C^1 e C^2 são, cada um, independentemente, selecionados a partir de carbonila, tiocarbonila, sulfonyla ou fosforila; f , g , h , i , j , e k são, cada um, independentemente, 0 ou 1; e D é alquila C_{1-10} opcionalmente substituída, alquenila C_{2-10} opcionalmente substituída, alquinila C_{2-10} opcionalmente substituída, heterociclila C_{2-6} opcionalmente substituída, arila C_{6-12} opcionalmente substituída, polietileno glicol C_2-C_{10} opcionalmente substituído, ou heteroalquila C_{1-10} opcionalmente substituída, ou uma ligação química ligando $A^1-(B^1)_f-(C^1)_g-(B^2)_h-$ a $-(B^3)_i-(C^2)_j-(B^4)_k-A^2$

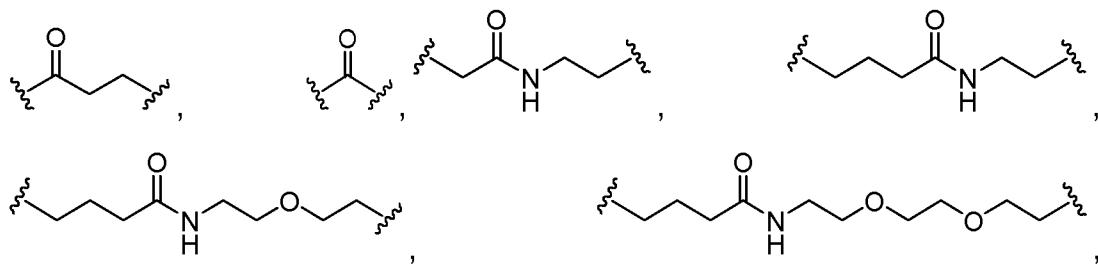
[00205] Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos anteriores, conjugados, complexos, composições, ou métodos, o ligante inclui a estrutura da Fórmula VI:

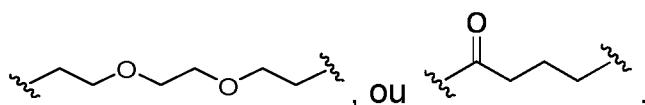


Fórmula VI

- [00206] em que A^1 é uma ligação entre o ligante e a porção química de ligação de proteína;
- [00207] A^2 é uma ligação entre o grupo de reticulação e o ligante;
- [00208] l é 0, 1, 2, ou 3;
- [00209] m é 0 ou 1;
- [00210] n é 0, 1, ou 2; e
- [00211] X^3 , X^4 , e X^5 são, cada um, independentemente, ausente, O, S, $-\text{C}\equiv\text{C}-$, CR^9R^{10} ou NR^{11} ; e
- [00212] cada R^9 , R^{10} , e R^{11} são, independentemente, hidrogênio, alquila $\text{C}_1\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, alquenila $\text{C}_2\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, alquinila $\text{C}_2\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, arila opcionalmente substituída, carbociclila $\text{C}_3\text{-C}_7$, $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ aril $\text{C}_1\text{-C}_6$ alquila opcionalmente substituída, e $\text{C}_3\text{-C}_7$ carbocicil C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída. Em algumas modalidades, cada R^9 , R^{10} e R^{11} é, independentemente, hidrogênio, alquila $\text{C}_1\text{-C}_6$ não substituída, alquenila $\text{C}_2\text{-C}_6$ não substituída, alquinila $\text{C}_2\text{-C}_6$ não substituída, arila não substituída, carbociclila $\text{C}_3\text{-C}_7$, $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ aril $\text{C}_1\text{-C}_6$ alquila não substituída e $\text{C}_3\text{-C}_7$ carbocicil C₁-C₆ alquila não substituída.

- [00213] Em algumas modalidades de qualquer um dos compostos anteriores, conjugados, complexos, composições, ou métodos, o ligante inclui a estrutura:





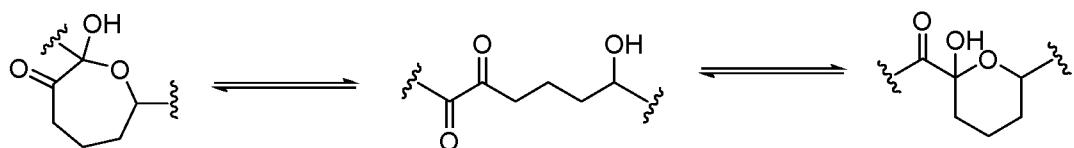
TERMOS QUÍMICOS

[00214] Aqueles versados na técnica entenderão que determinados compostos descritos no presente documento podem existir num ou mais formas isométricas (por exemplo, estereoisômeros, isômeros geométricos, tautômeros) e/ou isotópicas (por exemplo, em que um ou mais átomos foram substituídos por um isótopo diferente do átomo, como hidrogênio substituído por deutério). Salvo indicado de outro modo ou livre de contexto, uma estrutura retratada pode ser compreendida por representar qualquer destas formas isoméricas ou isotópicas, individualmente ou em combinação.

[00215] Os compostos descritos no presente documento podem ser assimétricos (por exemplo, tendo um ou mais estereocentros). Todos os estereoisômeros, como enantiômeros e diastereômeros, são pretendidos salvo indicado de outro modo. Os compostos da presente descrição que contêm átomos de carbono assimetricamente substituídos podem ser isolados em formas opticamente ativas ou racêmicas. Os métodos sobre como preparar formas opticamente ativas a partir de materiais de partida opticamente ativos são conhecidos na técnica, como pela resolução de misturas racêmicas ou pela síntese estereoseletiva. Muitos isômeros geométricos de olefinas, ligações duplas de C=N, e similares também podem estar presentes nos compostos descritos no presente documento, e todos estes isômeros estáveis são contemplados na presente descrição. Os isômeros geométricos cis e trans dos compostos da presente descrição são descritos e podem ser isolados como uma mistura de isômeros ou como formas isoméricas separadas.

[00216] Em algumas modalidades, um ou mais compostos retratados no presente documento podem existir em diferentes formas tau-

toméricas. Como estará livre de contexto, a menos que excluído explicitamente, referências a estes compostos abrangem todas estas formas tautoméricas. Em algumas modalidades, as formas tautoméricas resultam da permuta de uma ligação única por uma ligação dupla adjacente e a migração concomitante de um próton. Em determinadas modalidades, uma forma tautomérica pode ser um tautômero prototrópico, que é um estado de protonação isomérica que tem a mesma fórmula empírica e carga total como uma forma de referência. Os exemplos de porções químicas formas tautoméricas prototrópicas são cetona – pares de enol, amida – pares de ácido imídico, lactam – pares de lactim, amida – pares de ácido imídico, enamina – pares de imina, e formas anulares em que um próton pode ocupar duas ou mais posições de um sistema heterocíclico, como, 1H- e 3H-imidazol, 1H-, 2H- e 4H- 1,2,4-triazol, 1H- e 2H- isoindol, e 1H- e 2H-pirazol. Em algumas modalidades, as formas tautoméricas podem estar em equilíbrio ou estericamente travadas numa forma por substituição adequada. Em determinadas modalidades, as formas tautoméricas resultam de uma interconversão acetal, por exemplo, a interconversão ilustrada no esquema abaixo:



[00217] Aqueles versados na técnica entenderão que, em algumas modalidades, os isótopos de compostos descritos no presente documento podem ser preparados e/ou utilizados de acordo com a presente invenção. "Isótopos" se refere a átomos que têm o mesmo número atômico, mas diferentes números de massa resultantes de um número diferente de nêutrons nos núcleos. Por exemplo, isótopos de hidrogênio incluem trítio e deutério. Em algumas modalidades, uma substituição isotópica (por exemplo, substituição de hidrogênio por deutério)

pode alterar as propriedades físico-químicas das moléculas, como metabolismo e/ou a taxa de racemização de um centro quiral.

[00218] Como é conhecido na técnica, muitas entidades químicas (em particular muitas moléculas orgânicas e/ou muitas moléculas pequenas) podem adotar uma variedade de formas sólidas diferentes como, por exemplo, formas amorfas e/ou formas cristalinas (por exemplo, polimorfos, hidratos, solvatos, etc.). Em algumas modalidades, estas entidades podem ser utilizadas em qualquer forma, incluindo em qualquer forma sólida. Em algumas modalidades, estas entidades são utilizadas numa forma particular, por exemplo, numa forma sólida particular.

[00219] Em algumas modalidades, os compostos descritos e/ou retratados no presente documento podem ser fornecidos e/ou utilizados na forma de sal.

[00220] Em determinadas modalidades, os compostos descritos e/ou retratados no presente documento podem ser fornecidos e/ou utilizados na forma de hidrato ou solvato.

[00221] Em vários lugares no presente relatório descritivo, os substituintes de compostos da presente descrição são descritos em grupos ou em faixas. É especificamente pretendido que a presente descrição inclua cada e toda subcombinação individual dos membros destes grupos e faixas. Por exemplo, o termo "alquila C₁₋₆" é especificamente pretendido para revelar individualmente metila, etila, alquila C₃, alquila C₄, alquila C₅ e alquila C₆. Ademais, quando um composto inclui uma pluralidade de posições em que os substitutos são descritos em grupos ou em faixas, salvo indicado de outro modo, a presente descrição destina-se a abranger grupos e compostos individuais de compostos (por exemplo, gêneros e subgêneros) que contêm cada e toda subcombinação individual de membros em cada posição.

[00222] No presente documento uma frase da forma "X opcional-

mente substituído" (por exemplo, alquila opcionalmente substituída) se destina a ser equivalente a "X, em que X é opcionalmente substituído" (por exemplo, "alquila, em que a referida alquila é opcionalmente substituída"). Não se destina a significar que a particularidade "X" (por exemplo, alquila) *por si só* é opcional.

[00223] O termo "alquila", conforme usado no presente documento, se refere a grupos de hidrocarboneto saturado que contém de 1 a 20 (por exemplo, de 1 a 10 ou de 1 a 6) carbonos. Em algumas modalidades, um grupo alquila é não ramificado (isto é, é linear); Em algumas modalidades, um grupo alquila é ramificado. Os grupos alquila são exemplificados por metila, etila, n- e iso-propila, n-, sec-, iso- e terc-butila, neopentila, e similar, e podem ser opcionalmente substituídos por um, dois, três, ou, no caso de grupos alquila de dois carbonos ou mais, quatro substituintes independentemente selecionados a partir do grupo que consiste em: (1) alcóxi C₁₋₆; (2) alquilsulfinila C₁₋₆; (3) amino, conforme definido no presente documento (por exemplo, amino não substituído (isto é, -NH₂) ou um amino substituído (isto é, -N(R^{N1})₂, em que R^{N1} é conforme definido for amino); (4) C₆₋₁₀ aril-C₁₋₆ alcóxi; (5) azido; (6) halo; (7) (C₂₋₉ heterociclil)óxi; (8) hidroxila, opcionalmente substituída por um grupo de proteçãoO; (9) nitro; (10) oxo (por exemplo, carboxialdeído ou acila); (11) espirociclila C₁₋₇; (12) tioalcóxi; (13) tiol; (14) -CO₂R^{A'}, opcionalmente substituído por um grupo de proteçãoO e em que R^{A'} é selecionado a partir do grupo que consiste em (a) C₁₋₂₀ alquil (por exemplo, alquila C₁₋₆), (b) alquenila C₂₋₂₀ (por exemplo, alquenila C₂₋₆), (c) arila C₆₋₁₀, (d) hidrogênio, (e) C₁₋₆ aq-C₆₋₁₀ arila, (f) amino-C₁₋₂₀ alquila, (g) polietileno glicol de - (CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR', em que s1 é um número inteiro de 1 a 10 (por exemplo, de 1 a 6 ou de 1 a 4), cada um dentre s2 e s3 é, independentemente, um número inteiro de 0 a 10 (por exemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, ou de 1 a 10), e R' é H ou alquila C₁₋₂₀

alquila, e (h) amino-polietileno glicol de - $NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$, em que $s1$ é um número inteiro de 1 a 10 (por exemplo, de 1 a 6 ou de 1 a 4), cada um dentre $s2$ e $s3$ é, independentemente, um número inteiro de 0 a 10 (por exemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, ou de 1 a 10), e cada R^{N1} é, independentemente, hidrogênio ou alquila C_{1-6} opcionalmente substituída; (15) $-C(O)NR^{B'}R^{C'}$, em que cada um dentre $R^{B'}$ e $R^{C'}$ é, independentemente, selecionado a partir do grupo que consiste em (a) hidrogênio, (b) alquila C_{1-6} , (c) arila C_{6-10} , e (d) C_{1-6} alq- C_{6-10} arila; (16) $-SO_2R^{D'}$, em que $R^{D'}$ é selecionado a partir do grupo que consiste em (a) alquila C_{1-6} , (b) arila C_{6-10} , (c) C_{1-6} alq- C_{6-10} arila, e (d) hidroxila; (17) $-SO_2NR^{E'}R^{F'}$, em que cada um dentre $R^{E'}$ e $R^{F'}$ é, independentemente, selecionado a partir do grupo que consiste em (a) hidrogênio, (b) alquila C_{1-6} , (c) arila C_{6-10} e (d) C_{1-6} alq- C_{6-10} arila; (18) $-C(O)R^{G'}$, em que $R^{G'}$ é selecionado a partir do grupo que consiste em (a) alquila C_{1-20} (por exemplo, alquila C_{1-6}), (b) alquenila C_{2-20} (por exemplo, alquenila C_{2-6}), (c) arila C_{6-10} , (d) hidrogênio, (e) C_{1-6} alq- C_{6-10} arila, (f) amino- C_{1-20} alquila, (g) polietileno glicol de $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$, em que $s1$ é um número inteiro de 1 a 10 (por exemplo, de 1 a 6 ou de 1 a 4), cada um dentre $s2$ e $s3$ é, independentemente, um número inteiro de 0 a 10 (por exemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, ou de 1 a 10), e R' é H ou alquila C_{1-20} , e (h) amino-polietileno glicol de - $NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$, em que $s1$ é um número inteiro de 1 a 10 (por exemplo, de 1 a 6 ou de 1 a 4), cada um dentre $s2$ e $s3$ é, independentemente, um número inteiro de 0 a 10 (por exemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, ou de 1 a 10), e cada R^{N1} é, independentemente, hidrogênio ou alquila C_{1-6} opcionalmente substituída; (19) $-NR^{H'}C(O)R^I'$, em que $R^{H'}$ é selecionado a partir do grupo que consiste em (a1) hidrogênio e (b1) alquila C_{1-6} , e R^I' é selecionado a partir do grupo que consiste em (a2) alquila C_{1-20} (por exemplo, alquila C_{1-6}),

(b2) alquenila C₂₋₂₀ (por exemplo, alquenila C₂₋₆), (c2) arila C₆₋₁₀, (d2) hidrogênio, (e2) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arila, (f2) amino-C₁₋₂₀ alquila, (g2) polietileno glicol de -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR', em que s1 é um número inteiro de 1 a 10 (por exemplo, de 1 a 6 ou de 1 a 4), cada um dentre s2 e s3 é, independentemente, um número inteiro de 0 a 10 (por exemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, ou de 1 a 10), e R' é H ou alquila C₁₋₂₀, e (h2) amino-polietileno glicol de -NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1}, em que s1 é um número inteiro de 1 a 10 (por exemplo, de 1 a 6 ou de 1 a 4), cada um dentre s2 e s3 é, independentemente, um número inteiro de 0 a 10 (por exemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, ou de 1 a 10), e cada R^{N1} é, independentemente, hidrogênio ou alquila C₁₋₆ opcionalmente substituída; (20) -NR^{J'}C(O)OR^{K'}, em que R^{J'} é selecionado a partir do grupo que consiste em (a1) hidrogênio e (b1) alquila C₁₋₆, e R^{K'} é selecionado a partir do grupo que consiste em (a2) alquila C₁₋₂₀ (por exemplo, alquila C₁₋₆), (b2) alquenila C₂₋₂₀ (por exemplo, alquenila C₂₋₆), (c2) arila C₆₋₁₀, (d2) hidrogênio, (e2) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arila, (f2) amino-C₁₋₂₀ alquila, (g2) polietileno glicol de -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR', em que s1 é um número inteiro de 1 a 10 (por exemplo, de 1 a 6 ou de 1 a 4), cada um dentre s2 e s3 é, independentemente, um número inteiro de 0 a 10 (por exemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, ou de 1 a 10), e R' é H ou alquila C₁₋₂₀, e (h2) amino-polietileno glicol de -NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1}, em que s1 é um número inteiro de 1 a 10 (por exemplo, de 1 a 6 ou de 1 a 4), cada um dentre s2 e s3 é, independentemente, um número inteiro de 0 a 10 (por exemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, ou de 1 a 10), e cada R^{N1} é, independentemente, hidrogênio ou alquila C₁₋₆ opcionalmente substituída; (21) amidina; e (22) grupos silila como trimetilsilila, t-butildimetilsilila e tri-isopropilsilila. Em algumas modalidades, cada um destes grupos pode ser adicionalmente substituído conforme descrito no presente

documento. Por exemplo, o grupo alquíleno de uma alcarila C₁ pode ser adicionalmente substituído por um grupo oxo para proporcionar o respectivo substituinte ariloila.

[00224] O termo "alquíleno" e o prefixo "alq-", conforme usado no presente documento, representam um grupo hidrocarboneto divalente saturado derivado de um hidrocarbonato saturado de cadeia ramificada ou reta pela remoção de dois átomos de hidrogênio, e é exemplificado por metíleno, etíleno, isopropíleno e similares. O termo "C_{x-y} alquíleno" e o prefixo "C_{x-y} alq-" representam grupos alquíleno que têm entre x e y carbonos. Os valores exemplificativos para x são 1, 2, 3, 4, 5, e 6, e valores exemplificativos para y são 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, ou 20 (por exemplo, alquíleno C₁₋₆, C₁₋₁₀, C₂₋₂₀, C₂₋₆, C₂₋₁₀, ou C₂₋₂₀). Em algumas modalidades, o alquíleno pode ser substituído adicionalmente por 1, 2, 3 ou 4 grupos substituintes conforme definido no presente documento para um grupo alquila.

[00225] O termo "alquenila", conforme usado no presente documento, representa grupos de cadeia ramificada ou reta monovalentes de, a menos que especificado de outro modo, de 2 a 20 carbonos (por exemplo, de 2 a 6 ou de 2 a 10 carbonos) que contêm uma ou mais ligações duplas de carbono-carbono e é exemplificado por etenila, 1-propenila, 2-propenila, 2-metil-1-propenila, 1-butenila, 2-butenila e similares. As alquenilas incluem ambos isômeros cis e trans. Os grupos alquenila podem ser opcionalmente substituídos por 1, 2, 3, ou 4 grupos substituintes que são selecionados, independentemente, de amino, arila, cicloalquila, ou heterociclica (por exemplo, heteroarila), conforme definido no presente documento, ou qualquer um dos grupos substituintes alquila exemplificativos descritos no presente documento.

[00226] O termo "alquinila", conforme usado no presente documento, representa grupos de cadeia ramificada ou reta monovalentes de 2 a 20 átomos de carbono (por exemplo, de 2 a 4, de 2 a 6, ou de 2 a 10

carbonos) que contêm uma ligação tripla de carbono-carbono e é exemplificativa por etinila, 1-propinila e similares. Os grupos alquinila podem ser opcionalmente substituídos por 1, 2, 3 ou 4 grupos substituintes que são selecionados, independentemente, de arila, cicloalquila ou heterociclila (por exemplo, heteroarila), conforme definido no presente documento, ou qualquer um dos grupos substituintes alquila exemplificativos descritos no presente documento.

[00227] O termo "amino", conforme usado no presente documento, representa $-N(R^{N1})_2$, em que cada R^{N1} é, independentemente, H, OH, NO_2 , $N(R^{N2})_2$, SO_2OR^{N2} , SO_2R^{N2} , SOR^{N2} , um grupo *N*-protetor grupo, alquila, alquenila, alquinila, alcóxi, arila, alcarila, cicloalquila, alqcicloalquila, carboxialquila (por exemplo, opcionalmente substituído por um grupo O-protetor, como grupos arilalcóxicarbonila opcionalmente substituída ou qualquer um descrito no presente documento), sulfoalquila, acila (por exemplo, acetila, trifluoroacetila, ou outros descritos no presente documento), alcóxicarbonilalquila (por exemplo, opcionalmente substituída por um grupo O-protetor, como grupos arilalcóxicarbonila opcionalmente substituída ou qualquer descrito no presente documento), heterociclila (por exemplo, heteroarila), ou alqheterociclila (por exemplo, alqheteroarila), em que cada um destes grupos R^{N1} citados podem ser opcionalmente substituídos, conforme definido no presente documento para cada grupo; ou dois R^{N1} se combinam para formar uma heterociclila ou um grupo *N*-protetor, e em que cada R^{N2} é, independentemente, H, alquila ou arila. Os grupos amino da invenção podem ser um amino não substituído (isto é, $-NH_2$) ou um amino substituído (isto é, $-N(R^{N1})_2$). Em uma modalidade preferencial, amino é $-NH_2$ ou $-NHR^{N1}$, em que R^{N1} é, independentemente, OH, NO_2 , NH_2 , NR^{N2}_2 , SO_2OR^{N2} , SO_2R^{N2} , SOR^{N2} , alquila, carboxialquila, sulfoalquila, acila (por exemplo, acetila, trifluoroacetila ou outros descritos no presente documento), alcóxicarbonilalquila (por exemplo, t-

butoxicarbonilalquila) ou arila, e cada R^{N2} pode ser H, alquila C₁₋₂₀ (por exemplo, alquila C₁₋₆), ou arila C₆₋₁₀.

[00228] O termo "aminoácido", conforme descrito no presente documento, se refere a uma molécula que tem uma cadeia lateral, um grupo amino, e um grupo ácido (por exemplo, um grupo carbóxi de –CO₂H ou um grupo sulfo de –SO₃H), em que o aminoácido é fixado ao grupo molecular parental pela cadeia lateral, grupo amino, ou grupo ácido (por exemplo, a cadeia lateral). Conforme usado no presente documento, o termo "aminoácido" em seu sentido mais amplo, se refere a qualquer composto e/ou substância que pode ser incorporada numa cadeia de polipeptídeo, por exemplo, através da formação de uma ou mais ligações de peptídeo. Em algumas modalidades, um aminoácido tem a estrutura geral H₂N–C(H)(R)–COOH. Em algumas modalidades, um aminoácido é um aminoácido de ocorrência natural. Em algumas modalidades, um aminoácido é um aminoácido sintético; Em algumas modalidades, um aminoácido é um D-aminoácido; Em algumas modalidades, um aminoácido é um L-aminoácido. "Aminoácido padrão" se refere a quaisquer dos vinte L-aminoácidos padrão comumente encontrados em peptídeos de ocorrência natural. "Aminoácido não padrão" se refere a qualquer aminoácido, além dos aminoácidos padrão, independentemente de se é preparado sinteticamente ou obtido de uma fonte natural. Em algumas modalidades, um aminoácido, incluindo um aminoácido carboxi- e/ou amino-terminal num polipeptídeo, pode obter uma modificação estrutural em comparação à estrutura geral acima. Por exemplo, em algumas modalidades, um aminoácido pode ser modificado por metilação, amidação, acetilação e/ou substituição em comparação à estrutura geral. Em algumas modalidades, esta modificação pode, por exemplo, alterar a meia-vida de circulação de um polipeptídeo que contém o aminoácido modificado em comparação a um que contém um aminoácido não modificado de outro modo idêntico.

Em algumas modalidades, esta modificação não altera significativamente uma atividade relevante de um polipeptídeo que contém o aminoácido modificado, em comparação a um que contém um aminoácido não modificado de outro modo idêntico. Como será evidente a partir do contexto, em algumas modalidades, o termo "aminoácido" é usado para se referir a um aminoácido livre; Em algumas modalidades é usado para se referir a um resíduo de aminoácido de um polipeptídeo. Em algumas modalidades, o aminoácido é fixado ao grupo molecular parental por um grupo carbonila, em que a cadeia lateral ou grupo amino é fixado ao grupo carbonila. Em algumas modalidades, o aminoácido é um α -aminoácido. Em determinadas modalidades, o aminoácido é a β -aminoácido. Em algumas modalidades, o aminoácido é um γ -aminoácido. As cadeias laterais exemplificativas incluem uma alquila, arila, heterociclila, alcarila, alqheterociclila, aminoalquila, carbamoilalquila, e carboxialquila opcionalmente substituída. Os aminoácidos exemplificativos incluem alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutâmico, glutamina, glicina, histidina, hidroxinorvalina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norvalina, ornitina, fenilalanina, prolina, pirrolisina, selenocisteína, serina, taurina, treonina, triptofano, tirosina e valina. Os grupos aminoácidos podem ser opcionalmente substituídos por um, dois, três, ou, no caso de grupos aminoácido de dois carbonos ou mais, quatro substituintes selecionados independentemente a partir do grupo que consiste em: (1) alcóxi C₁₋₆; (2) alquilsulfina C₁₋₆; (3) amino, conforme definido no presente documento (por exemplo, amino não substituído (isto é, -NH₂) ou um amino substituído (isto é, -N(R^{N1})₂, em que R^{N1} é conforme definido para amino); (4) C₆₋₁₀ aril-C₁₋₆ alcóxi; (5) azido; (6) halo; (7) (C₂₋₉ heterociclic)óxi; (8) hidroxila; (9) nitro; (10) oxo (por exemplo, carboxialdeído ou acila); (11) espirociclila C₁₋₇; (12) tioalcóxi; (13) tiol; (14) -CO₂R^{A'}, em que R^{A'} é selecionado a partir do grupo que consiste em (a) alquila C₁₋₂₀ (por exemplo, al-

quila C₁₋₆), (b) alquenila C₂₋₂₀ (por exemplo, alquenila C₂₋₆), (c) arila C₆₋₁₀, (d) hidrogênio, (e) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arila, (f) amino-C₁₋₂₀ alquila, (g) polietileno glicol de -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR', em que s1 é um número inteiro de 1 a 10 (por exemplo, de 1 a 6 ou de 1 a 4), cada um dentre s2 e s3 é, independentemente, um número inteiro de 0 a 10 (por exemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, ou de 1 a 10), e R' é H ou C₁₋₂₀ alquila, e (h) amino-polietileno glicol de -NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1}, em que s1 é um número inteiro de 1 a 10 (por exemplo, de 1 a 6 ou de 1 a 4), cada um dentre s2 e s3 é, independentemente, um número inteiro de 0 a 10 (por exemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, ou de 1 a 10), e cada R^{N1} é, independentemente, hidrogênio ou alquila C₁₋₆ opcionalmente substituída; (15) -C(O)NR^{B'}R^{C'}, em que cada um dentre R^{B'} e R^{C'} é, independentemente, selecionado a partir do grupo que consiste em (a) hidrogênio, (b) alquila C₁₋₆, (c) arila C₆₋₁₀, e (d) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arila; (16) -SO₂R^{D'}, em que R^{D'} é selecionado a partir do grupo que consiste em (a) alquila C₁₋₆, (b) arila C₆₋₁₀, (c) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arila, e (d) hidroxila; (17) -SO₂NR^{E'}R^{F'}, em que cada um dentre R^{E'} e R^{F'} é, independentemente, selecionado a partir do grupo que consiste em (a) hidrogênio, (b) alquila C₁₋₆, (c) arila C₆₋₁₀ e (d) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arila; (18) -C(O)R^{G'}, em que R^{G'} é selecionado a partir do grupo que consiste em (a) alquila C₁₋₂₀ (por exemplo, alquila C₁₋₆), (b) alquenila C₂₋₂₀ (por exemplo, alquenila C₂₋₆), (c) arila C₆₋₁₀, (d) hidrogênio, (e) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arila, (f) amino-C₁₋₂₀ alquila, (g) polietileno glicol de -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR', em que s1 é um número inteiro de 1 a 10 (por exemplo, de 1 a 6 ou de 1 a 4), cada um dentre s2 e s3 é, independentemente, um número inteiro de 0 a 10 (por exemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, ou de 1 a 10), e R' é H ou alquila C₁₋₂₀, e (h) amino-polietileno glicol de -NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1}, em que s1 é um número inteiro de 1 a 10 (por exemplo, de 1 a 6 ou de 1 a 4), cada um dentre s2 e s3

é, independentemente, um número inteiro de 0 a 10 (por exemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, ou de 1 a 10), e cada R^{N1} é, independentemente, hidrogênio ou alquila C_{1-6} opcionalmente substituída; (19) $-NR^H C(O)R'$, em que R^H é selecionado a partir do grupo que consiste em (a1) hidrogênio e (b1) alquila C_{1-6} , e R' é selecionado a partir do grupo que consiste em (a2) alquila C_{1-20} (por exemplo, alquila C_{1-6}), (b2) alquenila C_{2-20} (por exemplo, alquenila C_{2-6}), (c2) arila C_{6-10} , (d2) hidrogênio, (e2) C_{1-6} alq- C_{6-10} arila, (f2) amino- C_{1-20} alquila, (g2) polietileno glicol de $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$, em que $s1$ é um número inteiro de 1 a 10 (por exemplo, de 1 a 6 ou de 1 a 4), cada um dentre $s2$ e $s3$ é, independentemente, um número inteiro de 0 a 10 (por exemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, ou de 1 a 10), e R' é H ou alquila C_{1-20} , e (h2) amino-polietileno glicol de $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$, em que $s1$ é um número inteiro de 1 a 10 (por exemplo, de 1 a 6 ou de 1 a 4), cada um dentre $s2$ e $s3$ é, independentemente, um número inteiro de 0 a 10 (por exemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, ou de 1 a 10), e cada R^{N1} é, independentemente, hidrogênio ou alquila C_{1-6} opcionalmente substituída; (20) $-NR^J C(O)OR^K$, em que R^J é selecionado a partir do grupo que consiste em (a1) hidrogênio e (b1) alquila C_{1-6} , e R^K é selecionado a partir do grupo que consiste em (a2) alquila C_{1-20} (por exemplo, alquila C_{1-6}), (b2) alquenila C_{2-20} (por exemplo, alquenila C_{2-6}), (c2) arila C_{6-10} , (d2) hidrogênio, (e2) C_{1-6} alq- C_{6-10} arila, (f2) amino- C_{1-20} alquila, (g2) polietileno glicol de $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$, em que $s1$ é um número inteiro de 1 a 10 (por exemplo, de 1 a 6 ou de 1 a 4), cada um dentre $s2$ e $s3$ é, independentemente, um número inteiro de 0 a 10 (por exemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, ou de 1 a 10), e R' é H ou alquila C_{1-20} , e (h2) amino-polietileno glicol de $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$, em que $s1$ é um número inteiro de 1 a 10 (por exemplo, de 1 a 6 ou de 1 a 4), cada um dentre $s2$ e $s3$

é, independentemente, um número inteiro de 0 a 10 (por exemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, ou de 1 a 10), e cada R^{N1} é, independentemente, hidrogênio ou alquila C₁₋₆ opcionalmente substituída; e (21) amidina. Em algumas modalidades, cada um destes grupos pode ser adicionalmente substituído conforme descrito no presente documento.

[00229] O termo "aminoácidos N-alquilados" conforme usado no presente documento, se refere a aminoácidos que contêm uma alquila C₁ a C₆ opcionalmente substituída no nitrogênio do aminoácido que forma a ligação peptídica. Os aminoácidos N-alquilados incluem, sem limitação, aminoácidos N-metila, como N-metil-alanina, N-metil-treonina, N-metil-fenilalanina, ácido N-metil-aspártico, N-metil-valina, N-metil-leucina, N-metil-glicina, N-metil-isoleucina, N(α)-metil-lisina, N(α)-metil-asparagina, e N(α)-metil-glutamina.

[00230] O termo "arila", conforme usado no presente documento, representa um sistema de anel carbocíclico mono, bi ou multicíclico que tem um ou dois anéis aromáticos e é exemplificado por fenila, naftila, 1,2-di-hidronaftila, 1,2,3,4-tetra-hidronaftila, antracenila, fenantrenila, fluorenila, indanila, indenila, e similares, e pode ser opcionalmente substituída por 1, 2, 3, 4, ou 5 substituintes selecionados independentemente a partir do grupo que consiste em: (1) acila C₁₋₇ (por exemplo, carboxialdeído); (2) alquila C₁₋₂₀ (por exemplo, alquila C₁₋₆, C₁₋₆ alcóxi-C₁₋₆ alquila, C₁₋₆ alquilsulfinil-C₁₋₆ alquila, amino-C₁₋₆ alquila, azido-C₁₋₆ alquila, (carboxialdeído)-C₁₋₆ alquila, halo-C₁₋₆ alquila (por exemplo, perfluoroalquila), hidróxi-C₁₋₆ alquila, nitro-C₁₋₆ alquila, ou C₁₋₆ tioalcóxi-C₁₋₆ alquila); (3) alcóxi C₁₋₂₀ (por exemplo, alcóxi C₁₋₆, como perfluoro-alcóxi); (4) alquilsulfinila C₁₋₆; (5) arila C₆₋₁₀; (6) amino; (7) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arila; (8) azido; (9) cicloalquila C₃₋₈; (10) C₁₋₆ alq-C₃₋₈ cicloalquila; (11) halo; (12) heterociclica C₁₋₁₂ (por exemplo, heteroarila C₁₋₁₂); (13) (C₁₋₁₂ heterociclico)óxi; (14) hidroxila; (15) nitro; (16) tioalcóxi C₁₋₂₀ (por exem-

plo, tioalcóxi C₁₋₆); (17) -(CH₂)_qCO₂R^{A'}, em que q é um número inteiro de zero a quatro, e R^{A'} é selecionado a partir do grupo que consiste em (a) alquila C₁₋₆, (b) arila C₆₋₁₀, (c) hidrogênio, e (d) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arila; (18) -(CH₂)_qCONR^{B'}R^{C'}, em que q é um número inteiro de zero a quatro e em que R^{B'} e R^{C'} são, independentemente, selecionados a partir do grupo que consiste em (a) hidrogênio, (b) alquila C₁₋₆, (c) arila C₆₋₁₀, e (d) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arila; (19) -(CH₂)_qSO₂R^{D'}, em que q é um número inteiro de zero a quatro e em que R^{D'} é selecionado a partir do grupo que consiste em (a) alquila, (b) arila C₆₋₁₀ e (c) alq-C₆₋₁₀ arila; (20) -(CH₂)_qSO₂NR^{E'}R^{F'}, em que q é um número inteiro de zero a quatro e em que cada um dentre R^{E'} e R^{F'} é, independentemente, selecionado a partir do grupo que consiste em (a) hidrogênio, (b) alquila C₁₋₆, (c) arila C₆₋₁₀, e (d) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arila; (21) tiol; (22) arilóxi C₆₋₁₀; (23) cicloalcóxi C₃₋₈; (24) C₆₋₁₀ aril-C₁₋₆ alcóxi; (25) C₁₋₆ alq-C₁₋₁₂ heterociclila (por exemplo, C₁₋₆ alq-C₁₋₁₂ heteroarila); (26) alquenila C₂₋₂₀; e (27) alquinila C₂₋₂₀. Em algumas modalidades, cada um destes grupos pode ser adicionalmente substituído conforme descrito no presente documento. Por exemplo, o grupo alquíleno de uma C₁-alcarila ou uma C₁-alqheterociclila pode ser substituído adicionalmente por um grupo oxo para proporcionar o respectivo grupo substituinte ariloila e (heterociclil)oilila.

[00231] O grupo "arilalquila", que conforme usado no presente documento, representa um grupo arila, conforme definido no presente documento, fixado ao grupo molecular parental através de um grupo alquíleno, conforme definido no presente documento. Os grupos arilalquila não substituídos de 7 a 30 carbonos (por exemplo, de 7 a 16 ou de 7 a 20 carbonos, como C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arila, C₁₋₁₀ alq-C₆₋₁₀ arila, ou C₁₋₂₀ alq-C₆₋₁₀ arila). Em algumas modalidades, cada um dentre o alquíleno e a arila pode ser substituído adicionalmente por 1, 2, 3 ou 4 grupos substituintes conforme definido no presente documento para os

respectivos grupos. Outros grupos precedidos pelo prefixo "alq-" são definidos da mesma forma, em que "alq" se refere a um alquíleno C₁₋₆, a menos que indicado de outro modo, e a estrutura química fixada é conforme definido no presente documento.

[00232] O termo "azido" representa um grupo $-N_3$, que pode ser representado como $-N=N=N$.

[00233] Os termos "carbocíclico" e "carbociclila", conforme usados no presente documento, se referem a uma estrutura de anel não aromática, monocíclica, bicíclica ou tricíclica C₃₋₁₂ opcionalmente substituída em que os anéis são formados por átomos de carbono. As estruturas carbocíclicas incluem grupos cicloalquila, cicloalquenila e cicloalquinila.

[00234] O grupo "carbociclilalquila", que conforme usado no presente documento, representa um grupo carbocíclico, conforme definido no presente documento, fixado ao grupo molecular parental através de um grupo alquíleno, conforme definido no presente documento. Os grupos carbociclilalquila não substituída exemplificativos são de 7 a 30 carbonos (por exemplo, de 7 a 16 ou de 7 a 20 carbonos, como C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ carbociclila, C₁₋₁₀ alq-C₆₋₁₀ carbociclila, ou C₁₋₂₀ alq-C₆₋₁₀ carbociclila). Em algumas modalidades, cada um dentre o alquíleno e a carbociclila podem ser substituídos adicionalmente por 1, 2, 3, ou 4 grupos substituintes conforme definido no presente documento para os respectivos grupos. Outros grupos precedidos pelo prefixo "alq-" são definidos da mesma forma, em que "alq" se refere a um alquíleno C₁₋₆, a menos que indicado de outro modo, e a estrutura química fixada é conforme definido no presente documento.

[00235] O termo "carbonila", conforme usado no presente documento, representa um grupo C(O), que também pode ser representado como C=O.

[00236] O termo "carbóxi", conforme usado no presente documento,

significa $-\text{CO}_2\text{H}$.

[00237] O termo "ciano", conforme usado no presente documento, representa um grupo $-\text{CN}$.

[00238] O termo "cicloalquila", conforme usado no presente documento, representa um grupo hidrocarboneto cíclico não aromático saturado ou insaturado monovalente de três a oito carbonos, a menos que especificado de outro modo, e é exemplificado por ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila, ciclohexila, cicloheptila, biciclo heptila e similares. Quando o grupo cicloalquila inclui uma ligação dupla de carbono-carbono, o grupo cicloalquila pode ser referido como grupo "cicloalquenila". Os grupos cicloalquenila exemplificativos incluem ciclopentenila, ciclohexenila e similares. Os grupos cicloalquila desta invenção podem ser opcionalmente substituídos por: (1) acila C_{1-7} (por exemplo, carboxialdeído); (2) alquila C_{1-20} (por exemplo, alquila C_{1-6} , C_{1-6} alcóxi- C_{1-6} alquila, C_{1-6} alquilsulfinil- C_{1-6} alquila, amino- C_{1-6} alquila, azido- C_{1-6} alquila, (carboxialdeído)- C_{1-6} alquila, halo- C_{1-6} alquila (por exemplo, perfluoroalquila), hidróxi- C_{1-6} alquila, nitro- C_{1-6} alquila, ou C_{1-6} tioalcóxi- C_{1-6} alquila); (3) alcóxi C_{1-20} (por exemplo, alcóxi C_{1-6} , como perfluoro-alcóxi); (4) alquilsulfinila C_{1-6} ; (5) arila C_{6-10} ; (6) amino; (7) C_{1-6} alq- C_{6-10} arila; (8) azido; (9) C_{3-8} cicloalquila; (10) C_{1-6} alq- C_{3-8} cicloalquila; (11) halo; (12) heterociclica C_{1-12} (por exemplo, heteroarila C_{1-12}); (13) (C_{1-12} heterociclico)óxi; (14) hidroxila; (15) nitro; (16) tioalcóxi C_{1-20} (por exemplo, tioalcóxi C_{1-6}); (17) $-(\text{CH}_2)_q\text{CO}_2\text{R}^{\text{A}'}$, em que q é um número inteiro de zero a quatro, e $\text{R}^{\text{A}'}$ é selecionado a partir do grupo que consiste em (a) alquila C_{1-6} , (b) arila C_{6-10} , (c) hidrogênio, e (d) C_{1-6} alq- C_{6-10} arila; (18) $-(\text{CH}_2)_q\text{CONR}^{\text{B}'}\text{R}^{\text{C}'}$, em que q é um número inteiro de zero a quatro e em que $\text{R}^{\text{B}'}$ e $\text{R}^{\text{C}'}$ são, independentemente, selecionados a partir do grupo que consiste em (a) hidrogênio, (b) alquila C_{6-10} , (c) arila C_{6-10} , e (d) C_{1-6} alq- C_{6-10} arila; (19) $-(\text{CH}_2)_q\text{SO}_2\text{R}^{\text{D}'}$, em que q é um número inteiro de zero a quatro e em que $\text{R}^{\text{D}'}$ é selecionado a partir do grupo

que consiste em (a) alquila C₆₋₁₀, (b) arila C₆₋₁₀, e (c) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arila; (20) -(CH₂)_qSO₂NR^ER^F, em que q é um número inteiro de zero a quatro e em que cada um dentre R^E e R^F é, independentemente, selecionado a partir do grupo que consiste em (a) hidrogênio, (b) alquila C₆₋₁₀, (c) arila C₆₋₁₀, e (d) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arila; (21) tiol; (22) ariloxi C₆₋₁₀; (23) cicloalcóxi C₃₋₈; (24) C₆₋₁₀ aril-C₁₋₆ alcóxi; (25) C₁₋₆ alq-C₁₋₁₂ heterociclila (por exemplo, C₁₋₆ alq-C₁₋₁₂ heteroarila); (26) oxo; (27) alquenila C₂₋₂₀; e (28) alquinila C₂₋₂₀. Em algumas modalidades, cada um destes grupos pode ser adicionalmente substituído conforme descrito no presente documento. Por exemplo, o grupo alquíleno de uma C₁-alcarila ou uma C₁-alqheterociclila pode ser substituído adicionalmente por um grupo oxo para proporcionar o respectivo grupo substituinte ariloila e (heterociclil)oilila.

[00239] O grupo "cicloalquilalquila", que conforme usado no presente documento, representa um grupo cicloalquila, conforme definido no presente documento, fixado ao grupo molecular parental através de um grupo alquíleno, conforme definido no presente documento (por exemplo, um grupo alquíleno de 1 a 4, de 1 a 6, de 1 a 10, ou de 1 a 20 carbonos). Em algumas modalidades, o alquíleno e a cicloalquila podem, cada um, ser opcionalmente substituídos por 1, 2, 3, ou 4 grupos substituintes conforme definido no presente documento para o respectivo grupo.

[00240] O termo "diastereômero", conforme usado no presente documento, significa estereoisômeros que não são imagens espelhadas um do outro e são não sobreponíveis entre si.

[00241] O termo "enantiômero", conforme usado no presente documento, significa cada forma opticamente ativa individual de um composto da invenção, que tem uma pureza óptica ou excesso enantiomeroico (como determinado por métodos padrão na técnica) de pelo menos 80% (isto é, pelo menos 90% de um enantiômero e no máximo

10% do outro enantiômero), de preferência pelo menos 90% e com mais preferência pelo menos 98%.

[00242] O termo "halo", conforme usado no presente documento, representa um halogênio selecionado a partir de bromo, cloro, iodo ou flúor.

[00243] O termo "heteroalquila", conforme usado no presente documento, se refere a um grupo alquila, conforme definido no presente documento, em que um ou dois dos átomos de carbono constituintes foram, cada um, substituídos por nitrogênio, oxigênio ou enxofre. Em algumas modalidades, o grupo heteroalquila pode ser adicionalmente substituído por 1, 2, 3 ou 4 grupos substituintes conforme descrito no presente documento para grupos alquila. Os termos "heteroalquenila" e "heteroalquinila", conforme usado no presente documento se referem a grupos alquenila e alquinila, conforme definido no presente documento, respectivamente, em que um ou dois dos átomos de carbono constituintes foram, cada um, substituídos por nitrogênio, oxigênio, ou enxofre. Em algumas modalidades, os grupos heteroalquenila e heteroalquinila podem ser adicionalmente substituídos por 1, 2, 3 ou 4 grupos substituintes conforme descrito no presente documento para grupos alquila.

[00244] O termo "heteroarila", conforme usado no presente documento, representa que o subconjunto de heterociclicas, conforme definido no presente documento, que são aromáticas: isto é, as mesmas contêm $4n+2$ pi elétrons dentro do sistema de anel mono ou multicílico. Os grupos heteroarila não substituídos exemplificativos são de 1 a 12 (por exemplo, 1 a 11, 1 a 10, 1 a 9, 2 a 12, 2 a 11, 2 a 10, ou 2 a 9) carbonos. Em algumas modalidades, a heteroarila é substituída por 1, 2, 3, ou 4 grupos substituintes conforme definido para um grupo heterociclica.

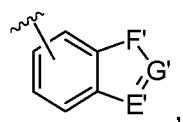
[00245] O termo "heteroarilalquila" refere-se a grupo heteroarila,

conforme definido no presente documento, fixado ao grupo molecular parental através de um grupo alquíleno, conforme definido no presente documento. Os grupos heteroarilalquila não substituídos exemplificativos são de 2 a 32 carbonos (por exemplo, de 2 a 22, de 2 a 18, de 2 a 17, de 2 a 16, de 3 a 15, de 2 a 14, de 2 a 13, ou de 2 a 12 carbonos, como C₁₋₆ alq-C₁₋₁₂ heteroarila, C₁₋₁₀ alq-C₁₋₁₂ heteroarila, ou C₁₋₂₀ alq-C₁₋₁₂ heteroarila). Em algumas modalidades, o alquíleno e a heteroarila podem, cada um, ser adicionalmente substituídos por 1, 2, 3, ou 4 grupos substituintes conforme definido no presente documento para o respectivo grupo. Os grupos heteroarilalquila consistem num subconjunto de grupos heterociclilalquila.

[00246] O termo "heterociclila", conforme usado no presente documento, representa um anel de 5, 6 ou 7 membros, a menos que especificado de outro modo, que contém um, dois, três ou quatro heteroátomos independentemente selecionados a partir do grupo que consiste em nitrogênio, oxigênio e enxofre. O anel de 5 membros tem zero a duas ligações duplas, e os anéis de 6 a 7 membros têm zero a três ligações duplas. Os grupos heterociclila exemplificativos não substituídos são de 1 a 12 (por exemplo, 1 a 11, 1 a 10, 1 a 9, 2 a 12, 2 a 11, 2 a 10, ou 2 a 9) carbonos. O termo "heterociclila" também representa um composto heterocíclico que tem uma estrutura multicíclica em ponte em que um ou mais carbonos e/ou heteroátomos liga em ponte dois membros não adjacentes de um anel monocíclico, por exemplo, um grupo quinuclidinila. O termo "heterociclila" inclui grupos bicíclico, tricíclico e tetracíclico em que quaisquer dos anéis heterocíclicos acima são fundidos a um, dois ou três anéis carbocíclicos, por exemplo, um anel arila, um anel ciclohexano, um anel ciclohexeno, um anel ciclopentano, um anel ciclopenteno ou outro anel monocíclico heterocíclico, como indolila, quinolila, isoquinolila, tetra-hidroquinolila, benzofurila, benzotienila e similares. Os exemplos de heterociclilas fundidas inclu-

em tropanos e 1,2,3,5,8,8a-hexa-hidroindolizina. Os heterocíclicos incluem pirrolila, pirrolinila, pirrolidinila, pirazolila, pirazolinila, pirazolidinila, imidazolila, imidazolinila, imidazolidinila, piridila, piperidinila, homopiperidinila, pirazinila, piperazinila, pirimidinila, piridazinila, oxazolila, oxazolidinila, isoxazolila, isoxazolidinila, morfolinila, tiomorfolinila, tiazolila, tiazolidinila, isotiazolila, isotiazolidinila, indolila, indazolila, quinolila, isoquinolila, quinoxalinila, di-hidroquinoxalinila, quinazolinila, cinnolinila, ftalazinila, benzimidazolila, benzotiazolila, benzoxazolila, benzotiadiazolila, furila, tienila, tiazolidinila, isotiazolila, triazolila, tetrazolila, oxadiazolil (por exemplo, 1,2,3-oxadiazolil), purinila, tiadiazolila (por exemplo, 1,2,3-tiadiazolil), tetra-hidrofuranila, di-hidrofuranila, tetra-hidrotienila, di-hidrotienila, di-hidroindolila, di-hidroquinolila, tetra-hidroquinolila, tetra-hidroisoquinolila, di-hidroisoquinolila, piranila, dihidropiranila, ditiazolila, benzofuranila, isobenzofuranila, benzotienila, e similares, incluindo as formas di-hidro e tetra-hidro dos mesmos, em que uma ou mais ligações duplas são reduzidas e substituídas por hidrogênios. Ainda outras heterociclicas exemplificativas incluem: 2,3,4,5-tetra-hidro-2-oxo-oxazolila; 2,3-di-hidro-2-oxo-1H-imidazolila; 2,3,4,5-tetra-hidro-5-oxo-1H-pirazolil (por exemplo, 2,3,4,5-tetra-hidro-2-fenil-5-oxo-1H-pirazolil); 2,3,4,5-tetra-hidro-2,4-dioxo-1H-imidazolil (por exemplo, 2,3,4,5-tetra-hidro-2,4-dioxo-5-metil-5-fenil-1H-imidazolil); 2,3-di-hidro-2-tioxo-1,3,4-oxadiazolil (por exemplo, 2,3-di-hidro-2-tioxo-5-fenil-1,3,4-oxadiazolil); 4,5-di-hidro-5-oxo-1H-triazolil (por exemplo, 4,5-di-hidro-3-metil-4-amino 5-oxo-1H-triazolil); 1,2,3,4-tetra-hidro-2,4-dioxopiridinila (por exemplo, 1,2,3,4-tetra-hidro-2,4-dioxo-3,3-dietilpiridinil); 2,6-dioxo-piperidinila (por exemplo, 2,6-dioxo-3-etyl-3-fenilpiperidinil); 1,6-di-hidro-6-oxopiridiminila; 1,6-di-hidro-4-oxopirimidinila (por exemplo, 2-(metiltio)-1,6-di-hidro-4-oxo-5-metilpirimidin-1-il); 1,2,3,4-tetra-hidro-2,4-dioxopirimidinila (por exemplo, 1,2,3,4-tetra-hidro-2,4-dioxo-3-etylpirimidinil); 1,6-di-hidro-6-oxo-

piridazinila (por exemplo, 1,6-di-hidro-6-oxo-3-etilpiridazinil); 1,6-di-hidro-6-oxo-1,2,4-triazinil (por exemplo, 1,6-di-hidro-5-isopropil-6-oxo-1,2,4-triazinil); 2,3-di-hidro-2-oxo-1*H*-indolila (por exemplo, 3,3-dimetil-2,3-di-hidro-2-oxo-1*H*-indolila e 2,3-di-hidro-2-oxo-3,3'-spiropropano-1*H*-indol-1-il); 1,3-di-hidro-1-oxo-2*H*-iso-indolila; 1,3-di-hidro-1,3-dioxo-2*H*-iso-indolila; 1*H*-benzopirazolila (por exemplo, 1-(etoxicarbonil)-1*H*-benzopirazolil); 2,3-di-hidro-2-oxo-1*H*-benzimidazolil (por exemplo, 3-etyl-2,3-di-hidro-2-oxo-1*H*-benzimidazolil); 2,3-di-hidro-2-oxo-benzoxazolila (por exemplo, 5-cloro-2,3-di-hidro-2-oxo-benzoxazolil); 2,3-di-hidro-2-oxo-benzoxazolila; 2-oxo-2*H*-benzopiranila; 1,4-benzodioxanila; 1,3-benzodioxanila; 2,3-di-hidro-3-oxo,4*H*-1,3-benzotiazinila; 3,4-di-hidro-4-oxo-3*H*-quinazolinil (por exemplo, 2-metil-3,4-di-hidro-4-oxo-3*H*-quinazolinil); 1,2,3,4-tetra-hidro-2,4-dioxo-3*H*-quinazolil (por exemplo, 1-etyl-1,2,3,4-tetra-hidro-2,4-dioxo-3*H*-quinazolil); 1,2,3,6-tetra-hidro-2,6-dioxo-7*H*-purinila (por exemplo, 1,2,3,6-tetra-hidro-1,3-dimetil-2,6-dioxo-7*H*-purinil); 1,2,3,6-tetra-hidro-2,6-dioxo-1*H*-purinil (por exemplo, 1,2,3,6-tetra-hidro-3,7-dimetil-2,6-dioxo-1*H*-purinil); 2-oxobenz[*c,d*]indolila; 1,1-dioxo-2*H*-naft[1,8-*c,d*]isotiazolila; e 1,8-naftilenodicarboxamido. Os heterocíclicos adicionais incluem 3,3a,4,5,6,6a-hexahidro-pirrolo[3,4-b]pirrol-(2*H*)-ila, e 2,5-diazabiciclo[2.2.1]heptan-2-ila, homopiperazinila (ou diazepanila), tetra-hidropiranila, ditiazolila, benzofuranila, benzotienila, oxepanila, tiepanila, azocanila, oxecanila e tiocanila. Os grupos heterocíclicos também incluem grupos da fórmula



[00247] em que

[00248] E' é selecionado a partir do grupo que consiste em -N- e -CH-; F' é selecionado a partir do grupo que consiste em -N=CH-, -NH-CH₂-, -NH-C(O)-, -NH-, -CH=N-, -CH₂-NH-, -C(O)-NH-, -CH=CH-, -

CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH₂O-, -OCH₂-, -O-, e -S-; e G' é selecionado a partir do grupo que consiste em -CH- e -N-. Qualquer um dos grupos heterociclila mencionados no presente documento pode ser opcionalmente substituído por um, dois, três, quatro ou cinco substituintes selecionados independentemente a partir do grupo que consiste em: (1) acila C₁₋₇ (por exemplo, carboxialdeído); (2) alquila C₁₋₂₀ (por exemplo, alquila C₁₋₆, C₁₋₆ alcóxi-C₁₋₆ alquila, C₁₋₆ alquilsulfinil-C₁₋₆ alquila, amino-C₁₋₆ alquila, azido-C₁₋₆ alquila, (carboxialdeído)-C₁₋₆ alquila, halo-C₁₋₆ alquila (por exemplo, perfluoroalquil), hidróxi-C₁₋₆ alquila, nitro-C₁₋₆ alquila, ou C₁₋₆ tioalcóxi-C₁₋₆ alquila); (3) alcóxi C₁₋₂₀ (por exemplo, alcóxi C₁₋₆, como perfluoroalcóxi); (4) alquilsulfinila C₁₋₆; (5) arila C₆₋₁₀; (6) amino; (7) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arila; (8) azido; (9) cicloalquila C₃₋₈; (10) C₁₋₆ alq-C₃₋₈ cicloalquila; (11) halo; (12) heterociclila C₁₋₁₂ (por exemplo, heteroarila C₂₋₁₂); (13) (C₁₋₁₂ heterociclí)óxi; (14) hidroxila; (15) nitro; (16) tioalcóxi C₁₋₂₀ (por exemplo, tioalcóxi C₁₋₆); (17) -(CH₂)_qCO₂R^{A'}, em que q é um número inteiro de zero a quatro, e R^{A'} é selecionado a partir do grupo que consiste em (a) alquila C₁₋₆, (b) arila C₆₋₁₀, (c) hidrogênio, e (d) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arila; (18) -(CH₂)_qCONR^{B'}R^{C'}, em que q é um número inteiro de zero a quatro e em que R^{B'} e R^{C'} são, independentemente, selecionados a partir do grupo que consiste em (a) hidrogênio, (b) alquila C₁₋₆, (c) arila C₆₋₁₀, e (d) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arila; (19) -(CH₂)_qSO₂R^{D'}, em que q é um número inteiro de zero a quatro e em que R^{D'} é selecionado a partir do grupo que consiste em (a) alquila C₁₋₆, (b) arila C₆₋₁₀, e (c) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arila; (20) -(CH₂)_qSO₂NR^{E'}R^{F'}, em que q é um número inteiro de zero a quatro e em que cada um dentre R^{E'} e R^{F'} é, independentemente, selecionado a partir do grupo que consiste em (a) hidrogênio, (b) alquila C₁₋₆, (c) arila C₆₋₁₀, e (d) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arila; (21) tiol; (22) arilóxi C₆₋₁₀; (23) cicloalcóxi C₃₋₈; (24) arilalcóxi; (25) C₁₋₆ alq-C₁₋₁₂ heterociclila (por exemplo, C₁₋₆ alq-C₁₋₁₂ heteroarila); (26) oxo; (27) (C₁₋₁₂ heterociclí)imino; (28) alquenila C₂₋₂₀; e (29) alquinila C₂₋₂₀. Em al-

gumas modalidades, cada um destes grupos pode ser adicionalmente substituído conforme descrito no presente documento. Por exemplo, o grupo alquíleno de uma C₁-alcarila ou uma C₁-alqheterociclila pode ser substituído adicionalmente por um grupo oxo para proporcionar o respectivo grupo substituinte ariloila e (heterociclil)oilila.

[00249] O grupo "heterociclilalquila", que conforme usado no presente documento, representa um grupo heterociclila, conforme definido no presente documento, fixado ao grupo molecular parental através de um grupo alquíleno, conforme definido no presente documento. Os grupos heterociclilalquila não substituída exemplificativa são de 2 a 32 carbonos (por exemplo, de 2 a 22, de 2 a 18, de 2 a 17, de 2 a 16, de 3 a 15, de 2 a 14, de 2 a 13, ou de 2 a 12 carbonos, como C₁₋₆ alq-C₁₋₁₂ heterociclila, C₁₋₁₀ alq-C₁₋₁₂ heterociclila, ou C₁₋₂₀ alq-C₁₋₁₂ heterociclila). Em algumas modalidades, o alquíleno e a heterociclila podem, cada um, ser adicionalmente substituídos por 1, 2, 3 ou 4 grupos substituintes conforme definido no presente documento para o respectivo grupo.

[00250] O termo "hidrocarboneto", conforme usado no presente documento, representa um que consiste em átomos de carbono e hidrogênio.

[00251] O termo "hidroxila", conforme usado no presente documento, representa um grupo –OH. Em algumas modalidades, o grupo hidroxila pode ser substituído por 1, 2, 3, ou 4 grupos substituintes (por exemplo, grupos O-protetor) conforme definido no presente documento para uma alquila.

[00252] O termo "isômero", conforme usado no presente documento, significa qualquer tautômero, estereoisômero, enantiômero, ou diastereômero de qualquer composto da invenção. Conhece-se que os compostos da invenção podem ter um ou mais centros quirais e/ou ligações duplas e, portanto, existem como estereoisômeros, como

isômeros de ligação dupla (isto é, isômeros E/Z geométricos) ou diastereómeros (por exemplo, enantiômeros (isto é, (+) ou (-)) ou isômeros cis/trans). De acordo com a invenção, as estruturas químicas retratadas no presente documento e, portanto, os compostos da invenção, abrangem todos os estereoisômeros correspondentes, isto é, tanto a forma estereomericamente pura (por exemplo, geometricamente pura, enantiomericamente pura, ou diastereometricamente pura) e misturas enantiomeroicas e estereoisomeroicas, por exemplo, racematos. As misturas enantioméricas e estereoisomeroicas dos compostos da invenção podem ser tipicamente resolvidas em seus enantiômeros ou estereoisômeros componentes por métodos bem conhecidos, como cromatografia gasosa de fase quiral, cromatografia líquida de alto desempenho de fase quiral, cristalizar o composto como um complexo de sal quiral, ou cristalizar o composto num solvente quiral. Os enantiômeros e estereoisômeros também podem ser obtidos a partir de intermediários, reagentes e catalisadores estereomericamente ou enantiomericamente puros por métodos sintéticos assimétricos bem conhecidos.

[00253] O termo "amino *N*-protegido", conforme usado no presente documento, se refere a um grupo amino, conforme definido no presente documento, ao qual é fixado um ou dois grupos *N*-protetores, conforme definido no presente documento.

[00254] O termo "grupo *N*-protetor", conforme usado no presente documento, representa aqueles grupos destinados a proteger um grupo amino contra reações indesejáveis durante procedimentos sintéticos. Os grupos *N*-protetores comumente usados são descritos em Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", 3^a Edição (John Wiley & Sons, New York, 1999), que é incorporado no presente documento a título de referência. Os grupos *N*-protetores incluem grupos acila, ariloila, ou carbamila como formila, acetila, propionila, pivaloila, t-

butilacetila, 2-cloroacetila, 2-bromoacetila, trifluoroacetila, tricloroacetila, ftalila, o-nitrofenoxiacetila, α -clorobutirila, benzoila, 4-clorobenzoila, 4-bromobenzoila, 4-nitrobenzoila, e auxiliares quirais como D, L protegidos ou não protegidos ou D, L-aminoácidos como alanina, leucina, fenilalanina e similares; grupos que contêm sulfonila como benzenosulfonila, p-toluenosulfonila, e similares; grupos formadores de carbamato como benziloxicarbonila, p-clorobenziloxicarbonila, p-metoxibenziloxicarbonila, p-nitrobenziloxicarbonila, 2-nitrobenziloxicarbonila, p-bromobenziloxicarbonila, 3,4-dimetoxibenziloxicarbonila, 3,5-dimetoxibenziloxicarbonila, 2,4-dimetoxibenziloxicarbonila, 4-metoxibenziloxicarbonila, 2-nitro-4,5-dimetoxibenziloxicarbonila, 3,4,5-trimetoxibenziloxicarbonila, 1-(p-bifenilil)-1-metiletoxicarbonila, α,α -dimetil-3,5-dimetoxibenziloxicarbonila, benzidriloxi carbonila, t-butiloxicarbonila, di-isopropilmetoxicarbonila, isopropiloxicarbonila, etoxicarbonila, metoxicarbonila, aliloxicarbonila, 2,2,2-tricloroetoxicarbonila, fenoxicarbonila, 4-nitrofenoxi carbonila, fluorenil-9-metoxicarbonila, ciclopentiloxicarbonila, adamantiloxicarbonila, ciclohexiloxicarbonila, feniltiocarbonila e similares, grupos alcarila como benzila, trifenilmetila, benziloximetila e similares, e grupos silila, como trimetilsilila e similares. Os grupos *N*-protetores preferenciais são formila, acetila, benzoila, pivaloila, t-butilacetila, alanila, fenilsulfonila, benzila, t-butiloxicarbonila (Boc), e benziloxicarbonila (Cbz).

[00255] O termo "nitro", conforme usado no presente documento, representa um grupo $-\text{NO}_2$.

[00256] O termo "grupo O-protetor", conforme usado no presente documento, representa aqueles grupos destinados a proteger um grupo que contém oxigênio (por exemplo, fenol, hidroxila, ou carbonila) contra reações indesejáveis durante procedimentos sintéticos. Os grupos O-protetores comumente usados descritos em Greene, "Protective

Groups in Organic Synthesis", 3^a Edição (John Wiley & Sons, New York, 1999), que é incorporado no presente documento a título de referência. Os grupos O-protetores incluem grupos acila, ariloila ou carbamila, como grupos formila, acetila, propionila, pivaloila, t-butilacetila, 2-cloroacetila, 2-bromoacetila, trifluoroacetila, tricloroacetila, ftalila, o-nitrofenoxiacetila, α -clorobutirila, benzoila, 4-clorobenzoila, 4-bromobenzoila, *t*-butildimetsilila, tri-*iso*-propilsiloximetila, 4,4'-dimetoxitritila, isobutirila, fenoxiacetila, 4-isopropilpehenoxyacetila, dimetilformamidino e 4-nitrobenzoila; alquilcarbonil, como acila, acetila, propionila, pivaloila, e similares; grupos arilcarbonila opcionalmente substituída, como benzoila; grupos silila, como trimetsilila (TMS), terc-butildimetsilila (TBDMS), tri-*iso*-propilsiloximetil (TOM), triisopropilsil (TIPS), e similares; grupos formadores de éter com a hidroxila, como metila, metoximetila, tetra-hidropiranila, benzila, p-metoxibenzila, tritila, e similares; alcoxicarbonilas, como metoxicarbonila, etoxicarbonila, isopropoxicarbonila, n-isopropoxicarbonila, n-butiloxicarbonila, isobutiloxicarbonila, sec-butiloxicarbonila, *t*-butiloxicarbonila, 2-etylhexiloxicarbonila, ciclohexiloxicarbonila, metiloxicarbonila e similares; grupos alcoxialcoxicarbonila, como metoximetoxicarbonila, etoximetoxicarbonila, 2-metoxietoxicarbonila, 2-etoxietoxicarbonila, 2-butoxietoxicarbonila, 2-metoxietoximetoxicarbonila, aliloxicarbonila, propargiloxicarbonila, 2-butenoxicarbonila, 3-metil-2-butenoxicarbonila e similares; haloalcoxicarbonilas, como 2-cloroetoxicarbonila, 2-cloroetoxicarbonila, 2,2,2-tricloroetoxicarbonila, e similares; grupos arilalcoxicarbonila opcionalmente substituída, como benziloxicarbonila, p-metilbenziloxicarbonila, p-metoxibenziloxicarbonila, p-nitrobenziloxicarbonila, 2,4-dinitrobenziloxicarbonila, 3,5-dimetilbenziloxicarbonila, p-clorobenziloxicarbonila, p-bromobenziloxicarbonila, fluorenilmeliloxicarbonila, e similares; e grupos ariloxicarbonila opcionalmente substituída, como fenoxicarbonila, p-

nitrofenoxicarbonila, o-nitrofenoxicarbonila, 2,4-dinitrofenoxicarbonila, p-metil-fenoxycarbonila, m-metilfenoxicarbonila, o-bromofenoxycarbonila, 3,5-dimetilfenoxicarbonila, p-clorofenoxycarbonila, 2-cloro-4-nitrofenoxi-carbonila, e similares); alquila, arila e alcaril éteres substituídas (por exemplo, tritila; metiltiometila; metoximetila; benziloximetila; siloximetila; 2,2,2,-tricloroetoximetila; tetra-hidropiranila; tetra-hidrofuranila; etoxietila; 1-[2-(trimetilsilil)etóxi]etila; 2-trimetilsililetila; t-butil éter; p-clorofenila, p-metoxifenila, p-nitrofenila, benzila, p-metoxibenzila, e nitrobenzil); silil éteres (por exemplo, trimetilsilila; trietilsilila; triisopropilsilila; dimetilisopropilsilila; t-butildimetilsilila; t-butildifenilsilila; tribenzilsilila; trifenilsilila; e difenimetilsilil); carbonatos (por exemplo, metila, metoximetila, 9-fluorenilmetila; etila; 2,2,2-tricloroetila; 2-(trimetilsilil)etila; vinila, allila, nitrofenila; benzila; metoxibenzila; 3,4-dimetoxibenzila; e nitrobenzila); grupos carbonil-protetores (por exemplo, grupos acetal e cetal, como dimetil acetal, 1,3-dioxolano, e similares; grupos acilal; e grupos ditiano, como 1,3-ditianos, 1,3-ditiolano, e similares); grupos ácido carboxílico-protetores (por exemplo, grupos éster, como éser metílico, éster benzílico, éster t-butílico, ortoésteres, e similares; e grupos oxazolina.

[00257] O termo "oxo" conforme usado no presente documento, representa =O.

[00258] O prefixo "perfluoro", conforme usado no presente documento, representa grupo anila, conforme definido no presente documento, em que cada radical de hidrogênio ligado ao grupo alquila foi substituído por um radical de fluoreto. Por exemplo, os grupos perfluoroalquila são exemplificados por trifluorometila, pentafluoroetila, e similares.

[00259] O termo "hidroxila protegida", conforme usado no presente documento, se refere a um átomo de oxigênio ligado a um *grupo O-protetor*.

[00260] O termo "espirociclila", conforme usado no presente documento, representa um diradical de alquíleno C₂₋₇, ambas as extremidades do qual estão ligadas ao mesmo átomo de carbono do grupo parental para formar um grupo espirocíclico, e também um diradical de heteroalquíleno C₁₋₆, ambas as extremidades do qual são ligadas ao mesmo átomo. O radical de heteroalquíleno que forma o grupo espirociclila pode conter um, dois, três ou quatro heteroátomos independentemente selecionados a partir do grupo que consiste em nitrogênio, oxigênio, e enxofre. Em algumas modalidades, o grupo espirociclila inclui um a sete carbonos, excluindo o átomo de carbono ao qual o diradical é fixado. Os grupos espirociclila da invenção podem ser opcionalmente substituídos por 1, 2, 3 ou 4 substituintes fornecidos no presente documento como substituintes opcionais para grupos cicloalquila e/ou heterociclila.

[00261] O termo "estereoisômero", conforme usado no presente documento, se refere a todos os possíveis isoméricos diferentes bem como formas conformacionais que um composto pode possuir (por exemplo, um composto de qualquer fórmula descrita no presente documento), em particular todas as formas estereoquímica e conformacionalmente isoméricas possíveis, todos os diastereómeros, enantiômeros e/ou conformadores da estrutura molecular básica. Alguns compostos da presente invenção podem existir em diferentes formas tautoméricas, todas as anteriores sendo incluídas no escopo da presente invenção.

[00262] O termo "sulfonila", conforme usado no presente documento, representa um grupo -S(O)₂-.

[00263] O termo "tiol", conforme usado no presente documento, representa um grupo -SH.

DEFINIÇÕES

[00264] Neste pedido, a menos que de outro modo evidente a partir

do contexto, (i) o termo "um" pode ser compreendido de modo a significar "pelo menos um"; (ii) o termo "ou" pode ser compreendido de modo a significar "e/ou"; (iii) os termos "que comprehende" e "que inclui" pode ser compreendido por abranger componentes itemizados ou etapas se apresentadas por si só ou juntas com um ou mais componentes adicionais ou etapas; e (iv) os termos "cerca de" e "aproximadamente" podem ser compreendidos por permitir variação padrão como seroá compreendido por aqueles indivíduos de habilidade comum na técnica; e (v) em que faixas são fornecidas, pontos de extremidade são incluídos.

[00265] Como é conhecido na técnica, "afinidade" é uma medida da estreiteza com a qual um ligante particular se liga a seu parceiro. Afinidades podem ser medidas de diferentes formas. Em algumas modalidades, a afinidade é medida por um ensaio quantitativo. Em algumas destas modalidades, a concentração de parceiro de ligação pode ser fixa de modo a estar em excesso da concentração de ligante para espelhar as condições fisiológicas. Alternativa ou adicionalmente, em algumas modalidades, a concentração de parceiro de ligante e/ou concentração de ligante pode ser variada. Em algumas destas modalidades, a afinidade pode ser comparada a uma referência sob condições comparáveis (por exemplo, concentrações).

[00266] Conforme usado no presente documento, os termos "aproximadamente" e "cerca de" destinam-se, cada um, a abranger variação estatística normal como seria compreendido por aqueles indivíduos de habilidade comum na técnica como adequado ao contexto relevante. Em determinadas modalidades, os termos "aproximadamente" ou "cerca de" se referem, cada um, a uma faixa de valores abrangidos dentro de 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, ou menos em qualquer direção (maior do que ou menor do que) de um valor decla-

rado, a menos que declarado de outro modo ou evidente de outro modo a partir do contexto (por exemplo, em que este número excederia 100% de um valor possível).

[00267] Será compreendido que o termo "ligação" conforme usado no presente documento, se refere tipicamente à associação (por exemplo, covalente ou não covalente) entre ou dentre duas ou mais entidades. A ligação "direta" envolve contato físico entre entidades ou porções químicas; ligação indireta envolve a interação física por meio de contato físico com uma ou mais entidades intermediárias. A ligação entre duas ou mais entidades pode, tipicamente, ser avaliada em qualquer uma dentre uma variedade de contextos – incluindo o local em que as entidades ou porções químicas em interação são estudadas em isolamento ou no contexto de sistemas mais complexos (por exemplo, enquanto covalentemente ou, de outro modo, associada a uma entidade carreadora e/ou numa células ou sistema biológico).

[00268] A afinidade de uma molécula X por seu parceiro Y pode ser, de modo geral, representada pela constante de dissociação (K_D). A afinidade pode ser medida por métodos comuns conhecidos na técnica, incluindo aqueles descritos no presente documento. As modalidades ilustrativas e exemplificativas para medir a afinidade de ligação são descritas abaixo. O termo " K_D ", conforme usado no presente documento, se destina a se referir à constante de equilíbrio de dissociação de uma interação de composto-proteína particular ou complexo-proteína. Tipicamente, os compostos da invenção se ligam a proteínas apresentadoras com uma constante de equilíbrio de dissociação (K_D) menor do que cerca de 10^{-6} M, como menor do que aproximadamente 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, ou 10^{-10} M ou até mesmo inferior, por exemplo, quando determinado pela tecnologia de ressonância de plasmon de superfície (SPR) usando-se a proteína apresentadora como o analito e o composto como o ligante. Os complexos de proteína apresentado-

ra/composto da invenção se liga a proteínas-alvo (por exemplo, uma proteína-alvo eucariótica como uma proteína-alvo de mamífero ou uma proteína fúngica alvo ou uma proteína-alvo procariótica como uma proteína-alvo bacteriana) com uma constante de equilíbrio de dissociação (K_D) menor do que cerca de 10^{-6} M, como menor do que aproximadamente 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, ou 10^{-10} M ou até mesmo inferior, por exemplo, quando determinado pela tecnologia ressonância de plasmon de superfície (SPR) usando-se a proteína-alvo como o analito e o complexo como o ligante.

[00269] Conforme usado no presente documento, o termo "grupo de reticulação" se refere a um grupo compreendendo um grupo funcional reativo com capacidade para fixar quimicamente aos grupos funcionais específicos (por exemplo, aminas primárias, sulfidrilas) em proteínas ou outras moléculas. Uma "porção química com capacidade para a reação quimiosseletiva com um aminoácido", conforme usado no presente documento se refere a uma porção química compreendendo um grupo funcional reativo com capacidade para se fixar quimicamente a um grupo funcional de um aminoácido natural ou não natural (por exemplo, aminas primárias e secundárias, sulfidrilas, álcoois, grupos carboxila, carbonilas, ou grupos funcionais formadores de triazol como azidos ou alcinas). Os exemplos de grupos de reticulação incluem grupos de reticulação reativos a sulfidrila (por exemplo, grupos compreendendo maleimidas, haloacetilas, piridildisulfidas, tiosulfonatos, ou vinilssulfonas), grupos de reticulação reativos a amina (por exemplo, grupos compreendendo ésteres como NHS ésteres, imidoésteres, e pentafluorofenil ésteres, ou hidroximetilfosfina), grupos de reticulação reativos a carboxila (por exemplo, grupos compreendendo aminas primárias ou secundárias, álcoois, ou tióis), grupos de reticulação reativos a carbonila (por exemplo, grupos compreendendo hidrazidos ou alcoxiaminas), e grupos de reticulação formadores de triazol (por

exemplo, grupos compreendendo azidos ou alcinas).

[00270] Conforme usado no presente documento, o termo "complexo" se refere a um grupo de dois ou mais compostos e/ou proteínas que são ligadas juntas através de uma interação de ligação (por exemplo, uma interação não covalente, como uma interação de efeito de hidrofóbico, uma interação eletrostática, uma interação de van der Waals, ou interação de efeito π). Os exemplos de complexos são "complexo de proteína apresentadora/conjugado" e "complexo de proteína-alvo/conjugado" que incluem um conjugado da invenção ligado a uma proteína apresentadora ou uma proteína-alvo.

[00271] Conforme usado no presente documento, o termo "conjugado" se refere a um formado pela união (por exemplo, por meio de uma reação formadora de ligação covalente) de dois ou mais compostos químicos (por exemplo, um composto que inclui um grupo de reticulação e uma proteína como uma proteína-alvo ou uma proteína apresentadora).

[00272] Conforme usado no presente documento, o termo "grupo removedor de elétrons" se refere a um grupo funcional que remove densidade de elétron de um sistema de π . Os exemplos de grupos removedores de elétrons incluem, sem limitação, grupos haletos (por exemplo, fluoreto, cloreto, brometo, iodeto), aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos, cloretos de acila, ésteres, amidas, trihaletos (por exemplo, trifluorometila, triclorometila), nitrilas, sulfonatos e nitro.

[00273] Conforme usado no presente documento, o termo "grupo de saída" se refere a um fragmento molecular que sai com um par de elétrons numa clivagem de ligação heterolítica. Os exemplos de grupo de saídas incluem, sem limitação haletos (por exemplo, fluoreto, cloreto, brometo, iodeto), carboxilatos, tosilatos, mesilatos, perfluoroalquilsulfonatos (por exemplo, triflato), nitratos e fosfatos.

[00274] Conforme usado no presente documento, um átomo que

"participa na ligação" está dentro de 4 Å da entidade ao qual os mesmos se ligam ou se conecta a um átomo que está com 4 Å da entidade ao qual os mesmos se ligam.

[00275] O termo "proteína apresentadora" se refere a uma proteína que se liga a uma molécula pequena para formar um complexo que se liga e modula a atividade de uma proteína-alvo (por exemplo, uma proteína-alvo eucariótica como uma proteína-alvo de mamífero ou uma proteína fúngica alvo ou uma proteína-alvo procariótica como uma proteína-alvo bacteriana). Em algumas modalidades, a proteína apresentadora é uma proteína relativamente abundante (por exemplo, a proteína apresentadora é suficientemente abundante, em que a participação num complexo de tripartite não impacta substancialmente o papel biológico da proteína apresentadora numa célula e/ou viabilidade ou outros atributos da célula). Em determinadas modalidades, a proteína apresentadora é uma proteína que tem atividade de chaperona dentro de uma célula. Em algumas modalidades, a proteína apresentadora é uma proteína que tem múltiplos parceiros de interação natural dentro de uma célula. Em determinadas modalidades, a proteína apresentadora é uma que é conhecida por ligar uma molécula pequena para formar um complexo binário que é conhecido ou suspeito de ligação a e modulação da atividade biológica de uma proteína-alvo.

[00276] O termo "porção química de ligação de proteína apresentadora" se refere a um grupo de átomos e as porções químicas fixadas ao mesmo (por exemplo, átomos dentro de 20 átomos como, átomos dentro de 15 átomos, átomos dentro de 10, átomos dentro de 5 átomos) que participam na ligação a uma proteína apresentadora de modo que o composto se ligue especificamente à referida proteína apresentadora, por exemplo, com um K_D menor do que 10 μM (por exemplo, menor do que 5 μM , menor do que 1 μM , menor do que 500 nM, menor do que 200 nM, menor do que 100 nM, menor do que 75 nM,

menor do que 50 nM, menor do que 25 nM, menor do que 10 nM) ou inibe a atividade de peptidil-prolil isomerase da proteína apresentadora, por exemplo, com um IC₅₀ menor do que 1 µM (por exemplo, menor do que 0,5 µM, menor do que 0,1 µM, menor do que 0,05 µM, menor do que 0,01 µM). Será compreendido que a porção química de ligação de proteína apresentadora não abrange necessariamente a totalidade de átomos no composto que interagem com a proteína apresentadora. Será compreendido também que um ou mais átomos da porção química de ligação de proteína apresentadora podem estar dentro da porção química de ligação de proteína-alvo (por exemplo, porção química de ligação de proteína-alvo eucariótica como porção química de ligação de proteína-alvo de mamífero ou porção química de ligação de proteína-alvo fúngica ou porção química de ligação de proteína-alvo procariótica como uma porção química de ligação de proteína-alvo bacteriana).

[00277] Conforme usado no presente documento, "porção química de ligação de FKBP" se refere a uma porção química de ligação de proteína apresentadora que é seletiva para proteínas apresentadoras na família FKBP de proteínas (por exemplo, FKBP12, FKBP12.6, FKBP13, FKBP25, FKBP51, ou FKBP52). Uma "porção química de ligação de FKBP seletiva", conforme usado no presente documento, se refere a uma porção química de ligação que é específica para um ou mais (por exemplo, dois, três, quatro, cinco) membros da família FKBP em relação a todos os outros membros da família FKBP. Uma "porção química de ligação de FKBP não seletiva", conforme usado no presente documento, se refere a uma porção química de ligação que tem afinidade comparável (dentro de 2 vezes, dentro de 3 vezes, dentro de 4 vezes, dentro de 5 vezes, dentro de 10 vezes) para todos os membros da família FKBP.

[00278] O termo "porção química de ligação de proteína" se refere a

um grupo de átomos e as porções químicas fixadas ao mesmo (por exemplo, átomos dentro de 20 átomos como, átomos dentro de 15 átomos, átomos dentro de 10, átomos dentro de 5 átomos) que participam na ligação a uma proteína (por exemplo, uma proteína apresentadora ou uma proteína-alvo) de modo que o composto se ligue especificamente à referida proteína, por exemplo, com um K_D menor do que 10 μM (por exemplo, menor do que 5 μM , menor do que 1 μM , menor do que 500 nM, menor do que 200 nM, menor do que 100 nM, menor do que 75 nM, menor do que 50 nM, menor do que 25 nM, menor do que 10 nM) ou inibe a atividade de peptidil-prolil isomerase da proteína apresentadora, por exemplo, com um IC_{50} menor do que 1 μM (por exemplo, menor do que 0,5 μM , menor do que 0,1 μM , menor do que 0,05 μM , menor do que 0,01 μM). Será compreendido que a porção química de ligação de proteína não abrange necessariamente a totalidade de átomos no composto que interage com a proteína.

[00279] Conforme usado no presente documento, o termo "reagir" se refere a um processo em que os átomos dos mesmos elementos ou elementos diferentes se redispõem para formar uma nova substância. Por exemplo, a formação de uma ligação covalente entre dois átomos como a reação entre um aminoácido reativo numa proteína e um grupo de reticulação para formar uma ligação covalente. Uma reação pode ser medida por qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, a formação de um produto de reação pode ser determinada por LC-MS ou RMN.

[00280] Conforme usado no presente documento, o termo "aminoácido reativo" se refere a um aminoácido natural ou não natural compreendendo um grupo funcional (por exemplo, um grupo funcional nucleofílico) com capacidade para se fixar quimicamente a grupos funcionais específicos (por exemplo, um grupo de reticulação). Os exemplos de aminoácidos reativos incluem cisteína, lisina, serina e aminoá-

cidos que têm azidos na cadeia lateral. O termo "aminoácidos não reativos" se refere a aminoácidos naturais ou não naturais que não contêm um grupo funcional com capacidade para se fixar quimicamente a grupos funcionais específicos. Os exemplos de aminoácidos não reativos incluem valina, alanina, isoleucina, teronina e leucina.

[00281] O termo "referência" é frequentemente usado no presente documento para descrever um composto padrão ou de controle, indivíduo, população, amostra, sequência ou valor em relação ao qual um composto, indivíduo, população, amostra, sequência ou valor de interesse é comparado. Em algumas modalidades, um composto de referência, indivíduo, população, amostra, sequência ou valor é testado e/ou determinado de modo substancialmente simultâneo com o teste ou determinação do composto, indivíduo, população, amostra, sequência ou valor de interesse. Em algumas modalidades, um composto de referência, indivíduo, população, amostra, sequência ou valor é uma referência histórica, opcionalmente incorporado num meio tangível. Tipicamente, como seria compreendido por aqueles indivíduos versados na técnica, um composto de referência, indivíduo, população, amostra, sequência ou valor é determinado ou caracterizado sob condições comparáveis àquelas utilizadas para determinar ou caracterizar o composto, indivíduo, população, amostra, sequência ou valor de interesse.

[00282] Conforme usado no presente documento, o termo "aminoácido exposto a solvente" se refere a um aminoácido que é acessível ao solvente que circunda a proteína. Em algumas modalidades, um aminoácido exposto a solvente é um aminoácido que quando substituído não muda substancialmente a estrutura tridimensional da proteína.

[00283] Conforme usado no presente documento, os termos "ligação específica" ou "específico para" ou "específico para" se referir a uma interação entre um agente de ligação e uma entidade alvo. Como

será compreendido por aqueles indivíduos de habilidade comum, uma interação é considerada como "específica" se for favorecida na presença de interações alternativas, por exemplo, ligação com um K_D menor do que 10 μM (por exemplo, menor do que 5 μM , menor do que 1 μM , menor do que 500 nM, menor do que 200 nM, menor do que 100 nM, menor do que 75 nM, menor do que 50 nM, menor do que 25 nM, menor do que 10 nM). Em muitas modalidades, a interação específica é dependente da presença de uma particularidade estrutural particular da entidade alvo (por exemplo, um epítopo, uma fenda, um sítio de ligação). É compreendido que a especificidade não precisa ser absoluta. Em algumas modalidades, especificidade pode ser avaliada em relação àquela do agente de ligação para uma ou mais outras entidades alvos potenciais (por exemplo, competidores). Em algumas modalidades, a especificidade é avaliada em relação àquela de um agente de ligação específico de referência. Em algumas modalidades, a especificidade é avaliada em relação àquela de um agente de ligação não específico de referência.

[00284] O termo "específico" quando usado com referência a um composto que tem uma atividade, é compreendido por aqueles indivíduos versados na técnica para significar que o composto discrimina entre entidades alvos potenciais ou estados. Por exemplo, em algumas modalidades, diz-se que um composto se liga "especificamente" ao seu alvo se o mesmo se ligar preferencialmente com aquele alvo na presença de um ou mais alvos alternativos competidores. Em muitas modalidades, a interação específica é dependente da presença de uma particularidade estrutural particular da entidade alvo (por exemplo, um epítopo, uma fenda, um sítio de ligação). É compreendido que a especificidade não precisa ser absoluta. Em algumas modalidades, especificidade pode ser avaliada em relação àquela do agente de ligação para uma ou mais outras entidades alvos potenciais (por exemplo,

competidores). Em algumas modalidades, a especificidade é avaliada em relação àquela de um agente de ligação específico de referência. Em algumas modalidades, a especificidade é avaliada em relação àquela de um agente de ligação não específico de referência. Em algumas modalidades, o agente ou entidade não se liga de modo detectável ao alvo alternativo competidor sob condições de ligação à sua entidade alvo. Em algumas modalidades, o agente de ligação se liga com on-rate superior, off-rate inferior, maior afinidade, menor dissociação e/ou maior estabilidade à sua entidade alvo em comparação ao alvo (ou alvos) alternativo competidor.

[00285] O termo "substancialmente" se refere à condição qualitativa de exibir grau ou extensão total ou quase total de uma propriedade ou característica de interesse. Uma pessoa de habilidade comum na técnica biológica entenderá que fenômenos biológicos e químicos raramente, se alguma vez, são concluídos e/ou avançam para a conclusão ou alcançam ou evitam um resultado absoluto. O termo "substancialmente" é, portanto, usado no presente documento para capturar a falta potencial de conclusão inerente em muitos fenômenos biológicos e químicos.

[00286] O termo "não se liga substancialmente" a uma proteína particular conforme usado no presente documento pode ser exibido, por exemplo, por uma molécula ou porção de uma molécula que tem um K_D para o alvo de 10^{-4} M ou maior, alternativamente 10^{-5} M ou maior, alternativamente 10^{-6} M ou maior, alternativamente 10^{-7} M ou maior, alternativamente 10^{-8} M ou maior, alternativamente 10^{-9} M ou maior, alternativamente 10^{-10} M ou maior, alternativamente 10^{-11} M ou maior, alternativamente 10^{-12} M ou maior, ou um K_D na faixa de 10^{-4} M a 10^{-12} M ou 10^{-6} M a 10^{-10} M ou 10^{-7} M a 10^{-9} M.

[00287] O termo "proteína-alvo" se refere a qualquer proteína que participa numa trajetória biológica associada a uma doença, distúrbio

ou condição. Em algumas modalidades, a proteína-alvo não é mTOR ou calcineurina. Em algumas modalidades, a proteína-alvo tem capacidade para formar um complexo de tripartite com uma proteína apresentadora e uma molécula pequena. Em algumas modalidades, uma proteína-alvo é uma proteína de ocorrência natural; em algumas destas modalidades, uma proteína-alvo é naturalmente encontrada em determinadas células de mamífero (por exemplo, uma proteína-alvo de mamífero), células fúngicas (por exemplo, uma proteína fúngica alvo), células bacterianas (por exemplo, uma proteína-alvo bacteriana) ou células vegetais (por exemplo, uma proteína-alvo de planta). Em algumas modalidades, uma proteína-alvo é caracterizada pela interação natural com um ou mais complexos de proteína apresentadora natural/molécula pequena natural. Em algumas modalidades, uma proteína-alvo é caracterizada por interações naturais com uma pluralidade de diferentes complexos de proteína apresentadora natural/molécula pequena natural; em algumas destas modalidades alguns ou todos os complexos utilizam a mesma proteína apresentadora (e diferentes moléculas pequenas). Em algumas modalidades, uma proteína-alvo não se liga substancialmente a um complexo de ciclosporina, rapamicina, ou FK506 e uma proteína apresentadora (por exemplo, FKBP). As proteínas-alvo podem ser de ocorrência natural, por exemplo, do tipo selvagem. Alternativamente, a proteína-alvo pode variar da proteína do tipo selvagem, mas ainda reter a função biológica, por exemplo, como uma variante alélica, um mutante de emenda ou um fragmento biologicamente ativo. As proteínas-alvo de mamífero are GTPases, proteína de ativação de GTPase, fator de troca de nucleotídeo de Guanina, proteínas de choque térmico, canais de íon, proteínas de bobina em espiral, quinases, fosfatases, ubiquitin ligases, fatores de transcrição, modificador/remodeladores de cromatina, proteínas com motivos e domínio de interação de proteína-proteína clássicos, ou quaisquer outras

proteínas que participam numa trajetória biológica associada a uma doença, distúrbio ou condição.

[00288] Em algumas modalidades, uma proteína-alvo é uma proteína-alvo modificada. Uma proteína-alvo modificada pode incluir uma inserção, deleção ou substituição de aminoácido, conservativa ou não conservativa (por exemplo, D-aminoácidos, desaminoácidos) na sequência de proteínas (por exemplo, em que estas mudanças não alteraram substancialmente a atividade biológica do polipeptídeo). Em particular, a adição de um ou mais resíduos de cisteína ao amino ou terminal carboxi de quaisquer dos polipeptídeos da invenção pode facilitar a conjugação destas proteínas por, por exemplo, ligação de dissulfeto. Em algumas modalidades, um ou mais resíduos de aminoácido reativo (por exemplo, cisteínas) são removidos para diminuir o número de sítios de conjugação possíveis na proteína. As substituições de aminoácido podem ser conservativas (isto é, em que um resíduo é substituído por outro do mesmo tipo ou grupo geral) ou não conservativas (isto é, em que um resíduo é substituído por um aminoácido de outro tipo). Além disto, um aminoácido de ocorrência natural pode ser substituído por um aminoácido de ocorrência não natural (isto é, substituição de aminoácido conservativo de ocorrência não natural ou uma substituição de aminoácido não conservativa de ocorrência não natural).

[00289] O termo "porção química de ligação de proteína-alvo" se refere a um grupo de átomos de anel e as porções químicas fixadas ao mesmo (por exemplo, átomos dentro de 20 átomos como, átomos dentro de 15 átomos, átomos dentro de 10 átomos, dentro de 5 átomos) que participam na ligação a uma proteína-alvo (por exemplo, uma proteína-alvo eucariótica como uma proteína-alvo de mamífero ou uma proteína fúngica alvo ou uma proteína-alvo procariótica como uma proteína-alvo bacteriana) quando o composto estiver num complexo com uma proteína apresentadora. Será compreendido que a porção quími-

ca de ligação de proteína-alvo não abrange necessariamente a totalidade de átomos no composto que interagem com a proteína-alvo. Também será compreendido que um ou mais átomos da porção química de ligação de proteína apresentadora também podem estar presentes na porção química de ligação de proteína-alvo.

[00290] O termo "bolso de ligação tradicional" se refere a cavidades ou bolsos numa estrutura de proteína com propriedades fisioquímicas e/ou geométricas comparáveis a proteínas cuja atividade foi modulada por uma ou mais moléculas pequenas. Em algumas modalidades, um bolso de ligação tradicional é um bolso bem definido com um volume maior do que 1000 A³. Aqueles de habilidade comum na técnica são familiares com o conceito de bolso de ligação tradicional e, ademais, estão cientes de sua relação a "farmacoababilidade". Em determinadas modalidades, uma proteína é considerada não ter um bolso de ligação tradicional se for não susceptível a modulação por fármaco, conforme definido no presente documento.

[00291] O termo "não susceptível a modulação por fármaco-alvo" se refere a proteínas que não são membros de uma família de proteína que é conhecida por ser alvejada por fármacos e/ou não possui um sítio de ligação que é adequado para ligação de alta afinidade a uma molécula pequena. Os métodos para determinar se a proteína-alvo é não susceptível a modulação por fármaco são conhecidos na técnica. Por exemplo, se uma proteína-alvo é não susceptível a modulação por fármaco pode ser determinado usando-se um algoritmo com base em estrutura, como aqueles usados pelo programa DOGSITESCORER® (Universitat Hamburg, Hamburg, Alemanha) que avalia a farmacoababilidade com base em parâmetros computados para bolsos de ligação numa proteína que inclui volume, área de superfície, área de superfície lipofílica, profundidade e/ou razão hidrofóbica.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[00292] A **Figura 1** é uma imagem que ilustra a análise SDS-PAGE de conjugados KRAS_{GTP/S39C} lite/C2-FK506. Raia 1: KRAS_{GTP/S39C} lite; Raia 2: mistura de reação de KRAS_{GTP/S39C} lite/C2-FK506; Raia 3: Mistura de reação de KRAS_{GTP/S39C} lite/C2-FK506 + 100 mM de DTT.

[00293] A **Figura 2** é uma imagem que ilustra a análise SDS-PAGE dos conjugados KRAS_{GTP/G12C} lite/SFAX9DS.

[00294] As **Figuras 3A e 3B** são imagens que ilustram a análise SEC e SDS-PAGE da Formação de Complexo KRAS_{GTP/S39C} lite/C2Holt/FKBP12. Figura 3A) Perfil de purificação de SEC. As linhas tracejadas azuis indicam o pico correspondente à eluição do complexo ternário KRAS_{GTP/S39C} lite/C2Holt/FKBP12; Figura 3B) Análise SDS-PAGE de picos de eluição de SEC. As linhas tracejadas azuis correspondem às frações coletadas para o pico de eluição de KRAS_{GTP/S39C} lite/C2Holt/FKBP12.

[00295] A **Figura 4** é uma imagem que ilustra perfil de SEC e análise SDS-PAGE dos picos de eluição confirmam a formação do complexo KRAS_{GDP/S39C} lite/SFAC4DS/CypA_{C52S}.

[00296] As **Figuras 5A e 5B** são imagens que ilustram o perfil de SEC e análise SDS-PAGE das proteínas PTP1B_{S187C} lite e FKBP12 livres e o complexo PTP1B_{S187C} lite/C3SLF/FKBP12.

[00297] A **Figura 6** é uma imagem que ilustra a eficácia de reticulação de C3 e C4SLF por SDS-PAGE.

[00298] As **Figuras 7A e 7B** consistem numa imagem que ilustra a estrutura de cristal do complexo FKBP12-Composto 1-KRAS_{GTP/S39C}. Figura 7A) Representação de laço que mostra FKBP12, KRAS_{GTP/S39C} e o ligante. A densidade de elétron Fo-Fc em 3 σ é mostrada para o ligante na vista aproximada. Figura 7B) Representação de superfície do complexo com átomos dentro da proximidade 4 Å para ligante ou proteína de parceiro colorida na terça.

[00299] A **Figura 8** é uma imagem que ilustra a estrutura de cristal

de CypA_{C52S}-SFAC4DS-KRAS_{GDP/S39C}.

[00300] As **Figuras 9A e 9B** são imagens que ilustram a estrutura de cristal de FKBP12-C3SLF-PTP1B_{S187C}. A Figura 9A ilustra que o cristal contém duas moléculas de complexo de FKBP12-C3SLF-PTP1B_{S187C} na unidade assimétrica. A Figura 9B ilustra que a área de superfície enterrada de PTP1B_{S187C} é 427 Å² e a área de superfície enterrada de C3SLF é 615 Å².

[00301] A **Figura 10** é uma imagem que ilustra a estrutura de cristal de MCL1_{S245C}/C3SLF/FKBP52.

[00302] A **Figura 11** é uma imagem que ilustra a curva de ligação da formação de complexo dependente de W21487 do complexo ternário CYPA-W21487- KRAS_{G12C-GTP}.

[00303] A **Figura 12** é uma imagem que ilustra a curva de ligação da formação de complexo dependente de W21487 do complexo ternário CYPA-W21487- KRAS_{G12C-GTP}.

[00304] A **Figura 13** é uma imagem que ilustra medições de ITC para a ligação de complexos binários FKBP12-Composto 1 e FKBP12-Composto 2 a CEP250.

[00305] A **Figura 14** é uma imagem que ilustra sensorgramas de SPR para a ligação de FKBP12/Composto 1 a CEP250_{11.4} e CEP250_{29.2}.

[00306] A **Figura 15** é uma imagem que ilustra sensorgrama e curvas de ajuste de estado contínuo para a ligação de CYPA/ Composto 3 a KRAS_{G12C-GTP}.

[00307] A **Figura 16** é uma imagem que ilustra curvas de polarização de fluorescência para formação de complexo CypA:C3DS:KRAS.

[00308] As **Figuras 17A-17C** são imagens que ilustram o espectro 2D 1H-15N TROSY-HSQC de KRAS_{G12C-GTP} (Figura 17A), a adição de uma quantidade estequiométrica de CYPA (Figura 17B), e KRAS e CYPA sozinhos (Figura 17C).

DESCRIÇÃO DETALHADA DE DETERMINADAS MODALIDADES

[00309] As moléculas pequenas são limitadas em suas habilidades de alvejamento devido ao fato de que suas interações com o alvo são acionadas por forças adesivas, cuja intensidade é aproximadamente proporcional à área de superfície de contato. Devido ao seu tamanho pequeno, a única forma para uma molécula pequena acumular área de superfície de contato intermolecular suficiente para interagir de modo eficaz com uma proteína-alvo é ser literalmente engolida por aquela proteína. De fato, um corpo grande de dados tanto experimentais quanto computacionais suporta aquela visão de que apenas aquelas proteínas que têm um "bolso" hidrofóbico sobre sua superfície têm capacidade para ligar moléculas pequenas. Naqueles casos, a ligação é habilitada pela imersão.

[00310] A natureza evoluiu uma estratégia que permite que uma molécula pequena interaja com proteínas-alvo em sítios além de bolsos hidrofóbicos. Esta estratégia é exemplificada por fármacos imunossupressores de ocorrência natural ciclosporina A, rapamicina e FK506. A atividade biológica destes fármacos envolve a formação de um complexo de alta afinidade da molécula pequena com uma proteína de apresentação pequena. A superfície compósita da molécula pequena e a proteína de apresentação engajam o alvo. Portanto, por exemplo, o complexo binário formado entre a ciclosporina A e ciclofilina A alveja calcineurina com alta afinidade e especificidade, mas nem ciclosporina A ou ciclofilina A sozinha liga calcineurina com afinidade mensurável.

[00311] Muitos alvos terapêuticos importantes exercem sua função pela complexação com outras proteínas. As superfícies de interação de proteína/proteína em muitos destes sistemas contêm um núcleo interno de cadeias laterais de hidrofóbico circundado por um anel amplo de resíduos polares. Os resíduos hidrofóbicos contribuem quase

todos os contatos energeticamente favoráveis e, por conseguinte, este grupamento foi designado como um "ponto quente" para engajamento em interações de proteína-proteína. De modo importante, nos complexos supracitados de moléculas pequenas de ocorrência natural com proteínas apresentadoras pequenas, a molécula pequena fornece um grupamento de funcionalidade hidrofóbico similar a um ponto quente, e a proteína fornece o anel de, em sua maioria, resíduos polares. Em outras palavras, os sistemas de molécula pequena apresentados simulam a arquitetura de superfície empregue amplamente em sistemas de interação de proteína/proteína naturais

[00312] A natureza demonstrou a capacidade de reprogramar a especificidade alvo de moléculas pequenas apresentadas --pontos quentes portáteis --através de diversificação evolucionária. No exemplo mais bem caracterizado, o complexo formado entre a proteína de ligação FK506 (FKBP) e FK506 alveja calcineurina. Entretanto, a FKBP também pode formar um complexo com a molécula relacionada rapamicina, e aquele complexo interage com um alvo completamente diferente, TorC1. Até o momento, nenhuma metodologia foi desenvolvida para reprogramar a capacidade ligação e modulação das interfaces de proteína apresentadora/ligante de modo que as mesmas possam interagir com e modular outras proteínas-alvo que foram consideradas anteriormente não susceptíveis a modulação por fármaco.

[00313] Além disto, é bem estabelecido que alguns candidatos de fármaco falham devido ao fato de que os mesmos modulam a atividade tanto do alvo pretendido quanto de outras proteínas não pretendidas também. O problema é particularmente assustador quando o sítio de ligação de fármaco da proteína-alvo for similar aos sítios de ligação proteínas não alvo. O receptor de fator de crescimento similar à insulina (IGF-1R), cujo bolso de ligação de ATP é estruturalmente similar ao bolso de ligação do receptor de insulina não alvo (IR), é um exemplo.

Os candidatos de desenvolvimento de molécula pequena que foram designados para alvejar IGF-1R têm, tipicamente, efeitos colaterais inaceitáveis de também modular o receptor de insulina. Entretanto, as dissemelhanças estruturais existem entre estas duas proteínas nas regiões que circundam o bolso de ligação de ATP. Apesar deste conhecimento, nenhuma metodologia existe até o momento para tomar vantagem daquelas diferenças e desenvolver fármacos que são específicos para IGF-1R em relação a IR.

[00314] A presente descrição fornece métodos e reagentes úteis para analisar interfaces de proteína-proteína como a interface entre uma proteína apresentadora (por exemplo, um membro da família FKBP, um membro da família ciclofilina, ou PIN1) e uma proteína-alvo. Em algumas modalidades, as proteínas-alvo e/ou apresentadoras são proteínas intracelulares. Em algumas modalidades, as proteínas-alvo e/ou apresentadoras são proteínas de mamífero. Em algumas modalidades, estes métodos e reagentes podem ser úteis para identificar proteínas-alvo favoráveis à inibição ou ativação pela formação de um complexo com uma proteína apresentadora e uma molécula pequena. Em algumas modalidades, estes métodos e reagentes podem ser úteis na identificação de compostos com capacidade para inibir ou ativar proteínas-alvo formando-se um complexo com uma proteína apresentadora e a proteína-alvo.

COMPOSTOS E CONJUGADOS

[00315] A divulgação fornece compostos que incluem uma porção química de ligação de proteína (por exemplo, uma porção química de ligação de proteína apresentadora ou porção química de ligação de proteína-alvo) e um grupo de reticulação. A invenção também apresenta conjugados que incluem uma porção química de ligação de proteína conjugada a uma proteína, por exemplo, uma porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada a uma proteína-alvo ou

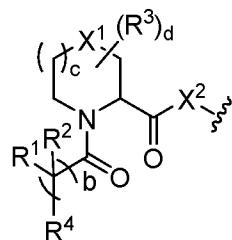
uma porção química de ligação de proteína-alvo conjugada a uma proteína apresentadora.

[00316] A invenção também apresenta os compostos da Fórmula VII:

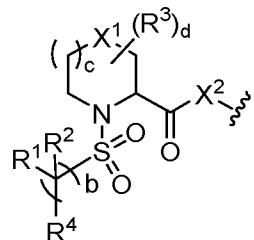
A-L-B

Fórmula VII

em que A compreende a estrutura da Fórmula VIII:

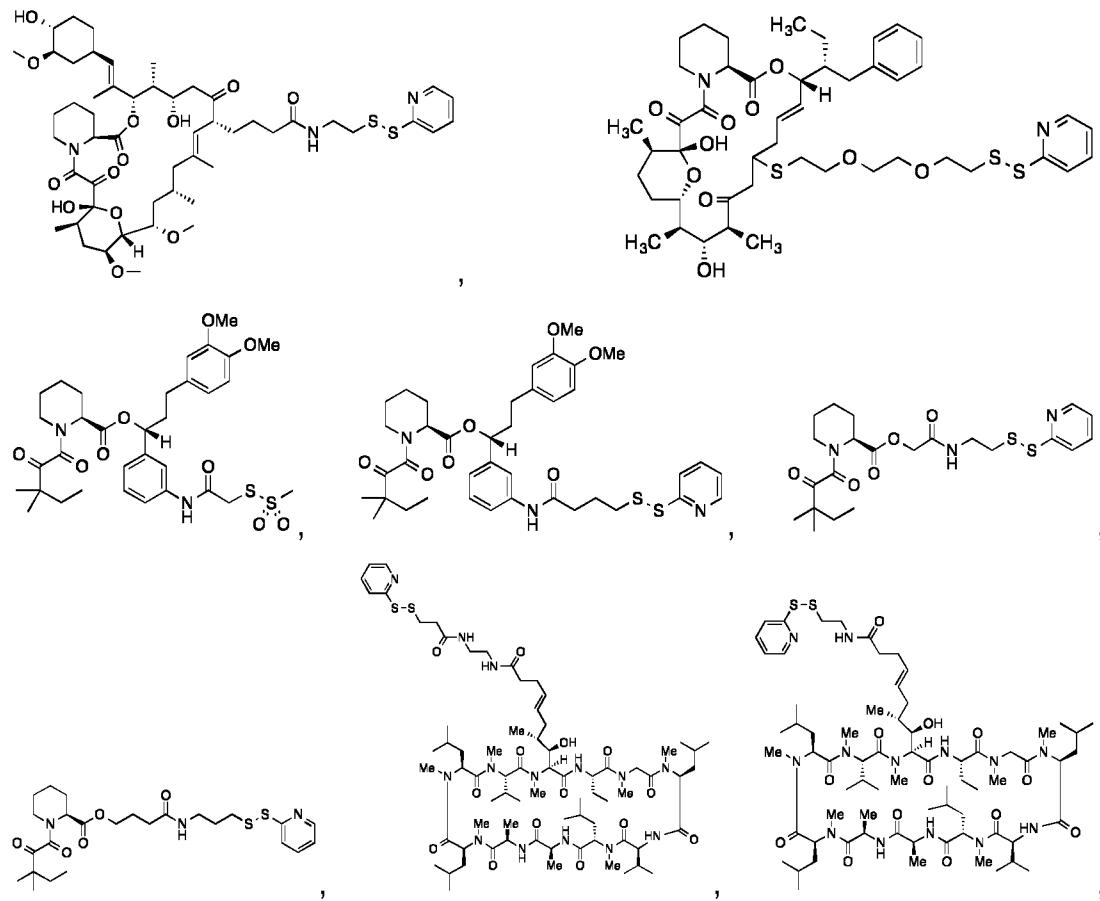


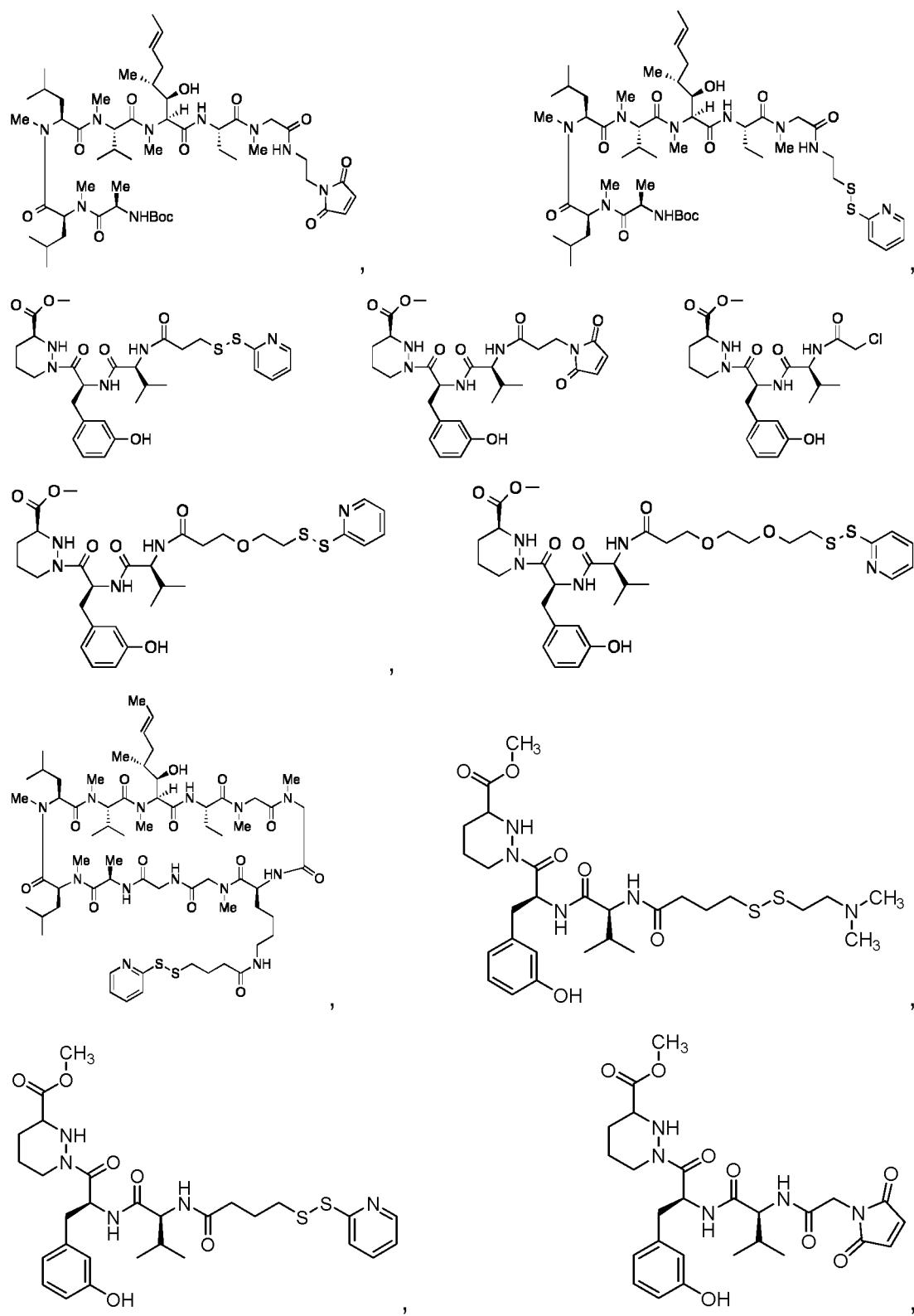
Fórmula VIIIa

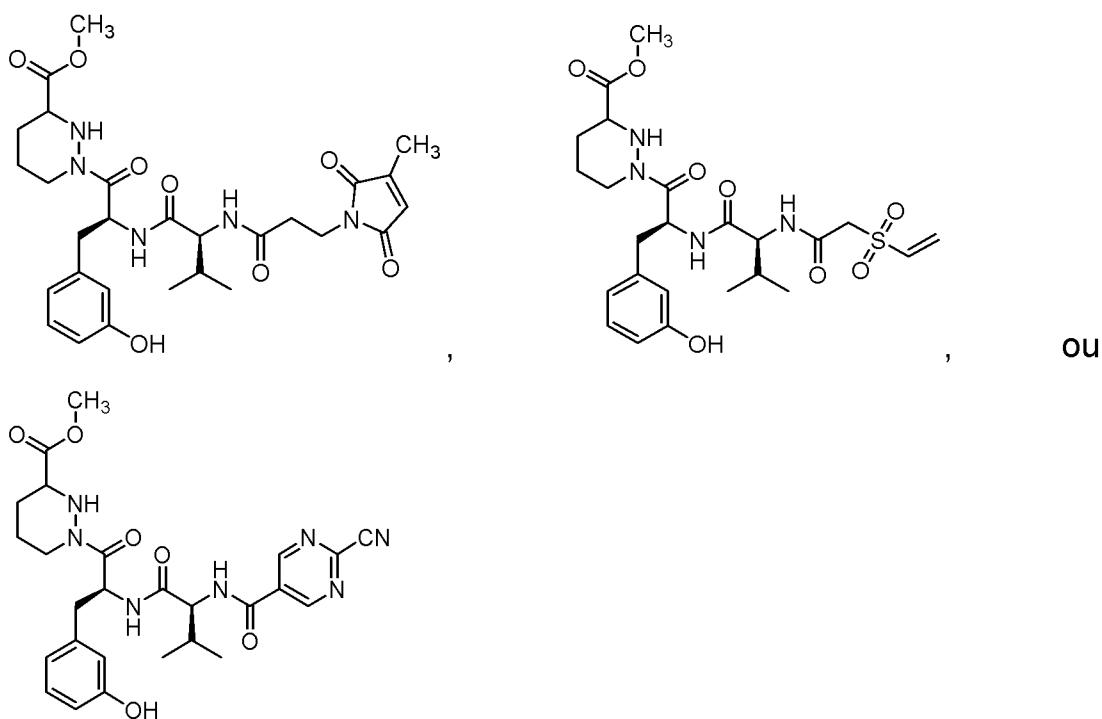


Fórmula VIIIb

[00317] Em algumas modalidades, o composto da invenção é:







GRUPOS DE RETICULAÇÃO

[00318] Em algumas modalidades, os compostos da invenção incluem um grupo de reticulação. Um grupo de reticulação se refere a um grupo compreendendo um grupo funcional reativo com capacidade para se fixar quimicamente a grupos funcionais específicos (por exemplo, aminas primárias, sulfidrilas) em proteínas ou outras moléculas. Os exemplos de grupos de reticulação incluem grupos de reticulação reativos a sulfidrila (por exemplo, grupos compreendendo maleimidas, haloacetilas, piridildisulfidas, tiosulfonatos, ou vinilssulfonas), grupos de reticulação reativos a amina (por exemplo, grupos compreendendo ésteres como NHS ésteres, imidoésteres, e pentafluorofenil ésteres, ou hidroximetilfosfina), grupos de reticulação reativos a carboxila (por exemplo, grupos compreendendo aminas primárias ou secundárias, álcoois, ou tióis), grupos de reticulação reativos a carbonila (por exemplo, grupos compreendendo hidrazidos ou alcoxiaminas), e grupos de reticulação formadores de triazol (por exemplo, grupos compreendendo azidos ou alcinas).

[00319] Os grupos de reticulação exemplificativos incluem 2'-

piridildisulfeto, 4'-piridildisulfeto iodoacetila, maleimidas, tioésteres, alquildisulfetos, dissulfetos de alquilamina, dissulfeto de ácido nitrobenzoico, anidridos, ésteres de NHS, aldeídos, cloretos de alquila, alcinas, grupos de aceitador de Michael (por exemplo, cetonas α,β -não substituídas ou sulfonas), epóxidos, heteroaril nitrilas e azidos.

PORÇÕES QUÍMICAS DE LIGAÇÃO DE PROTEÍNA APRESENTADORA

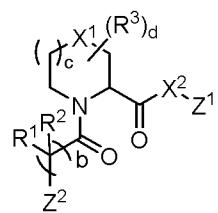
[00320] Em algumas modalidades, os compostos da invenção incluem uma porção química de ligação de proteína apresentadora. Em algumas modalidades, uma porção química de ligação de proteína apresentadora inclui um grupo de átomos (por exemplo, 5 a 20 átomos, 5 a 10 átomos, 10 a 20 átomos) e pode incluir quaisquer porções químicas fixadas ao mesmo (por exemplo, átomos dentro de 20 átomos, átomos dentro de 15 átomos, átomos dentro de 10 átomos, átomos dentro de 5 átomos) que participa na ligação a uma proteína apresentadora de modo que um composto fornecido se ligue especificamente à referida proteína apresentadora, por exemplo, com um K_D menor do que 10 μM (por exemplo, menor do que 5 μM , menor do que 1 μM , menor do que 500 nM, menor do que 200 nM, menor do que 100 nM, menor do que 75 nM, menor do que 50 nM, menor do que 25 nM, menor do que 10 nM) ou inibe a atividade de peptidil-prolil isomerase da proteína apresentadora, por exemplo, com um IC_{50} menor do que 1 μM (por exemplo, menor do que 0,5 μM , menor do que 0,1 μM , menor do que 0,05 μM , menor do que 0,01 μM). Em algumas modalidades, a porção química de ligação de proteína apresentadora não abrange a totalidade de átomos num composto fornecido que interage com a proteína apresentadora. Em determinadas modalidades, um ou mais átomos da porção química de ligação de proteína apresentadora não interagem com a proteína apresentadora.

[00321] Em algumas modalidades, uma porção química de ligação

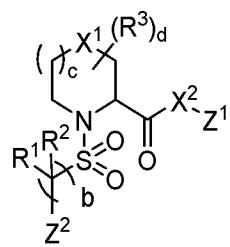
de proteína apresentadora inclui uma porção química de N-acil prolina, uma porção química de ácido N-acil-pipecólico, uma porção química de ácido N-acil 3-morfolino-carboxílico e/ou uma porção química de ácido N-acil piperízico (por exemplo, com acilação em qualquer átomo de nitrogênio. Em determinadas modalidades, uma porção química de ligação de proteína apresentadora inclui uma porção química de ácido N-acil-pipecólico. Em algumas modalidades, uma porção química de ligação de proteína apresentadora inclui uma porção química de N-acil prolina. Em determinadas modalidades, uma porção química de ligação de proteína apresentadora inclui uma porção química de ácido N-acil 3-morfolino-carboxílico. Em algumas modalidades, uma porção química de ligação de proteína apresentadora inclui uma porção química de ácido N-acil piperízico.

[00322] Em algumas modalidades, pelo menos um átomo de uma porção química de ligação de proteína apresentadora participa na ligação com um ou mais (por exemplo, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze, quatorze, ou quinze) de Tyr 27, Phe 37, Asp 38, Arg 41, Phe 47, Gln 54, Glu 55, Val 56, Ile 57, Trp 60, Ala 82, Try 83, His 88, Ile 92 e/ou Phe 100 de FKBP12. Em algumas modalidades, pelo menos uma de uma porção química de ligação de proteína apresentadora participa na ligação com pelo menos um (por exemplo, dois, três, ou quatro) de Arg 41, Gln 54, Glu 55 e/ou Ala 82 de FKBP12.

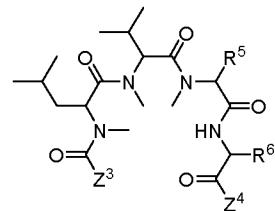
[00323] Em algumas modalidades, uma porção química de ligação de proteína apresentadora tem uma estrutura de acordo com a Fórmula II-IV:



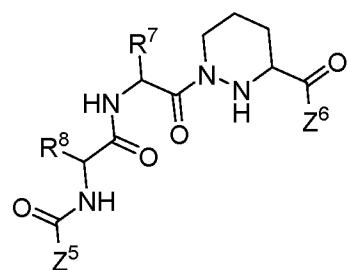
Fórmula IIa



Fórmula IIb

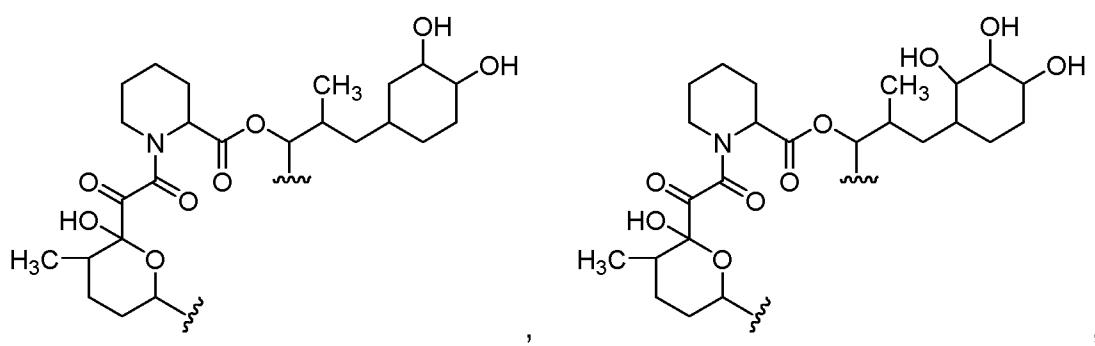
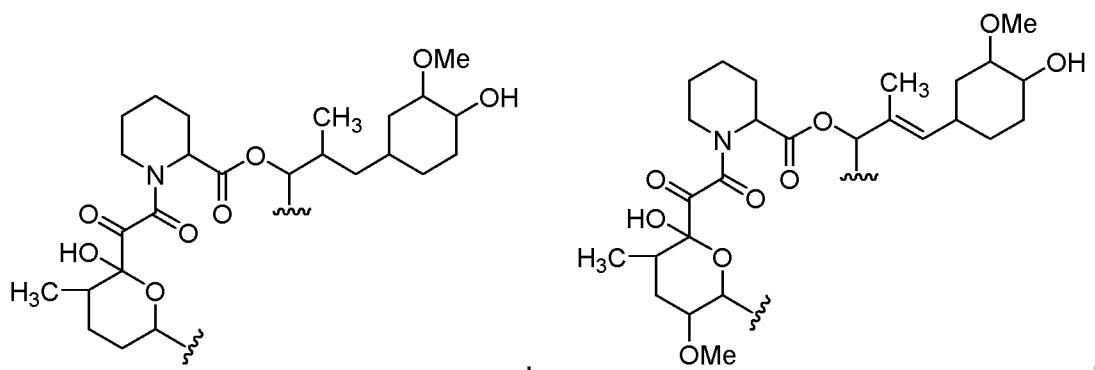


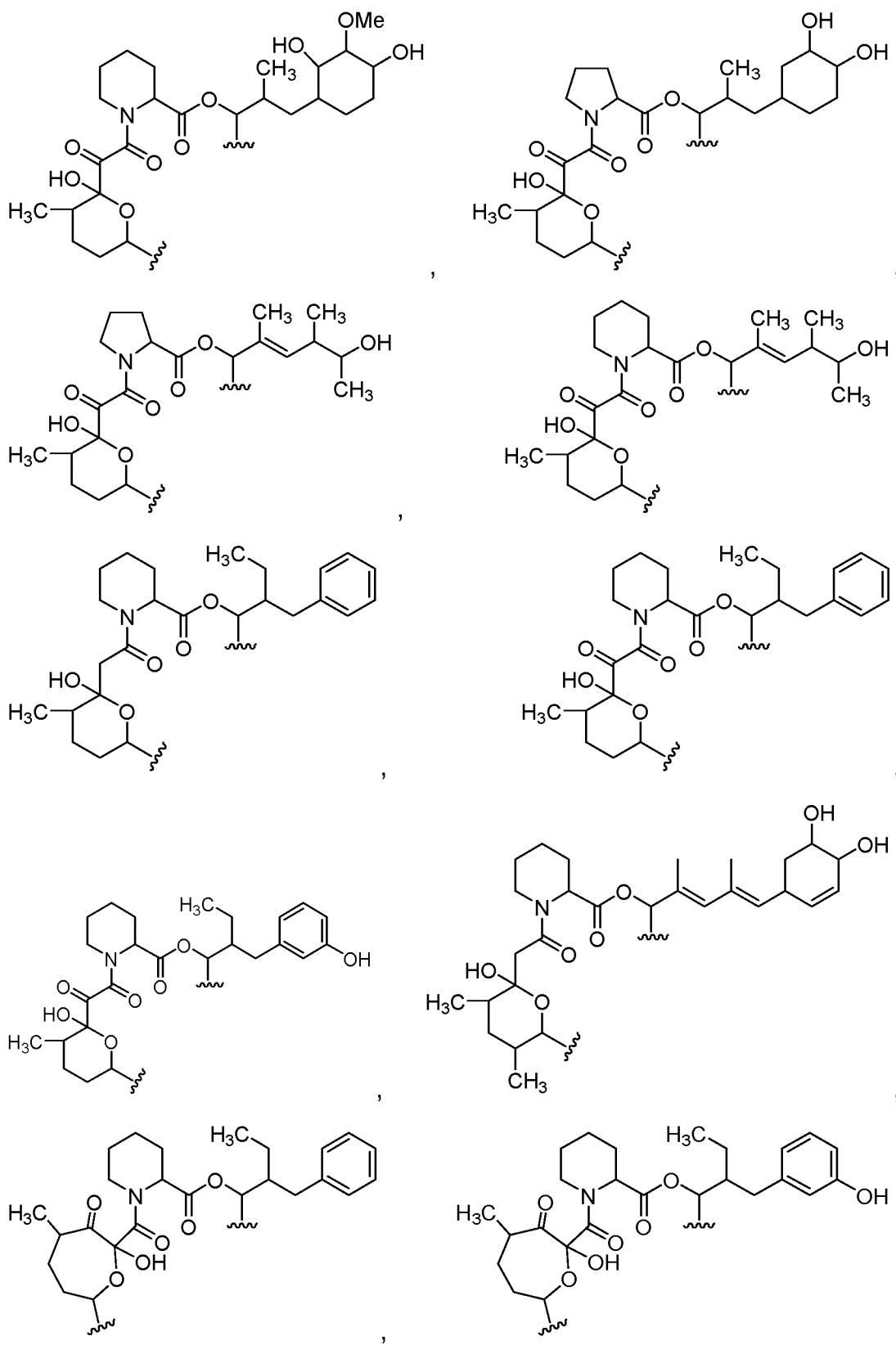
Fórmula III

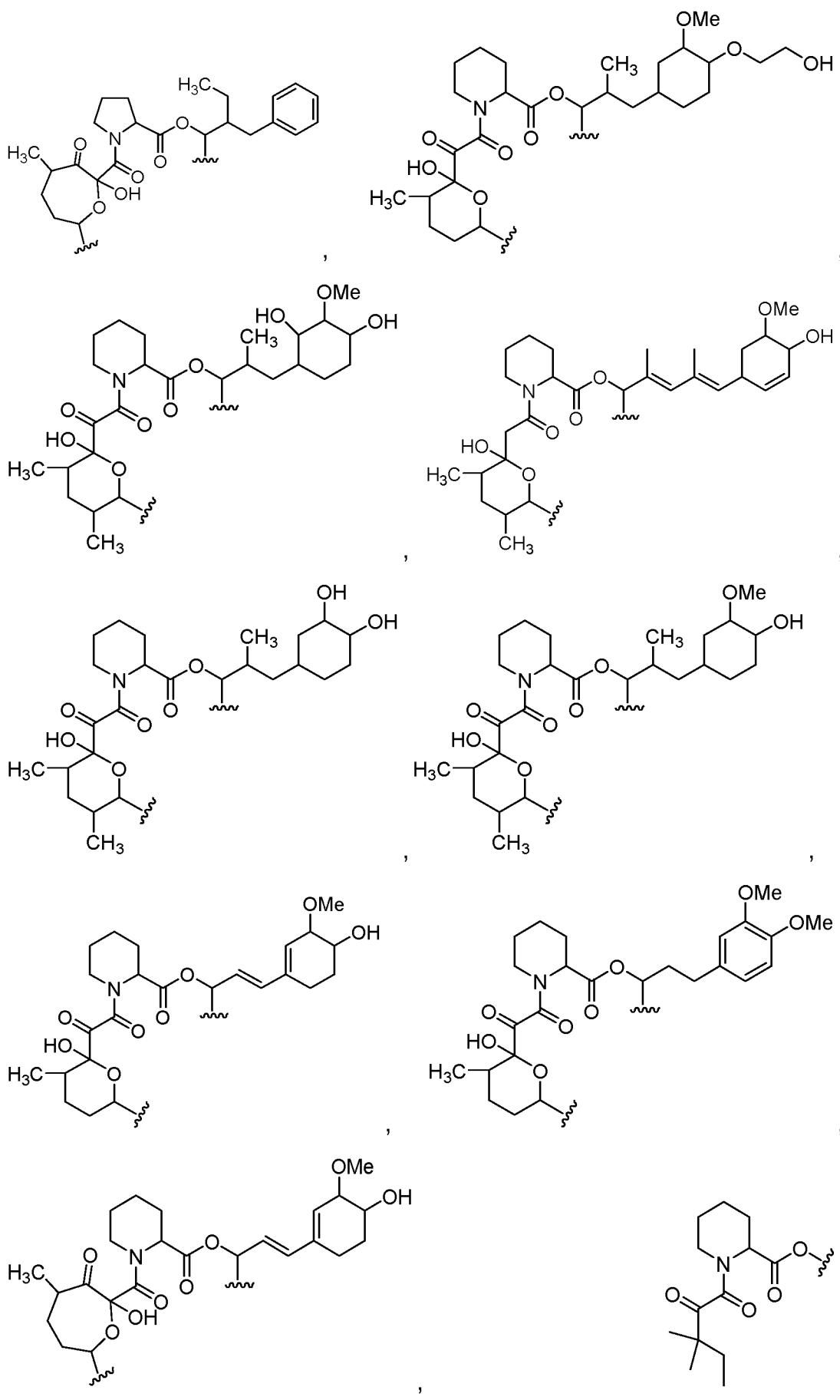


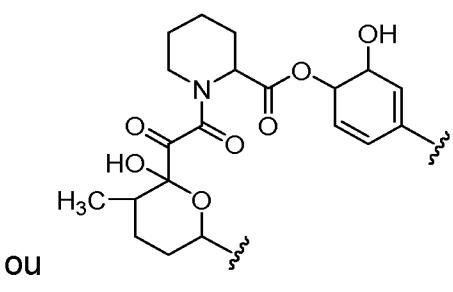
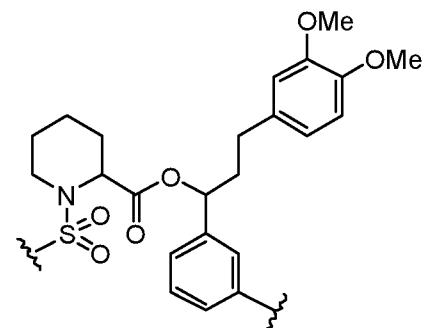
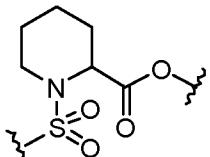
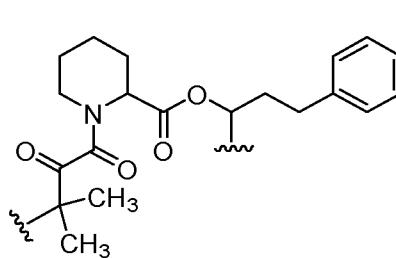
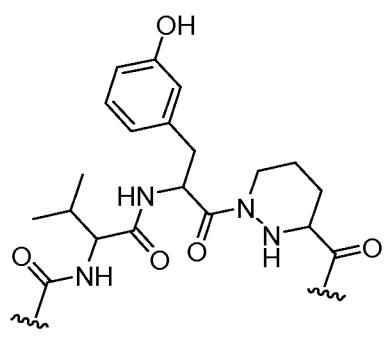
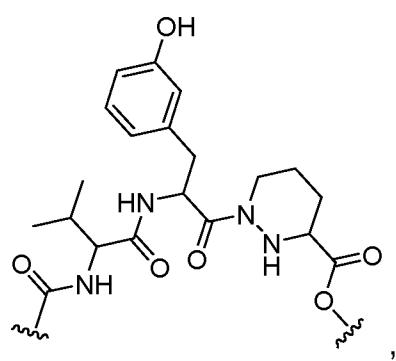
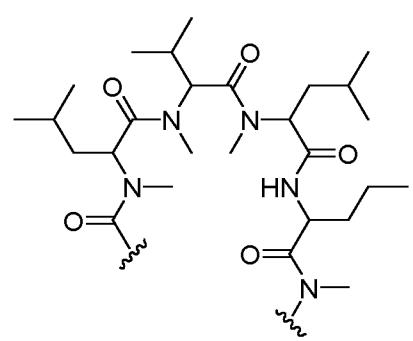
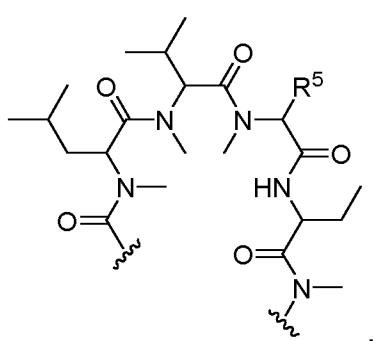
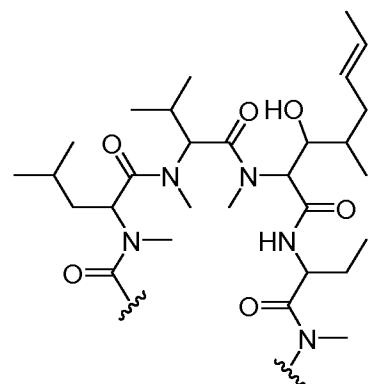
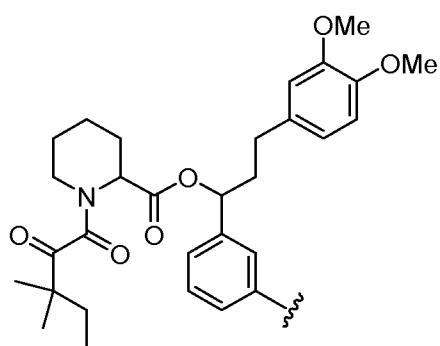
Fórmula IV

[00324] Em algumas modalidades, uma porção química de ligação de proteína apresentadora inclui ou consiste na estrutura:









ou um estereoisômero do mesmo.

[00325] Uma proteína apresentadora pode se ligar a um átomo numa porção química de ligação de proteína apresentadora. Alternativa ou adicionalmente, uma proteína apresentadora pode se ligar a dois ou mais átomos numa porção química de ligação de proteína apresentadora. Em outra alternativa, uma ligação de proteína apresentadora pode ser a um substituinte fixado a um ou mais átomos numa porção química de ligação de proteína apresentadora. Além do mais, em algumas modalidades, uma proteína apresentadora pode se ligar a um átomo numa porção química de ligação de proteína apresentadora e a um substituinte fixado a um ou mais átomos numa porção química de ligação de proteína apresentadora. Em algumas modalidades, uma proteína apresentadora se liga a um grupo que simula um ligante natural de uma proteína apresentadora e em que o grupo que simula um ligante natural de uma proteína apresentadora é fixado a uma porção química de ligação de proteína apresentadora. Em algumas modalidades, uma proteína apresentadora se liga a uma proteína apresentadora e afinidade de uma proteína apresentadora para uma proteína apresentadora no complexo binário é aumentada em relação à afinidade de uma proteína apresentadora para uma proteína apresentadora na ausência do complexo. A ligação nestes exemplos é tipicamente, mas não limitados a, interações não covalentes de uma proteína apresentadora a uma porção química de ligação de proteína apresentadora.

PORÇÕES QUÍMICAS DE LIGAÇÃO DE PROTEÍNA-ALVO

[00326] Em algumas modalidades, os compostos da invenção incluem uma porção química de ligação de proteína-alvo (por exemplo, uma porção química de ligação de proteína-alvo eucariótica como uma porção química de ligação de proteína-alvo de mamífero ou uma porção química de ligação de proteína-alvo fúngica ou uma porção química de ligação de proteína-alvo procariótica como uma porção química

de ligação de proteína-alvo bacteriana). Em algumas modalidades, a porção química de ligação de proteína-alvo inclui um grupo de átomos (por exemplo, 5 a 20 átomos, 5 a 10 átomos, 10 a 20 átomos) e pode incluir quaisquer porções químicas fixadas ao mesmo (por exemplo, átomos dentro de 20 átomos, átomos dentro de 15 átomos, átomos dentro de 10 átomos, átomos dentro de 5 átomos) que se ligam especificamente a uma proteína-alvo. Em algumas modalidades, uma porção química de ligação de proteína-alvo compreende uma pluralidade dos átomos no composto que interagem com a proteína-alvo. Em determinadas modalidades, um ou mais átomos de uma porção química de ligação de proteína-alvo não interagem com a proteína-alvo.

[00327] Uma proteína-alvo pode se ligar a um átomo numa porção química de ligação de proteína-alvo. Alternativa ou adicionalmente, uma proteína-alvo pode se ligar a dois ou mais átomos numa porção química de ligação de proteína-alvo. Em outra alternativa, uma ligação de proteína-alvo pode ser a um substituinte fixado a um ou mais átomos numa porção química de ligação de proteína-alvo. Em outra alternativa, uma proteína-alvo pode se ligar a um átomo numa porção química de ligação de proteína-alvo e a um substituinte fixado a um ou mais átomos numa porção química de ligação de proteína-alvo. Em outra alternativa, uma proteína-alvo se liga a um grupo que simula um ligante natural de uma proteína-alvo e em que o grupo que simula um ligante natural de uma proteína-alvo é fixado a uma porção química de ligação de proteína-alvo. Em ainda outra alternativa, uma proteína-alvo se liga a uma proteína apresentadora e a afinidade de uma proteína-alvo para uma proteína apresentadora no complexo binário é aumentada em relação à afinidade de uma proteína-alvo para uma proteína apresentadora na ausência do complexo. A ligação nestes exemplos é tipicamente através de, mas não limitadas a, interações não covalentes de uma proteína-alvo a uma porção química de ligação de proteí-

na-alvo.

[00328] Em algumas modalidades, a porção química de ligação de proteína-alvo inclui um grupo de reticulação (por exemplo, um grupo de reticulação interno).

LIGANTES

[00329] Os compostos da invenção incluem um ligante (por exemplo, porção química ligante que une uma porção química de ligação de proteína (por exemplo, uma porção química de ligação de proteína apresentadora ou uma porção química de ligação de proteína-alvo) a um grupo de reticulação ou um ligante que une uma porção química de ligação de proteína a uma proteína (por exemplo, uma proteína apresentadora ou proteína-alvo). O componente de ligante da invenção é, na sua forma mais simples, uma ligação, mas também pode fornecer um esqueleto molecular linear, cíclico ou ramificado que tem grupos pendentes que ligam de modo covalente duas porções químicas.

[00330] Em algumas modalidades, pelo menos um átomo de um ligante participa na ligação à proteína apresentadora e/ou à proteína-alvo. Em determinadas modalidades, pelo menos um átomo de um ligante não participa na ligação à proteína apresentadora e/ou à proteína-alvo.

[00331] Portanto, um ligante, quando incluído num composto e/ou conjugado conforme descrito no presente documento, alcança a ligação de duas (ou mais) porções químicas por meio covalente, envolvendo a formação de ligação com um ou mais grupos funcionais localizados em qualquer porção química. Os exemplos de grupo funcional quimicamente reativos que podem ser utilizados para este propósito incluem, sem limitação, grupos amino, hidroxila, sulfhidrila, carboxila, carbonila, carboidrato, vicinal dióis, tioéteres, 2-aminoálcoois, 2-aminotíois, guanidinila, imidazolila e grupos fenólicos.

[00332] Em algumas modalidades, esta ligação covalente de duas (ou mais) porções químicas pode ser efetuada usando-se um ligante que contém porções químicas reativas com capacidade para reação com estes grupos funcionais presentes em qualquer porção química. Por exemplo, um grupo amina de uma porção química pode reagir com um grupo carboxila do ligante, ou um derivado ativado do mesmo, resultando na formação de uma amida ligando os dois.

[00333] Os exemplos de porções químicas com capacidade para reação com grupos sulfidrila incluem compostos de α -haloacetila do tipo XCH_2CO^- (em que $X=Br$, Cl , ou I), que mostram reatividade particular para grupos sulfidrila, mas que também podem ser usados para modificar grupos imidazolila, tioéter, fenol e amino conforme descrito por Gurd, *Methods Enzymol.* 11:532 (1967). Os derivados de N-Maleimida também são considerados seletivos para os grupos sulfidrila, mas podem, adicionalmente, ser úteis no acoplamento a grupos amino sob determinadas condições. Os reagentes como 2-iminotiolano (Traut et al., *Biochemistry* 12:3266 (1973)), que introduzem um grupo tiol através da conversão de um grupo amino, podem ser considerados como reagentes de sulfidrila se a ligação ocorrer através da formação de pontes de dissulfeto.

[00334] Os exemplos de porções químicas reativas com capacidade para reação com grupos amino incluem, por exemplo, agentes alquilantes e acilantes. Os agentes alquilantes representativos incluem:

[00335] (i) compostos de α -haloacetila, que mostram especificidade para grupos amino na ausência de grupos tiol reativos e são do tipo XCH_2CO^- (em que $X=Br$, Cl , ou I), por exemplo, conforme descrito por Wong *Biochemistry* 24:5337 (1979);

[00336] (ii) derivados de N-maleimida, que podem reagir com grupos amino através de uma reação do tipo Michael ou através de acilação pela adição ao grupo carbonila de anel, por exemplo, conforme

descrito por Smyth et al., *J. Am. Chem. Soc.* 82:4600 (1960) e *Biochem. J.* 91:589 (1964);

[00337] (iii) halogenos de arila como compostos nitrohaloaromáticos reativos;

[00338] (iv) halogenos de alquila, conforme descrito, por exemplo, por McKenzie et al., *J. Protein Chem.* 7:581 (1988);

[00339] (v) aldeídos e cetonas com capacidade para formação de base de Schiff com grupos amino, sendo que os adutos formados são geralmente estabilizados através da redução para gerar uma amina estável;

[00340] (vi) derivados de epóxido como epiclorohidrina e bisoxiranos, que podem reagir com grupo amino, sulfidrila, ou hidroxila fenólica;

[00341] (vii) derivados que contêm cloro de s-triazinas, que são muito reativos a nucleófilos como grupos amino, sulfidrila e hidroxila;

[00342] (viii) aziridinas com base em compostos de s-triazina detalhados acima, por exemplo, conforme descrito por Ross, *J. Adv. Cancer Res.* 2:1 (1954), que reagem com nucleófilos como grupos amino pela abertura de anel;

[00343] (ix) ésteres dietílicos de ácidos esquárico conforme descrito por Tietze, *Chem. Ber.* 124:1215 (1991); e

[00344] (x) α -haloalquil éteres, que são agentes alquilantes mais reativos do que halogenos de alquila normais devido à ativação causada pelo átomo de oxigênio éter, conforme descrito por Benneche et al., *Eur. J. Med. Chem.* 28:463 (1993).

[00345] Os agentes acilantes reativos a amino representativos incluem:

[00346] (i) isocianatos e isotiocianatos, derivados particularmente aromáticos, que formam derivados de ureia e tioureia estáveis, respectivamente;

- [00347] (ii) cloretos de sulfonila, que foram descritos por Herzig et al., *Biopolymers* 2:349 (1964);
- [00348] (iii) haletos ácidos;
- [00349] (iv) ésteres ativos como nitrofenilésteres ou N-hidroxisuccinimidil ésteres;
- [00350] (v) anidridos ácidos como mistos, simétricos ou N-carboxianidridos;
- [00351] (vi) outros reagentes úteis para formação de ligação de amida, por exemplo, conforme descrito por M. Bodansky, *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, 1984;
- [00352] (vii) acilazidos, por exemplo, em que o grupo azido é gerado a partir de um derivado de hidrazido pré-formado usando-se nitrito de sódio, conforme descrito por Wetz et al., *Anal. Biochem.* 58:347 (1974);
- [00353] (viii) imidoésteres, que formam amidinas estáveis mediante reação com grupos amino, por exemplo, conforme descrito por Hunter e Ludwig, *J. Am. Chem. Soc.* 84:3491 (1962); e
- [00354] (ix) grupos halo-heteroarila como halopiridina ou halopirimidina.
- [00355] Aldeídos e cetonas podem ser reagidos com aminas para formar bases de Schiff, o que pode ser vantajosamente estabilizado através da aminaçãao redutiva. As porções químicas de alcoxilamino reagem prontamente com cetonas e aldeídos para produzir alcoxaminas, por exemplo, conforme descrito por Webb et al., em *Bioconjugate Chem.* 1:96 (1990).
- [00356] Os exemplos de porções químicas reativas com capacidade para reação com grupos carboxila incluem compostos diazo como diazoacetato ésteres e diazoacetamidas, que reagem com alta especificidade para gerar grupos éster, por exemplo, conforme descrito por Herriot, *Adv. Protein Chem.* 3:169 (1947). Os reagentes modificadores de

carboxila como carbodiimidas, que reagem através da formação de O-acilureia seguida pela formação de ligação de amida, também podem ser utilizados.

[00357] Será entendido que os grupos funcionais em qualquer porção química podem, se desejado, ser convertidos em outros grupos funcionais antes da reação, por exemplo, para conferir reatividade ou seletividade adicional. Os exemplos de métodos úteis para este propósito incluem a conversão de aminas em carboxilas usando-se reagentes como anidridos dicarboxílicos; conversão de aminas em tióis usando-se reagentes como N-acetilhomocisteína tiolactona, anidrido S-acetilmercaptosuccínico, 2-iminotiolano, ou derivados de succinimidila que contêm tiol; conversão de tióis em carboxilas usando-se reagentes como α -haloacetatos; conversão de tióis em aminas usando-se reagentes como etilenimina ou 2-bromoetilamina; conversão de carboxilas em aminas usando-se reagentes como carbodiimidas seguidas por diaminas; e conversão de álcoois em tióis usando-se reagentes como cloreto tosila seguido pela transesterificação com tioacetato e hidrólise para o tiol com acetato de sódio.

[00358] Os assim chamados ligantes de comprimento zero, envolvendo a união covalente direta de um grupo químico reativo de uma porção química com um grupo químico reativo da outra sem introduzir material de ligação adicional pode, se desejado, ser usados de acordo com a invenção.

[00359] Mais comumente, entretanto, o ligante inclui duas ou mais porções químicas reativas, conforme descrito acima, conectadas por um elemento espaçador. A presença deste espaçador permite que os ligantes bifuncionais reajam com grupos funcionais específicos dentro de qualquer porção química, resultando numa ligação covalente entre os dois. As porções químicas reativas num ligante podem ser iguais (ligante homobifuncional) ou diferentes (ligante heterobifuncional ligan-

te, ou, em que várias porções químicas reativas similares estão presentes, ligante heteromultifuncional), fornecendo uma diversidade de reagentes potenciais que podem provocar a fixação covalente entre as duas porções químicas.

[00360] Os elementos espaçadores no ligante consistem, tipicamente, em cadeia lineares ou ramificadas e podem incluir uma alquila C₁₋₁₀, alquenila C₂₋₁₀, alquinila C₂₋₁₀, heterociclila C₂₋₆, arila C₆₋₁₂, alcarila C₇₋₁₄, alqheterociclila C₃₋₁₀, polietileno glicol C_{2-C₁₀₀} ou heteroalquila C₁₋₁₀.

[00361] Em alguns casos, o ligante é descrito pela Fórmula V.

[00362] Os exemplos de ligantes homobifuncionais úteis na preparação de conjugados da invenção incluem, sem limitação, diaminas e dióis selecionados a partir de etilenodiamina, propilenodiamina e hexametilenodiamina, etileno glicol, dietileno glicol, propileno glicol, 1,4-butanodiol, 1,6-hexanodiol, ciclohexanodiol, e policaprolactona diol.

[00363] Em algumas modalidades, o ligante é uma ligação ou uma cadeia linear de até 10 átomos, selecionado independentemente a partir de átomos de carbono, nitrogênio, oxigênio, enxofre ou fósforo, em que cada átomo na cadeia é opcionalmente substituído por um ou mais substituintes independentemente selecionados a partir de alquila, alquenila, alquinila, arila, heteroarila, cloro, iodo, bromo, fluoro, hidroxila, alcóxi, arilóxi, carbóxi, amino, alquilamino, dialquilamino, acilamino, carboxamido, ciano, oxo, tio, alquiltio, ariltio, aciltio, alquilsulfonato, arilsulfonato, fosforila e sulfonila, e em que quaisquer dois átomos na cadeia podem ser tomados juntos com os substituintes ligados aos mesmos para formar um anel, em que o anel pode ser adicionalmente substituído e/ou fundido a um ou mais anéis carbocíclico, heterocíclicos, de arila ou de heteroaril opcionalmente substituídos.

[00364] Em algumas modalidades, um ligante tem a estrutura da Fórmula XIX:



Fórmula XIX

[00365] em que A^1 é uma ligação entre o ligante e a porção química de ligação de proteína apresentadora; A^2 é uma ligação entre a porção química de interação de alvo mamífero e o ligante; B^1 , B^2 , B^3 e B^4 são, cada um, independentemente, selecionados a partir de alquila C_{1-2} opcionalmente substituída, heteroalquila C_{1-3} opcionalmente substituída, O, S, e NR^N ; R^N é hidrogênio, alquila C_{1-4} opcionalmente substituída, alquenila C_{2-4} opcionalmente substituída, alquinila C_{2-4} opcionalmente substituída, heterociclila C_{2-6} opcionalmente substituída, arila C_{6-12} opcionalmente substituída ou heteroalquila C_{1-7} opcionalmente substituída; C^1 e C^2 são, cada um, independentemente, selecionados a partir de carbonila, tiocarbonila, sulfonila, ou fosforila; a , b , c , d , e , e f são, cada um, independentemente, 0 ou 1; e D é alquila C_{1-10} opcionalmente substituída, alquenila C_{2-10} opcionalmente substituída, alquinila C_{2-10} opcionalmente substituída, heterociclila C_{2-6} opcionalmente substituída, arila C_{6-12} opcionalmente substituída, polietileno glicol $C_{2-C_{10}}$ opcionalmente substituído ou heteroalquila C_{1-10} opcionalmente substituída, ou uma ligação química que liga $A^1-(B^1)_a-(C^1)_b-(B^2)_c-$ $a-(B^3)_d-(C^2)_e-(B^4)_f-A^2$.

PROTEÍNAS

PROTEÍNAS APRESENTADORAS

[00366] As proteínas apresentadoras podem ligar uma molécula pequena para formar um complexo, que pode se ligar a e modular a atividade de uma proteína-alvo (por exemplo, uma proteína-alvo eucariótica como uma proteína-alvo de mamífero ou uma proteína fúngica alvo ou uma proteína-alvo procariótica como uma proteína-alvo bacteriana). Em algumas modalidades, a proteína apresentadora é uma proteína apresentadora de mamífero (por exemplo, uma proteína apresentadora de humano). Em algumas modalidades, a proteína apresen-

tadora é uma proteína apresentadora fúngica. Em determinadas modalidades, a proteína apresentadora é uma proteína apresentadora bacteriana. Em algumas modalidades, a proteína apresentadora é uma proteína apresentadora vegetal. Em algumas modalidades, a proteína apresentadora é uma proteína relativamente abundante (por exemplo, a proteína apresentadora é suficientemente abundante que a participação em complexo de tripartite não impacta negativamente de modo material o papel biológico da proteína apresentadora numa célula e/ou viabilidade ou outros atributos da célula). Em algumas modalidades, a proteína apresentadora é mais abundante do que a proteína-alvo. Em determinadas modalidades, a proteína apresentadora é uma proteína que tem atividade de chaperona dentro de uma célula. Em algumas modalidades, a proteína apresentadora tem múltiplos parceiros de interação natural dentro de uma célula. Em determinadas modalidades, a proteína apresentadora é uma que é conhecida por ligar uma molécula pequena para formar um complexo binário que é conhecido ou suspeito de ligação a e modulação da atividade biológica de uma proteína-alvo. Imunofilinas são uma classe de proteínas apresentadoras que são conhecidas por terem estas funções e incluem FKBP e ciclofilinas. Em algumas modalidades, a proteína apresentadora de referência exibe atividade de peptidil prolil isomerase; Em algumas modalidades, uma proteína apresentadora mostra atividade comparável à proteína apresentadora de referência. Em determinadas modalidades, a proteína apresentadora é um membro da família FKBP (por exemplo, FKBP12, FKBP12.6, FKBP13, FKBP19, FKBP22, FKBP23, FKBP25, FKBP36, FKBP38, FKBP51, FKBP52, FKBP60, FKBP65, e FKBP133), um membro da família ciclofilina (por exemplo, PP1A, CYPB, CYPC, CYP40, CYPE, CYPD, NKTR, SRCyp, CYPH, CWC27, CYPL1, CYP60, CYPJ, PPL4, PPL6, RANBP2, PPWD1, PPIAL4A, PPIAL4B, PPIAL4C, PPIAL4D, ou PPIAL4G), ou PIN1. A "família FKBP" é uma

família de proteínas que têm atividade de prolil isomerase e funciona como chaperonas de enovelamento de proteína para proteínas que contêm resíduos de prolina. Genes que codificam proteínas nesta família incluem AIP, AIPL1, FKBP1A, FKBP1B, FKBP2, FKBP3, FKBP4, FKBP5, FKBP6, FKBP7, FKBP8, FKBP9, FKBP9L, FKBP10, FKBP11, FKBP14, FKBP15, e LOC541473.

[00367] A "família ciclofilina" é uma família de proteínas que se ligam a ciclosporina. Genes que codificam proteínas nesta família incluem PPIA, PPIB, PPIC, PPID, PPIE, PPIF, PPIG, PPIH, SDCCAG-10, PPIL1, PPIL2, PPIL3, PPIL4, P270, PPWD1 e COAS-2. As ciclofilinas exemplificativas incluem PP1A, CYPB, CYPC, CYP40, CYPE, CYPD, NKTR, SRCyp, CYPH, CWC27, CYPL1, CYP60, CYPJ, PPIL4, PPIL6, RANBP2, PPWD1, PPIAL4A, PPIAL4B, PPIAL4C, PPIAL4D e PPIAL4G.

[00368] Em algumas modalidades, uma proteína apresentadora é uma proteína chaperona como GRP78/BiP, GRP94, GRP170, calnexina, calreticulina, HSP47, ERp29, proteína dissulfeto isomerase (PDI) e ERp57.

[00369] Em algumas modalidades, uma proteína apresentadora é uma variante alélica ou variante de emenda de uma FKBP ou ciclofilina revelada no presente documento.

[00370] Em algumas modalidades, uma proteína apresentadora é um polipeptídeo cuja sequência de aminoácidos i) mostra identidade significativa com aquela de uma proteína apresentadora de referência; ii) inclui uma porção que mostra identidade significativa com uma porção correspondente de uma referência proteína apresentadora; e/ou iii) inclui pelo menos uma sequência característica encontrada na proteína apresentadora. Em muitas modalidades, a identidade é considerada "significativa" para os propósitos de definir uma proteína apresentadora se estiver acima de 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%,

87%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou superior. Em algumas modalidades, a porção que mostra identidade significativa tem um comprimento de pelo menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 300, 350, 450, 500, 550, 600 aminoácidos ou mais.

[00371] As proteínas apresentadoras representativas são codificadas pelos genes ou homólogos dos mesmos listados na Tabela 1; em algumas modalidades, uma proteína apresentadora de referência é codificada por um gene apresentado na Tabela 1. Além disto, aqueles indivíduos de habilidade comum na técnica, referindo-se à Tabela 1, podem identificar prontamente sequências que são características de proteínas apresentadoras geralmente e/ou de subconjuntos particulares de proteínas apresentadoras.

TABELA 1. GENES QUE CODIFICAM PROTEÍNAS APRESENTADORAS SELECIONADAS

Nome de Gene	Número de Acesso Uniprot
AIP	O00170
AIPL1	Q9ZN9
FKBP1A	P62942
FKBP1B	P68106
FKBP2	P26885
FKBP3	Q00688
FKBP4	Q02790
FKBP5	Q13451
FKBP6	O75344
FKBP7	Q9Y680
FKBP8	Q14318
FKBP9	O95302

Nome de Gene	Número de Acesso Uniprot
FKBP9L	Q75LS8
FKBP10	Q96AY3
FKBP11	Q9NYL4
FKBP14	Q9NWM8
FKBP15	Q5T1M5
LOC541473	-
PPIA	Q567Q0
PPIB	P23284
PPIC	P45877
PPID	Q08752
PPIE	Q9UNP9
PPIG	Q13427
PPIH	O43447
PPIL1	Q9Y3C6
PPIL2	Q13356
PPIL3	Q9H2H8
PPIL4	Q8WUA2
PPIL5	Q32Q17
PPIL6	Q8IXY8
PPWD1	Q96BP3

PROTEÍNAS-ALVO

[00372] Uma proteína-alvo (por exemplo, uma proteína-alvo eucariótica como uma proteína-alvo de mamífero ou uma proteína fúngica alvo ou uma proteína-alvo procariótica como uma proteína-alvo bacteriana) é uma proteína que media uma condição de doença ou um sintoma de uma condição de doença. Como tal, um efeito terapêutico desejável pode ser alcançado modulando-se (inibindo ou aumentando) sua atividade. As proteínas-alvo úteis nos complexos e métodos da invenção incluem aquelas que não se associam naturalmente a uma proteína apresentadora, por exemplo, aquelas que têm uma afinidade para uma proteína apresentadora na ausência de um complexo binário

com um composto da invenção maior do que 1 μM , de preferência maior do que 5 μM , e com mais preferência maior do que 10 μM . Alternativamente, as proteínas-alvo que não se associam naturalmente a uma proteína apresentadora são aquelas que têm uma afinidade para um composto da invenção na ausência de um complexo binário maior do que 1 μM , de preferência maior do que 5 μM , e com mais preferência maior do que 10 μM . Em outra alternativa, as proteínas-alvo que não se associam naturalmente a uma proteína apresentadora são aquelas que têm uma afinidade para um complexo binário de ciclosporina, rapamicina, ou FK506 e uma proteína apresentadora (por exemplo, FKBP) maior do que 1 μM , de preferência maior do que 5 μM , e com mais preferência maior do que 10 μM . Em ainda outra alternativa, as proteínas-alvo que não se associam naturalmente a uma proteína apresentadora são aquelas que são diferentes de calcineurina ou mTOR. A seleção de proteínas-alvo adequadas para os complexos e métodos da invenção podem depender da proteína apresentadora. Por exemplo, as proteínas-alvo que têm baixa afinidade para uma ciclofílna podem ter alta afinidade para uma FKBP e não seria usada juntamente com a anterior.

[00373] As proteínas-alvo podem ser de ocorrência natural, por exemplo, do tipo selvagem. Alternativamente, uma proteína-alvo pode variar da proteína do tipo selvagem, mas ainda reter a função biológica, por exemplo, como uma variante alélica, um mutante de emenda ou um fragmento biologicamente ativo.

[00374] Em algumas modalidades, uma proteína-alvo é uma proteína transmembranar. Em algumas modalidades, uma proteína-alvo tem uma estrutura de bobina em espiral. Em determinadas modalidades, uma proteína-alvo é uma proteína de um complexo dimérico.

[00375] Em algumas modalidades, uma proteína-alvo da invenção inclui um ou mais sítios de superfície (por exemplo, um sítio de super-

fície plano) caracterizado pelo fato de que, na ausência da formação de um complexo de proteína apresentadora/composto, as moléculas pequenas demonstram, tipicamente, ligação baixa ou não detectável ao sítio (ou sítios). Em algumas modalidades, uma proteína-alvo inclui um ou mais sítios de superfície (por exemplo, um sítio de superfície plano) ao qual, na ausência da formação de um complexo de proteína apresentadora/composto, uma molécula pequena particular (por exemplo, o composto) mostra a ligação baixa ou não detectável (por exemplo, ligação pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 100 vezes, ou mais, menor do que o observado com um complexo de proteína apresentadora/que envolve o mesmo composto). Em algumas modalidades, uma proteína-alvo tem uma superfície caracterizada por um ou mais sítios (e, em algumas modalidades, uma superfície inteira) que carece qualquer bolso de ligação tradicional, por exemplo, uma cavidade ou bolso na estrutura de proteína com propriedades fisioquímicas e/ou geométricas comparável a proteínas cuja atividade foi modulada por uma ou mais moléculas pequenas. Em determinadas modalidades, uma proteína-alvo tem um bolso de ligação tradicional e um sítio para uma interação de proteína-proteína. Em algumas modalidades, uma proteína-alvo é um alvo não susceptível a modulação por fármaco, por exemplo, uma proteína-alvo não é um membro de uma família de proteína que é conhecida por ser alvejada por fármacos e/ou não possui um sítio de ligação que é esperado (por exemplo, acordo com a compreensão aceita pela técnica, conforme discutido no presente documento) ser adequado para ligação a uma molécula pequena. Em algumas modalidades, a proteína inclui pelo menos uma cisteína reativa.

[00376] Em algumas modalidades, a proteína-alvo é uma GTPase como DIRAS1, DIRAS2, DIRAS3, ERAS, GEM, HRAS, KRAS, MRAS, NKIRAS1, NKIRAS2, NRAS, RALA, RALB, RAP1A, RAP1B, RAP2A,

RAP2B, RAP2C, RASD1, RASD2, RASL10A, RASL10B, RASL11A, RASL11B, RASL12, REM1, REM2, RERG, RERGL, RRAD, RRAS, RRAS2, RHOA, RHOB, RHOBTB1, RHOBTB2, RHOBTB3, RHOC, RHOD, RHOF, RHOG, RHOH, RHOJ, RHOQ, RHOU, RHOV, RND1, RND2, RND3, RAC1, RAC2, RAC3, CDC42, RAB1A, RAB1B, RAB2, RAB3A, RAB3B, RAB3C, RAB3D, RAB4A, RAB4B, RAB5A, RAB5B, RAB5C, RAB6A, RAB6B, RAB6C, RAB7A, RAB7B, RAB7L1, RAB8A, RAB8B, RAB9, RAB9B, RABL2A, RABL2B, RABL4, RAB10, RAB11A, RAB11B, RAB12, RAB13, RAB14, RAB15, RAB17, RAB18, RAB19, RAB20, RAB21, RAB22A, RAB23, RAB24, RAB25, RAB26, RAB27A, RAB27B, RAB28, RAB2B, RAB30, RAB31, RAB32, RAB33A, RAB33B, RAB34, RAB35, RAB36, RAB37, RAB38, RAB39, RAB39B, RAB40A, RAB40AL, RAB40B, RAB40C, RAB41, RAB42, RAB43, RAP1A, RAP1B, RAP2A, RAP2B, RAP2C, ARF1, ARF3, ARF4, ARF5, ARF6, ARL1, ARL2, ARL3, ARL4, ARL5, ARL5C, ARL6, ARL7, ARL8, ARL9, ARL10A, ARL10B, ARL10C, ARL11, ARL13A, ARL13B, ARL14, ARL15, ARL16, ARL17, TRIM23, ARL4D, ARFRP1, ARL13B, RAN, RHEB, RHEBL1, RRAD, GEM, REM, REM2, RIT1, RIT2, RHOT1 ou RHOT2. Em algumas modalidades, a proteína-alvo é uma proteína de ativação de GTPase como NF1, IQGAP1, PLEXIN-B1, RASAL1, RASAL2, ARHGAP5, ARHGAP8, ARHGAP12, ARHGAP22, ARHGAP25, BCR, DLC1, DLC2, DLC3, GRAF, RALBP1, RAP1GAP, SIPA1, TSC2, AGAP2, ASAP1, ou ASAP3. Em algumas modalidades, a proteína-alvo é um fator de troca de nucleotídeo de Guanina como CNRASGEF, RASGEF1A, RASGRF2, RASGRP1, RASGRP4, SOS1, RALGDS, RGL1, RGL2, RGR, ARHGEF10, ASEF/ARHGEF4, ASEF2, DBS, ECT2, GEF-H1, LARG, NET1, OBSCURIN, P-REX1, P-REX2, PDZ-RHOGEF, TEM4, TIAM1, TRIO, VAV1, VAV2, VAV3, DOCK1, DOCK2, DOCK3, DOCK4, DOCK8, DOCK10, C3G, BIG2/ARFGEF2, EFA6, FBX8 ou GEP100. Em determinadas modalidades, a proteína-alvo é

uma proteína com um domínio de interação de proteína-proteína como ARM; BAR; BEACH; BH; BIR; BRCT; BROMO; BTB; C1; C2; CARD; CC; CALM; CH; CHROMO; CUE; DEATH; DED; DEP; DH; EF-hand; EH; ENTH; EVH1; F-box; FERM; FF; FH2; FHA; FYVE; GAT; GEL; GLUE; GRAM; GRIP; GYF; HEAT; HECT; IQ; LRR; MBT; MH1; MH2; MIU; NZF; PAS; PB1; PDZ; PH; POLO-Box; PTB; PUF; PWWP; PX; RGS; RING; SAM; SC; SH2; SH3; SOCS; SPRY; START; SWIRM; TIR; TPR; TRAF; SNARE; TUBBY; TUDOR; UBA; UEV; UIM; VHL; VHS; WD40; WW; SH2; SH3; TRAF; Bromodomínio; ou TPR. Em algumas modalidades, a proteína-alvo é uma proteína de choque térmico como Hsp20, Hsp27, Hsp70, Hsp84, alfa B cristalina, TRAP-1, hsf1 ou Hsp90. Em determinadas modalidades, a proteína-alvo é um canal iônico como Cav2.2, Cav3.2, IKACH, Kv1.5, TRPA1, NAv1.7, Nav1.8, Nav1.9, P2X3 ou P2X4. Em algumas modalidades, a proteína-alvo é uma proteína de bobina em espiral como geminin, SPAG4, VAV1, MAD1, ROCK1, RNF31, NEDP1, HCCM, EEA1, Vimentin, ATF4, Nemo, SNAP25, Syntaxin 1a, FYCO1, ou CEP250. Em determinadas modalidades, a proteína-alvo é uma quinase como Ciclina D1, ABL, ALK, AXL, BTK, EGFR, FMS, FAK, FGFR1, 2, 3, 4, FLT3, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3, HER4/ErbB4, IGF1R, INSR, JAK1, JAK2, JAK3, KIT, MET, PDGFRA, PDGFRB, RET RON, ROR1, ROR2, ROS, SRC, SYK, TIE1, TIE2, TRKA, TRKB, KDR, AKT1, AKT2, AKT3, PDK1, PKC, RHO, ROCK1, RSK1, RKS2, RKS3, ATM, ATR, CDK1, CDK2, CDK3, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7, CDK8, CDK9, CDK10, ERK1, ERK2, ERK3, ERK4, GSK3A, GSK3B, JNK1, JNK2, JNK3, AurA, AurB, PLK1, PLK2, PLK3, PLK4, IKK, KIN1, cRaf, PKN3, c-Src, Fak, PyK2 ou AMPK. Em algumas modalidades, a proteína-alvo é uma fosfatase como WIP1, SHP2, SHP1, PRL-3, PTP1B ou STEP. Em determinadas modalidades, a proteína-alvo é uma ubiquitina ou proteína similar a ubiquitina (como NEDD8, proteínas ATG8 , proteínas SUMO,

ISG15), enzima ativadora (E1's como UBA1, UBA2, UBA3, UBA5, UBA6, UBA7, ATG7, NAE1, SAE1), enzima de conjugação (E2's como proteínas UBE, ATG3, BIRC6), enzima de ligação (E3's como BMI-1, MDM2, NEDD4-1, Beta-TRCP, SKP2, E6AP, CBL-B, ou APC/C), e ubiquitina ou proteína protease similar a ubiquitina. Em algumas modalidades, a proteína-alvo é um modificador/remodelador de cromatina como um modificador/remodelador de cromatina codificado pelo gene BRG1, BRM, ATRX, PRDM3, ASH1L, CBP, KAT6A, KAT6B, MLL, NSD1, SETD2, EP300, KAT2A, ou CREBBP. Em algumas modalidades, a proteína-alvo é um fator de transcrição como um fator de transcrição codificado pelo gene EHF, ELF1, ELF3, ELF4, ELF5, ELK1, ELK3, ELK4, ERF, ERG, ETS1, ETV1, ETV2, ETV3, ETV4, ETV5, ETV6, FEV, FLI1, GAVPA, SPDEF, SPI1, SPIC, SPIB, E2F1, E2F2, E2F3, E2F4, E2F7, E2F8, ARNTL, BHLHA15, BHLHB2, BHLBHB3, BHLHE22, BHLHE23, BHLHE41, CLOCK, FIGLA, HAS5, HES7, HEY1, HEY2, ID4, MAX, MESP1, MLX, MLXIPL, MNT, MSC, MYF6, NEUROD2, NEUROG2, NHLH1, OLIG1, OLIG2, OLIG3, SREBF2, TCF3, TCF4, TFAP4, TFE3, TFEB, TFEC, USF1, ARF4, ATF7, BATF3, CEBPB, CEBPD, CEBPG, CREB3, CREB3L1, DBP, HLF, JDP2, MAFF, MAFG, MAFK, NRL, NFE2, NFIL3, TEF, XBP1, PROX1, TEAD1, TEAD3, TEAD4, ONECUT3, ALX3, ALX4, ARX, BARHL2, BARX, BSX, CART1, CDX1, CDX2, DLX1, DLX2, DLX3, DLX4, DLX5, DLX6, DMBX1, DPRX, DRGX, DUXA, EMX1, EMX2, EN1, EN2, ESX1, EVX1, EVX2, GBX1, GBX2, GSC, GSC2, GSX1, GSX2, HESX1, HMX1, HMX2, HMX3, HNF1A, HNF1B, HOMEZ, HOXA1, HOXA10, HOXA13, HOXA2, HOXB13, HOXB2, HOXB3, HOXB5, HOXC10, HOXC11, HOXC12, HOXC13, HOXD11, HOXD12, HOXD13, HOXD8, IRX2, IRX5, ISL2, ISX, LBX2, LHX2, LHX6, LHX9, LMX1A, LMX1B, MEIS1, MEIS2, MEIS3, MEOX1, MEOX2, MIXL1, MNX1, MSX1, MSX2, NKX2-3, NKX2-8, NKX3-1, NKX3-2, NKX6-1, NKX6-2, NOTO,

ONECUT1, ONECUT2, OTX1, OTX2, PDX1, PHOX2A, PHOX2B, PITX1, PITX3, PKNOX1, PROP1, PRRX1, PRRX2, RAX, RAXL1, RHOXF1, SHOX, SHOX2, TGIF1, TGIF2, TGIF2LX, UNCX, VAX1, VAX2, VENTX, VSX1, VSX2, CUX1, CUX2, POU1F1, POU2F1, POU2F2, POU2F3, POU3F1, POU3F2, POU3F3, POU3F4, POU4F1, POU4F2, POU4F3, POU5F1P1, POU6F2, RFX2, RFX3, RFX4, RFX5, TFAP2A, TFAP2B, TFAP2C, GRHL1, TFCP2, NFIA, NFIB, NFIX, GCM1, GCM2, HSF1, HSF2, HSF4, HSFY2, EBF1, IRF3, IRF4, IRF5, IRF7, IRF8, IRF9, MEF2A, MEF2B, MEF2D, SRF, NRF1, CPEB1, GMEB2, MYBL1, MYBL2, SMAD3, CENPB, PAX1, PAX2, PAX9, PAX3, PAX4, PAX5, PAX6, PAX7, BCL6B, EGR1, EGR2, EGR3, EGR4, GLIS1, GLIS2, GLI2, GLIS3, HIC2, HINFP1, KLF13, KLF14, KLF16, MTF1, PRDM1, PRDM4, SCRT1, SCRT2, SNAI2, SP1, SP3, SP4, SP8, YY1, YY2, ZBED1, ZBTB7A, ZBTB7B, ZBTB7C, ZIC1, ZIC3, ZIC4, ZNF143, ZNF232, ZNF238, ZNF282, ZNF306, ZNF410, ZNF435, ZBTB49, ZNF524, ZNF713, ZNF740, ZNF75A, ZNF784, ZSCAN4, CTCF, LEF1, SOX10, SOX14, SOX15, SOX18, SOX2, SOX21, SOX4, SOX7, SOX8, SOX9, SRY, TCF7L1, FOXO3, FOXB1, FOXC1, FOXC2, FOXD2, FOXD3, FOXG1, FOXI1, FOXJ2, FOXJ3, FOXK1, FOXL1, FOXO1, FOXO4, FOXO6, FOXP3, EOMES, MGA, NFAT5, NFATC1, NFkB1, NFkB2, TP63, RUNX2, RUNX3, T, TBR1, TBX1, TBX15, TBX19, TBX2, TBX20, TBX21, TBX4, TBX5, AR, ESR1, ESRRα, ESRRβ, ESRRγ, HNF4A, NR2C2, NR2E1, NR2F1, NR2F6, NR3C1, NR3C2, NR4A2, RARA, RARB, RARG, RORA, RXRA, RXRB, RXRG, THRA, THRB, VDR, GATA3, GATA4, ou GATA5; ou C-myc, Max, Stat3, Stat4, Stat6, receptor de androgênio, C-Jun, C-Fox, N-Myc, L-Myc, MITF, Hif-1alfa, Hif-2alfa, Bcl6, E2F1, NF-kappaB, Stat5, ou ER(coact). Em determinadas modalidades, a proteína-alvo é TrkA, P2Y14, mPEGS, ASK1, ALK, Bcl-2, BCL-XL, mSIN1, RORyt, IL17RA, eIF4E, TLR7 R, PCSK9, IgE R, CD40, CD40L, Shn-3, TNFR1, TNFR2,

IL31RA, OSMR, IL12beta1,2, Tau, FASN, KCTD 6, KCTD 9, Raptor, Rictor, RALGAPA, RALGAPB, membros da família Anexina, BCOR, NCOR, beta catenina, AAC 11, PLD1, PLD2, Frizzled7, RaLP, ,MLL-1, Myb, Ezh2, RhoGD12, EGFR, CTLA4R, GCGC (coact), Adiponectina R2, GPR 81, IMPDH2, IL-4R, IL-13R, IL-1R, IL2-R, IL-6R, IL-22R, TNF-R, TLR4, MyD88, Keap1, ou Nrlp3.

VARIANTES DE PROTEÍNA

[00377] Uma proteína ou variante de polipeptídeo, conforme descrito no presente documento, tem geralmente uma sequência de aminoácidos que mostra identidade significativa (por exemplo, 80% ou mais, isto é, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou mais) com aquela de um polipeptídeo de referência (por exemplo, uma proteína apresentadora ou proteína-alvo conforme descrito no presente documento como, por exemplo, uma proteína apresentadora ou proteína-alvo de mamífero), mas inclui um número limitado de mudanças de aminoácido particular (por exemplo, inserções, deleções ou substituições, conservativas ou não conservativas e/ou incluindo uma ou mais variantes de aminoácido ou análogos (por exemplo, D-aminoácidos, desaminoácidos) em relação ao polipeptídeo de referência. Em determinadas modalidades, uma variante compartilha uma atividade biológica relevante (por exemplo, ligação a um composto particular ou porção química do mesmo) com o polipeptídeo de referência; em algumas destas modalidades, a variante exibe esta atividade num nível que não é menor do que cerca de 50% daquela do polipeptídeo de referência e/ou não é menor do que cerca de 0,5 vezes abaixo daquela do polipeptídeo de referência.

[00378] Em algumas modalidades, uma variante de polipeptídeo tem uma sequência de aminoácidos que difere daquela de um polipeptídeo de referência pelo menos (ou apenas) em que a variante tem um

número de resíduos de cisteína maior e/ou tem um ou mais resíduos de cisteína numa posição correspondente a um resíduo de não cisteína no polipeptídeo de referência. Por exemplo, em algumas modalidades, a adição de um ou mais resíduos de cisteína ao amino ou carboxi terminal de qualquer um dentre um polipeptídeo (por exemplo, de uma proteína apresentadora e/ou de uma proteína-alvo) conforme descrito no presente documento pode facilitar a conjugação deste polipeptídeo por, por exemplo, ligação de dissulfeto. Em algumas modalidades, as substituições de aminoácido podem ser conservativas (isto é, em que um resíduo é substituído por outro do mesmo tipo geral ou grupo) ou não conservativas (isto é, em que um resíduo é substituído por um aminoácido de outro tipo). Em algumas modalidades, um aminoácido de ocorrência natural pode ser substituído por um aminoácido de ocorrência não natural (isto é, substituição de aminoácido conservativo de ocorrência não natural ou uma substituição de aminoácido não conservativa de ocorrência não natural), ou vice-versa.

[00379] Os polipeptídeos produzidos sinteticamente podem incluir substituições de aminoácidos codificados de modo não natural por DNA (por exemplo, aminoácido de ocorrência não natural ou não natural). Os exemplos de aminoácidos de ocorrência não natural incluem D-aminoácidos, um aminoácido que tem uma cadeia lateral que contém azido, um aminoácido que tem um grupo acetilaminometila fixado a um átomo de enxofre de uma cisteína, um aminoácido peguilado, os aminoácidos omega da fórmula $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ em que n é 2 a 6, aminoácidos não polares neutros, como sarcosina, t-butil alanina, t-butil glicina, N-metil isoleucina e norleucina. A fenilglicina pode ser substituída por Trp, Tyr, ou Phe; citrulina e sulfóxido de metionina são não polares neutros, ácido cisteico é ácido, e ornitina é básico. Prolina pode ser substituída por hidroxiprolina e retém as propriedades de conferência de conformação.

[00380] Os análogos podem ser gerados por mutagênese substitucional e reter a estrutura (por exemplo, uma estrutura local ou estrutura global) da proteína original. Os exemplos de substituições identificados como "substituições conservativas" são mostrados na Tabela 2. Se estas substituições resultarem numa mudança não desejada, então outro tipo de substituições, denominadas "substituições exemplificativas" na Tabela 2, ou como descrito adicionalmente no presente documento em referência em classes de aminoácido, são introduzidas e os produtos testados.

[00381] As modificações substanciais na função ou identidade imunológica são realizadas selecionando-se substituições que diferem significativamente em seu efeito sobre a manutenção (a) da estrutura da estrutura principal de proteína na área da substituição, por exemplo, como uma conformação de lâmina ou helicoidal. (b) a carga ou hidrofobicidade da molécula no sítio alvo, ou (c) o volume da cadeia lateral. Os resíduos de ocorrência natural são divididos em grupos com base em propriedades de cadeia lateral comum:

[00382] (1) hidrofóbico: norleucina, metionina (Met), Alanina (Ala), Valina (Val), Leucina (Leu), Isoleucina (Ile), Histidina (His), Triptofano (Trp), Tirosina (Tyr), Fenilalanina (Phe),

[00383] (2) hidrofílico neutro: Cisteína (Cys), Serina (Ser), Treonina (Thr)

[00384] (3) ácido/negativamente carregado: Ácido aspártico (Asp), Ácido glutâmico (Glu)

[00385] (4) básico: Asparagina (Asn), Glutamina (Gln), Histidina (His), Lisina (Lys), Arginina (Arg)

[00386] (5) resíduos que influenciam a orientação de cadeia: Glicina (Gly), Prolina (Pro);

[00387] (6) aromático: Triptofano (Trp), Tirosina (Tyr), Fenilalanina (Phe), Histidina (His),

- [00388] (7) polar: Ser, Thr, Asn, Gln
- [00389] (8) positivamente carregado básico: Arg, Lys, His e;
- [00390] (9) carregado: Asp, Glu, Arg, Lys, His
- [00391] Outras substituições de aminoácido são listadas na Tabela 2.

TABELA 2. SUBSTITUIÇÕES DE AMINOÁCIDO

Resíduo Original	Substituição exemplificativa	Substituição Conservativa
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro	Pro
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala	Leu
Pro (P)	Gly	Gly
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, norleucina	Leu

VARIANTES DE PROTEÍNA COM PERFIS DE AMINOÁCIDO REATIVOS ALTERADOS

[00392] Em algumas modalidades, uma proteína ou polipeptídeo variante pode incluir a adição de um ou mais resíduos de aminoácido reativo (por exemplo, cisteínas) a uma proteína (por exemplo, no amino ou carboxi terminal de qualquer uma das proteínas descritas no presente documento) pode facilitar a conjugação destas proteínas por, por exemplo, ligação de dissulfeto. Em algumas modalidades, um ou mais aminoácidos reativos (por exemplo, cisteínas) pode ser removido para remover o número de sítios de conjugação possíveis numa proteína. As substituições de aminoácido podem ser conservativas (isto é, em que um resíduo é substituído por outro do mesmo tipo ou grupo geral) ou não conservativas (isto é, em que um resíduo é substituído por um aminoácido de outro tipo). Além disto, um aminoácido de ocorrência natural pode ser substituído por um aminoácido de ocorrência não natural (isto é, substituição de aminoácido conservativo de ocorrência não natural ou uma substituição de aminoácido não conservativa de ocorrência não natural).

[00393] Como é conhecido na técnica, por exemplo, como descrito em Chin, J. W., Expanding and Reprogramming the Genetic Code of Cells and Animals, Annual Review of Biochemistry, Vol. 83: 379 a 408, aminoácidos não naturais podem ser incorporados em proteínas produzidas *in vitro*. Por exemplo, num sistema, códons âmbar UAG (terminação) foram usados para incorporar pirrolisina por meio de uma tRNA sintetase arqueal e tRNA e estes também podem ser usados para incorporar azidos e alcinas por meio de alimentação. Outras cadeias laterais em aminoácidos não naturais que foram demonstradas na técnica incluem ciclopopeno, trans-ciclo-octeno, biciclo[6.1.0]nonina-lisina, coumarinas, p-azidofenilalanina, N6-[(2-propinloxi)carbonil]-L-Lisina, biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilmetanol (BCN), N-5-norborneno-2-iloxicarbonil-L-lisina, N-terc-butiloxicarbonil-L-lisina, N-2-azidoetiloxicarbonil-L-lisina, N-L-tiaproli-L-lisina, N-D-cisteinil-L-lisina,

N-L-cisteinil-L-lisina, N6-[(2-propiniloxi)carbonil]-L-lisina, N6-[(2-azidoetoxi)carbonil]-L-lisina, benzofenona, 4-(6-metil-s-tetrazin-3-il)aminofenilalanina, e ciclo-octinas.

COMPLEXOS

[00394] Em interações de proteína-proteína de ocorrência natural, os eventos de ligação são tipicamente acionados em grande parte por resíduos hidrofóbicos em sítios de superfície planos das proteínas de interação, em contraste a muitas interações de molécula pequena-proteína que são acionadas por interações entre a molécula pequena numa cavidade ou bolso na proteína. Comumente, resíduos hidrofóbicos num sítio de superfície plana da proteína formam um ponto quente hidrofóbico em que a maior parte das interações de ligação entre ou dentro proteínas em interação são interação de van der Waalss. Em algumas situações, uma molécula pequena pode fornecer um "ponto quente portátil" (ou porção do mesmo) em que participa ou gera como um sítio de interação hidrofóbico numa proteína (por exemplo, uma proteína apresentadora) em que isto não existe na ausência da molécula pequena; aspectos da presente descrição são particularmente aplicáveis a estas situações. Por exemplo, em algumas modalidades, um composto (e/ou uma forma marcada do mesmo) conforme descrito no presente documento forma um complexo com uma proteína (por exemplo, um complexo de proteína apresentadora/composto) e participa nas interações de pseudo proteína-proteína (por exemplo, formando um complexo de tripartite com uma proteína-alvo).

[00395] Muitas proteínas de mamíferos têm capacidade para fornecer se ligar a qualquer um dentre uma pluralidade de diferentes parceiros; em alguns casos, estas interações de ligação alternativa contribuem para a atividade biológica das proteínas. Muitas destas proteínas adaptam a variabilidade inerente das regiões de proteína de ponto quente para apresentar os mesmos resíduos em diferentes contextos

estruturais. Mais especificamente, as interações de proteína-proteína podem ser mediadas por uma classe de produtos naturais produzidos por um grupo selecionado de espécies fúngicas e bacterianas. Estas moléculas exibem tanto uma organização estrutural comum quanto funcionalidade resultante que fornece a capacidade para modular interação de proteína-proteína. Estas moléculas podem conter a porção química de ligação de proteína apresentadora que é altamente conservada e uma porção química de interação de proteína-alvo que exibe um alto grau de variabilidade dentre os diferentes produtos naturais. A porção química de ligação de proteína apresentadora confere especificidade para a proteína apresentadora e permite que a molécula se ligue à proteína apresentadora para formar um complexo; a porção química de ligação de proteína-alvo de mamífero confere especificidade para a proteína-alvo e permite que o complexo binário se ligue à proteína-alvo, tipicamente modulando (por exemplo, modulando positivamente ou negativamente) sua atividade. Na presente invenção, um complexo binário (por exemplo, entre um composto e proteína apresentadora ou um composto e uma proteína-alvo) é simulado conjugando-se uma porção química de ligação de proteína apresentadora a uma proteína-alvo ou uma porção química de ligação de proteína-alvo à proteína apresentadora. Os conjugados resultantes da invenção podem, então, se ligar a uma proteína apresentadora ou proteína-alvo que forma um complexo que simula o complexo de tripartite. Estes complexos podem ser usados, por exemplo, para determinar a estrutura da interface entre a proteína apresentadora e a proteína-alvo. Além do mais, simplificando-se a formação do complexo, por exemplo, conjugando-se uma porção química de ligação de proteína apresentadora a uma proteína-alvo, os compostos da invenção podem ser usados, por exemplo, para identificar proteínas-alvo com capacidade para ligação a proteínas apresentadoras.

USOS

IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS-ALVO

[00396] Em algumas modalidades, os compostos, conjugados, complexos, composições e/ou métodos da presente invenção podem ser úteis para identificar proteínas-alvo com capacidade para formar complexos com proteínas apresentadoras (por exemplo, na presença de uma molécula pequena). As proteínas-alvo podem ser identificadas pela formação de conjugados que incluem uma porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada a uma porção química alvo e determinando se o conjugado forma um complexo com uma proteína apresentadora.

[00397] A maioria das proteínas-alvo conhecidas na técnica para formar complexos ternários com proteínas apresentadoras e moléculas pequenas foram identificadas fortuitamente durante a determinação do mecanismo de ação da molécula pequena. Os presentes métodos permitem a identificação racional de proteínas-alvo com capacidade para formar complexos com proteínas apresentadoras na presença de moléculas pequenas pela conjugação covalente de uma porção química de ligação de proteína apresentadora à molécula alvo, permitindo a formação de um complexo antes da identificação de um composto com capacidade para ligar tanto a proteína apresentadora quanto a proteína-alvo simultaneamente.

[00398] O teste de moléculas pequenas quanto à sua capacidade para facilitar a formação de complexo entre a proteína apresentadora e a proteína-alvo identificada poderia, então, ser executado para identificar terapêuticos potenciais com capacidade para modular a atividade biológica da proteína-alvo.

[00399] Em algumas modalidades, os compostos da invenção podem ser usados para identificar proteínas-alvo com capacidade para formar complexos com proteínas apresentadoras. Por exemplo, as

proteínas-alvo podem ser identificadas combinando-se uma ou mais proteínas-alvo com uma proteína apresentadora rotulada (por exemplo, rotulada com biotina) na presença de um composto da invenção sob condições adequadas para permitir a formação de um complexo de proteína apresentadora/proteína-alvo. As proteínas-alvo que não formam complexos com proteínas apresentadoras podem, então, ser removidas (por exemplo, lavadas) e as proteínas-alvo que formam complexos podem, então, ser submetidas a pulldown usando-se o rótulo na proteína apresentadora e analisadas. Em algumas modalidades, as proteínas-alvo submetidas a pulldown podem ser analisadas pela espectrometria de massa a fim de determinar sua identidade.

DESIGN DE COMPOSTO

[00400] Em algumas modalidades, os compostos, conjugados, complexos, composições e/ou métodos da presente invenção podem ser úteis para o design de compostos com capacidade para modular a atividade biológica de proteínas-alvo para uso no tratamento de doença.

[00401] Por exemplo, formação de complexos de proteínas apresentadoras e conjugados da invenção pode facilitar a determinação da estrutura da interface de proteína-proteína entre uma proteína apresentadora e uma proteína-alvo pela cristalização e determinação de estrutura de cristal do complexo. Uma vez que a estrutura de cristal de um complexo da invenção é determinada, métodos conhecidos na técnica para design de fármaco racional podem ser usados para desenvolver moléculas pequenas com capacidade para facilitar a formação de complexo entre a proteína apresentadora e a proteína-alvo como métodos de química computacional para construir estruturas de novo e/ou fármaco com base em fragmento usando-se métodos como enbebimento de fragmento dos cristais de complexos da invenção e determinar a estrutura resultante.

[00402] Os compostos projetados como descrito acima podem, então, ser testados para determinar sua capacidade de modular atividade biológica da proteína-alvo e modificada usando-se técnicas de química medicinal, conforme necessário, para produzir compostos terapeuticamente úteis.

IDENTIFICAÇÃO DE TERAPÊUTICOS DE MOLÉCULA PEQUENA COVALENTE

[00403] Em algumas modalidades, os compostos, conjugados, complexos, composições e/ou métodos da presente invenção podem ser úteis para identificar compostos com capacidade para modular a atividade biológica de proteínas-alvo através de interação covalente.

[00404] Por exemplo, os compostos das invenções podem ser testados por sua capacidade de se ligar de modo covalente a proteínas-alvo na presença e ausência de proteínas apresentadoras para identificar compostos com capacidade para se ligar de modo seletivo a proteínas-alvo apenas na presença de uma proteína apresentadora. Estes compostos podem, então, ser testados por sua capacidade para modular atividade biológica da proteína-alvo e modificada usando-se técnicas de química medicinal, conforme necessário, para produzir compostos terapeuticamente úteis.

DETERMINAÇÃO DE PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E/OU BIOFÍSICAS

[00405] Em algumas modalidades, os compostos, conjugados, complexos, composições e/ou métodos da invenção podem ser úteis para determinar propriedades bioquímicas e/ou biofísicas de uma proteína ou complexo.

[00406] Por exemplo, a energia livre de ligação entre um conjugado que inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora e uma proteína-alvo e uma proteína apresentadora pode ser determinada, por exemplo, por calorimetria de titulação isotérmica. O K_d de um

conjugado que inclui uma porção química de ligação de proteína apresentadora e uma proteína-alvo para uma proteína apresentadora pode ser determinada, por exemplo, por ressonância de plasmon de superfície. O K_i , K_{inact} , e/ou K_i/K_{inact} para um composto e uma proteína apresentadora para uma proteína-alvo podem ser determinados, por exemplo, por espectrometria de massa.

TRATAMENTO DE DOENÇAS OU DISTÚRBIOS

[00407] Os compostos, conjugados, e complexos descritos no presente documento podem ser úteis nos métodos para tratar doenças e distúrbios relacionados às proteínas-alvo descritas no presente documento, e, ao mesmo tempo em que não é limitado pela teoria, acredita-se que exercem seus efeitos desejáveis através de sua capacidade de modular (por exemplo, modular positivamente ou negativamente) a atividade de uma proteína-alvo (por exemplo, uma proteína-alvo euacriótica como uma proteína-alvo de mamífero ou uma proteína fúngica alvo ou uma proteína-alvo procariótica como uma proteína-alvo bacteriana), através da interação com proteínas apresentadoras e a proteína-alvo.

KITS

[00408] Em algumas modalidades, a presente invenção se refere a um kit para executar de modo conveniente e eficaz os métodos de acordo com a presente invenção. Em geral, o kit ou pacote farmacêutico compreende um ou mais recipiente preenchidos com um ou mais dos ingredientes das composições farmacêuticas da invenção. Estes kits são especificamente adequados para a entrega de formas orais sólidas como comprimidos ou cápsulas. Este kit de preferência inclui um número de dosagens unitárias, e também pode incluir um cartão que tem as dosagens orientadas na ordem de seu uso pretendido. Se desejado, por exemplo, se o indivíduo sofre da doença de Alzheimer, um auxílio de memória pode ser fornecido, por exemplo, na forma de

números, letras, ou outras marcações ou com uma inserção de calendário, designando os dias no cronograma de tratamento em que as dosagens podem ser administradas. Alternativamente, as dosagens de placebo, ou suplementos dietéticos de cálcio, numa forma similar ou distinta das dosagens das composições farmacêuticas, podem ser incluídas para fornecer um kit em que uma dosagem é tomada todo dia. Um aviso opcionalmente associado com este recipiente (ou recipientes) na forma prescrita por uma agência governamental que regula a fabricação, uso ou venda de produtos farmacêuticos, cujo aviso reflete a aprovação pela agência de fabricação, uso ou venda para administração humana.

COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

[00409] Para uso como tratamento de indivíduos humanos e animais, os compostos e conjugados da invenção podem ser formulados como composições farmacêuticas ou veterinárias. Dependendo do indivíduo a ser tratado, o modo de administração, e o tipo de tratamento desejado — por exemplo, prevenção, profilaxia, ou terapia — os compostos são formulados em formas consonantes com estes parâmetros. Um sumário destas técnicas é encontrado em *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21^ª Edição, Lippincott Williams & Wilkins, (2005); e *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, eds. J. Swarbrick e J. C. Boylan, 1988 a 1999, Marcel Dekker, New York, cada um dos quais é incorporado no presente documento a título de referência.

[00410] Os compostos descritos no presente documento podem estar presentes em quantidades que totalizam 1 a 95% em peso do peso total da composição. A composição pode ser fornecida numa forma de dosagem que é adequada para administração intra-articular, oral, parenteral (por exemplo, intravenosa, intramuscular), retal, cutânea, subcutânea, tópica, transdérmica, sublingual, nasal, vaginal, intravesicular, intrauretral, intratecal, epidural, aural ou ocular, ou por injeção, inala-

ção, ou contato direto com a mucosa nasal, genitourinária, reprodutiva ou oral. Portanto, a composição farmacêutica pode estar na forma de, por exemplo, comprimidos, cápsulas, pílulas, pós, granulados, suspensões, emulsões, soluções, géis que incluem hidrogéis, pastas, pomadas, cremes, emplastros, por sonda (drenches), dispositivos de entrega osmóticos, supositórios, enemas, injetáveis, implantes, aspersões, preparações adequadas para entrega inotoforética, ou aerosóis. As composições podem ser formuladas de acordo com a prática farmacêutica convencional.

[00411] Em geral, para uso no tratamento, os compostos descritos no presente documento podem ser usados sozinhos, ou em combinação com um ou mais outros agentes ativos. Um exemplo de outros farmacêuticos para combinar com os compostos descritos no presente documento incluiria farmacêuticos para o tratamento da mesma indicação. Outro exemplo de um farmacêutico potencial para combinar com compostos descritos no presente documento incluiria farmacêuticos para o tratamento de sintomas ou indicações diferentes, porém, porém associadas ou relacionadas. Dependendo do modo de administração, os compostos são formulados em composições adequadas para permitir a entrega fácil. Cada composto de uma terapia de combinação pode ser formulado numa variedade de formas que são conhecidas na técnica. Por exemplo, o primeiro e o segundo agentes da terapia de combinação podem ser formulados juntos ou separadamente. Desejavelmente, o primeiro e segundo agentes são formulados juntos para a administração simultânea ou quase simultânea dos agentes.

[00412] Os compostos da invenção podem ser preparados e usados como composições farmacêuticas compreendendo uma quantidade eficaz de um composto descrito no presente documento e um veículo ou excipiente farmaceuticamente aceitável, como é bem conhecido na técnica. Em algumas modalidades, uma composição inclui pelo

menos dois carreadores ou excipiente farmaceuticamente diferentes.

[00413] As formulações podem ser preparadas de modo adequado para administração sistêmica ou administração tópica ou local. As formulações sistêmicas incluem aquelas projetadas para injeção (por exemplo, injeção intramuscular, intravenosa ou subcutânea) ou podem ser preparadas para administração transdérmica, transmucosa ou oral. Uma formulação geralmente inclui diluentes, também, em alguns casos, adjuvantes, tampões, conservantes e similares. Os compostos podem ser administrados também em composições lipossômicas ou como microemulsões.

[00414] Para injeção, as formulações podem ser preparadas de formas convencionais como soluções líquidas ou como formas sólidas adequadas para solução ou suspensão em líquido antes da injeção ou como emulsões. Os excipientes adequados incluem, por exemplo, água, solução salina, dextrose, glicerol e similares. Estas composições também podem conter quantidades de substâncias auxiliares não tóxicas como agentes umectantes ou emulsificantes, agentes de tampão-nagem de pH e similares, como, por exemplo, acetato de sódio, monolaurato de sorbitano e assim por diante.

[00415] Vários sistemas de liberação prolongados para fármacos também foram projetados. Consulte, por exemplo, Patente US nº 5.624.677, que é incorporada no presente documento a título de referência.

[00416] A administração sistêmica também pode incluir métodos relativamente não invasivos como o uso de supositórios, adesivos transdérmicos, entrega transmucosal e administração intranasal. A administração oral também é adequada para os compostos da invenção. As formas adequadas incluem xaropes, cápsulas e comprimidos, como é compreendido na técnica.

[00417] Cada composto de uma terapia de combinação, conforme

descrito no presente documento, pode ser formulado de várias formas que são conhecidas na técnica. Por exemplo, o primeiro e o segundo agentes da terapia de combinação podem ser formulados juntos ou separadamente.

[00418] Os agentes individual ou separadamente formulados podem ser embalados juntos como um kit. Os exemplos não limitadores incluem, sem limitação, kits que contêm, por exemplo, duas pílulas, uma pílula e um pó, um supositório e um líquido num frasco, dois creme-s tópicos, etc. o kit pode incluir componentes opcionais que auxiliam na administração da dose unitária a indivíduos, como amplas para reconstituir formas de pó, seringas para injeção, sistemas de entrega personalizados, inaladores, etc. Adicionalmente, o kit de dose unitária pode conter instruções para preparação e administração das composições. O kit pode ser fabricado como uma dose unitária de único uso para um indivíduo, múltiplos usos para um indivíduo particular (em uma dose constante ou em que os compostos individuais podem variar em potência conforme a terapia progride); ou o kit pode conter múltiplas doses adequadas para administração a múltiplos indivíduos ("embalagem a granel"). Os componentes de kit podem ser reunidos em caixas de cartão, pacotes de bolha, garrafas, tubos e similares.

[00419] As formulações para uso oral incluem comprimidos que contêm o ingrediente (ou ingredientes) ativo numa mistura com excipientes farmaceuticamente aceitáveis não tóxicos. Estes excipientes podem ser, por exemplo, cargas e diluentes inertes (por exemplo, sacarose, sorbitol, sugar, manitol, celulose microcristalina, amidos incluindo amido de batata, carbonato de cálcio, cloreto de sódio, lactose, fosfato de cálcio, sulfato de cálcio, ou fosfato de sódio); agentes granulantes e desintegrantes (por exemplo, derivados de celulose incluindo celulose microcristalina, amidos incluindo amido de batata, croscarmelose sódio, alginatos, ou ácido algínico); agentes de ligação (por exemplo, sa-

carose, glicose, sorbitol, acácia, ácido algínico, alginato de sódio, gelatina, amido, amido pré-gelatinizado, celulose microcristalina, silicato de magnésio alumínio, carboximetilcelulose sódio, metilcelulose, hidroxipropil metilcelulose, etilcelulose, polivinilpirrolidona, ou polietileno glicol); e agentes lubrificantes, deslizantes, e antiadesivos (por exemplo, estearato de magnésio, estearato de zinco, ácido esteárico, sílicas, óleos vegetais hidrogenados, ou talco). Outros excipientes farmaceuticamente aceitáveis podem ser colorantes, agentes flavorizantes, plástificantes, umectantes, agentes de tamponagem e similares.

[00420] Dois ou mais compostos podem ser misturados juntos num comprimido, cápsula ou outro veículo ou pode ser particionado. Em um exemplo, o primeiro composto é contido no interior do comprimido, e o segundo composto está no exterior, de modo que uma porção substancial do segundo composto seja liberada antes da liberação do primeiro composto.

[00421] As formulações para uso oral também podem ser fornecidas como comprimidos mastigáveis, ou como cápsulas de gelatina rígidas em que o ingrediente ativo é misturado com um diluente sólido inerte (por exemplo, amido de batata, lactose, celulose microcristalina, carbonato de cálcio, fosfato de cálcio ou caolina), ou como cápsulas de gelatina molas em que o ingrediente ativo é misturado com água ou um meio de óleo, por exemplo, óleo de amendoim, parafina líquida, ou azeite. Os pós, granulatos, e péletes podem ser preparados usando-se os ingredientes mencionados acima sob comprimidos e cápsulas de modo convencional usando-se, por exemplo, um misturador, um aparelho de leito fluido ou um equipamento de secagem por aspersão.

[00422] A dissolução ou liberação de difusão controlada pode ser alcançada por revestimento adequado de um comprimido, cápsula, pélete, ou formulação de granulado de compostos, ou incorporando-se o composto numa matriz adequada. Um revestimento de liberação

controlada pode incluir uma ou mais das substâncias de revestimento mencionadas acima e/ou, por exemplo, goma-laca, cera de abelha, glicocera, cera de rícino, cera de carnaúba, álcool estearílico, monoestearato de glicerila, distearato de glicerila, palmitostearato de glicerol, etilcelulose, resinas acrílicas, ácido dl-poliláctico, acetato butirato de celulose, cloreto de polivinila, acetato de polivinila, vinil pirrolidona, polietileno, polimetacrilato, metilmacrilato, 2-hidroximetacrilato, metacrilato hidrogéis, 1,3 butileno glicol, metacrilato de etileno glicol metacrilato, e/ou polietileno glicóis. Em uma formulação de matriz de liberação controlada, o material de matriz também pode incluir, por exemplo, metilcelulose hidratada, cera de carnaúba e álcool estearílico, carbopol 934, silicone, tristearato de glicerila, acrilato de metil-metacrilato de metil, cloreto de polivinila, polietileno e/ou fluorocarboneto halogenado.

[00423] As formas líquidas em que os compostos e composições da presente invenção podem ser incorporados para administração oralmente incluem soluções aquosas, xaropes adequados flavorizadas, suspensões aquosas ou de óleo, e emulsões flavorizadas com óleos comestíveis como óleo de semente de algodão, óleo de gergelim, óleo de coco, ou óleo de amendoim, bem como elixires e veículos farmacêuticos similares.

[00424] Em geral, quando administrados a um humano, a dosagem oral de qualquer um dos compostos da combinação da invenção depende da natureza do composto, e pode ser prontamente determinado por um indivíduo versado na técnica. Tipicamente, esta dosagem é normalmente cerca de 0,001 mg a 2000 mg por dia, desejavelmente cerca de 1 mg a 1000 mg por dia, e mais desejavelmente cerca de 5 mg a 500 mg por dia. As dosagens até 200 mg por dia podem ser necessárias.

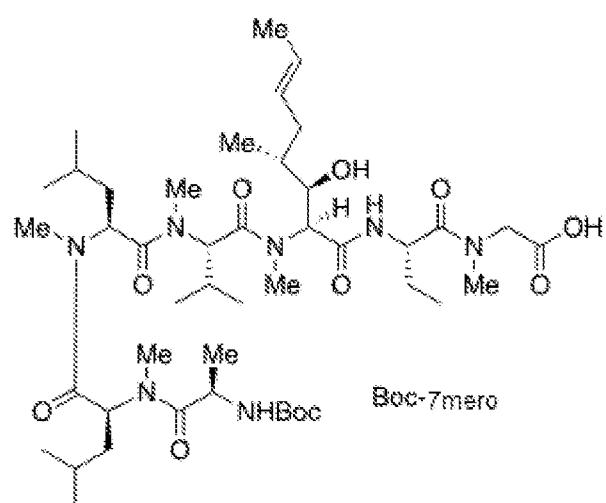
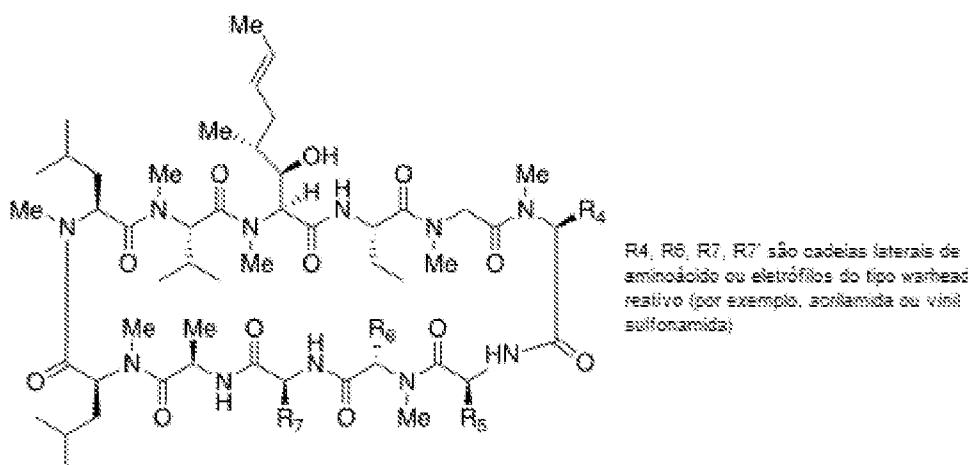
[00425] A administração de cada fármaco numa terapia de combinação, conforme descrito no presente documento, pode, independen-

temente, ser uma a quatro vezes por dia por um dia a um ano, e pode até mesmo ser pela vida do indivíduo. A administração de longo prazo crônica pode ser indicada.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1: SÍNTESE DE DETERMINADOS REAGENTES DE RETICULAÇÃO

SÍNTESE DE ANÁLOGOS DE CICLOSPORINA QUE CONTÊM ACRLAMIDA



[00426] Todos os reagentes e solventes foram adquiridos junto à Sinopharm Chemical Reagent Co. Ltd. aminoácidos Fmoc, HATU, HOAT, resina H-Ala-2-Cl-(Trt) (0,36 mmol/g), resina H-Leu-2-Cl-(Trt) (0,30 mmol/g), resina H-Phe-2-Cl-(Trt) (0,35 mmol/g) e resina H-Thr(tBu)-2-Cl-(Trt) (0,36 mmol/g) foram adquiridos junto à GL Biochem

(Shanghai) Ltd.

[00427] O acoplamento de peptídeos lineares foi executado usando-se procedimento de SPSS em Fmoc padrão em sintetizador automatizado.

[00428] **Método Geral A:** Os peptídeos lineares foram sintetizados usando-se um sintetizador TETRAS™ com uma escala de 0,025 mmol de resina. Um protocolo geral é conforme a seguir: solução de 2 x NMP, 30 s; 1 x 20% de (vol/vol) piperidina em NMP, 15 min; 5 x NMP, 30 s; aminoácidos (3 eq) em NMP foi adicionada no vaso que contém resina seguido pela adição de uma solução de HATU e DIEA em DMF respectivamente, acoplamento por 45 min; 3 x NMP, 30 s. Uma estratégia de acoplamento duplo foi acoplada para todos os aminoácidos.

[00429] **Método Geral B:** fixação de Boc-7mer

[00430] O acoplamento foi realizado no sintetizador TETRAS™ usando-se o mesmo protocolo geral que para acoplamento de aminoácido exceto que a quantidade de Boc-7mer é 1,5 equivalente. Apenas um acoplamento foi necessário.

[00431] **Método Geral C:** Remoção de grupo protetor ivDde.

[00432] A remoção de grupo protetor ivDde na cadeia lateral de Dap foi realizada no sintetizador TETRAS™. Protocolo Geral: Uma solução de 20% (vol/vol) de monoidrato de hidrazina em NMP foi adicionada no vaso que contém a resina. O vaso foi sacudido por 30 min. A resina foi drenada e enxaguada com 5 x 5 ml (30 s) de NMP.

[00433] **Método Geral D:** fixação de ácido acrílico no grupo amino de cadeia lateral de Dap.

[00434] O acoplamento foi realizado no sintetizador TETRAS™ usando-se o mesmo protocolo geral que o acoplamento de aminoácido. Uma estratégia de acoplamento duplo foi aplicada.

[00435] **Método Geral E:** Desproteção de grupos protetores de cadeia lateral e clivagem final da resina.

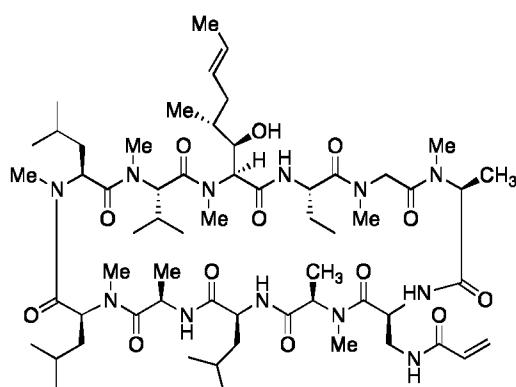
[00436] A desproteção e clivagem da resina foi realizada por coquetéis de TFA por 1 a 2 horas à temperatura ambiente. Os coquetéis de clivagem (TFA/TIPS/H₂O, 95/2,5/2,5) ou (TFA/DCM/TIPS, 40:60:1) podem ser usados para a clivagem final. Mais solvente foi removido sob pressão reduzida e o resíduo foi concentrado sob vácuo para remover o solvente traço. O resíduo resultante foi usado na próxima ciclização diretamente sem purificação adicional.

[00437] **Método Geral F:** Ciclização de peptídeos lineares

[00438] O peptídeo linear bruto foi dissolvido em DCM seco para gerar a concentração final de 0,1 M. Então HATU (3eq), HOAt (3eq) e DIEA (6eq) foram adicionados. A mistura de reação foi agitada de um dia para o outro e, então, monitorado por ESI-LCMS. O solvente foi concentrado sob pressão reduzida e o resíduo foi dissolvido em NMP e purificado por HPLC preparativo. Ciclo-peptídeos foram identificados por ESI-LCMS.

[00439] **HPLC de Fase Inversa.** A coluna Accucore C18 (2,6 µm, 2,1 mm x 50 mm) com uma taxa de fluxo de 1 ml/min foi usada para RP-HPLC analítica. A coluna Xselect Peptide CSH (5 µm, 19 mm x 150 mm) foi usada para RP-HPLC preparativo. Fase móvel A: água (ácido fórmico a 0,1%), Fase móvel B: ACN; Taxa de fluxo: 20 ml/min; Gradiente: 25% B a 95% B em 16 min.

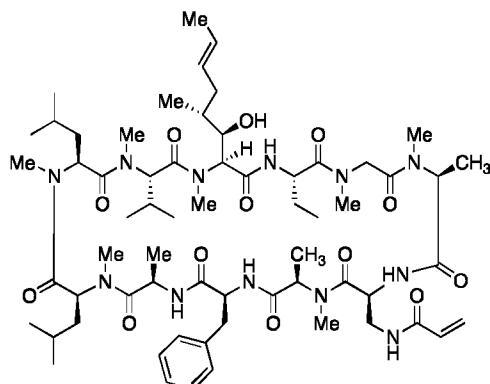
Síntese de ciclo[7mer-NMALA-Dap-d-nmala-LEU]:



[00440] O conjunto de cadeia de peptídeo linear foi realizado usando-se os métodos gerais descritos acima com 850 mg de resina H-

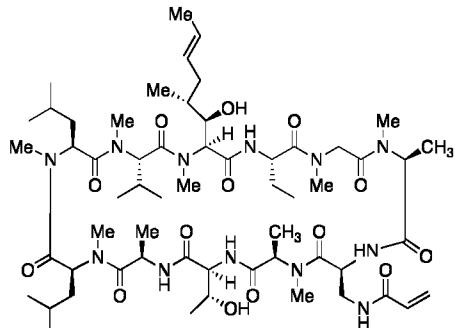
Leu-2-Cl-(Trt) (0,3 mmol/g, escala de 0,025 mmol). D-N-metil Ala, Dap e resíduo de L-N-metil Ala foram fixados usando-se método geral A. Então Boc-7mer foi reunido com método geral B. A remoção de grupo protetor ivDde de cadeia lateral foi realizado usando-se o método geral C. Então ácido acrílico foi fixado no grupo amino livre na cadeia lateral de Dap com método geral D. Após a desproteção global e clivagem da resina numa etapa (método geral E), o peptídeo linear bruto foi submetido à ciclização (método geral F). Após o HPLC preparativo final, 17 mg de composto final foi obtido como um sólido branco (56,6% calculado por carregamento de resina). ESI-MS: $[M+1]^+=1202$, $[M+Na]^+=1224$, $[M/2 + 1]^+=602$.

Síntese de ciclo[7mer-NMALA-Dap-d-nmala-PHE]:



[00441] 2,8 mg de composto final foi obtido como um sólido branco (9,1% calculado por carregamento de resina) com o método de similar como a síntese de ciclo[7mer-NMALA-Dap-d-nmala-LEU]. ESI-MS: $[M+1]^+=1236$, $[M+Na]^+=1258$, $[M/2 + 1]^+=619$.

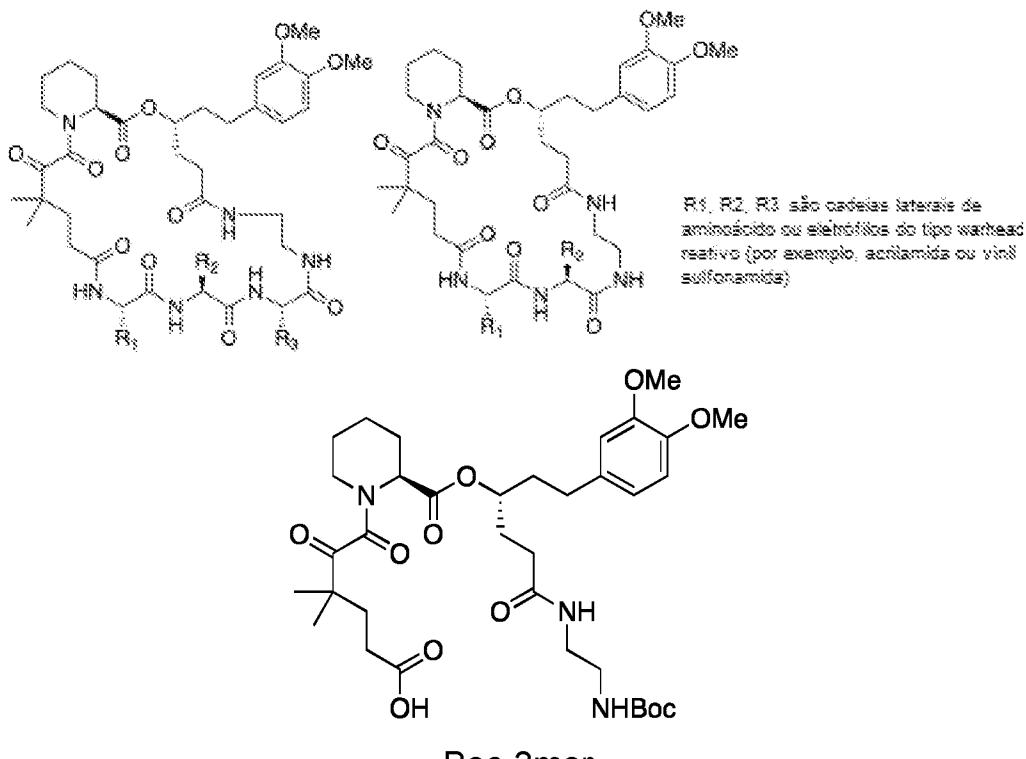
Síntese de ciclo[7mer-NMALA-Dap-d-nmala-THR]:



[00442] 3,4 mg de composto final foi obtido como um sólido branco

(11,4% calculado por carregamento de resina) com o método similar como a síntese de ciclo[7mer-NMALA-Dap-d-nmala-LEU]. ESI-MS: $[M+1]^+=1190$, $[M+Na]^+=1212$, $[M/2 + 1]^+=596$.

Síntese de ligantes de FKBP12 que contêm acrilamida



[00443] Todos os reagentes e solventes foram adquiridos junto à Sinopharm Chemical Reagent Co. Ltd. Fmoc-aminoácidos, HATU, HOAT, resina 2-Cl-(Trt)-Cl (0,9 mmol/g com base em sítio ativo) e resina 2-Cl-(Trt)-Cl carregada com Ala (0,36 mmol/g) foram adquiridas junto à GL Biochem (Shanghai) Ltd.

[00444] Para fixar o primeiro aminoácido na resina 2-Cl-(Trt)-Cl.

[00445] Em um vaso para SPSS, 5 g de resina foram expandidos em 50 ml de NMP seco por 40 minutos. Drenar a resina e enxaguar a mesma com DCM (5 x 30 ml) então com NMM 2%/DCM (3 x 30 ml). Uma solução de Fmoc-Dap(ivDde)-OH (3,0 mmol, 1,6g) com NMM (4 mmol, 400 mg) em 50 ml de DCM foi adicionada. O vaso foi sacudido de um dia para o outro. Então 2 ml de uma solução de NMM a 25%/MeOH foi adicionado e o vaso foi sacudido por mais uma hora. A

resina foi drenada e enxaguada com DCM, NMP, MeOH e EtOH (3 x 50 ml cada). A resina foi submetida à secagem sob vácuo à temperatura ambiente.

[00446] O carregamento foi medido pela medição fotométrica de clivagem de Fmoc (0,32 mmol/g).

[00447] O acoplamento de peptídeos lineares foi executado usando-se procedimento de SPSS de Fmoc padrão num sintetizador automatizado.

[00448] **Método Geral A:** Os peptídeos lineares foram sintetizados usando-se um sintetizador TETRAS™ com uma escala de 0,025 mmol de resina. Um protocolo geral conforme a seguir: solução de 2 x NMP, 30 s; 1 x 20% de (vol/vol) piperidina em NMP, 15 min; 5 x NMP, 30 s; aminoácidos (3 eq) em NMP foi adicionada no vaso que contém resina seguido pela adição de uma solução de HATU e DIEA em DMF respectivamente, acoplamento por 45 min; 3 x NMP, 30 s. Uma estratégia de acoplamento duplo foi acoplada para todos os aminoácidos.

[00449] **Método Geral B:** fixação de Boc-3mer

[00450] O acoplamento foi realizado no sintetizador TETRAS™ usando-se o mesmo protocolo geral que para acoplamento de aminoácidos exceto que a quantidade de Boc-3mer é 1,5 equivalente. A acoplamento foi necessário apenas uma vez.

[00451] **Método Geral C:** Remoção de grupo protetor ivDde.

[00452] A remoção de grupo protetor ivDde na cadeia lateral de Dap foi realizada no sintetizador TETRAS™. Protocolo Geral: Uma solução de 20% (vol/vol) de monoidrato de hidrazina em NMP foi adicionada no vaso que contém a resina. O vaso foi sacudido por 30 min. A resina foi drenada e enxaguada com 5 x 5 ml (30 s) de NMP.

[00453] **Método Geral D:** fixação de ácido acrílico no grupo amino de cadeia lateral de Dap.

[00454] O acoplamento foi realizado no sintetizador TETRAS™

usando-se o mesmo protocolo geral que para acoplamento de aminoácidos. Uma estratégia de acoplamento duplo foi aplicada.

[00455] **Método Geral E:** Desproteção de grupos protetores de cadeia lateral e clivagem final da resina.

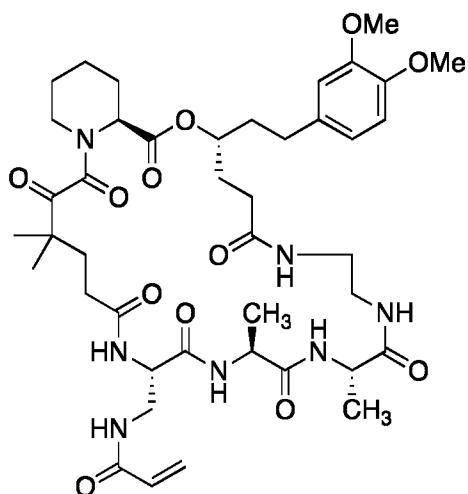
[00456] A desproteção e clivagem da resina foi realizada por coquetéis de TFA por 1 a 2 horas à temperatura ambiente. Os coquetéis de clivagem (TFA/TIPS/H₂O, 95/2,5/2,5) ou (TFA/DCM/TIPS, 40:60:1) podem ser usados para a clivagem final. Mais solvente foi removido sob pressão reduzida e o resíduo foi concentrado sob vácuo para remover o solvente traço. O resíduo resultante foi usado na próxima ciclização diretamente sem purificação adicional.

[00457] **Método geral F:** ciclização de peptídeos lineares

[00458] O peptídeo linear bruto foi dissolvido em DCM seco para gerar a concentração final de 0,1 M. Então HATU (3eq), HOAt (3eq) e DIEA (6eq) foram adicionados. A mistura de reação foi agitada de um dia para o outro e, então, monitorado por ESI-LCMS. O solvente foi concentrado sob pressão reduzida e o resíduo foi dissolvido em NMP e purificado por HPLC preparativo. Ciclo-peptídeos foram identificados por ESI-LCMS.

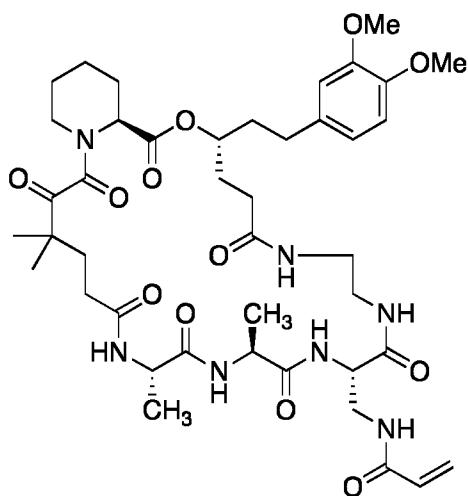
[00459] **HPLC de Fase Inversa.** A coluna Accucore C18 (2,6 µm, 2,1 mm x 50 mm) com uma taxa de fluxo de 1 ml/min foi usada para RP-HPLC analítica. A coluna Xselect Peptide CSH (5 um, 19 mm x 150 mm) foi usada para RP-HPLC preparativo. Fase móvel A: água (ácido fórmico a 0,1%), Fase móvel B: ACN; Taxa de fluxo: 20 ml/min; Gradiente: 25% B a 95% B em 16 min.

Síntese de ciclo[diamina-Dap-ALA-ALA]:



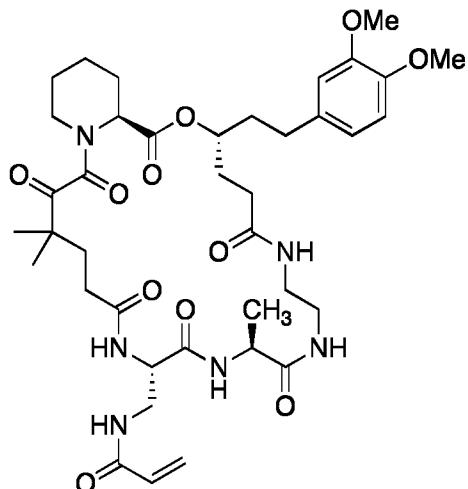
[00460] O conjunto de cadeia de peptídeo linear foi realizado usando-se os métodos gerais acima com 700 mg de resina H-Ala-2-Cl-(Trt) (0,025 mmol em escala). Ala e resíduo de Dap foi fixado usando-se o método geral A. Então Boc-3mer foi reunido com método geral B. A remoção do grupo protetor ivDde de cadeia lateral foi realizada usando-se o método geral C. Então o ácido acrílico foi fixado no grupo amino livre na cadeia lateral de Dap com método geral D. Após a desproteção global e clivagem da resina numa etapa (método geral E), o peptídeo linear bruto foi submetido à ciclização (método geral F). Após o HPLC preparativo final, 3,1 mg de composto final foi obtido como um sólido branco (14,5% calculado por carregamento de resina). ESI-MS: $[M+1]^+=857$, $[M+Na]^+=879$.

Síntese de ciclo[diamina-ALA-ALA-Dap]



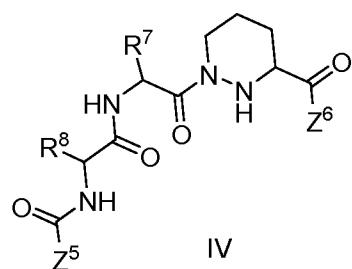
[00461] 2,2 mg de composto final foram obtidos como um sólido branco (10,3% calculado pelo carregamento de resina) com o método similar à síntese de ciclo[diamina-Dap-ALA-ALA]. ESI-MS: $[M+1]^+=857$, $[M+Na]^+=879$.

Síntese de ciclo[diamina-Dap-ALA]:



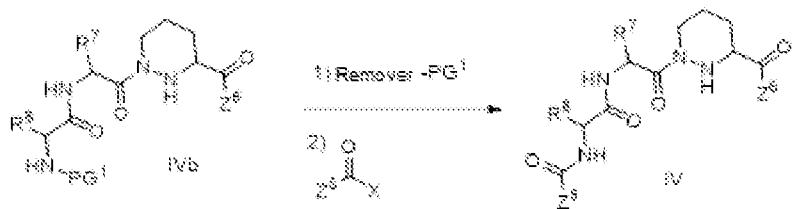
[00462] 2,7 mg de composto final foram obtidos como um sólido branco (12,6% calculado pelo carregamento de resina) com o método similar à síntese de ciclo[diamina-Dap-ALA-ALA]. ESI-MS: $[M+1]^+=786$.

Síntese de análogos de sanglefehrin:



[00463] Método A pode ser usado para preparar os compostos da Fórmula IV como mostrado abaixo no Esquema 1.

ESQUEMA 1



em que R^7 , R^8 , Z^5 , e Z^6 são conforme definido anteriormente, PG^1 é um

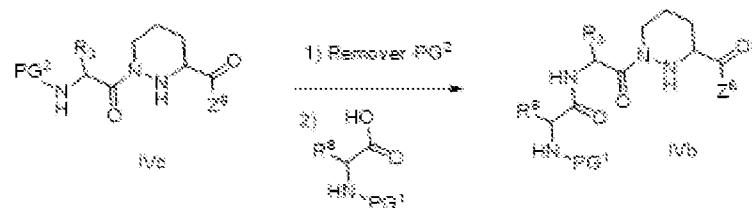
grupo protetor de amina adequado que inclui, sem limitação, Boc, Cbz, Alloc, e Fmoc, e X é OH, Cl, F, ou algum outro grupo adequado para deslocamento ou ativação seguida por deslocamento.

[00464] Em um procedimento típico, amina protegida IV é reagida com um reagente adequado familiar àqueles indivíduos versados na técnica para remover o grupo protetor PG¹. O produto bruto isolado pode ser reagido com agente acilante Z⁵C(O)X na presença de agentes de acoplamento padrão (por exemplo, EDC/HOBt, DCC, PyBOP, PyBROP, HATU, HBTU, COMU) conhecidos por aqueles indivíduos versados na técnica. Os parceiros de acoplamento de ácido e amina são combinados com o agente de acoplamento num solvente orgânico (incluindo, sem limitação DMF, diclorometano, acetonitrila e tetra-hidrofuran) na presença de uma base (incluindo, sem limitação DIPEA, trietilamina, e NMM) à temperatura ambiente ou temperatura ligeiramente elevada.

[00465] Alternativamente, a amina desprotegida pode ser diretamente reagida com o reagente acilante Z⁵C(O)X quando X for um halogênio num solvente adequado (incluindo, sem limitação DMF, diclorometano, DME, acetonitrila, e tetra-hidrofuran) na presença of base (incluindo, sem limitação piridina, DIPEA, trietilamina e NMM) na faixa de temperatura de -78 °C a cerca de 120 °C, de preferência entre -20 °C e 50 °C.

[00466] Os compostos da Fórmula IVb do Esquema 1 podem ser preparados conforme mostrado abaixo no Esquema 2.

ESQUEMA 2



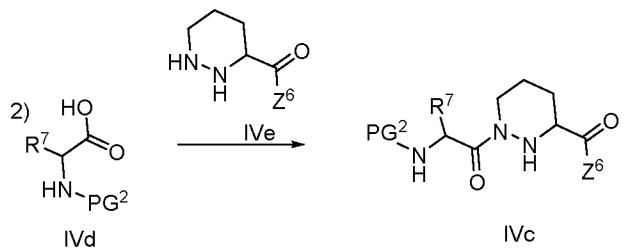
em que R⁷, R⁸, e Z⁶ são conforme definido anteriormente e PG¹ e PG²

são, cada um, independentemente, grupos protetores de amina incluindo, sem limitação Boc, Cbz, Alloc e Fmoc.

[00467] Em um procedimento típico, amina protegida IVc é reagida com o reagente adequado familiar àqueles indivíduos versados na técnica para remover o grupo protetor PG² para produzir a amina correspondente, que é, então, reagida com o aminoácido adequado na presença de agentes de acoplamento padrão (por exemplo, EDC/HOBt, DCC, PyBOP, PyBROP, HATU, HBTU, COMU) conhecidos por aqueles indivíduos versados na técnica. Os parceiros de acoplamento de ácido e amina são combinados com o agente de acoplamento num solvente orgânico (incluindo, sem limitação DMF, diclorometano, acetonitrila e tetra-hidrofurano) na presença de uma base (incluindo, sem limitação DIPEA, trietilamina e NMM) à temperatura ambiente ou temperatura ligeiramente elevada para entregar os compostos da Fórmula IVb.

[00468] Os compostos da Fórmula IVc do Esquema 2 podem ser preparados como mostrado abaixo no Esquema 3.

ESQUEMA 3



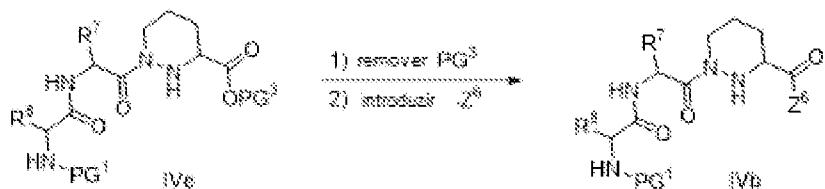
em que R⁷ e Z⁶ são conforme definido anteriormente e PG² é um grupo protetor de amina adequado incluindo, sem limitação Boc, Cbz, Alloc, e Fmoc.

[00469] Em um procedimento típico, a amina protegida IVd é reagida com o derivado de ácido piperázico IVe na presença de agentes de acoplamento padrão (por exemplo, EDC/HOBt, DCC, PyBOP, PyBROP, HATU, HBTU, COMU) conhecidos por aqueles indivíduos versados na técnica. Os parceiros de acoplamento de ácido e amina

são combinados com o agente de acoplamento num solvente orgânico (incluindo, sem limitação DMF, diclorometano, acetonitrila e tetra-hidrofurano) na presença de uma base (incluindo, sem limitação DI-PEA, trietilamina, e NMM) à temperatura ambiente ou temperatura ligeiramente elevada.

[00470] Alternativamente, os compostos da Fórmula IVb podem ser sintetizados a partir de compostos da fórmula II-B conforme descrito no Esquema 4.

ESQUEMA 4



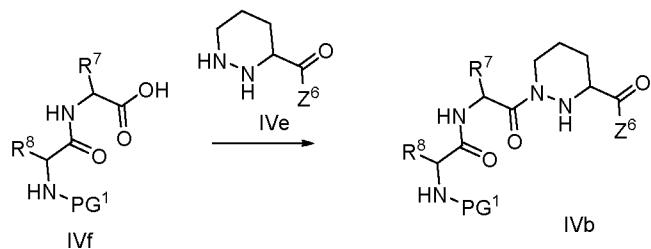
em que R⁷, R⁸, e Z⁶ são conforme definido anteriormente, PG¹ é um grupo protetor de amina adequado incluindo, sem limitação Boc, Cbz, Alloc, e Fmoc, e PG³ é um grupo alquila ou arila incluído, mas não limitado a, metila, etila, benzila, allila, fenila, e similares que podem ser removidos por métodos conhecidos por aqueles indivíduos versados na técnica.

[00471] Em um procedimento típico, o composto IVe é reagido à temperatura ambiente sob condições de hidrólise usando-se base (por exemplo, hidróxido de lítio, hidróxido de sódio, carbonato de sódio) num sistema de solvente compreendido de orgânico (por exemplo, metanol, THF, dioxano) com ou sem água. Será entendido por aqueles indivíduos versados na técnica que, dependendo da identidade de PG³, remoção de PG³ também pode ocorrer sob hidrogenólise usando-se um catalisador adequado, ou sob condições de desalilação usando-se um catalisador de paládio, por exemplo Pd(PPh₃)₄ e um depurador básico (por exemplo, piperidina, morfolina, piperidina). Após a desproteção para gerar o ácido carboxílico resultante, Z⁶ pode ser introduzido

na presença de agentes de acoplamento padrão (por exemplo, EDC/HOBt, DCC, PyBOP, PyBROP, HATU, HBTU, COMU) conhecidos àqueles indivíduos versados na técnica. O ácido carboxílico e os parceiros de acoplamento são combinados com o agente de acoplamento num solvente orgânico (incluindo, sem limitação DMF, diclorometano, acetonitrila e tetra-hidrofuran) na presença de uma base (incluindo, sem limitação DIPEA, trietilamina e NMM) à temperatura ambiente ou temperatura ligeiramente elevada para gerar o produto IVb.

[00472] Alternativamente, os compostos da Fórmula IVb podem ser sintetizados como mostrado abaixo no Esquema 5.

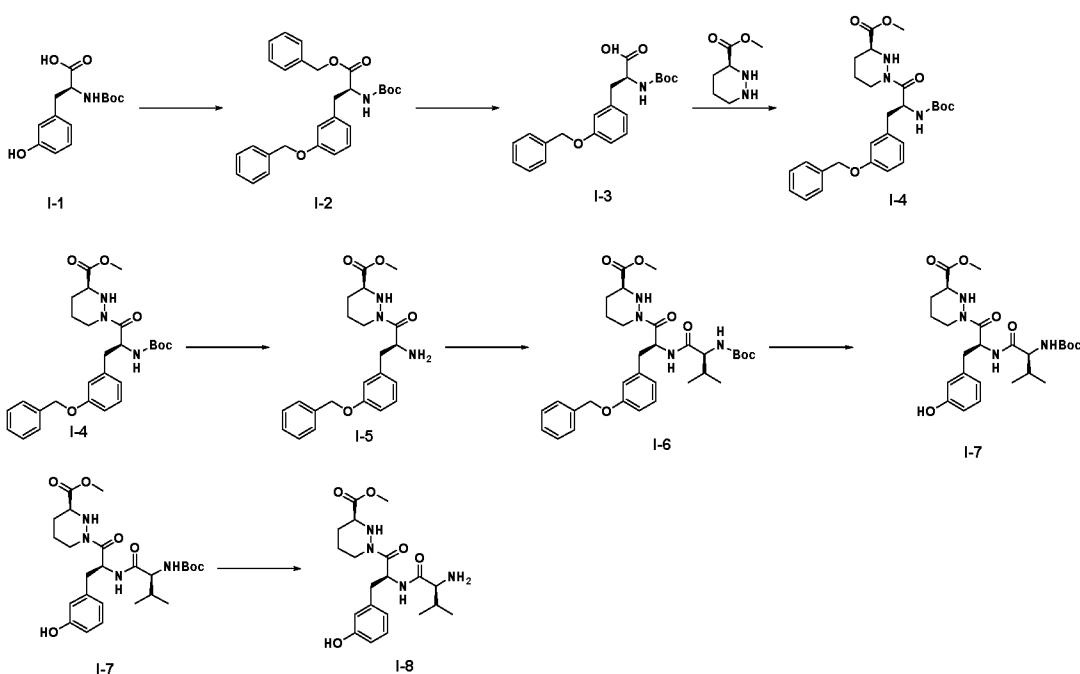
ESQUEMA 5



em que R⁷, R⁸, e Z⁶ são conforme definido anteriormente e PG¹ é um grupo protetor de amina adequado incluindo, sem limitação Boc, Cbz, Alloc, e Fmoc.

[00473] Em um procedimento típico, a amina protegida VI é reagida com reagente V na presença de agentes de acoplamento padrão (por exemplo, EDC/HOBt, DCC, PyBOP, PyBROP, HATU, HBTU, COMU) conhecidos por aqueles indivíduos versados na técnica. Os parceiros de acoplamento de ácido e amina são combinados com o agente de acoplamento num solvente orgânico (incluindo, sem limitação DMF, diclorometano, acetonitrila, e tetra-hidrofuran) na presença de uma base (incluindo, sem limitação DIPEA, trietilamina, NMM) à temperatura ambiente ou temperatura ligeiramente elevada.

Síntese de Intermediário I-8



[00474] A uma solução de temperatura ambiente de **Intermediário I-1** (2,00 g, 7,11 mmol) em DMF (13 ml) adicionou-se carbonato de célio (4,75 g, 14,58 mmol) e brometo de benzila (2,49 g, 14,58 mmol, 1,73 ml) a 25°C. A mistura de reação foi agitada por duas horas e, então, diluída com acetato de etila (100 ml) e lavada com salmoura (50 ml x 3). A camada orgânica foi submetida à secagem sobre sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida para gerar um resíduo bruto. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna com sílica-gel (eluente: éter de petróleo/acetato de etila → 20:1 a 10:1) para proporcionar **Intermediário I-2** (3,20 g, 96% de rendimento) como óleo incolor. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,45 - 7,30 (m, 10 H), 7,20 - 7,10 (m, 1 H), 6,95 - 6,85 (m, 1 H), 6,74 (s, 1 H), 6,70 - 6,60 (m, 1 H), 5,20 - 5,10 (m, 2 H), 4,99 (s, 2 H), 4,70 - 4,60 (m, 1 H), 3,15 - 3,05 (m, 2 H), 1,43 (s, 9 H). ESI-MS $m/z = 484,1$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$; MW Calculado: 461,55.

[00475] A uma solução de **Intermediário I-2** (3,20 g, 6,93 mmol) em tetra-hidrofurano (15 ml) adicionou-se hidróxido de lítio (1 M em água, 10 ml) a 0°C. A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente por 1 hora. A mistura de reação foi ajustada para $\text{pH} \sim 6$ com HCl (1 M

em água) a 0°C e extraída com acetato de etila (100 ml x 3). A camada orgânica combinada foi lavada com salmoura (20 ml), submetida à secagem sobre sulfato de sódio, filtrada e concentrada sob pressão reduzida para gerar um resíduo bruto. O produto bruto foi dissolvido em bicarbonato de sódio aquoso (7 ml) e extraído com MTBE (100 ml x 3). A camada aquosa foi ajustada para pH~6 com ácido clorídrico (1 M em H₂O) e extraída com acetato de etila (50 ml x 3). As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura (50 ml), submetidas à secagem sobre sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas sob pressão reduzida para proporcionar **Intermediário I-3** (2,27 g, 88% de rendimento) como um óleo incolor. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,45 - 7,30 (m, 5 H), 7,25 - 7,18 (m, 1 H), 6,90 - 6,85 (m, 1 H), 6,83 - 6,75 (m, 2 H), 5,05 (s, 2 H), 4,94 (d, J=8,00 Hz, 1H), 4,60 - 4,50 (m, 1 H), 3,20 - 3,12 (m, 1 H), 3,10 - 3,00 (m, 1 H), 1,43 (s, 9 H). ESI-MS m/z = 394,3 [M+Na]⁺; MW Calculado: 371,43

[00476] A uma solução de **Intermediário I-3** (888 mg, 2,39 mmol) em diclorometano (15 ml) adicionou-se *N*-metil morfolina (967 mg, 9,56 mmol), HOBr (65 mg, 478 umol), hexa-hidropiridazina-3-carboxilato de (S)-metila como o sal de TFA (890 mg, 2,39 mmol), e EDCI (917 mg, 4,78 mmol) a 0°C. A mistura de reação foi agitada a 0°C por 1 hora. A mistura de reação foi diluída com diclorometano (50 ml) e ajustada para o pH~6 com ácido cítrico aquoso a 5%. A camada aquosa foi extraída com diclorometano (20 ml x 2). As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura (50 ml), submetidas à secagem sobre sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas sob pressão reduzida para gerar um produto bruto. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna com sílica-gel (eluente: éter de petróleo/acetato de etila→ 10:1, 5:1 a 3:1) para proporcionar **Intermediário I-4** (910 mg, 77% de rendimento) como óleo incolor. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,50 - 7,35 (m, 5 H), 7,20 - 7,13 (m, 1 H), 6,90 - 6,80 (m, 3 H), 5,60 -

5,50 (m, 1 H), 5,30 - 5,20 (m, 1 H), 5,05 - 5,00 (m, 2 H), 4,40 - 4,30 (m, 1 H), 3,65 (s, 3 H), 3,55 (d, $J=11,20$ Hz, 1H), 3,00 - 2,93 (m, 1 H), 2,90 - 2,80 (m, 1 H), 2,75 - 2,65 (m, 1 H), 2,35 - 2,25 (m, 1 H), 1,80 - 1,72 (m, 2 H), 1,42 (s, 9 H). ESI-MS m/z = 520,1 [M+Na]⁺. MW Calculado: 497,58.

[00477] A uma solução de **Intermediário I-4** (450 mg, 904 umol) em acetato de etila(4 ml) adicionou-se ácido clorídrico em acetato de etila(4 M, 8,00 ml) a 0°C. A mistura de reação foi agitada a 25°C por 1 hora. A mistura de reação foi concentrada sob pressão reduzida para proporcionar o sal de HCl de **Intermediário I-5** (390 mg, 100% de rendimento) como sólido amarelo claro e usado para a próxima etapa sem purificação. ESI-MS m/z = 398,0 [M+H]⁺, 420,0 [M+Na]⁺, MW Calculado: 397,47.

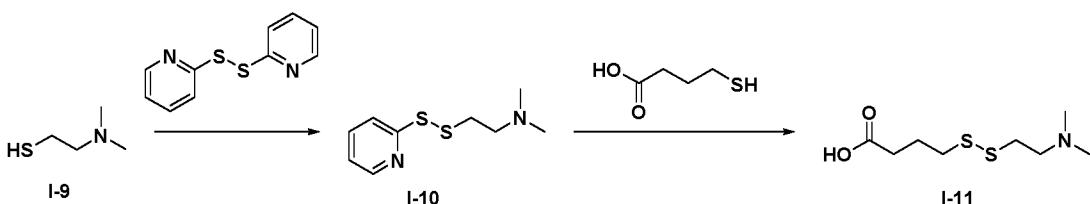
[00478] A uma solução de **Intermediário I-5** (195 mg, 899 umol) em diclorometano (5,00 ml) adicionou-se *N*-metilmorfolina (273 mg, 2,70 mmol), HOBr (24,29 mg, 179,75 umol), o sal de HCl de 1-((S)-2-amino-3-(3-(benziloxi)fenil)propanoil)hexa-hidropiridazina-3-carboxilato de (S)-metila (390 mg, 899 umol) e EDCI (345 mg, 1,80 mmol) a 0°C. A mistura de reação foi agitada a 0°C por 1 hora. A mistura de reação foi diluída com diclorometano (20 ml) e ajustada para o pH~6 com ácido cítrico aquoso a 5%. A camada aquosa foi extraída com diclorometano (20 ml x 2). As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura (20 ml), submetidas à secagem sobre sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas sob pressão reduzida para gerar um produto bruto. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna com sílica-gel (eluente: éter de petróleo/acetato de etila→ 5:1, 2:1, 1:1) para proporcionar **Intermediário I-6** (750 mg, 70% de rendimento) como um sólido branco. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,50 - 7,35 (m, 5 H), 7,23 - 7,15 (m, 1 H), 6,90 - 6,80 (m, 3 H), 6,13 - 6,08 (m, 1 H), 5,83 - 5,73 (m, 1 H), 5,10 - 5,00 (m, 3 H), 4,30 - 4,20 (m, 1 H), 4,00 -

3,90 (m, 1 H), 3,65 (s, 3 H), 3,50 (d, $J=11,20$ Hz, 1H), 3,05 - 2,97 (m, 1 H), 2,93 - 2,83 (m, 1 H), 2,80 - 2,70 (m, 1 H), 2,35 - 2,25 (m, 1 H), 2,15 - 2,10 (m, 1 H), 1,75 - 1,65 (m, 4 H), 1,45 (s, 9 H), 0,94 (d, $J=6,80$ Hz, 3H), 0,88 (d, $J=6,80$ Hz, 3H). ESI-MS m/z = 597,1 [M+H]⁺. MW Calculado: 596,71.

[00479] A uma solução de **Intermediário I-6** (3,00g, 6,03 mmol) em metanol (300 ml) adicionou-se paládio em carbono (2 gramas, 10% de carregamento) sob uma atmosfera de nitrogênio. A suspensão foi desgaseificada e purgada com gás hidrogênio e a mistura foi agitada sob hidrogênio (1 atm) a 20°C por 3 horas. A mistura foi filtrada e concentrada sob pressão reduzida para gerar **Intermediário I-7** (2,3 g, 5,64 mmol, 94% de rendimento) como um sólido branco. ESI-MS m/z = 430,1 [M+Na]⁺. MW Calculado: 407,46

[00480] A uma mistura de **Intermediário I-7** (2,3 g, 5,64 mmol) em dioxano (10 ml) adicionou-se ácido clorídrico em dioxano (4 M, 30 ml) numa porção a 20°C. A mistura foi agitada a 20°C por 3 horas. A mistura foi ajustada para o pH ~7-8 com NaHCO₃ aquoso saturado e extraída com acetato de etila(100 ml x 3). A fase orgânica combinada foi lavada com salmoura (100 ml x 2), submetida à secagem sobre sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada *em vácuo* para gerar o **Intermediário I-8** (1,3 g, 3,63 mmol, 64% de rendimento, 86% de pureza) como um sólido amarelo claro. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,15-7,02 (m, 1 H), 6,75-6,5 (m, 3 H), 4,90-4,77 (m, 1 H), 4,50-4,37 (m, 1 H), 4,00-3,90 (m, 1 H), 3,80-3,70 (m, 1 H), 3,68-3,65 (m, 3 H), 2,95-2,80 (m, 1 H), 2,77-2,62 (m, 2 H), 2,50-2,35 (m, 1 H), 1,97-1,85 (m, 1 H), 1,82-1,70 (m, 1 H), 1,60 – 1,45 (m, 1 H), 1,42-1,28 (m, 1 H). ESI-MS m/z = 308,2 [M+Na]⁺. MW Calculado: 307,34.

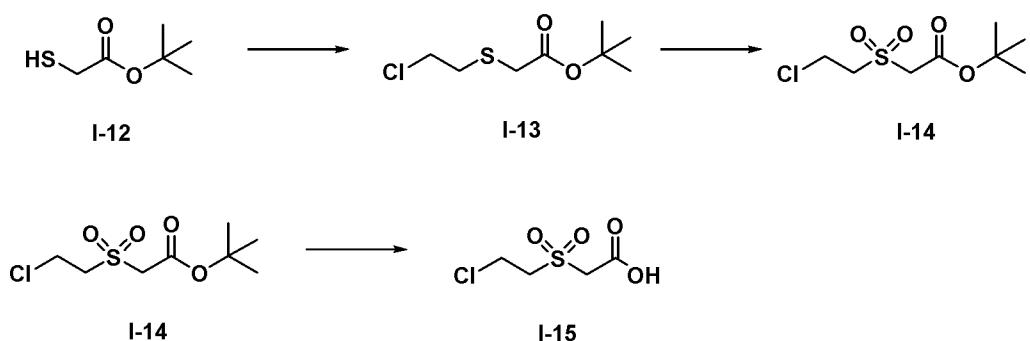
Síntese de **Intermediário I-11**



[00481] A uma solução de 2-(dimetilamino)etanotiol **I-9** (500 mg, 3,53 mmol) em metanol (10 ml) adicionou-se uma solução de 1,2-di(piridin-2-il)dissulfeto (1,17 g, 5,3 mmol) em metanol (10 ml) a 0°C. A mistura foi agitada a 25°C por 15 horas. A mistura de reação foi concentrada *em vácuo*. O resíduo foi purificado por coluna de sílica-gel (eluente: éter de petróleo/acetato de etila → 3:1, 1:1, então diclorometano/acetato de etila → 2:1, então diclorometano/metanol → 10:1) que foi combinado com um lote anterior para proporcionar o **Intermediário I-10** (1,05 g, 58% de rendimento) como sólido amarelo claro. RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ 8,56 (d, $J=4,0$ Hz, 1 H), 7,85-7,75 (m, 1 H), 7,69 (d, $J=8,0$ Hz, 1 H), 7,36-7,26 (m, 1 H), 3,48-3,40 (m, 2 H), 3,28-3,20 (m, 2 H), 2,93 (s, 6 H). ESI-MS $m/z = 214,9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. MW Calculado: 214,35.

[00482] A uma solução de ácido 4-mercaptobutanoico (50 mg, 416 umol) em metanol (1 ml) adicionou-se uma solução de **Intermediário I-10** (125 mg, 499 umol) em metanol (1,5 ml) a 25°C. A mistura foi agitada a 25°C por 15 horas. A mistura de reação foi concentrada em baixa pressão. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna com sílica-gel (eluente: éter de petróleo/acetato de etila → 2:1, 1:1, então diclorometano/metanol → 10:1) para proporcionar **Intermediário I-11** (80 mg, 86% de rendimento) como uma goma branca. RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ 3,55-3,45 (m, 2 H), 3,08-3,00 (m, 2 H), 2,93 (s, 6H), 2,83 (t, $J=7,2$ Hz, 2 H), 2,43 (t, $J=7,2$ Hz, 2 H), 2,05-1,94 (m, 2 H).

Síntese de Intermediário I-15



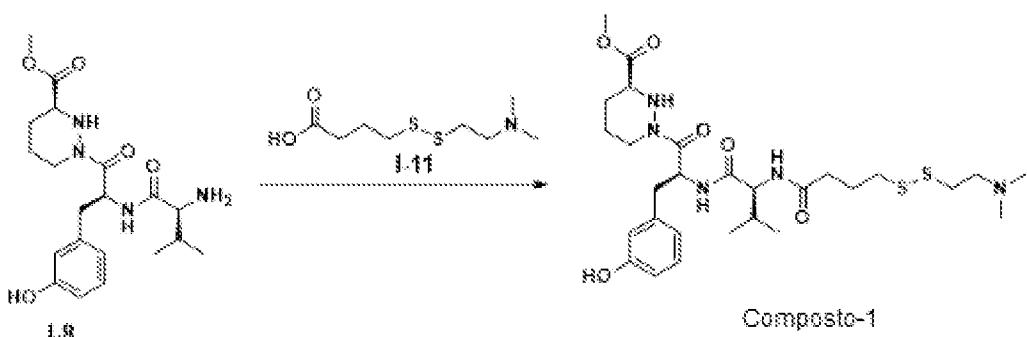
[00483] A uma solução de 2-mercaptopacetato de terc-butila **I-12** (800 mg, 5,4 mmol) em *N,N*-dimetilformamida (15 ml) adicionou-se carbonato de potássio (1,49 g, 10,8 mmol) e 1-bromo-2-cloroetano (2,32 g, 16,2 mmol). A mistura foi agitada a 25°C por 2 horas. A mistura foi diluída com acetato de etila(100 ml) e lavada com água (50 ml x 3). A camada orgânica foi submetida à secagem sobre sulfato de sódio anidro e concentrada para gerar **Intermediário I-13** (1,00 g, 79% de rendimento) como um óleo incolor. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 3,64 - 3,71 (m, 2 H), 3,14 - 3,17 (m, 2 H), 2,95 - 3,01 (m, 2 H), 1,47 (s, 9 H).

[00484] A uma solução de **Intermediário I-13** (1,00 g, 4,75 mmol) em diclorometano (10 ml) adicionou-se uma solução de *m*-CPBA (4,61 g, 21,4 mmol, 80% de pureza) em diclorometano (10 ml) a 0°C. A mistura foi aquecida para a temperatura ambiente e agitada por 2 horas. A mistura foi diluída com diclorometano (80 ml) e lavada com sulfeto de sódio aquoso saturado (50 ml) e bicarbonato de sódio aquoso saturado (50 ml). A camada orgânica foi submetida à secagem sobre sulfato de sódio anidro e concentrada para gerar um resíduo bruto que foi purificado por cromatografia de sílica-gel (eluente: éter de petróleo/acetato de etila → 5/1) para gerar **Intermediário I-14** (700 mg, 60% de rendimento) como um óleo incolor. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 3,99 (s, 2 H), 3,90 - 3,95 (m, 2 H), 3,69 - 3,75 (m, 2 H), 1,50 - 1,53 (m, 9 H).

[00485] A uma solução de **Intermediário I-14** (650 mg, 2,68 mmol)

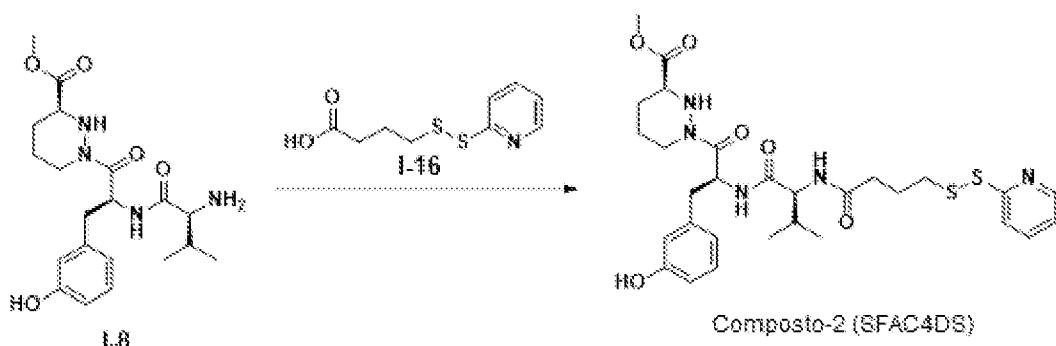
em diclorometano (12 ml) adicionou-se ácido trifluoroacético (6,00 ml). A mistura foi agitada a 45 °C por 2 horas. Então a mistura foi concentrada para gerar **Intermediário I-15** (360,00 mg, 72% de rendimento) como um sólido branco. RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 4,34 (s, 2 H), 3,89 - 4,01 (m, 2 H), 3,71 - 3,81 (m, 2 H).

Síntese do Composto-1



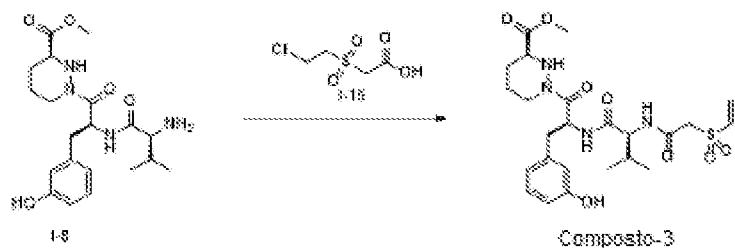
[00486] A uma solução de sal de HCl de **Intermediário I-8** (31 mg, 119 umol) e **Intermediário I-11** (44 mg, 99 umol) em diclorometano (1,5 ml) adicionou-se HOBt (1,34 mg, 9,9 umol), *N*-metilmorfolina (38,2 μl) e EDCI (27 mg, 139 umol). A mistura foi agitada a 25°C por uma hora. A mistura de reação foi diluída com diclorometano (10 ml) e lavada com água (5 ml). A camada aquosa foi extraída com diclorometano (5 ml x 2). As camadas orgânicas combinadas foram submetidas à secagem sobre sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas. O resíduo foi purificado por HPLC de fase inversa (aditivo de HCl) e repurificado usando-se HPLC de fase inversa (aditivo de HCOOH) e liofilizada para proporcionar **Composto-1** (5,8 mg, 9% de rendimento) como um óleo amarelo claro. RMN de ^1H (400 MHz, MeOD) δ 8,53 (br,s., 1 H), 7,12-7,04 (m, 1 H), 6,72-6,62 (m, 3H), 5,75 -5,65 (m, 1 H), 4,20-4,10 (m, 2H), 3,70 (s, 3H), 3,08- 3,00 (m, 2H), 2,95-2,76 (m, 5 H), 2,76-2,70 (m, 2 H), 2,60 (s, 6 H), 2,42-2,32 (m, 3 H), 2,10-1,98 (m, 3 H), 1,85-1,70 (m, 2 H), 1,55-1,40 (m, 2 H), 1,02-0,85 (m, 6 H). ESI-MS m/z = 612,1 [M+H] $^+$, 634,5 [M+Na] $^+$. MW Calculado: 611,82.

Síntese do Composto-2 (SFAC4DS)



[00487] Uma solução de **Intermediário I-8** (27 mg, 60 umol) em díclorometano foi tratada com *N,N*-di-isopropiletilamina (24 mg, 180 umol), **Intermediário I-16** (14 mg, 60 umol), HOBr (1,6 mg, 2 umol) e, então, finalmente EDCI (18mg, 90 umol). Após a agitação para 15 horas, a solução foi vertida em água e acetato de etila. As camadas foram separadas e a camada aquosa foi extraída com acetato de etila. Os orgânicos foram submetidos à secagem sobre sulfato de magnésio, filtrados e o solvente removido estava em vácuo. A purificação por HPLC de fase inversa (acetonitrila em água com ácido fórmico a 0,1%) e liofilização forneceu o **Composto-2 (SFAC4DS)** (16mg, 42% de rendimento) como um sólido branco. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) 8,47 (d, 1H), 8,16 (br s, 1H), 7,69-7,66 (m, 1H), 7,63-7,60 (m, 1H), 7,13 (app t, 1H), 7,09-7,05 (m, 1H), 5,85-5,79 (m, 1H), 4,72 (m, 1H), 4,31 (br s, 1H), 3,70 (s, 3H), 3,42 (d, 1H), 3,00 (dd, 1H), 2,87-2,78 (m, 3H), 2,52-2,43 (m, 2H), 2,28 (br s, 1H), 2,14 -2,04 (m, 3H), 1,83-1,73 (m, 2H), 1,62-143 (m, 5H), 0,95 (d, 3H), 0,90 (d, 3H). ESI-MS m/z = 617,9 [M+H]⁺. MW Calculado: 617,78.

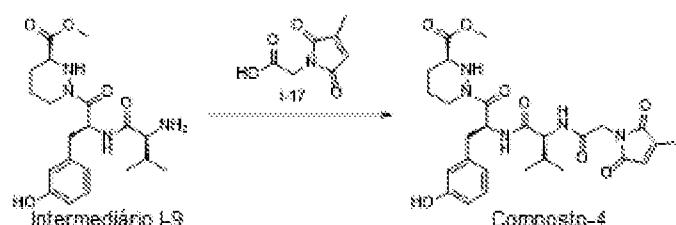
Síntese do Composto-3



[00488] A uma solução do sal de HCl de **Intermediário I-15** (31,8 mg, 0,17 mmol), HOBr (2,3 mg, 0,017 mmol) e NMM (54 µl, 0,54 mmol)

em DCM (0,75 ml) adicionou-se o sal de HCl de **I-8** (86mg, 0,17 mmol,) e EDCI (76 mg, 0,34 mmol) à temperatura ambiente. A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente por 2 horas. A mistura foi diluída com diclorometano (2 ml), lavada com ácido cítrico (pH~3, 2 ml), bicarbonato de sódio aquoso saturado (2 ml), e cloreto de sódio aquoso saturado (2 ml), submetida à secagem sobre sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida a 15°C para gerar um produto como óleo amarelo. O resíduo foi purificado por TLC preparativo com sílica-gel (eluente: DCM/MeOH → 10:1) seguido por HPLC preparativo (coluna: Phenomenex Gemini C18 250 x 50 10u; fase móvel: [água (0,225% de FA)-ACN]; B%: 26% a 56%, 11,2 min) para proporcionar **Composto-3** (8,5 mg, 8% de rendimento) como sólido branco. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 9,02 (s, 1 H), 8,80 (s, 1 H), 8,42 (s, 1 H), 7,01 - 7,08 (m, 1 H), 6,82 (dd, *J*=16,3, 9,9 Hz, 1 H), 6,74 (d, *J*=7,5 Hz, 1 H), 6,64 - 6,70 (m, 2 H), 6,36 (d, *J*=16,5 Hz, 1 H), 6,12 – 6,16 (m, 2 H), 4,81 – 4,85 (m, 1 H), 4,40 – 4,46 (m, 2 H), 4,21 – 4,25 (m, 1 H), 4,09 - 4,13 (m, 1 H), 3,57 (s, 3 H), 2,81 - 3,08 (m, 2 H), 2,63 – 2,65 (m, 1 H), 2,15 – 2,19 (m, 1 H), 1,21 - 1,60 (m, 4 H), 0,88 – 0,92 (m, 6 H). ESI-MS m/z = 539,1 [M+H]⁺. MW Calculado: 538,61.

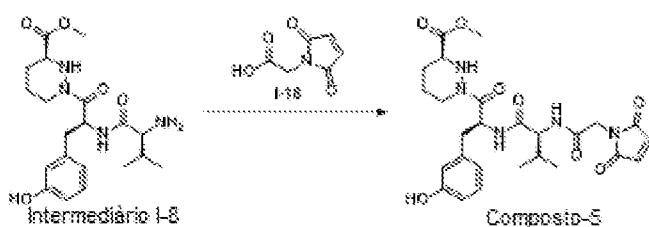
Síntese do Composto-4



[00489] O **Composto-4** foi preparado conforme descrito na preparação de **Composto-3** usando-se o sal de HCl de **Intermediário I-8** (34 mg, 77 umol) e ácido 2-(3-metil-2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)acético **I-17** (13 mg, 77 umol) como materiais de partida. O produto bruto resultante foi combinado com material bruto anteriormente sintetizado e purificado para gerar o **Composto-4** (29,0 mg, 51,28 umol,

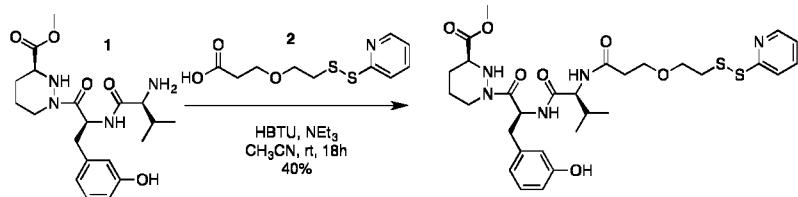
45% de rendimento) como um sólido branco após lyophilização. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8,55-8,40 (s, 1 H), 8,20-8,07 (m, 1 H), 7,10-6,97 (m, 2 H), 6,80-6,73 (m, 1 H), 6,73-6,63 (m, 1 H), 6,63-6,50 (m, 1 H), 6,47-6,37 (m, 1 H), 5,90-5,75 (m, 1 H), 4,80-4,67 (m, 1 H), 4,35-4,15 (m, 3 H), 3,70-3,57 (m, 3 H), 3,45-3,30 (d, 1 H), 3,10-3,00 (m, 1 H), 3,00-2,70 (m, 2 H), 2,20-2,00 (m, 5 H), 1,85-1,60 (m, 2 H), 1,60-1,45 (m, 1 H), 1,45-1,30 (m, 1 H), 1,05-0,80 (m, 6 H). ESI-MS m/z = 558,3 [M+H] $^+$; MW Calculado: 557,60.

Síntese do Composto-5



[00490] O **Composto-5** foi preparado conforme descrito na preparação de **Composto-3** usando-se o sal de HCl de **Intermediário I-8** (34 mg, 77 umol) e **ácido 2-(2,5-dioxo-2,5-di-hidro-1H-pirrol-1-il)acético I-18** (13 mg, 77 umol) como materiais de partida para gerar o **Composto-5**. ESI-MS m/z = 544,0 [M+H] $^+$; MW Calculado: 543,58.

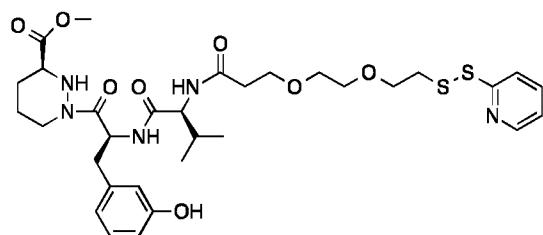
[00491] Síntese de (S)-1-((S)-3-(3-hidroxifenil)-2-((S)-3-metil-2-(3-(2-(piridin-2-ildisulfanil)etóxi)propanamido)butanamido)propanoil)hexahidropiridazina-3-carboxilato de metila (SFAX6):



[00492] Ácido carboxílico **2** (70mg, 0,270mmol) e HBTU (204mg, 0,540mmol, 2,00eq) foram misturados em 3 ml de acetonitrila, e a suspensão resultante foi agitada à temperatura ambiente por 15 minutos. Após este período, amina **1** (Intermediário I-8) (110mg, 0,270mmol, 1,00eq) foi adicionada seguida por trietilamina (113 μl , 0,810mmol,

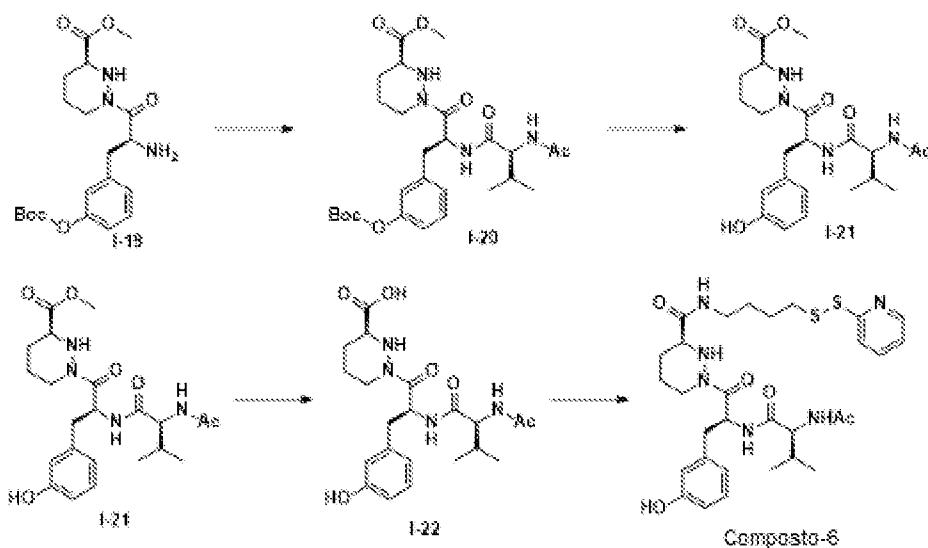
3,00eq) e a mistura foi agitada a temperatura ambiente por 18 horas. A mistura foi, então, tratada com 20 ml de bicarbonato de sódio saturado e extraído com 2x30 ml de porções de acetato de etila. Os extratos orgânicos agrupados foram lavados com 2x20 ml de porções de salmoura, submetidos à secagem sobre sulfato de sódio saturado, filtrados e concentrados sob vácuo. O resíduo foi purificado usando-se cromatografia de gel de sílica, eluindo com diclorometano:MeOH, 100 : 1 a 50 : 1, proporcionando 70mg (40%) do produto como um óleo incolor. $R_f = 0,31$ (diclorometano:MeOH, 20 : 1). MS (ESI) calc=648,2 (M+H), obs = 648,2.

Síntese de SFAX9DS:



[00493] SFAX9DS foi sintetizado de acordo comum procedimento similar descrito acima para a síntese de SFAX6.

Síntese do Composto-6



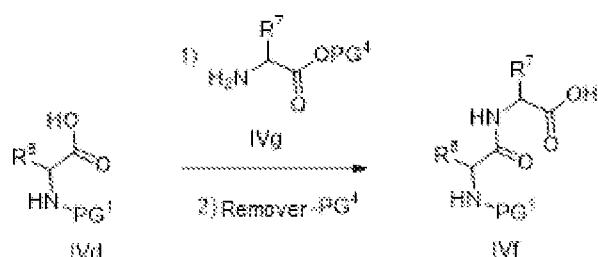
[00494] Composto-6 foi preparado começando com o Intermediário I-19 para gerar o Composto-6. ESI-MS $m/z = 631,0$ $[M+H]^+$; MW

Calculado: 630,82.

Síntese de Compostos da Fórmula IVf

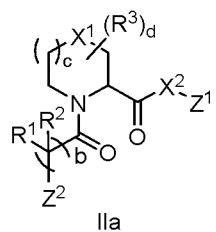
[00495] Síntese de Compostos da Fórmula IVf podem ser sintetizados conforme mostrado abaixo no Esquema 6.

ESQUEMA 6



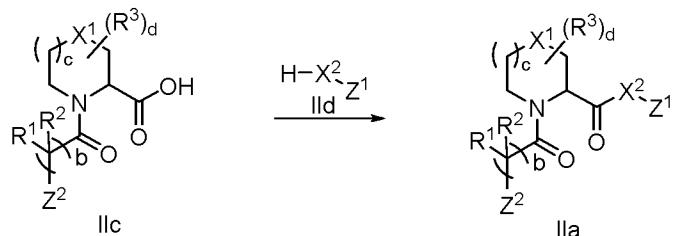
em que R⁷, R⁸, e Z⁶ são conforme definido anteriormente, PG¹ é um grupo protetor de amina adequado incluindo, sem limitação Boc, Cbz, Alloc, e Fmoc, e PG⁴ é um grupo alquila ou arila incluído, mas não limitado a, metila, etila, benzila, allila, e fenila que pode ser removida por métodos conhecidos por aqueles indivíduos versados na técnica.

[00496] Em um procedimento típico, o composto IVd é reagido com o reagente IVg na presença de agentes de acoplamento padrão (por exemplo, EDC/HOBt, DCC, PyBOP, PyBROP, HATU, HBTU, COMU) familiar àqueles indivíduos versados na técnica. Os parceiros de acoplamento de ácido e amina são combinados com o agente de acoplamento num solvente orgânico (incluindo, sem limitação DMF, diclorometano, acetonitrila e tetra-hidrofuran) na presença de uma base (incluindo, sem limitação DIPEA, trietilamina, e NMM) à temperatura ambiente ou temperatura ligeiramente elevada. Após a formação de amida, o grupo protetor PG⁴ é, então, removido usando-se condições descritas para remover PG³ do composto da fórmula IVe (Esquema 4).



[00497] Método B pode ser usado para preparar compostos da Fórmula IIa conforme mostrado agora no Esquema 7.

ESQUEMA 7

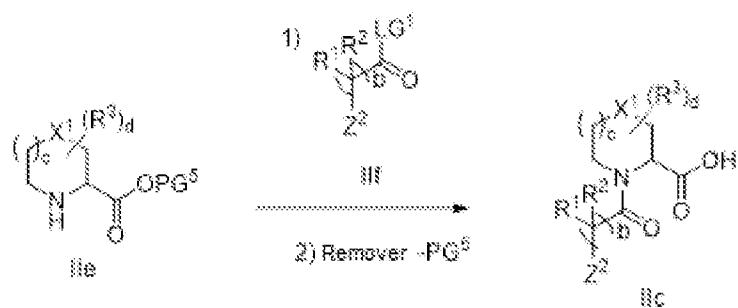


em que R^1 , R^2 , R^3 , X^1 , X^2 , Z^1 e Z^2 são conforme definido anteriormente.

[00498] Em um procedimento típico, o ácido carboxílico IIc é reagido com intermediário XI na presença de agentes de acoplamento padrão (por exemplo, EDC/HOBt, DCC, PyBOP, PyBROP, HATU, HBTU, COMU) conhecidos por aqueles indivíduos versados na técnica. O ácido IIc e parceiro de acoplamento é combinado com o agente de acoplamento num solvente orgânico (incluindo, sem limitação DMF, diclorometano, DCE, acetonitrila, e tetra-hidrofurano) na presença de uma base (incluindo, sem limitação DIPEA, trietilamina, e NMM) à temperatura ambiente ou temperatura ligeiramente elevada.

[00499] Os compostos da Fórmula IIc podem ser sintetizados conforme mostrado abaixo no Esquema 8.

ESQUEMA 8



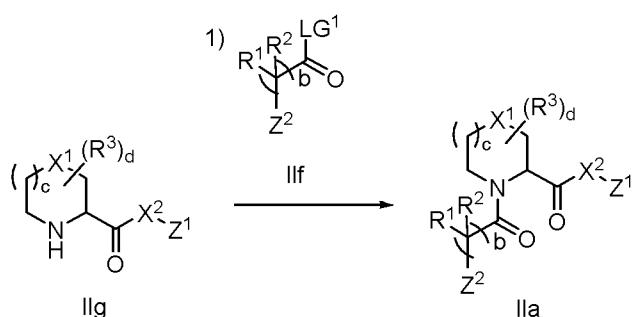
em que R^1 , R^2 , R^3 , X^1 e Z^2 são conforme definido anteriormente, PG^5 é um grupo alquila ou arila incluído, mas não limitado a, metila, etila, benzila, allila, e fenila que pode ser removido por métodos conhecidos por aqueles indivíduos versados na técnica, e LG^1 é um grupo como

OH que pode ser ativado e deslocado pela amina de composto IIe. Alternativamente, LG¹ pode ser um haleto adequado (como F, Cl, e Br) que pode ser deslocado por um nucleófilo.

[00500] Em um procedimento típico, IIe é reagido com IIf (LG¹= haleto) na presença de uma base adequada (incluindo, sem limitação piridina, trietilamina, DIPEA, e NMM) num solvente adequado (incluindo, sem limitação THF, DCM e DMF) a temperaturas que estão na faixa de -78°C a 120°C, mas idealmente de -20°C a 50°C. Alternativamente, se LG¹ for OH, XII é reagido com o reagente IIf na presença de agentes de acoplamento padrão (por exemplo, EDC/HOBt, DCC, PyBOP, PyBROP, HATU, HBTU, COMU) conhecido por aqueles indivíduos versados na técnica. Os parceiros de acoplamento de ácido e amina são combinados com o agente de acoplamento num solvente orgânico (incluindo, sem limitação DMF, diclorometano, acetonitrila e tetra-hidrofurano) na presença de uma base (incluindo, sem limitação DIPEA, trietilamina, e NMM) à temperatura ambiente ou temperatura ligeiramente elevada. Será entendido por aqueles indivíduos versados na técnica que o composto IIf (LG¹= haleto), pode ser prontamente produzido a partir do ácido carboxílico correspondente pelo tratamento com um reagente halogenante adequado. Após a formação de amida entre IIe e IIf, o grupo protetor PG⁵ é, então, removido usando-se condições descritas para remover PG³ de composto de fórmula IVe (esquema 4) para gerar o composto IIc.

[00501] Método B-2 pode ser usado para preparar os compostos da Fórmula IIa conforme mostrado abaixo no Esquema 9.

ESQUEMA 9



em que R^1 , R^2 , R^3 , X^1 , X^2 , Z^1 e Z^2 são conforme definido anteriormente. A reação pode ser conduzida sob condições descritas para acoplar a reação entre o composto IIg e composto IIf (esquema 8)

[00502] Os compostos da Fórmula IIg podem ser preparados conforme mostrado abaixo no Esquema 11.

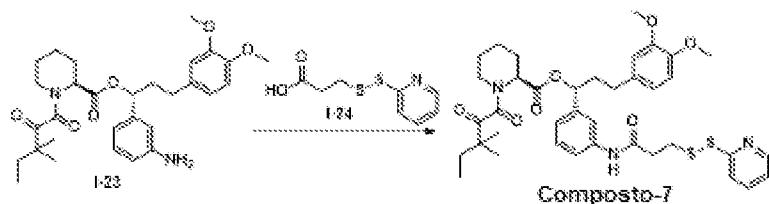
ESQUEMA 11



em que R^3 , X^1 , X^2 , Z^1 são conforme definido anteriormente e PG^6 é um grupo protetor de amina adequado incluindo, sem limitação, Boc, Cbz, Alloc, e Fmoc.

[00503] Em um procedimento típico, ácido carboxílico IIg é reagido com um parceiro de acoplamento adequado que contém uma porção química de $-X^2-Z^1$ na presença de agentes de acoplamento padrão (por exemplo, EDC/HOBt, DCC, PyBOP, PyBROP, HATU, HBTU, COMU) conhecido por aqueles indivíduos versados na técnica. O ácido e o parceiro de acoplamento são combinados com o agente de acoplamento num solvente orgânico (incluindo, sem limitação DMF, diclorometano, acetonitrila e tetra-hidrofurano) na presença de uma base (incluindo, sem limitação DIPEA, trietilamina, e NMM) à temperatura ambiente ou temperatura ligeiramente elevada. PG^6 é, então, removido reagindo-se o intermediário resultante com o reagente adequado familiar àqueles indivíduos versados na técnica.

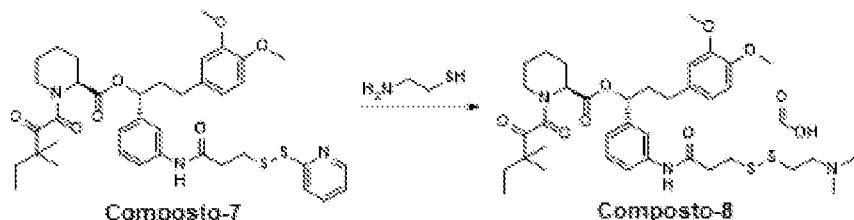
Síntese de Composto-7 (C3SLF)



[00504] A uma solução de **Intermediário I-24** (18 mg, 0,085 mmol) em tetra-hidrofuranô (1,2 ml) adicionou-se *N*-metilmorfolina (10 μ l, 0,085 mmol). A solução foi resfriada até -20°C e, então, isobutilcloroformato (11 μ l, 0,085 mmol) foi adicionado em gotas. A solução foi imediatamente aquecida para 0°C. Após a agitação por 45 minutos a 0°C, o sal de TFA de **Intermediário I-23** (37 mg, 0,057 mmol) foi misturado com *N*-metilmorfolina (7 μ l, 0,057 mmol) em tetra-hidrofuranô anidro (0,5 ml) e adicionado em gotas para a solução de 0°C de anidro misto ao longo do curso de 5 minutos. A solução resultante foi agitada por 1,5 hora a 0°C, ponto no qual o metanol (1 ml) foi adicionado, e a solução foi aquecida imediatamente para a temperatura ambiente e agitada para 5 minutos. A solução foi diluída com diclorometano (75 ml) e bicarbonato de sódio aquoso saturado (50 ml). As camadas foram separadas e a camada aquosa foi extraída com diclorometano (2 x 30 ml). Os orgânicos foram combinados, lavados com salmoura (20 ml), submetidos à secagem sobre sulfato de magnésio, filtrado e o solvente foi removido em vácuo. A purificação por cromatografia de sílica-gel (0 a 80% de acetato de etila em hexanos) forneceu **Composto 7** (C3SLF) como uma espuma branca (20 mg, 50% de rendimento). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 9,49 (s, 1H), 8,55 (d, 1H), 7,77 (app t, 1H), 7,71-7,65 (m, 2H), 7,60-7,58 (m, 1H), 7,20-7,17 (m, 1H), 7,01 (d, 1H), 6,78-6,76 (m, 1H) 6,70-6,67 (m, 2H), 5,77 (dd, 1H), 5,33 (d, 1H), 3,86 (s, 3H), 3,85 (s, 3H), 3,35 (d, 1H), 3,25 (t, 2H), 3,15 (dt, 1H), 2,92 (t, 2H), 2,64-2,50 (m, 2H), 2,38 (d, 1H), 2,29-2,15 (m, 1H), 2,10-2,00 (m, 1H), 1,78-1,63 (m, 3H), 1,53-1,37 (m, 3H), 1,22 (s, 6H), 0,89 (t, 3H, rotâmero 1), 0,80 (t, 3H, rotâmero 2). ESI-MS m/z =

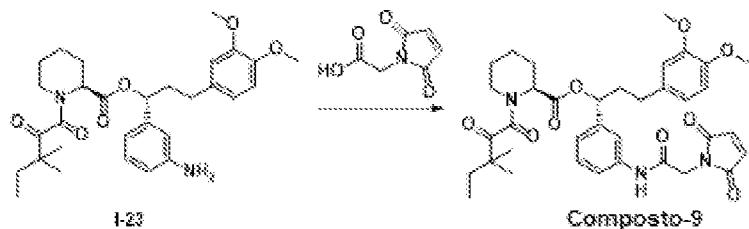
722,0 [M+H]⁺, 744,0 [M+Na]⁺; MW Calculado: 721,93.

Síntese do Composto-8



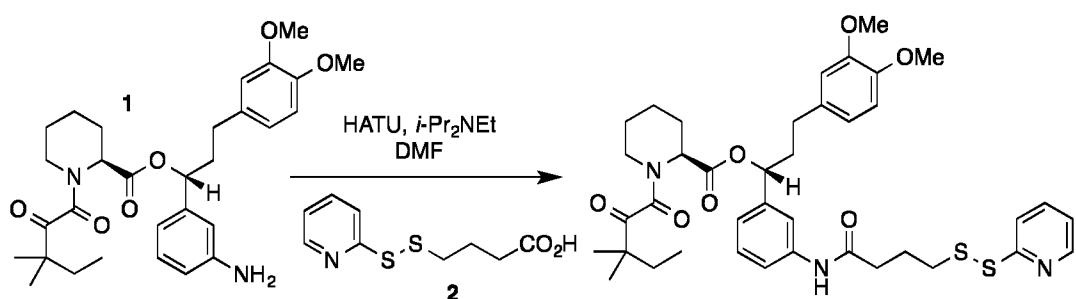
[00505] A uma solução de **Composto 7** (22 mg, 0,031 mmol) em diclorometano (0,5 ml) adicionou-se trietilamina (62 μ l, 0,55 mmol) seguido por 2-(dimetilamino)etanotiol (0,ml, 0,0500 mmol) (4,8 mg, 0,046 mmol). Após a agitação à temperatura ambiente por 30 minutos, a solução foi vertida em diclorometano (30 ml) e bicarbonato de sódio aquoso saturado (30 ml). As camadas foram separadas e a camada aquosa foi extraída com diclorometano (2 x 20 ml). Os orgânicos foram submetidos à secagem sobre sulfato de magnésio, filtrados, e o solvente foi removido em vácuo. A purificação por cromatografia de sílica-gel (0 a 10% de metanol em diclorometano) forneceu material impuro que foi repurificado por HPLC de fase inversa (acetonitrila em água com ácido fórmico a 0,1%) para gerar o sal de ácido fórmico de **Composto-8** (7,1 mg, 21% de rendimento) como um sólido branco. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 12,53 (br s, 1H), 9,50 (s, 1H), 8,00 (s, 1H), 7,75 (d, 1H), 7,68 (s, 1H), 7,29 (t, 1H), 7,02 (d, 1H), 6,79-6,77 (m, 1H), 6,70-6,67 (m, 2H), 5,76 (dd, 1H), 5,29 (d, 1H), 3,86 (s, 3H), 3,85 (s, 3H), 3,36-3,27 (m, 2H), 3,23-3,11 (m, 4H), 2,90 (t, 2H), 2,79-2,71 (m, 8H), 2,62-2,50 (m, 2H), 2,55 (d, 1H), 2,28-2,17 (m, 1H), 2,12-2,03 (m, 1H), 1,72-1,61 (m, 3H), 1,49-1,36 (m, 3H), 1,22 (s, 3H), 1,21 (s, 3H), 0,88 (t, 3H, rotâmero 1), 0,79 (t, 3H, rotâmero 2). ESI-MS m/z = 716,1 [M+H]⁺; Calculado MW: 715,97.

Síntese do Composto-9



[00506] A uma solução de **Intermediário I-23** à temperatura ambiente (15 mg, 0,029 mmol), ácido 3-(2,5-dioxopirrol-1-il)propanoico (5,8mg, 0,034 mmol), e DMAP (0,4 mg, 0,003 mmol), em diclorometano adicionou-se *N,N'*-diciclo-hexilcarbodiimida (9,4 mg, 0,046 mmol). Após a agitação à temperatura ambiente por 15 horas, os sólidos resultantes foram filtrados através de um filtro de seringa e lavados com diclorometano. O solvente foi removido em vácuo e o resíduo resultante foi levantado em acetato de etila. Após o resfriamento até -20 °C, a suspensão foi filtrada através de um filtro de seringa e lavado com acetato de etila frio. O filtrado foi diluído com acetato de etila(30 ml) e água (30 ml). As camadas foram separadas e a camada aquosa foi extraída com acetato de etila(2 x 20 ml). Os orgânicos foram submetidos à secagem sobre sulfato de magnésio, filtrados e o solvente foi removido em vácuo. A purificação por cromatografia de sílica-gel (0 a 90% de acetato de etila em hexanos) forneceu o **Composto-9** (11 mg, 60% de rendimento) como um óleo. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,25 (br s, 1H), 7,79 (d, 1H), 7,38 (s, 1H), 7,29 (t, 1H), 6,98 (d, 1H), 6,82 (s, 2H), 6,78-6,76 (m, 1H), 6,70-6,66 (m, 2H), 5,83 (dd, 1H), 5,37 (d, 1H), 4,43 (d, 1H), 4,37 (d, 1H), 3,86 (s, 3H), 3,85 (s, 3H), 3,32 (d, 1H), 2,96 (t, 1H), 2,55 (t, 2H), 2,35 (d, 1H), 2,29-2,15 (m, 1H), 2,11-2,01 (m, 1H), 1,81-1,60 (m, 4H), 1,49-1,42 (m, 3H), 1,27 (s, 3H), 1,25 (s, 3H), 0,93 (t, 3H, rotâmero 1), 0,82 (t, 3H, rotâmero 2). ESI-MS m/z = 662,0 [M+H]⁺; Calculado MW: 661,75.

Síntese de (S)-1-(3,3-dimetil-2-oxopentanoil)piperidine-2-carboxilato de (R)-3-(3,4-dimetoxifenil)-1-(3-(4-(piridin-2-ildisulfanil)butanamido)fenil)propil (C4-SLF):



[00507] A uma solução de Anilina **1** (90mg, 172 μ mol, 1eq), dissulfeto **2** (79mg, 343 μ mol, 2eq) e di-isopropiletilamina (149 μ L, 111mg, 858 μ mol, 5eq) em DMF (3 ml) adicionou-se HATU (130 mg, 343 μ mol, 2eq) e a mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente por 24 horas. A mistura de reação foi diluída com água e extraída com acetato de etila (3x). Os extratos orgânicos foram lavados com água, cloreto de sódio saturado, submetidos à secagem sobre sulfato de magnésio e evaporados. O resíduo foi purificado em eluição de gradiente de sílica-gel (20% de acetato de etila: 80% de heptano \rightarrow 100% de acetato de etila) para fornecer o composto titulador C4-SLF (98mg, 77%). MS (ESI) calc=736,3 (M+H), obs=736,3.

EXEMPLO 2: SÍNTESE DE DETERMINADOS CONJUGADOS

[00508] *Protocolo Geral:* Este protocolo descreve um método para a formação de conjugados de proteína-alvo-composto.

[00509] *Reagentes:* Composto em 100% de DMSO (interno) e proteína-alvo de mamífero (interno)

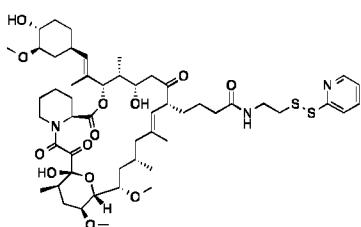
[00510] *Equipamento:* Gel Mini-PROTEAN TGX (Bio-Rad)

[00511] *Protocolo Experimental:* Uma razão 1:2 molar de proteína-alvo e composto são misturados juntos em HEPES a 12,5 mM com pH 7,4, tampão de NaCl a 75 mM que contém 2% de DMSO. A reação é incubada a 37°C por 30 minutos, seguido por uma incubação de um dia para o outro à temperatura ambiente. A eficácia de reticulação é avaliada por gel de SDS-PAGE. Os conjugados migram mais lentamente do que proteína-alvo não reticulada. Para compostos reativos de tiol, a fixação específica de Cys do composto à proteína-alvo pode

ser adicionalmente confirmada por SDS-PAGE após a adição de DTT a 100 mM à mistura de reação, o que reduz o conjugado de volta para seus componentes.

A. FORMAÇÃO DE CONJUGADOS KRAS_{GTP/S39C} LITE/C2-FK506

[00512] *Reagentes:* C2-FK506 em 100% de DMSO (interno), KRAS_{GTP/S39C} lite (interno; resíduos 1 a 169 que contêm G12V/S39C/C51S/C80L/C118S).



C2-FK506

[00513] *Equipamento:* Gel Mini-PROTEAN TGX (Bio-Rad)

[00514] *Protocolo Experimental:* Uma razão molar de 1:2 de KRAS_{GTP/S39C} lite e C2-FK506 são misturados juntos em HEPES a 12,5 mM com pH 7,4, tampão de NaCl a 75 mM que contém 2% de DMSO. A reação é incubada a 37°C por 30 minutos, seguido por uma incubação de um dia para o outro à temperatura ambiente. A eficácia de reticulação é avaliada por gel de SDS-PAGE. Fixação de C2-FK506 a Cisteína 39 em KRAS_{GTP/S39C} lite também é avaliada por incubação da mistura de reação com DTT a 100 mM.

[00515] *Resultados:* C2-FK506 reticula de modo eficaz com KRAS_{GTP/S39C} lite e é específico para Cisteína 39 (Figura 1).

B. FORMAÇÃO DE CONJUGADOS KRAS_{GTP/G12C} LITE/SFAX9DS

[00516] *Reagentes:* SFAX9DS em 100% de DMSO (interno), KRAS_{GTP/G12C} lite (interno; resíduos 1 a 169 que contêm G12C/C51S/C80L/C118S).

[00517] *Equipamento:* Gel Mini-PROTEAN TGX (Bio-Rad)

[00518] *Protocolo Experimental:* Uma razão molar 1:2 de KRAS_{GTP/G12C} lite e SFAX9DS são misturados juntos em HEPES a 12,5 mM

com pH 7,4, tampão de NaCl a 75 mM que contém 2% de DMSO. A reação é incubada a 37°C por 30 minutos, seguido por uma incubação de um dia para o outro à temperatura ambiente. A eficácia de reticulação é avaliada por gel de SDS-PAGE. CypA de tipo selvagem também reticulado com o composto. Cisteína 52 como uma Cisteína reativa em CypA e foi mutada para Serina a fim de revogar a reticulação de apresentadora.

[00519] Resultados: SFAX9DS reticula de modo eficaz com proteína KRAS_{GTP/G12C} lite e CypA_{C52S} não reticular para SFAX9DS (Figura 2).

EXEMPLO 3: FORMAÇÃO DE DETERMINADOS COMPLEXOS

[00520] *Protocolo Geral:* Este protocolo descreve dois métodos para a formação e isolamento de complexos compreendidos de proteína apresentadora, composto e proteína-alvo de mamífero.

[00521] *Reagentes:* Composto em 100% de DMSO (interno), proteína apresentadora (interno) e proteína-alvo de mamífero (interno)

[00522] *Equipamento:* Gel Mini-PROTEAN TGX (Bio-Rad), Superdex 75 (GE Healthcare, CV 120 ml)

PROTOCOLO EXPERIMENTAL A: PROTEÍNA E COMPOSTO PRÉ-CONJUGADO

[00523] Uma razão molar 1:2 molar de conjugado e proteína apresentadora são misturados juntos em HEPES a 12,5 mM com pH 7,4, tampão de NaCl a 75 mM que contém 2% de DMSO. A reação é incubada a 37°C por 30 minutos, seguido por uma incubação de um dia para o outro à temperatura ambiente. O complexo puro é isolado por purificação de Cromatografia de Exclusão de Tamanho (SEC). A mistura de reação é diretamente injetada numa coluna Superdex 75 (CV 120 ml) pré-equilibrada com tampão que contém HEPES a 12,5 mM com pH 7,4, NaCl a 75 mM. O complexo elui num peso molecular maior do que a proteína-alvo não reagida e proteína apresentadora. Para

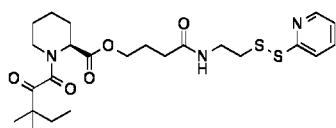
confirmar a presença de complexo no pico de eluição, as amostras são avaliadas por SDS-PAGE.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL B: REAGENTE DE RETICULAÇÃO, PROTEÍNA APRESENTADORA E PROTEÍNA-ALVO

[00524] Uma razão mola de 1:2:2 molar do composto, proteína apresentadora e proteína-alvo são misturados juntos em HEPES a 12,5 mM com pH 7,4, tampão de NaCl a 75 mM que contém 2% de DMSO. A reação é incubada a 37°C por 30 minutos, seguido por uma incubação de um dia para o outro à temperatura ambiente. O complexo puro é isolado por purificação de Cromatografia de Exclusão de Tamanho (SEC). A mistura de reação é diretamente injetada numa coluna Superdex 75 (CV 120 ml) pré-equilibrada com tampão que contém HEPES a 12,5 mM com pH 7,4, NaCl a 75 mM. O complexo elui num peso molecular maior do que a proteína-alvo não reagida e proteína apresentadora. Para confirmar a presença de complexo no pico de eluição, as amostras são avaliadas por SDS-PAGE.

A. FORMAÇÃO DE COMPLEXO TERNÁRIO KRAS_{GTP/S39C} LITE/C2HOLT/FKBP12

[00525] *Reagentes:* C2Holt em 100% DMSO (interno), KRAS_{GTP/S39C} lite (interno; resíduos 1 a 169 que contêm G12V/S39C/C51S/C80L/C118S) e FKBP12 (interno).



C2Holt

[00526] *Equipamento:* Gel Mini-PROTEAN TGX (Bio-Rad), Superdex 75 (GE Healthcare, CV 120 ml)

[00527] *Protocolo Experimental:* Uma razão molar 1:2:2 de C2-Holt, FKBP12, e KRAS_{GTP/S39C} lite são misturados juntos em HEPES a 12,5 mM com pH 7,4, tampão de NaCl a 75 mM que contém DMSO a 2%. A reação é incubada a 37°C por 30 minutos, seguido por uma incubação

de um dia para o outro à temperatura ambiente. O complexo puro é isolado por purificação de Cromatografia de Exclusão de Tamanho (SEC). A mistura de reação é diretamente injetada numa coluna Superdex 75 (CV 120 ml) pré-equilibrada com tampão que contém HEPES a 12,5 mM com pH 7,4, NaCl a 75 mM. O complexo elui em torno de 69 ml pós-injeção e KRAS_{GTP/S39C} lite não reagido e FKBP12 elui em torno de 75 ml e 87 ml pós-injeção, respectivamente. Para confirmar a presença de KRAS_{GTP/S39C} lite e FKBP12 no pico de eluição, as amostras também são avaliadas por SDS-PAGE.

[00528] *Resultados:* O perfil de SEC e análise SDS-PAGE dos picos de eluição confirmam a formação de complexo KRAS_{GTP/S39C} lite/C2Holt/FKBP12 (Figura 3A e 3B).

B. FORMAÇÃO DE COMPLEXO TERNÁRIO KRAS_{GDP/S39C} LITE/SFAC4DS/CYPAC_{C52S}

[00529] *Reagentes:* SFAC4DS em 100% de DMSO (interno), KRAS_{GDP/S39C} lite (interno; resíduos 1 a 169 que contêm G12V/S39C/C51S/C80L/C118S), e CypAC_{C52S} (interno).

[00530] *Equipamento:* Gel Mini-PROTEAN TGX (Bio-Rad), Superdex 75 (GE Healthcare, CV 120 ml)

[00531] *Protocolo Experimental:* Uma razão molar de 1:2:2 de SFAC4DS, CypAC_{C52S}, e KRAS_{GDP/S39C} lite são misturados juntos em HEPES a 12,5 mM com pH 7,4, tampão de NaCl a 75 mM que contém 2% de DMSO. A reação é incubada a 37°C por 30 minutos, seguido por uma incubação de um dia para o outro à temperatura ambiente. O complexo puro é isolado por purificação de Cromatografia de Exclusão de Tamanho (SEC). A mistura de reação é diretamente injetada numa coluna Superdex 75 (CV 120 ml) pré-equilibrada com tampão que contém HEPES a 12,5 mM com pH 7,4, NaCl a 75 mM. O complexo elui em torno de 69 ml pós-injeção e KRAS_{GDP/S39C} lite não reagido e CypAC_{C52S} elui em torno de 75 ml e 80 ml pós-injeção, respectivamente.

Para confirmar a presença de KRAS_{GDP/S39C} lite e CypA_{C52S} no pico de eluição, as amostras também são avaliadas por SDS-PAGE.

[00532] *Resultados:* O perfil de SEC e análise SDS-PAGE dos picos de eluição confirmam a formação de complexo KRAS_{GDP/S39C} lite/SFAC4DS/CypA_{C52S} (Figura 4).

C. FORMAÇÃO DE COMPLEXO TERNÁRIO PTP1B_{S187C} LITE/C3SLF/FKBP12

[00533] *Reagentes:* C3SLF em 100% de DMSO (interno), PTP1B_{E186C} lite (interno; resíduos 1 a 293 que contêm C32S/C92V/C121S/S187C) e FKBP12 (interno).

[00534] *Equipamento:* Gel Mini-PROTEAN TGX (Bio-Rad), Superdex 75 (GE Healthcare, CV 120 ml)

[00535] *Protocolo Experimental:* Uma razão molar de 1:3:3 de C3SLF, FKBP12 e PTP1B_{S187C} lite são misturadas juntas em HEPES a 12,5 mM com pH 7,4, tampão de NaCl a 75 mM que contém 4% de DMSO. A reação é incubada a 37°C por 30 minutos, seguido por uma incubação de um dia para o outro à temperatura ambiente. O complexo puro é isolado por purificação de Cromatografia de Exclusão de Tamanho (SEC). A mistura de reação é diretamente injetada numa coluna Superdex 75 (CV 120 ml) pré-equilibrada com tampão que contém HEPES a 12,5 mM com pH 7,4, NaCl a 75 mM. O complexo elui em torno de 62 ml pós-injeção e FKBP12 não reagido elui em torno de 75 ml (Dimer) e 90 ml (Monomer) pós-injeção, respectivamente. Para confirmar a presença de PTP1B_{S187C} lite e FKBP12 no pico de eluição, as amostras também são avaliadas por SDS-PAGE. A mistura de PTP1B_{S187C} lite livre e FKBP12 é submetida a uma coluna Superdex 75 sob a mesma condição para determinar seu tempo de eluição.

[00536] *Resultados:* O perfil de SEC e análise SDS-PAGE de PTP1B_{S187C} lite livre e proteínas FKBP12 (Figura 5A) confirmam que a PTP1B_{S187C} lite livre elui em torno de 64 a 65 ml. O perfil de SEC e

análise SDS-PAGE dos picos de eluição confirmam a formação de complexo PTP1B_{S187C} lite/C3SLF/FKBP12, que elui em torno de 61 ml (Figura 5B).

EXEMPLO 4: FORMAÇÃO DE CONJUGADO QUANDO A PROTEÍNA APRESENTADORA ESTÁ PRESENTE, MAS NÃO QUANDO ESTÁ AUSENTE

[00537] Este protocolo descreve métodos para analisar a eficácia de reticulação usando-se espectrometria de massa e ensaio de deslocamento de gel no esforço para avaliar a dependência de apresentador de formação de conjugado.

[00538] *Reagentes:* Composto em 100% de DMSO (interno), FKBP12 (interno), KRAS_{GTP/G12C} (interno, resíduos 1 a 169).

[00539] *Protocolo Experimental:* A fim de seguir a cinética de reações de reticulação de dissulfeto, os instrumentos Agilent 6230 TOF-LC/MS e Agilent 1260 HPLC que empregam uma coluna AdvanceBio RP-mAb C4 (2,1 x 100 mm, 3,5 µm) e equipados com um autoamostrador foram usados. A acetonitrila de grau de HPLC e água (cada um contendo formato de amônio a 1,0 mM e 1% de ácido fórmico em volume) foram usados como fase móvel com o seguinte aumento linear: Taxa de fluxo e 0,6 ml/min, água:acetonitrila = 95:5 de 0,0 a 13,0 min amentando linearmente para água:acetonitrila = 5:95 de 13,0 a 17,0 min. Tempo Total = 17,0 min.

[00540] Todas as reações de reticulação foram realizadas em ampolas de vidro com cor de âmbar de 1,5 ml equipadas com insertos de vidro de 0,5 ml. Um peptídeo solúvel em água (SEQ ID NO: 1: YQN-LLVGRNRGEEILD) foi empregue como um padrão interno. Embora a sequência real do padrão interno é inconsequente, a escolha de resíduos de aminoácido foi crítica para evitar a interferência nos ensaios de reticulação. Por conseguinte, resíduos de prolina (interferindo com FKBP12) e cisteína (interferindo com formação de ligação de dissulfeto).

to) foram excluídos. Todas as reações e soluções padrão foram preparadas em tampão de HEPES (pH 7,4, 1,0 mM MgCl₂).

[00541] Antes de cada reação, uma curva padrão foi obtida para os componentes individuais usando-se uma série de soluções padrão (uma análise de exemplo de curva padrão para FKBP12 é mostrada na Tabela 3 abaixo). Usando-se os dados da curva padrão, µmol as amostras de proteína foram plotadas contra a razão de áreas (amostra:std) e um ajuste linear ($y = mx+c$) foi empregue para obter para obter a inclinação e interseção. O valor de inclinação e interseção nestas curvas padrão foram contadas para durante a avaliação do substrato e concentração de produto antes e durante o curso da reação. Para cada substrato/produto, uma injeção inicial foi seguida por uma injeção de bloco bruto para verificar a presença de quaisquer reagentes/proteína residual. Com base nesta análise a sequência de autoamostrador pode ser ajustada para incluir o número adequado de injeções de bloco bruto para remoção de componentes residuais, se houver. Os espectros de MS foram analisados usando-se o software Agilent MassHunter v B.07.0.

TABELA 3. CURVA PADRÃO PARA FKBP12. INCLINAÇÃO = 6,53, INTERSEÇÃO = -0,64, R² = 0,999

Solução	Concentração (mM)	Área sob padrão interno ($R_t = 7,1$ min)	Área sob FKBP-12 ($R_t = 8,9$ min)	Razão de Amostra:Padrão
1	100	2615940,1	40314760,1	15,41
2	10	5244417,4	8718886,5	1,66
3	1	5868006,9	1745344,5	0,30
4	0,5	5407354,8	910748,2	0,17
5	0,1	5626447,0	237074,5	0,04

[00542] Em um experimento representativo para avaliar a dependência de apresentador da reticulação de ligante na proteína-alvo, KRAS_{GTP/G12C} e o ligante C3 ou C4SLF foi incubado na presença ou

ausência de FKBP12 em concentrações de KRAS a 2 μ M, FKBP12 a 10 μ M, C3 ou C4SLF a 10 μ M por 4 horas à temperatura ambiente em HEPES a 12,5 mM com pH 7,4, NaCl a 75 mM, MgCl₂ a 1 mM, 3% de DMSO. Análise da quantidade de KRAS passando por reticulação de dissulfeto com o ligante usando-se o método acima. Conforme mostrado na Tabela 4, a eficiência de reticulação aumentada de 5 a 10 vezes foi observada na presença do apresentador:

TABELA 4. EFICIÊNCIA DE RETICULAÇÃO DE C3- E C4SLF MS ANALISADO

	C3SLF		C4SLF	
FKBP12	-	+	-	+
%xlink para KRAS	9,6	47,5	7,0	69,8

[00543] Em paralelo à análise de espectrometria de massa, as reações de reticulação com C3 ou C4SLF foram submetidas para ensaio de deslocamento de gel usando-se SDS-PAGE a 12% na presença ou ausência de FKBP12 na mesma condição experimental descrita acima exceto que as reações de reticulação foram configuradas em concentrações maiores (KRAS a 60 μ M, FKBP12 a 180 μ M e C3 ou C4SLF a 180 μ M) e os mesmos foram arrefecidos bruscamente por MMTS para terminar a reação. Similar aos dados de MS, a eficiência de reticulação de ligante foi reforçada significativamente na presença de FKBP12, que é mais pronunciada para C4SLF (Figura 6).

EXEMPLO 5: DETERMINAÇÃO DE ESTRUTURA DE INTERFACE DE PROTEÍNA APRESENTADORA/PROTEÍNA-ALVO POR ANÁLISE DE RAIOS X

[00544] Este protocolo descreve o método de determinação de estrutura e cristalização para a estrutura de cristal de um complexo ternário de FKBP12-C2Holt-KRAS_{GTP/S39C}.

A. DETERMINAÇÃO DE ESTRUTURA DE CRISTAL DE COMPLEXO TERNÁRIO FKBP12-C2HOLT-KRAS_{GTP/S39C}

[00545] *Reagentes:* Ligante (C2Holt) em 100% de DMSO (interno),

FKBP12 (interno), KRAS_{GTP/S39C} lite (interno, resíduos 1 a 169 que contém G12V/S39C/C51S/C80L/C118S).

[00546] *Equipamento:* Superdex 75 (GE Healthcare)

[00547] *Protocolo Experimental:* C Holt e FKBP12 foram adicionados a KRAS_{GTP/S39C} lite no excesso molar de 3:1 e 1,5:1 em HEPES a 12,5 mM com pH 7,4, tampão de NaCl a 75 mM, MgCl₂ a 1 mM, 2% de DMSO, e incubados de um dia para o outro a 20°C ou 36 a 72 horas a 4°C. O complexo puro foi isolado por cromatografia de exclusão de tamanho numa coluna Superdex 75 em HEPES a 12,5 mM com pH 7,4, NaCl a 75 mM, e MgCl₂ a 1 mM. O complexo purificado (em 15 a 20 mg/ml) foi submetido a triagem de cristalização a 20°C usando-se método de difusão de vapor de gota depositada. Os cristais foram cultivados numa solução de poço que contém MES a 0,1 M com pH 6,5, 20 a 22% de PEG 20,000. Para cristais de coleção de dados foram transferidos para uma solução que contém o licor mãe suplementado com 15% de glicerol e, então, congelados em nitrogênio líquido. Os conjuntos de dados de difração foram coletados na Fonte de Fóton Avançada (APS) e processados com o programa HKL. As soluções de substituição molecular foram obtidas usando-se o programa PHASER no suíte CCP4, usando-se a estrutura publicada de FKBP12 (PDB-ID 1FKD) e KRAS (PDB-ID 3GFT) como modelos de busca. O refino e construção de modelo subsequente foram realizados de acordo com protocolos padrão com os pacotes de software CCP4 e COOT.

[00548] *Resultados:* A estrutura geral de FKBP12-C2Holt - KRAS_{GTP/S39C}: O cristal contém um heterodímero de FKBP12 e KRAS-GTP/S39C na unidade assimétrica (Figura 7). O modelo compreendia resíduos Met1 a Glu108 de FKBP12 e Met1 a Lys169 de KRAS_{GTP/S39C}. A densidade de elétron resultante mostra o modo de ligação não ambíguo, incluindo a orientação e conformação do ligante. A densidade de elétron contínua foi observada para o dissulfeto gerado da cisteína

da proteína e o enxofre do ligante.

[00549] Os resíduos de KRAS_{GTP/S39C} envolvidos na ligação de C2Holt (4 Å distância limite) são Glu37, Cys39, Leu56, e Met67. Os resíduos de KRAS_{GTP/S39C} envolvidos na ligação a FKBP12 são Glu3, Lys5, Ile36, Cys39, Tyr40, Arg41, Asp54, Glu63, Tyr64, Met67 e Arg73. Os resíduos de FKBP12 envolvidos na ligação de KRAS_{GTP/S39C} são Arg43, Lys53, Gln54, Glu55, Thr86, Pro89, Gly90, e Ile92. Os resíduos de FKBP12 envolvidos na ligação de C2Holt são Tyr27, Phe37, Asp38, Phe47, Glu55, Val56, Ile57, Trp60, Tyr83, His88, Ile91, Ile92, e Phe100.

[00550] A área de superfície enterrada total do complexo é 1947 Å². A área de superfície enterrada de KRAS_{GTP/S39C} é 600 Å² da qual 501 Å² é contribuída por FKBP12 (83%), e 99 Å² contribuída por C2Holt (17%). A área de superfície enterrada de FKBP12 é 762 Å² da qual 500 Å² contribuído por KRAS_{GTP/S39C} (66%) e 262 Å² contribuído por C2Holt (34%). A área de superfície enterrada de C2Holt é 584 Å² da qual 132 Å² contribuído por KRAS_{GTP/S39C} (23%) e 452 Å² contribuído por FKBP12 (77%). A interface de proteína-proteína entre KRAS_{GTP/S39C} e FKBP12 é formado por ambas as interações hidrofóbicas e polares, incluindo três ligações H intermoleculares. A interface de ligação entre C2Holt e FKBP12 é bastante contribuído por interações hidrofóbicas, mas também contribuído por três ligações H entre três grupos carbonila do ligante e Tyr27, Ile57, e Tyr83 de FKBP12. C2Holt forma contato mínimo com KRAS_{GTP/S39C} por design (99 Å²), mas forma uma ligação H com Glu37 de KRAS_{GTP/S39C}. Coleção de dados e estatística de refino da estrutura final são listados na Tabela 5 abaixo.

B. DETERMINAÇÃO DE ESTRUTURA DE CRISTAL DE COMPLEXO TERNÁRIO KRAS_{GDP/S39C}/SFAC4DS/CYPAC_{C52S}

[00551] *Reagentes:* Ligante (SFAC4DS) em 100% de DMSO (interno), CypAC_{C52S} (interno), KRAS_{GDP/S39C} lite (interno, resíduos 1 a 169

que contém G12V/S39C/C51S/C80L/C118S).

[00552] *Equipamento:* Superdex 75 (GE Healthcare)

[00553] *Protocolo Experimental:* SFAC4DS e CypAc_{52S} foram adicionados a KRAS_{GDP/S39C} lite em excesso molar de 2:1 e 2:1 em HEPES a 12,5 mM com pH 7,4, tampão de NaCl a 75 mM, MgCl₂ a 1 mM, 2% de DMSO, e incubados de um dia para o outro a 20°C. O complexo puro foi isolado por cromatografia de exclusão de tamanho numa coluna Superdex 75 em HEPES a 12,5 mM com pH 7,4, NaCl a 75 mM e MgCl₂ a 1 mM. O complexo purificado (a 15 mg/ml) foi submetido a triagem de cristalização a 20°C usando-se método de difusão de vapor de gota depositada. Os cristais foram cultivados numa solução de poço que contém Bis-Tris a 0,1 M com pH 6,5, 25 % de PEG 3350. Para coleção de dados, os cristais foram transferidos para uma solução que contém licor mãe suplementado com extra PEG 3350 para tornar 40% de PEG e, então, congelado em nitrogênio líquido. Os conjuntos de dados de difração foram coletados na Fonte de Luz Avançada (ALS) e processados com o programa HKL. As soluções de substituição molecular foram obtidas usando-se o programa PHASER no suíte CCP4, usando-se a estrutura publicada de CypA (PDB-ID 1CWA) e KRAS (PDB-ID 3GFT) como modelos de busca. O refino e construção de modelo subsequente foram realizados de acordo com protocolos padrão com os pacotes de software CCP4 e COOT.

[00554] *Resultados:* Estrutura geral de CypAc_{52S}-SFAC4DS - KRAS_{GDP/S39C}: O cristal contém um heterodímero de CypAc_{52S} e KRAS_{GDP/S39C} na unidade assimétrica (Figura 8). O modelo compreendido resíduos Met1 a Glu165 de CypA e Met1 a Lys169 de KRAS-GDP/S39C. A densidade de elétron resultante mostra o modo de ligação não ambíguo, incluindo a orientação e conformação do ligante. A densidade de elétron contínua foi observada para o dissulfeto gerado da cisteína da proteína e o enxofre do ligante.

[00555] Os resíduos de KRAS_{GDP/S39C} envolvidos na ligação de SFAC4DS (4 Å distância limite) são Glu3, Lys5, Cys39, Arg41, Leu52, Asp54, Ile55 e Leu56. Os resíduos de KRAS_{GDP/S39C} envolvidos na ligação a CypA_{C52S} são Glu37, Asp38, Cys39, Arg41, Gln43, Leu56, Ala66, Met67, Gln70 e Thr74. Os resíduos de CypA_{C52S} envolvidos na ligação de KRAS_{GDP/S39C} são Arg55, Ile57, Arg69, Asn71, Thr73, Ala81, Ala103, Arg148 e Asn149. Os resíduos de CypA_{C52S} envolvidos na ligação de SFAC4DS são Arg55, Phe60, Met61, Gln63, Gly72, Ala101, Asn102, Gln111, Phe113 e His126.

[00556] A área de superfície enterrada total deste complexo não pode ser calculada devido ao distúrbio estrutural parcial na interface de proteína-proteína. Excluindo a região desordenada para cálculo, a área de superfície enterrada na interface de proteína-proteína é maior do que 1350 Å², da qual mais que 30% é contribuído por SFAC4DS (443 Å²). A interface de proteína-proteína entre KRAS_{GDP/S39C} e CypA_{C52S} é formado por ambas as interações hidrofóbicas e polares, incluindo duas ligações H intermoleculares. A interface de ligação entre SFAC4DS e CypA é contribuída tanto por ambas as interações hidrofóbicas e polares. Existem seis ligações H entre os grupos carbonila e N-H do ligante e resíduos Arg55, Gln63, Asn102, e His126 de CypA_{C52S}. SFAC4DS forma contato direto mínimo com KRAS_{GDP/S39C} mas forma uma ligação H com Arg41 de KRAS_{GDP/S39C}. Coleção de dados e estatística de refino da estrutura final são listados na Tabela 5 abaixo.

C. DETERMINAÇÃO DE ESTRUTURA DE CRISTAL DE COMPLEXO TERNÁRIO PTP1B_{S187C}/C3SLF/FKBP12

[00557] *Reagentes:* Ligante (C3SLF) em 100% de DMSO (interno), FKBP12 (interno), PTP1B_{S187C} lite (interno, resíduos 1 a 169 que contêm C32S/C92V/C121S/S187C).

[00558] *Equipamento:* Superdex 75 (GE Healthcare), Gryphon (Art

Robbins Instruments)

[00559] *Protocolo Experimental:* C3SLF e FKBP12 foram adicionados a PTP1B_{S187C} lite em excesso molar de 3:1 em HEPES a 12,5 mM com pH 7,4, tampão de NaCl a 75 mM, 4% de DMSO, e incubados por 36 a 72 horas a 4°C. O complexo puro foi isolado por cromatografia de exclusão de tamanho numa coluna Superdex 75 em HEPES a 12,5 mM com pH 7,4 e NaCl a 75 mM. O complexo purificado (a 15 mg/ml) foi submetido a triagem de cristalização a 20°C usando-se método de difusão de vapor de gota depositada. Os cristais foram cultivados numa solução de poço que contém Acetato de Magnésio a 0,2 M, 20 % p/v de PEG 3350. Para coleção de dados, os cristais foram transferidos para uma solução que contém licor mãe suplementado com 25% de PEG400 e, então, congelados em nitrogênio líquido. Os conjuntos de dados de difração foram coletados na Fonte de Fóton Avançada (APS) e processados com o programa XDS. As soluções de substituição molecular foram obtidas usando-se o programa PHASER na suíte CCP4, usando-se a estrutura publicada de FKBP12 (PDB-ID 2PPN) e PTP1B (PDB-ID 2NT7) como modelos de busca. O refino e construção de modelo subsequente foram realizados de acordo com protocolos padrão com os pacotes de software CCP4 e COOT.

[00560] *Resultados:* A estrutura geral de FKBP12-C3SLF-PTP1B_{S187C}: O cristal contém duas moléculas de complexo de FKBP12-C3SLF-PTP1B_{S187C} na unidade assimétrica (Figura 9A). O modelo compreendia resíduos Gly2 a Glu108 de FKBP12 e Glu6 a Phe280 de PTP1B_{S187C}. A densidade de elétron resultante mostra o modo de ligação não ambíguo, incluindo a orientação e conformação do ligante. A densidade de elétron contínua foi observada para o disulfeto gerado da cisteína da proteína e o enxofre do ligante.

[00561] A área de superfície enterrada total do complexo é 1042 Å². A área de superfície enterrada de PTP1B_{S187C} é 427 Å². A área de su-

perfície enterrada de C3SLF é 615 Å² (Figura 9B). A interface de proteína-proteína entre PTP1B_{S187C} e FKBP12 é formada por ambas as interações hidrofóbicas e polares.

D. DETERMINAÇÃO DE ESTRUTURA DE CRISTAL DE COMPLEXO TERNÁRIO MCL1_{S245C}/C3SLF/FKBP52

[00562] *Reagentes:* Ligante (C3SLF) em 100% DMSO (interno), FKBP52 (interno, resíduos 1 a 140), MCL1_{S245C} lite (interno, resíduos 172 a 327 que contém S245C/C286S).

[00563] *Equipamento:* Superdex 75 (GE Healthcare), Gryphon (Art Robbins Instruments)

[00564] *Protocolo Experimental:* C3SLF e FKBP52 foram misturados com MCL1_{S245C} lite em excesso molar de 3:1 em HEPES a 12,5 mM com pH 7,4, tampão de NaCl a 75 mM, 2% de DMSO, e incubados por 24 a 48 horas a 4°C. O complexo puro foi isolado por cromatografia de exclusão de tamanho numa coluna Superdex 75 em HEPES a 12,5 mM com pH 7,4 e NaCl a 75 mM. O complexo purificado (a 15 mg/ml) foi submetido a triagem de cristalização a 20°C usando-se método de difusão de vapor de gota depositada. Os cristais foram cultivados numa solução de poço que contém Ácido Málico a 2,1 M. Para a coleção de dados, os cristais foram transferidos para uma solução que contém o licor mãe suplementado com 20% de glicerol e, então, congelado rapidamente em nitrogênio líquido. O conjunto de dados de difração de resolução de 3,0 Å foi medido na Fonte de Fóton Avançada (APS) e processado com o programa XDS. As soluções de substituições moleculares foram obtidas usando-se o programa PHASER no suíte CCP4, usando-se a estrutura publicada de FKBP52 (PDB-ID 1N1A) e PTP1B (PDB-ID 3MK8) como modelos de busca. O refino e construção de modelo subsequente foram realizados de acordo com protocolos padrão com os pacotes de software CCP4 e COOT.

[00565] *Resultados:* O cristal contém uma molécula de complexo de

MCL1_{S245C}/C3SLF/FKBP52 na unidade assimétrica (Figura 10). A densidade de elétron resultante revelou ligação não ambígua entre duas proteínas, incluindo a orientação e conformação do ligante. A densidade de elétron contínua foi observada para o dissulfeto gerado da cisteína da proteína e o enxofre do ligante. A área de superfície enterrada total do complexo é 1410 Å², da qual aproximadamente 60% é contribuído por FKBP52 (804 Å²), e aproximadamente 40% por C3SLF (606 Å²). Devido à resolução limitada, a análise detalhada na interação de proteína-proteína e proteína-ligante não foi factível.

TABELA 5. COLEÇÃO DE DADOS E ESTATÍSTICAS DE REFINO

	Estrutura A	Estrutura B	Estrutura C	Estrutura D
Resolução [A]	47,8-1,4	70,1-1,6	49,0-2,4	65,9-3,0
Número de reflexões (trabalho/teste)	50.557/2	34.377/1	30.175/1	5.343/24
R _{crist} [%]	18,9	17,9	23,0	33,2
R _{livre} [%] ¹	21,7	21,2	28,1	37,8
Número total de átomos:				
Proteína	2.202	2.528	6.192	2.035
Água	268	171	38	0
Ligantes	69	63	43	43
Íons	1	1	0	0
Desvio da geometria ideal: ²				
Comprimentos de ligação [A]	0,007	0,011	0,004	0,010
Ângulos de ligação [°]	1,33	1,49	0,87	1,30
Gráfico de Ramachandran: ³				
Regiões mais favorecidas [%]	93,8	96,5	93,3	95,2
Regiões permitidas [%]	6,2	3,1	4,9	4,4
Região não permitida [%]	0,0	0,3	1,8	0,4

¹ Conjunto de teste mantém 5% das reflexões medidas

² Desvios de raiz quadrada média de valores alvo geométricos

³ Calculado com RAMPAGE

EXEMPLO 6: DETERMINAÇÃO DE FORMAÇÃO DE COMPLEXO POR TR-FRET

[00566] Tecnologia de TR-FRET (LANCE, Perkin Elmer) é um método padrão para detectar a associação binária de duas proteínas marcadas por fusão, por exemplo, proteína 1/etiqueta A e proteína 2/etiqueta B, em que A e B podem ser qualquer um dentre glutationa-S-transferase (GST), hexahistidina (His₆), FLAG, biotin-avi, Myc, e Hemaglutinina (HA). Neste exemplo, a tecnologia é usada para medir a associação facilitada por composto de uma proteína apresentadora com uma proteína-alvo. Uma mistura de uma proteína apresentadora/etiqueta A e uma proteína-alvo/etiqueta B são adicionadas a uma placa de ensaio de 384 poços que contém compostos da invenção e incubados para 15 minutos. Uma mistura de doador de európio-quelato A ou B de etiqueta antifusão e reagentes de aceitador de luz U ou aceitador aloficolina A ou B de etiqueta antifusão são adicionados e as reações são incubadas por 240 minutos. O sinal TR-FRET é lido num leitor de microplaca de Envision (Perkin Elmer) usando-se excitação = 320 nm, emissão = 665/615 nm. Os compostos que facilitam a formação de complexo ternário são identificados como aqueles que elicitam um aumento na razão de TR-FRET em relação a poços de controle de DMSO.

DETERMINAÇÃO DA FORMAÇÃO DE COMPLEXO CYPA-COMPOSTO 3-KRAS_{G12C-GTP} POR TR-FRET

[00567] Ciclofilina A etiquetada com Avi e KRAS_{G12C-GTP} etiquetada com His foram misturados com concentração crescente de ligante (Composto 3) e incubada à temperatura ambiente por 15 minutos para permitir a formação de complexo ternário. Uma pré-mistura de Anti-His Eu-W1024 e Streptavidin APC foi adicionada e incubada por 60 minutos. O sinal de TR-FRET é lido num leitor de microplaca de EnVision (Perkin Elmer, Ex 320 nm, Em 665/615 nm). Uma contrariagem sem

proteína apresentadora e alvo também é executada para excluir a contribuição de compostos sozinhos.

[00568] *REAGENTES E INSTRUMENTO*

[00569] • His6-KRAS_{G12C-GTP} (interno; resíduos 1 a 169); 1,2 mM em tampão de PBS, pH 7,4

[00570] • Avi-CYPA (interno; resíduos 1 a 165); 556 µM em tampão de PBS, pH 7,4

[00571] • Eu-W1024 Anti-His (Perkin Elmer)

[00572] • Streptavidin APC (Perkin Elmer)

[00573] • Ligante (W21487), 10 mM em 100% de DMSO

[00574] • EnVision (Perkin Elmer)

[00575] • dispensador de líquido de multigotas Combi com cassete de volume pequeno de 8 canais

[00576] • ProxiPlate de 384-w (preto)

[00577] *PROTOCOLO EXPERIMENTAL*

[00578] 1. Uso de Mosquito para dispensar 100 nL/poço de compostos (concentração variada em DMSO) em ProxiPlate preta de 384-w para produzir placa pronta para ensaio (ARP).

[00579] 2. Produzir 2 x tampão de ensaio que contém Hepes a 40 mM com pH 8,0, NaCl a 200 mM, MgCl₂ a 2 mM, 0,1% de BSA e 0,004% de Tween-20.

[00580] 3. Produzir 2x PRE-MIX A: 100 nM de His6-KRas G12C-GTP (1-169) e 1000 nM de Avi-CypA (1 a 165) em 1X tampão de ensaio.

[00581] 4. Usar MutiDrop Combi para dispensar 2x PRE-MIX A em ARP, 5 µL/poço. Incubar por 15 min à TA.

[00582] 5. Produzir 2X PRE-MIX B: 10 nM de Eu-W1024 anti-His e 40 nM de SA APC.

[00583] 6. Usar MutiDrop Combi para dispensar 2x PRE-MIX B em ARP, 5 µL/poço. Sacudir brevemente em Combi e incubar por 60 min à

TA.

[00584] 7. Ler em EnVision (Ex: 320 nm; Em1: 615 nm; Em2: 665 nm).

[00585] 8. Os dados são processados usando-se Dotmatics. As curvas são ajustadas usando-se um ajuste não linear de 4 parâmetros para determinar o valor de EC50 para formação do complexo ternário.

[00586] *Resultados:* A curva de ligação (Figura 11) demonstra a formação de complexo dependente de Composto 3 de complexo ternário CYPA-Composto 3- KRAS_{G12C-GTP}, com um valor de EC50 calculado de 2,1 μ M

EXEMPLO 7: DETERMINAÇÃO DE FORMAÇÃO DE COMPLEXO POR ENSAIO HOMOGÊNEO DE PROXIMIDADE LUMINESCENTE AMPLIFICADA

[00587] A tecnologia AlphaScreen (Perkin Elmer) é um método padrão para detectar a associação binária de duas proteínas marcadas por fusão, por exemplo, proteína 1/etiqueta A e proteína 2/etiqueta B, em que A e B podem ser qualquer dentre glutationa-S-transferase (GST), hexahistidina (His₆), FLAG, biotin-avi, Myc, e Hemaglutinina (HA). Neste exemplo, a tecnologia é usada para medir a associação facilitada por composto de uma proteína apresentadora com uma proteína-alvo. Uma mistura de proteína apresentadora/etiqueta A e proteína-alvo/etiqueta B são adicionados a uma placa de ensaio de 384 poços que contêm compostos da invenção e incubados por 15 minutos. Uma mistura de esferas doadoras de AlphaScreen de etiqueta antifusão A ou B e esferas de aceitador de AlphaScreen de etiqueta antifusão A ou B são adicionados e as reações são incubadas por 240 minutos. O sinal de AlphaScreen é lido num leitor de microplaca de Envision (Perkin Elmer) usando-se excitação = 680 nm, emissão = 585 nm. Os compostos que facilitam a formação de complexo ternário são identificados como aquelas que elicitam um aumento no sinal de AlphaS-

creen em relação aos poços de controle de DMSO.

DETERMINAÇÃO DE FORMAÇÃO DE COMPLEXO CYPA-COMPOSTO 3- KRAS_{G12C-GTP}POR ALFA LISA

[00588] Ciclofilina A etiquetada com Avi e KRAS_{G12C-GTP} etiquetada com His foram misturados com concentração crescente de ligante (Composto 3) e incubada à temperatura ambiente por 60 minutos para permitir a formação de complexo ternário. Uma pré-mistura de esferas de doador de quelato de níquel e esferas de aceitador de estreptavidina foram, então, adicionados e incubados por 60 minutos. O sinal de AlphaLISA é lido num leitor de microplaca de EnVision (Perkin Elmer, Ex 680 nm, Em 615 nm). Uma contratriagem sem proteína apresentadora e alvo também é executada para excluir a contribuição de compostos sozinhos.

[00589] *REAGENTES E INSTRUMENTO:*

[00590] • His6-KRAS_{G12C-GTP} (interno; resíduos 1 a 169); 1,2 mM em tampão de PBS, pH 7,4

[00591] • Avi-CYPA (interno; resíduos 1 a 165); 556 uM em tampão de PBS, pH 7,4

[00592] • Esferas de doador de quelato de níquel (Perkin Elmer)

[00593] • Esferas de aceitador de estreptavidina (Perkin Elmer)

[00594] • Ligante (W21487), 10 mM em 100% de DMSO

[00595] • EnVision (Perkin Elmer)

[00596] • dispensador de líquido de multigotas Combi com cassete de volume pequeno de 8 canais

[00597] • placa alfaPlate-384 (branca)

[00598] *PROTOCOLO EXPERIMENTAL:*

[00599] 1. Usar Mosquito para dispensar 100 nl/poço de compostos (concentração variada em DMSO) em ProxiPlate preto de 384 poços para produzir placa pronta para ensaio (ARP).

[00600] 2. Produzir tampão de ensaio 2X que contém Hepes a 40

mM com pH 8,0, NaCl a 200 mM, MgCl₂ a 2 mM e 0,004% de Tween-20.

[00601] 3. Produzir 2x PRE-MIX A: 300 nM de His6-KRas G12C-GTP (1-169) e 300 nM de Avi-CypA (1 a 165) em 1X tampão de ensaio.

[00602] 4. Usar MutiDrop Combi para dispensar 2x PRE-MIX A em ARP, 5 µl/poço. Incubar por 60 min à TA.

[00603] 5. Produzir 2X PRE-MIX B: 30 µg/ml de esferas de aceitador de estreptavidina e 30 µg/ml de esferas de doador de quelato de níquel.

[00604] 6. Usar MutiDrop Combi para dispensar 2x PRE-MIX B em ARP, 5 µl/poço. Sacudir brevemente em Combi e incubar por 60 min à TA.

[00605] 7. Ler em EnVision (Ex: 680 nm; Em1: 615nm).

[00606] 8. Os dados são processados usando-se Dotmatics. As curvas são ajustadas usando-se um ajuste não linear de 4 parâmetros para determinar o valor de EC50 para formação do complexo ternário.

[00607] *Resultados:* A curva de ligação (Figura 12) demonstra a formação de complexo dependente de Composto 3 do complexo ternário CYPA-Composto 3-KRAS_{G12C-GTP}, com um valor de EC50 calculado de 0,99 µM.

EXEMPLO 8: DETERMINAÇÃO DE FORMAÇÃO DE COMPLEXO POR CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA

[00608] Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) é uma técnica biofísica estabelecida usada para medir diretamente a mudança térmica associada à interação binária de duas proteínas ou proteína a um ligante. A medição da mudança térmica permite a determinação precisa de constantes de associação (K_a), estequiometria de reação (N), e a mudança na entalpia de ligação (ΔH). As mudanças de energia de Gibbs (ΔG) e mudanças de entropia (ΔS) também podem ser determi-

nadas usando-se a relação: $\Delta G = -RT\ln K_a = \Delta H - T\Delta S$ (em que R é a constante de gás e T é a temperatura absoluta). Neste exemplo, o método é usado para medir a ligação (por exemplo, ligação não covalente ou covalente) de um composto ou conjugado da invenção a uma proteína apresentadora.

DETERMINAÇÃO CINÉTICA E TERMODINÂMICA DA LIGAÇÃO ENTRE FKBP12-COMPOSTO 1 E CEP250 POR ITC

[00609] *Reagentes:* Composto 1 e Composto 2 em 100% de DMSO (interno), Tampão de Proteína (HEPES a 10 mM, pH 7,5, NaCl a 75 mM, TCEP a 0,5 mM), tampão de ensaio (tampão de proteína + 1% de DMSO), FKBP12 (interno), CEP250_{29,4} (interno, resíduos 1982 a 2231) e CEP250_{11,4} (interno, resíduos 2134 a 2231).

[00610] *Equipamento:* MicroCal™ ITC₂₀₀ (GE Healthcare). Os parâmetros de instrumento são mostrados na Tabela 6.

TABELA 6. PARÂMETROS DE INSTRUMENTO DE CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA

Dispositivo Experimental	MicroCal™ ITC ₂₀₀ (GE Healthcare)
Volume de célula de amostra (μl)	270
Volume de injetor (μl)	40
Parâmetros Experimentais	
Número total de Injeções	19
Temperatura de célula (°C)	25
Potência de Referência (μCal/s)	5
Retardo Inicial (s)	200
Velocidade de Agitação (rpm)	750
Parâmetros de Injeção	
Volume (μl)	2
Duração (s)	4
Espaçamento (s)	170 a 200
Período de Filtro (s)	5
Modo de retroalimentação/Ganho	Alta

[00611] *Protocolo Experimental:* Solução estoque de FKBP12 é diluída em 10 μ M em tampão de ensaio (1% de DMSO final). Composto é adicionado ao FKBP12 a 20 μ M (1% de DMSO final), e o complexo binário é preenchido na célula de reação do dispositivo de ITC após o tempo de pré-incubação de 5 a 10 minutos. Os estoques de proteína CEP250 são diluídos em 50 μ M em tampão de ensaio e suplementados com composto a 20 μ M (1% de DMSO final) antes de ser preenchido na seringa de injeção. Um experimento de controle na ausência de composto também é executado para determinar o calor associado aos artefatos operacionais e a diluição de titulante à medida que é injetado a partir da seringa no interior da célula de reação. Os parâmetros experimentais mais detalhados são mostrados na Tabela 7.

TABELA 7. CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNA E LIGANTES FINAL

Experi- mento	Conteúdo de célula	Conteúdo de seringa	Ligante	conc. De DMSO (%)
3	FKBP12, 10 μ M	CEP250 _{29.2} , 50 μ M	Nenhum	1,0
4	FKBP12, 10 μ M	CEP250 _{11.4} , 50 μ M	Nenhum	1,0
5	FKBP12, 10 μ M	CEP250 _{29.2} , 118 μ M	Composto 1b, 20 μ M	1,0
6	FKBP12, 10 μ M	CEP250 _{29.2} , 118 μ M	Composto 2, 20 μ M	1,0
7	FKBP12, 10 μ M	CEP250 _{11.4} , 68 μ M	Composto 1b, 20 μ M	1,0
8	FKBP12, 10 μ M	CEP250 _{11.4} , 68 μ M	Composto 2, 20 μ M	1,0

[00612] Ajuste de Dados: Os dados foram ajustados com o software Origin ITC200 de acordo com o seguinte procedimento:

[00613] 1) Ler dados brutos

[00614] 2) Em "mRawITC": ajustar picos de integração e linha básica, integrar todos os picos

[00615] 3) Em "Delta H" - controle de dados: remover dados insatisfatórios (injeção nº 1 e outros artefatos), linha reta de subtração (subtração em segundo plano)

[00616] 4) Em "Delta H"- ajuste de modelo : selecionar *um conjunto de modelos de sítio*, realizar ajuste com o algoritmo de Levenberg-Marquardt até que Qui Quadrado não seja adicionalmente reduzido, finalizar com "pronto" (parâmetros N, K_d e ΔH são calculados com base em ajuste)

[00617] *Resultados:* Medições de ITC para a ligação dos complexos binários FKBP12-Composto 1 e FKBP12-Composto 2 a CEP250 são resumidas na Tabela 8 e Figura 13. Em geral, os dados para a ligação de complexos binários FKBP12-Composto 1 e FKBP12-Composto 2 a CEP250_{11,4} e CEP250_{29,4} mostram parâmetros de interação similares. Valores de K_d foram similares para todas as combinações. Todas as interações mostram um perfil termodinâmico quase idêntico em que a ligação é caracterizada por um modo de ligação puramente entálpico (termo $-T^*\Delta S$ é positivo e não contribui para a energia livre de Gibbs). As estequiometrias de ligação para todas as interações foram N=0,5 a 0,6 e suportam uma razão de ligação 1:2 para 1 ligação de homodímero de CEP250 a 2 moléculas de FKBP12, como evidenciado na estrutura de cristal de CEP250_{11,4}/Composto 1/FKBP12.

TABELA 8. DETERMINAÇÃO DE FORMAÇÃO DE COMPLEXO TERNÁRIO FKBP12-COMPOSTO 1-CEP250 POR ITC

Experi- mento	T (K)	N	K_d (μM)*	ΔH ($kJ \cdot mol^{-1}$)**	$-T^*\Delta S$ ($kJ \cdot mol^{-1}$ ***)	ΔH ($kJ \cdot mol^{-1}$)****
3	298	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4	298	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
5	298	0,50	0,19	-52,21	13,80	-38,41
6	298	0,57	0,36	-58,48	21,73	-36,74
7	298	0,56	0,07	-49,37	8,62	-40,75
8	298	0,54	0,08	-47,78	7,41	-40,36

* K_d (calculado a partir de $K_a = 1/K_d$)

** ΔH

*** $T^* \Delta S$ (calculado a partir de $-T\Delta S = \Delta G - \Delta H$)

**** $\Delta G = -RT \ln K_a = RT \ln K_d$

EXEMPLO 9: DETERMINAÇÃO DE CINÉTICA DE LIGAÇÃO ENTRE CONJUGADOS E PROTEÍNAS POR RESSONÂNCIA DE PLASMON DE SUPERFÍCIE

[00618] Ressonância de Plasmon de Superfície (SPR) é uma técnica biofísica usada para medir a cinética associada à interação binária de duas proteínas ou uma proteína a um ligante. Tipicamente, um componente do par de interação binário é imobilizado numa célula fluxo de um chip de sensor de ativado por meio de uma etiqueta de fusão. As concentrações crescentes do segundo componente (o analito) são, então, injetadas sobre a superfície ativa por um tempo fixo. Um aumento no sinal de SPR (expresso em unidades de ressonância, RU) durante a fase de associação e diminuição no sinal de SPR durante a fase de dissociação é indicativa de uma interação pode ser ajustada para determinar valores de K_D , K_a , K_d associados. Neste exemplo, o método é usado para medir a cinética para a ligação de um conjugado da invenção a uma proteína apresentadora, em que (i) o conjugado é imobilizado no chip por meio de etiqueta de fusão e uma proteína apresentadora é injetada sobre a superfície, ou (ii) uma proteína apresentadora é imobilizada no chip por meio de etiqueta de fusão e um conjugado é injetado sobre a superfície.

DETERMINAÇÃO DE CINÉTICA DE LIGAÇÃO ENTRE FKBP12-COMPOSTO 1 E CEP250 POR SPR

[00619] Este protocolo utiliza a Ressonância de Plasmon de Superfície (SPR) como um método para determinar a cinética (K_D , K_a , K_d) para a ligação de CEP250 (analito) ao complexo binário FKBP12-Composto 1 imobilizado (ligante).

[00620] *Reagentes:* Composto 1 em 100% de DMSO (interno), 10 X

HBS-P+ tampão (GE Healthcare BR-1006-71), Tampão de ensaio (1 X HBS-P+ tampão, 1% de DMSO, Composto 1 a 1 μ M), FKBP12 etiquetado com 12 x HIS (interno), CEP250_{29,2} (resíduos 1982-2231) e CEP250_{11,4} (resíduos 2134-2231) (interno).

[00621] *Equipamento:* BIACORE™ X100 (GE Healthcare)

[00622] *Suprimentos:* Chip de Sensor NTA (GE Healthcare BR-1000-34)

[00623] *Protocolo Experimental:* Os experimentos são realizados a 25°C. A solução estoque de FKBP12 etiquetado com 12XHIS é diluída em 100 nM em tampão de ensaio que contém Composto 1 a 1 μ M (1% de DMSO final). Aproximadamente 200-400 RU de FKBP12 é imobilizado numa dentre duas células de fluxo de um chip de NTA ativado. A segunda célula de fluxo não é ativada como uma referência para interação não específica do analito para o chip de sensor. Várias concentrações de CEP250 (faixa de 1 nM-1 μ M), serialmente diluídas no mesmo tampão de ensaio que contém Composto 1 a 1 μ M (1% de DMSO final), são injetadas sobre a superfície de FKBP12 e superfície de referência numa taxa de fluxo de 10 μ l/min. A superfície é regenerada entre injeções de analito com EDTA a 350 mM.

[00624] *Ajuste de Dados:* O programa de software BiaEvaluation é usado para ajuste de dados. Todos os dados são referências subtraídas em relação à célula de fluxo de referência e uma injeção de tampão. Para análises de cinética, os dados são ajustados localmente num modelo de interação 1:1.

[00625] *Resultados:* Sensorgramas de SPR e são mostrados na Figura 14. Constantes de dissociação (K_D) de 5,4 nM e 0,29 nM foram determinadas para a ligação de FKBP12/Composto 1 a CEP250_{11,4} e CEP250_{29,2}, respectivamente.

EXEMPLO 10: DETERMINAÇÃO DE CINÉTICA DE LIGAÇÃO ENTRE CONJUGADOS E PROTEÍNAS POR INTERFEROMETRIA DE

BIOCAMADA

[00626] A Interferometria de Biocamada (BLI) é uma técnica biofísica usada para medir a cinética associada à interação binária de duas proteínas ou uma proteína a um ligante. Tipicamente, um componente do par de interação binário é imobilizado numa ponta de biosensor por meio de uma etiqueta de fusão. Concentrações crescentes do segundo componente (o analito) são, então, injetadas sobre a ponta de biosensor por um tempo fixo. Um aumento no sinal de BLI (expresso em espessura óptica, nm) durante a fase de associação e diminuição no sinal de BLI durante a fase de dissociação é indicativo de uma interação e pode ser ajustado para um modelo de ligação para determinar os valores de K_D , K_a , K_d associados. Neste exemplo, o método é usado para medir a cinética para a ligação de um conjugado da invenção a uma proteína apresentadora, em que (i) o conjugado é imobilizado na ponta por meio da etiqueta de fusão e uma proteína apresentadora é injetada sobre a superfície, ou (ii) uma proteína apresentadora é imobilizada sobre a ponta por meio de uma etiqueta de fusão e um conjugado é injetado sobre a superfície.

DETERMINAÇÃO DE CINÉTICA DE LIGAÇÃO ENTRE CYPA-COMPOSTO 3 E KRAS_{G12C-GTP} POR BLI

[00627] Este protocolo utiliza a Interferometria de Biocamada (BLI) como um método para determinar a constante de dissociação (K_D) para a ligação de KRAS_{G12C-GTP} (analito) ao complexo binário CYPA-Composto 3 imobilizado (ligante).

[00628] *Reagentes:* Composto 3 em 100% DMSO (interno), Tampão Cinético ForteBio (*FortéBio Inc.*, Menlo Park, CA), Tampão de Ensaio (Tampão Cinético, 1% de DMSO, Composto 3 a 2 μ M), CYPA etiquetado com Avi (interno), KRAS_{G12C-GTP} (resíduos 1 a 169) (interno).

[00629] *Equipamento:* Instrumento Octet Red 96 (*FortéBio Inc.*, Menlo Park, CA)

[00630] *Suprimentos:* Biossensores de estreptavidina (SA) (FortéBio)

[00631] *Protocolo Experimental:* Os biossensores de estreptavidina (SA) foram revestidos numa solução que contém proteína Avi-CYPA a 10 μ M a 25°C para um sinal de carregamento de 0,6 nm. O carregamento da proteína mostrou estabilidade ao longo do tempo e uma ausência de desvio de linha básica. A formação do complexo ternário foi avaliada em experimentos de resposta de dose com concentrações de proteína KRAS_{G12C-GTP} começando de 200 μ M numa série de diluição 1:2. Para controle negativo, os sensores revestidos com proteína Avi-CYPA foram imersos em poços que continham apenas o tampão de triagem (suplementado com Composto 3 a 2 μ M). Sensogramas de resposta de ligação foram registrados e analisados.

[00632] *Ajuste de Dados:* Análise no instrumento *FortéBio Octet RED* foi realizada usando-se o software *FortéBio*. A análise considera a ligação não específica, histórico e desvio de sinal e minimiza a variabilidade de sensor e com base em poço. A formação dependente de dose do complexo ternário foi observada e as constantes de dissociação de equilíbrio correspondentes (K_D) foram determinadas.

[00633] *Resultados:* Sensograma e curvas de ajuste de estado contínuo são mostradas na Figura 15. Uma constante de dissociação (K_D) de 44 μ M foi determinada para a ligação de CYPA/Composto 3 a KRAS_{G12C-GTP}.

EXEMPLO 11: IDENTIFICAÇÃO PROTEÔMICA DE PROTEÍNAS-ALVO LIGADAS A FKBP12 PARA REAGENTES DE RETICULAÇÃO

[00634] *Reagentes:* Composto em 100% DMSO (interno), biotina-FKBP12 N-terminal (interno), lisato celular HEK293T (interno).

[00635] *Protocolo Experimental:* Lisato de célula HEK293T foi preparado usando-se um tampão de lise que consiste em HEPES a 40 mM, pH 7,3, NaCl a 120 mM, MgCl₂ a 2 mM, CaCl₂ a 2 mM, octil-b-

glicosídeo, e coquetel de inibidor de protease livre de EDTA (Roche) usando-se sonicação (4, 10 segundos pulsos em 20% de potência) em gelo. O lisato foi primeiramente limpado por meio de centrifugação e o sobrenadante resultante é passado através de um filtro de seringa de 0,2 mm em gelo. FKBP12 rotulada com biotina N-terminal foi adicionada à 500 ml do lisato para uma concentração final de 4mM, misturado por meio de pipetagem e, então, o composto foi adicionado para uma concentração final de 10 mM com a reação sendo misturada por meio de pipetagem. 60 ml de resina de agarose-Streptavidina em pasta a 50% (pré-equilibrada no tampão de lise) foram adicionados e a reação é permitida prosseguir a 4°C com sacudimento gentil por 1 hora. Após a incubação, a resina foi granulada gentilmente, lavada 4 vezes com 1 ml de tampão de lise em gelo por meio de adição, centrifugação e aspiração e, então, lavada outras 4 vezes com 1 ml de tampão de lise sem detergente da mesma forma física. As proteínas retidas foram eluídas da resina usando-se Ureia a 8 M, pH 8,0 em tampão de HEPES, diluídas para Ureia a 7 M com HEPES a 100 mM, pH 8,0 e Endoproteinase Lys-C adicionada para digestão de proteína a 37°C por 2 horas. A seguir, a amostra foi diluída para Ureia a 0,8 M usando-se HEPES a 100 mM, pH 8,0, Tripsina foi adicionada, e a amostra digerida por 16 horas adicionais a 37°C. Após a digestão estar completa, a amostra foi preparada por análise de LC-MS/MS usando-se um filtro C18 SPE no qual a amostra foi carregada, lavada, eluída, dessecada num speed-vac, e finalmente suspensa em 10 ml de tampão de acetonitrila a 5%, ácido fórmico a 5% para análise de LC-MS/MS. A análise de LC-MS/MS foi realizada num espectrômetro de massa Thermo-Fisher LTQ-Velos-Pro OrbiTrap usando-se um método de aquisição dependente de 20 dados superiores e gradiente de acetonitrila de 8 a 35% para a HPLC. As sequências de peptídeos foram atribuídas usando-se o algoritmo de Sequest e proteínas identificadas são com-

paradas a amostras de controle (apenas DMSO) a fim de identificar proteínas-alvo candidatas.

[00636] *Resultados:* Usando-se o protocolo acima, >100 proteínas-alvo foram identificadas como tendo capacidade para ligação a uma proteína apresentadora na presença de um composto de reticulação. As proteínas identificadas incluem quinases, fosfatases, ubiquitina ligases, proteínas de ligação de DNA, proteínas de choque térmico, DNA helicases, proteínas ativadoras de GTPase, proteínas de ligação de nucleotídeo e proteínas de ligação de proteína miscelânea.

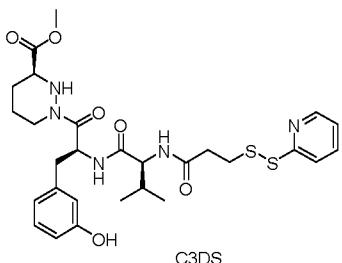
EXEMPLO 12: DETERMINAÇÃO DE LIGAÇÃO ENTRE CONJUGADOS E PROTEÍNAS POR POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA

[00637] A técnica de polarização de fluorescência (FP) se baseia na observação de que quando uma molécula rotulada fluorescentemente for excitada por luz polarizada, a mesma emite luz com um grau de polarização que é inversamente proporcional à taxa de rotação molecular. As moléculas pequenas giram rapidamente durante o estado excitado, e mediante emissão, têm valores de polarização baixos. Os complexos grandes, formados pela ligação de uma molécula rotulada a uma segunda molécula, giram pouco durante o estado excitado e, portanto, têm valores de polarização altos. Esta propriedade de fluorescência pode ser usada para medir a interação de um ligante rotulado com uma proteína maior e fornece uma base para ensaios de ligação de competição e direto. Neste exemplo, o método é usado para medir a ligação do composto ou conjugado da invenção à proteína apresentadora e estabelecer formação de complexo ternário com uma proteína-alvo.

DETERMINAÇÃO DE formação de complexo CypA:C3DS:KRAS POR FP

[00638] *Reagentes:* C3DS em 100% de DMSO (interno), Tampão de Proteína (HEPES a 12,5 mM com pH = 7,4, MgCl₂ a 1 mM), tampão

de ensaio (HEPES a 25 mM, pH 7,3, 0,002% de Tween 20, 0,1% de BSA, NaCl a 10 mM, MgCl₂ a 1 mM), CYPA (interno), KRAS (1 a 169 resíduos) carregado com Mant-GMP-PNP.



Equipamento: SpectraMax

[00639] *Protocolo Experimental:* Solução estoque de KRAS é carregada à concentração final de 0,8 μM no tampão de ensaio (1% de DMSO final). Composto (C3DS) é adicionado a uma concentração final de 10 μM e a mistura de reação é dispensada a uma placa preta Costar de 384 poços. CYPA é serialmente diluída nos poços da placa e permitida incubar por 15 minutos à temperatura ambiente. Um experimento de controle na ausência de composto também é executada para determinar a associação da CYPA a KRAS na ausência de composto. As misturas de reação são excitadas em 355nm e o sinal de emissão é gravado em 455 nm. Os sinais são medidos em planos perpendiculares e paralelos e a polarização é gravada usando-se a seguinte equação.

[00640] FP (unidades polarização x 10⁻³) = Sinal (Paralelo)-Sinal(Perpendicular)/ [Sinal (Paralelo)+Sinal(Perpendicular)]

[00641] *Resultados:* Uma curva representativa é mostrada na Figura 16 e uma tabela que lista EC50 (concentração necessária para aperfeiçoar o sinal de FP do KRAS por 50%) é listada abaixo. As curvas foram ajustadas para uma equação de quatro parâmetros e os EC50s obtidos indicam o efeito do ligante C3DS para aperfeiçoar a ligação entre CYPA e KRAS.

	CypA:Kras	CypA:C3DS:Kras
EC50	30 μM	2,3 μM

EXEMPLO 13: DETERMINAÇÃO DE LIGAÇÃO ENTRE CONJUGADOS E PROTEÍNAS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

[00642] A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica usada para solucionar estruturas tridimensionais e estudar a dinâmica das proteínas e complexos de proteína-ligante. Além disto, pode ser usado para identificar o sítio de ligação de ligante em interação de proteína-ligante. Dentre as várias abordagens de RMN disponíveis, a triagem de ligante com base em estrutura de proteína (espectro de ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC altamente sensível 2D) e identificação de resíduos críticos envolvidos na ligação de ligante (fármaco) é o método mais sensível para estes estudos. A adição de concentração de ligante sequencialmente crescente na amostra de RMN da proteína e coleção de ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC 2D fornece informações de perturbação de resíduo altamente resolvido de nível atômico, chamado de perturbação de deslocamento químico (CSP), que fornece diretamente mais informações precisas sob identificação de sítio de ligação de ligante não possível por qualquer outra técnica biofísica disponível. Com esta abordagem, afinidade fraca, intermediária e forte de ligação de ligante a uma proteína ou complexo de proteína binário pode ser estudado, e estas informações podem estar diretamente ligadas a informações estruturais, dinâmicas e cinéticas existentes. Neste exemplo, o método é usado para demonstrar ligação (por exemplo covalente ou não covalente) de um composto (fármaco) ou conjugado da invenção a uma proteína apresentadora.

DETERMINAÇÃO DE LIGAÇÃO DE KRAS(G12C)-CICLOFILIN-COMPOSTO 3 NO COMPLEXO TERNÁRIO POR ESPECTROSCOPIA DE RMN COM SOLUÇÃO

[00643] *Reagentes:* Composto 3 em 100% de DMSO (interno), Tampão de Proteína (TRIS-d₁₁ a 50 mM, NaCl a 50 mM, pH 7,0, TCEP-d₁₆ a 1 mM, MgCl₂ a 1 mM), Aditivos na amostra de RMN de

KRAS (DSS a 100 μ M em 93% de H₂O e 7% de D₂O), tampão de ensaio (tampão de proteína + equivalentes crescentes de fármaco em DMSO (\leq 5%)), GMP-¹⁵N-KRAS(G12C) -16 (N-His, resíduos 1 a 169, interno), Ciclofilina não rotulada (UL) (CYPA; resíduos 1 a 165) (interno).

[00644] *Equipamento:* Espectrômetro Bruker Avance 800 MHz equipado com criosonda de CPTCI ¹H-¹³C/¹⁵N/D Z-GRD Z44909/0026 de 5 mm (Bruker). Tubos de RMN de 5 mm de alta precisão são usados nestes experimentos.

[00645] *Análise e processamento de dados de RMN:* Computadores Linux executando Topspin v3,1 e NMRPipe/NMRDraw para processar, e programa de "análise" de CCPNMR para análise de dados.

[00646] *Protocolo Experimental:* Solução estoque de GMP-¹⁵N-KRAS(G12C)-16 de 0,72 mM em tampão de proteína foi usada para preparar a amostra de RMN a 0,18 mM em 600 μ l (incluindo aditivos de RMN). DSS foi usado como padrão interno (pico de ¹H em 0,0 ppm) para referenciamento de deslocamento químico. Espectro de ¹H-¹⁵N TROSY-HSQC 2D de ¹⁵N KRAS foi coletado (tamanho de dados de 2048x128). Uma equivalente (0,18 mM) de CYPA no tampão de proteína adicionou-se (da solução estoque de 0,4 mM) em amostra de RMN e agitada por 10 minutos. Volume de amostra de RMN Final foi mantido em 600 μ l. Espectro de ¹H-¹⁵N TROSY-HSQC 2D de complexo binário (¹⁵N-KRAS + UL-CYPA) foi coletado (tamanho de dados 2048x128) mantendo outros parâmetros de aquisição iguais (apenas picos cruzados de correlação de KRAS ¹H-¹⁵N são visíveis no espectro). Uma solução estoque de Composto 3 a 20 mM em 100% de DMSO foi usada para titulação de RMN. O Composto 3 foi adicionado sequencialmente na amostra de RMN para obter seus equivalentes de 0,5, 1,0, 2,5, e 5,0 (àquela de concentração de 15N-KRAS) na amostra de RMN do complexo binário (¹⁵N-KRAS + UL-CYPA). Em cada está-

gio o volume de amostra de 600 μ l foi mantido ao mesmo tempo em que mantinha os parâmetros de aquisição iguais. Em cada estágio de adição de Composto 3, espetro de ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC 2D foi adquirido para investigar a perturbação de deslocamento químico (CSP) de resíduos de KRAS. Todos os espetros foram superimpostos um ao outro. CSP eficaz em cada ponto de titulação de Composto 3 é determinado usando-se a diferença de deslocamentos químicos de cada resíduo de KRAS em complexo ternário (KRAS+CYPA+ Composto 3) versus o complexo binário (KRAS+CYPA). Subsequentemente, o deslocamento químico médio ponderado ($\Delta\delta_{\text{ponderado}}$) de cada resíduo de KRAS é determinado usando-se a fórmula abaixo:

$$\Delta\delta_{\text{ponderado}} = [(\Delta^1\text{H})^2 + (\Delta^{15}\text{N}/5)^2]^{1/2}$$

[00647] Os resíduos que elicitam $\Delta\delta_{\text{ponderado}}$ maior do que um desvio padrão de média geral são considerados significativamente perturbados e usados no mapeamento de sítio de ligação. Em experimentos de titulação separados, coletou-se espetros de ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC 2D de complexo binário (KRAS+CYPA) adicionando-se sequencialmente equivalentes de DMSO (para satisfazer a concentração de solvente equivalente como no experimento acima) para subtrair a contribuição da adição de DMSO. No segundo experimento de controle, coletou-se uma série de espetros de ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC 2D 15N-KRAS titulado com Composto 3 em diferentes equivalentes (na ausência de CYPA).

[00648] O CSP eficaz é tabulado e analisado. Resíduos de ligação de fármaco de KRAS (na presença de CYPA) são mapeados na superfície de proteína. Constante de dissociação, K_D , é determinada.

[00649] *Parâmetros de processamento e experimentais:*

Tamanho de dados de espetro: 2048 (dimensão 1H) x128 (dimensão 15N)

Número de varreduras: 4

Temperatura: 298 K

Modo de Detecção por Quadratura: DQD (1H) e Echo-AntiEcho (15N)

[00650] Tamanhos de dados foram estendidos aplicando-se previsão linear para frente e para trás dentro da dimensão indireta. Conjuntos de dados foram extrapolados por preenchimento zero uma vez em cada dimensão antes da transformação de Fourier.

[00651] *Resultados:* Espectro de 1H-15N TROSY-HSQC 2D de KRAS_{G12C-GTP} é mostrado na Figura 17A. Adicionar uma quantidade estequiométrica de CYPA não teve efeito sobre picos cruzados de estrutura principal de amida KRAS (Figura 17B), indicando que KRAS e CYPA não interagem diretamente. Titulação de W21487 numa amostra 1:1 de CYPA:KRAS elicitou deslocamentos químicos distintos (Figura 17C), indicativos de uma interação direta com KRAS.

EXEMPLO 14: DETERMINAÇÃO DE LIGAÇÃO ENTRE CONJUGADOS E PROTEÍNAS POR TERMOFORESE EM MICROESCALA

[00652] Termoforese em Microescala (MST) é uma técnica para caracterização de interações biomoleculares correlacionando-se quaisquer mudanças nas propriedades moleculares da molécula como tamanho, conformação à sua mobilidade num gradiente de temperatura direcionado. A geração do gradiente é induzida por um laser infravermelho. O movimento da biomolécula é frequentemente caracterizado rotulando-se a molécula usando-se fluoróforos fixados de modo covalente ou até mesmo fluorescência intrínseca. Neste exemplo, o método é usado para medir a ligação do composto ou conjugado da invenção à proteína apresentadora e estabelecer formação de complexo ternário com uma proteína-alvo, em que (i) o conjugado é rotulado com um fluoróforo e uma proteína apresentadora é titulada, ou (ii) uma proteína apresentadora é rotulada com um fluoróforo e um conjugado é titulado.

EXEMPLO 15: DETERMINAÇÃO DE LIGAÇÃO ENTRE CONJUGADOS E PROTEÍNAS POR TECNOLOGIA DE GERAÇÃO DE SE-

GUNDO HARMÔNICO

[00653] Geração de Segundo Harmônico (SHG) é um fenômeno óptico que pode ser usado para medir mudanças conformacionais na solução aquosa em tempo real. A intensidade de sinal de SHG é sensível à orientação angular média de corante rotulado a uma proteína aglutinada a uma superfície e magnitude da mudança de sinal se correlaciona diretamente à quantidade de mudança angular. Diferentes conformações podem ser classificadas por magnitude de mudança de sinal mediante ligação, sinal relativo à linha básica (mais orientações verticais em relação à superfície produzem mudanças de sinal positivas e vice-versa) e cinética. Neste exemplo, o método é usado para medir a ligação do composto ou conjugado da invenção à proteína apresentadora e estabelecer formação de complexo ternário com uma proteína-alvo, em que (i) um conjugado rotulado por corante é imobilizado sobre a superfície por meio de uma etiqueta de fusão e uma proteína apresentadora é injetada sobre a superfície, ou (ii) uma proteína apresentadora rotulada por corante é imobilizada sobre a superfície por meio de uma etiqueta de fusão e um conjugado é injetado sobre a superfície.

EXEMPLO 16: DETERMINAÇÃO DE LIGAÇÃO ENTRE CONJUGADOS E PROTEÍNAS POR FLUOROMETRIA DE VARREDURA DIFERENCIAL

[00654] Fluorometria de Varredura Diferencial (DSF) é uma técnica biofísica com base em solução usada para medir a temperatura de fusão (T_m) de uma proteína. num experimento típico, a proteína de interesse está sujeita a calor crescente (tipicamente de 4 °C a 95 °C) na presença de um corante fluorescente (por exemplo, laranja SYPRO). As intensidades fluorescentes são plotadas como uma função de temperatura e o T_m é calculado a partir do mínimo derivado negativo do sinal de fluorescência. Para uma proteína-alvo, o deslocamento térmico

co (ΔT_m) na presença de uma molécula pequena pode ser medido para avaliar se a molécula pequena se liga e estabiliza a proteína. Neste exemplo, o método é usado para medir o deslocamento térmico (por exemplo, ligação não covalente ou covalente) de um composto ou conjugado da invenção a uma proteína apresentadora, em que (i) o conjugado é rotulado com um corante fluorescente e uma proteína apresentadora é titulada, ou (ii) uma proteína apresentadora é rotulada com um corante fluorescente e um conjugado é titulado.

EXEMPLO 17: DETERMINAÇÃO DE LIGAÇÃO ENTRE CONJUGADOS E PROTEÍNAS POR NANODSF

[00655] NanoDSF é um método de DSF avançado para medir o T_m de uma proteína usando-se triptofano intrínseco ou fluorescência de tirosina. Em um experimento típico, a proteína de interesse está sujeita a calor crescente (tipicamente de 4 °C a 95 °C) e intensidades fluorescentes de resíduos de triptofano intrínseco ou tirosina são monitoradas como uma função de temperatura. T_m pode ser calculado a partir das mudanças na intensidade de fluorescência de triptofano, ou a partir da razão de emissão de triptofano em 330 e 350 nm, o que descreve o deslocamento de emissão de triptofano mediante o desenovelamento. Para uma proteína-alvo, ΔT_m na presença de uma molécula pequena pode ser medido para avaliar se a molécula pequena se liga e estabiliza a proteína. Neste exemplo, o método é usado para medir o deslocamento térmico (por exemplo, ligação não covalente ou covalente) de um composto ou conjugado da invenção a uma proteína apresentadora, em que (i) a fluorescência do conjugado é medida e uma proteína apresentadora é titulada, ou (ii) a fluorescência de uma proteína apresentadora é monitorada e um conjugado é titulado.

EXEMPLO 18: DETERMINAÇÃO DE FORMAÇÃO DE COMPLEXO POR ESPALHAMENTO DE LUZ DIFERENCIAL

[00656] O Espalhamento de Luz Dinâmica (DLS) é um método bio-

físico estabelecido usado para medir flutuações dependentes de tempo na intensidade de espalhamento que surge de partículas que passam pelo movimento browniano aleatório. As informações de tamanho de partícula e coeficiente de difusão podem ser obtidas a partir da análise destas flutuações. Mais especificamente, o método fornece a capacidade para medir características de tamanho que incluem raio e peso molecular de proteínas em solução aquosa. Neste exemplo, o método é usado para medir mudança no raio ou peso molecular (i) na proteína apresentadora mediante ligação do conjugado da invenção ou (ii) no conjugado da invenção mediante ligação a uma proteína apresentadora.

EXEMPLO 19: DETERMINAÇÃO DE LIGAÇÃO ENTRE CONJUGADOS E PROTEÍNAS POR TECNOLOGIA ACÚSTICA DE ONDA SÔNICA

[00657] A tecnologia de Onda Acústica Superficial (SAW) é um método biofísico usado para a detecção em tempo real de mudanças conformacionais induzidas por ligação através do monitoramento do deslocamento na fase de ondas acústicas superficiais que se deslocamento ao longo do biosensor. O mesmo pode ser usado para medir a cinética associada à interação binária de duas proteínas ou uma proteína a um ligante. Tipicamente, um componente do par de interação binário é imobilizado no biosensor por meio de uma etiqueta de fusão. As concentrações crescentes do segundo componente (o analito) são, então, injetadas através do biosensor por um tempo fixo. Um aumento no sinal (medido através de uma mudança na fase de onda ou amplitude) durante a fase de associação e a diminuição no sinal durante a fase de dissociação é indicativa de uma interação e pode ser adequada a um modelo de ligação para determinar valores de K_D , K_a , K_d associados. Neste exemplo, o método é usado para medir cinética para a ligação de um conjugado da invenção a uma proteína apresentadora, em que

(i) o conjugado é imobilizado no chip de biosensor por meio de etiqueta de fusão e a proteína apresentadora é injetada sobre a superfície, ou (ii) uma proteína apresentadora.

EXEMPLO 20: DETERMINAÇÃO DE FORMAÇÃO DE COMPLEXO PELO ESPALHAMENTO DE RAIOS X DE ÂNGULO PEQUENO

[00658] Espalhamento de Raios X de Ângulo Pequeno (SAXS) é um método com base em solução usado para determinar a estrutura de uma proteína em termos de formato e tamanho de partícula médio. O mesmo capacidade para entregar informações estruturais na faixa de resolução entre 1 e 25 nm, e de distâncias de repetição em sistemas parcialmente ordenados de até 150 nm de tamanho. O espalhamento de ângulo ultrapequeno (USAS) pode resolver dimensões ainda maiores. num experimento de espalhamento típico, uma solução de proteína ou complexo de proteína é exposto aos raios X (com comprimento de onda λ tipicamente em torno de 0,15 nm). A intensidade espalhada $I(s)$ é registrada como uma função de transferência de momento s ($s=4\pi\sin\theta/\lambda$, em que 2θ é o ângulo a radiação incidente e espalhada). A partir da intensidade da solução, o espalhamento apenas do solvente é subtraído. Uma curva de espalhamento de raios X (intensidade versus ângulo de espalhamento) é, então, usada para criar um modelo de baixa resolução de uma proteína ou complexo de proteína. Neste exemplo, o método é usado para identificar a existência de um complexo ternário (por exemplo, ligação não covalente ou covalente) de um composto ou conjugado da invenção a uma proteína apresentadora.

OUTRAS MODALIDADES

[00659] Deve ser entendido que, enquanto a presente divulgação foi descrita em combinação com a descrição detalhada da mesma, a descrição supracitada é destinada a ilustrar e não limitar o escopo da presente divulgação, que é definida pelo escopo das reivindicações

anexas. Outros aspectos, vantagens e alterações estão dentro do escopo das reivindicações a seguir.

[00660] Aqueles versados na técnica reconhecerão, ou terão capacidade para verificar usando não mais do que experimentação de rotina, muitos equivalentes às modalidades específicas de acordo com a invenção descrita no presente documento. O escopo da presente invenção não se destina a ser limitado à Descrição acima, mas, em vez disto, é apresentado nas reivindicações anexas.

[00661] Nas reivindicações, os artigos, como "um", "uma", "o" e "a" podem significar um ou mais do que um a menos que indicado ao contrário ou evidente de outro modo a partir do contexto. As reivindicações ou descrições que incluem "ou" entre um ou mais membros de um grupo são considerados satisfeitas se um, mais de um, ou todos os membros do grupo estiverem presentes, forem utilizados, ou forem, de outro modo, relevantes a um dado produto ou processo, a menos que indicado em contrário ou de outro modo evidente pelo contexto. A invenção inclui modalidades em que exatamente um membro do grupo está presente, é empregado ou, de outro modo, é relevante a um dado produto ou processo. A invenção inclui modalidades em que mais de um ou todos os membros do grupo estão presentes, são empregados ou, de outro modo, são relevantes a um dado produto ou processo.

[00662] Também é observado que o termo "que compreende" é destinado a ser aberto e permite, mas não necessita, da inclusão de elementos ou etapas adicionais. Quando o termo "que compreende" é usado no presente documento, o termo "que consiste em" também é abrangido e divulgado.

[00663] Quando as faixas são dadas, pontos finais são incluídos. Além do mais, deve ser compreendido que salvo indicado de outro modo ou evidente de outro modo pelo contexto e compreensão de uma pessoa de habilidade comum na técnica, os valores que são ex-

pressos como faixas podem assumir qualquer valor ou subfaixa específico em diferentes modalidades da invenção, até o décimo da unidade do menor limite da faixa, a menos que o contexto indique claramente de outro modo.

[00664] Além disto, deve ser compreendido que qualquer modalidade particular da presente invenção que está abrangida na técnica anterior pode ser explicitamente excluída de uma ou mais das reivindicações. Visto que estas são consideradas como conhecidas por uma pessoa de habilidade comum na técnica, as mesmas podem ser excluídas até mesmo se a exclusão não for apresentada explicitamente no presente documento. Qualquer modalidade particular das composições da invenção (por exemplo, qualquer polinucleotídeo ou proteína codificada pelo mesmo; qualquer método para produção; qualquer método para uso) pode ser excluído de qualquer uma ou mais reivindicações, por qualquer motivo, seja ou não relacionado à existência de técnica anterior.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto, caracterizado pelo fato de que compreende uma porção química de ligação de proteína e um grupo de reticulação.

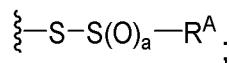
2. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito grupo de reticulação é uma porção química capaz de uma reação quimiosseletiva com um aminoácido.

3. Composto, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o dito grupo de reticulação é um grupo de reticulação reativo a sulfidrila, um grupo de reticulação amino-reativo, um grupo de reticulação reativo a carboxila, um grupo de reticulação reativo a carbonila ou um grupo de reticulação formador de triazol.

4. Composto, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o dito grupo de reticulação é um grupo de reticulação reativo a sulfidrila.

5. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o dito grupo de reticulação compreende um dissulfeto misto.

6. Composto, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o dito grupo de reticulação compreende a estrutura da Fórmula I:



Fórmula I

em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto; e

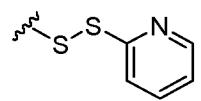
a é 0, 1 ou 2;

R^A é alquila C_1-C_6 opcionalmente substituída, heteroalquila C_1-C_6 opcionalmente substituída, arila C_6-C_{10} opcionalmente substituída ou heteroarila C_2-C_9 opcionalmente substituída.

7. Composto, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que R^A é heteroarila C_2-C_9 opcionalmente substituída.

8. Composto, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a dita heteroarila C₂-C₉ opcionalmente substituída é piridila.

9. Composto, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o dito grupo de reticulação compreende a estrutura:

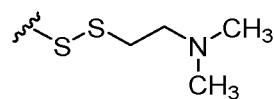


em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto.

10. Composto, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que R^A é heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída.

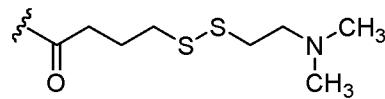
11. Composto, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a dita heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída é N,N-dimetil-etenilo.

12. Composto, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o dito grupo de reticulação compreende a estrutura:



em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto.

13. Composto, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o dito grupo de reticulação compreende a estrutura:



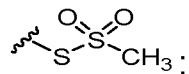
em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto.

14. Composto, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que R^A é alquila C_1-C_6 opcionalmente substituída.

15. Composto, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a dita alquila C_1-C_6 opcionalmente substituída é metila.

16. Composto, de acordo com a reivindicação 14 ou 15, caracterizado pelo fato de que a é 2.

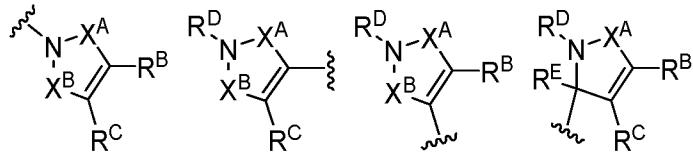
17. Composto, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o dito grupo de reticulação compreende a estrutura:



em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto.

18. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o dito grupo de reticulação compreende uma maleimida.

19. Composto, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o grupo de reticulação compreende a estrutura da fórmula Ib, Ic, Id ou Ie:



Fórmula Ib Fórmula Ic Fórmula Id Fórmula Ie

em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto;

X^A é $-C(O)-$ ou $-SO_2-$;

X^B é $-C(O)-$ ou CR^ER^F ;

R^B e R^C são, independentemente, hidrogênio, halogênio, hidroxila opcionalmente substituída, amino opcionalmente substituído, alquila C_1-C_6 opcionalmente substituída, alquenila C_2-C_6 opcionalmen-

te substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, carbociclila C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heteroarila C₂-C₉ opcionalmente substituída, C₂-C₉ heteroaril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heterociclila C₂-C₉ opcionalmente substituída, ou C₂-C₉ heterociclil C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída;

R^D é hidrogênio, hidroxila, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, carbociclila C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heteroarila C₂-C₉ opcionalmente substituída, C₂-C₉ heteroaril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heterociclila C₂-C₉ opcionalmente substituída, ou C₂-C₉ heterociclil C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída; e

R^E e R^F são, independentemente, hidrogênio, hidroxila, amino opcionalmente substituído, halogênio, tiol, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, carbociclila C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heteroarila C₂-C₉ opcionalmente substituída, C₂-C₉ heteroaril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heterociclila C₂-C₉ opcionalmente substituída, ou C₂-C₉ heterociclil C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída.

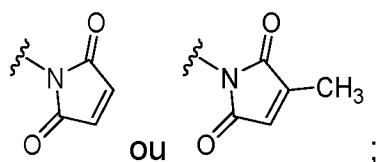
20. Composto, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o grupo de reticulação compreende a estrutura da Fórmula Ib.

21. Composto, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que X^A é $-C(O)-$.

22. Composto, de acordo com a reivindicação 20 ou 21, caracterizado pelo fato de que X^B é $-C(O)-$.

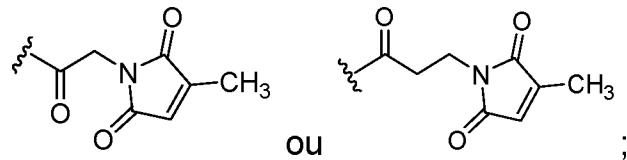
23. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 22, caracterizado pelo fato de que R^B e R^C são hidrogênio ou alquila C_1-C_6 opcionalmente substituída.

24. Composto, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o grupo de reticulação compreende a estrutura:



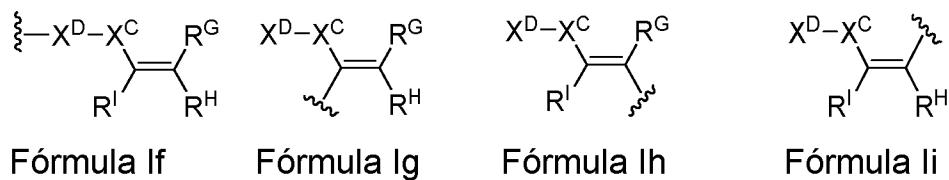
em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto.

25. Composto, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o grupo de reticulação compreende a estrutura:



em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto.

26. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o grupo de reticulação compreende a estrutura da fórmula I_f, I_g, I_h ou I_i:



em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto;

X^C é $-C(O)-$ ou $-SO_2-$;

X^D está ausente, $NR^J R^K$, ou OR^L ;

R^G , R^H , e R^I são, independentemente, hidrogênio, nitrila, halogênio, hidroxila opcionalmente substituída, amino opcionalmente substituído, alquila C_1 - C_6 opcionalmente substituída, alquenila C_2 - C_6 opcionalmente substituída, alquinila C_2 - C_6 opcionalmente substituída, carbociclica C_3 - C_{10} opcionalmente substituída, arila C_6 - C_{10} opcionalmente substituída, C_6 - C_{10} aril C_1 - C_6 alquila opcionalmente substituída, heteroarila C_2 - C_9 opcionalmente substituída, C_2 - C_9 heteroaril C_1 - C_6 alquila opcionalmente substituída, heterociclica C_2 - C_9 opcionalmente substituída, ou C_2 - C_9 heterociclico C_1 - C_6 alquila opcionalmente substituída; e

R^J , R^K , e R^L são, independentemente, ausente, hidrogênio, hidroxila, amino opcionalmente substituído, halogênio, tiol, alquila C_1 - C_6 opcionalmente substituída, alquenila C_2 - C_6 opcionalmente substituída, alquinila C_2 - C_6 opcionalmente substituída, heteroalquila C_1 - C_6 opcionalmente substituída, heteroalquenila C_2 - C_6 opcionalmente substituída, heteroalquinila C_2 - C_6 opcionalmente substituída, carbociclica C_3 - C_{10} opcionalmente substituída, arila C_6 - C_{10} opcionalmente substituída, C_6 - C_{10} aril C_1 - C_6 alquila opcionalmente substituída, heteroarila C_2 - C_9 opcionalmente substituída, C_2 - C_9 heteroaril C_1 - C_6 alquila opcionalmente substituída, heterociclica C_2 - C_9 opcionalmente substituída, ou C_2 - C_9 heterociclico C_1 - C_6 alquila opcionalmente substituída; e

27. Composto, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que o grupo de reticulação compreende a estrutura da Fórmula I_f.

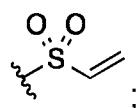
28. Composto, de acordo com a reivindicação 26 ou 27, caracterizado pelo fato de que X^D está ausente.

29. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 a 28, caracterizado pelo fato de que R^G , R^H e R^I são hidrogênio.

30. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 a 29, caracterizado pelo fato de que X^C é $-SO_2^-$.

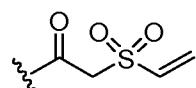
31. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 a 30, caracterizado pelo fato de que o dito grupo de reticulação compreende uma vinil sulfona.

32. Composto, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que o dito grupo de reticulação compreende a estrutura:



em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto.

33. Composto, de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que o dito grupo de reticulação compreende a estrutura:

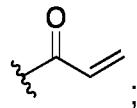


em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto.

34. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 a 29, caracterizado pelo fato de que X^C é $-C(O)-$.

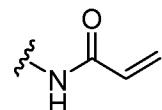
35. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 a 29, caracterizado pelo fato de que o dito grupo de reticulação inclui uma vinil cetona.

36. Composto, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o dito grupo de reticulação inclui a estrutura:



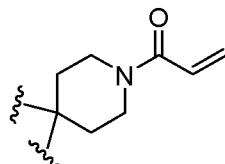
em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto.

37. Composto, de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o dito grupo de reticulação compreende a estrutura:



em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto.

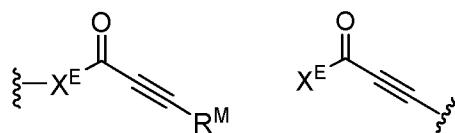
38. Composto, de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o dito grupo de reticulação compreende a estrutura:



em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto.

39. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 a 29, caracterizado pelo fato de que o dito grupo de reticulação compreende uma inona.

40. Composto, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que o grupo de reticulação compreende uma estrutura da Fórmula Ij ou Ik:



Fórmula Ij Fórmula Ik

em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto;

X^E é ausente, $NR^N R^O$, ou OR^P ;

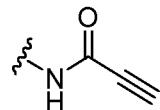
R^M é hidrogênio, halogênio, hidroxila opcionalmente substituída, amino opcionalmente substituído, alquila C₁-C₆ opcionalmente

substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, carbociclica C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heteroarila C₂-C₉ opcionalmente substituída, C₂-C₉ heteroaril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heterociclica C₂-C₉ opcionalmente substituída, ou C₂-C₉ heterocicil C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída; e

R^N, R^O, e R^P são, independentemente, hidrogênio, hidroxila, amino opcionalmente substituído, halogênio, tiol, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, carbociclica C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heteroarila C₂-C₉ opcionalmente substituída, C₂-C₉ heteroaril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heterociclica C₂-C₉ opcionalmente substituída, ou C₂-C₉ heterocicil C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída.

41. Composto, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que o grupo de reticulação compreende uma estrutura da Fórmula Ij.

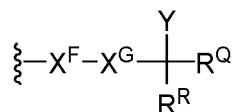
42. Composto, de acordo com a reivindicação 40 ou 41, caracterizado pelo fato de que o grupo de reticulação compreende a estrutura:



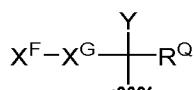
em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto.

43. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o grupo de reticulação com-

preende uma estrutura da fórmula Im ou In :



Fórmula Im



Fórmula In

em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto;

X^F é ausente, $NR^S R^T$, ou OR^U .

X^G é ausente ou -C(O)-;

Y é um grupo de saída;

R^Q e R^R são, independentemente, hidrogênio, hidroxila, amino opcionalmente substituído, halogênio, tiol, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, carbociclila C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heteroarila C₂-C₉ opcionalmente substituída, C₂-C₉ heteroaril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heterociclila C₂-C₉ opcionalmente substituída, ou C₂-C₉ heterociclil C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída; e

R^S , R^T , e R^U são, independentemente, ausente, hidrogênio, hidroxila, amino opcionalmente substituído, halogênio, tiol, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, carbociclila C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heteroarila C₂-C₉ opcionalmente substituída, C₂-C₉ heteroaril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heterociclila C₂-C₉ opcionalmente substituída, ou C₂-C₉

heterociclo C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída; e

44. Composto, de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que Y é um halogênio.

45. Composto, de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo fato de que o dito halogênio é um cloreto ou fluoreto.

46. Composto, de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que Y é uma nitrila.

47. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 43 a 46, caracterizado pelo fato de que X^F e X^G estão ausentes.

48. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 43 a 47, caracterizado pelo fato de que R^Q e R^R são hidrogênio.

49. Composto, de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que o dito grupo de reticulação compreende um haleto de alquila:

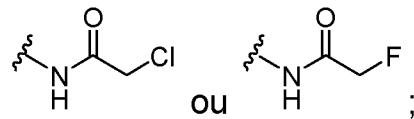
50. Composto, de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que o dito haleto de alquila é um cloreto de alquila ou fluoreto de alquila.

51. Composto, de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que o dito grupo de reticulação compreende a estrutura:



em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto.

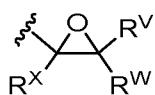
52. Composto, de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que o dito grupo de reticulação compreende a estrutura:



em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto.

53. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o dito grupo de reticulação compreende um epóxido.

54. Composto, de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo fato de que o dito grupo de reticulação compreende uma estrutura da Fórmula I o.

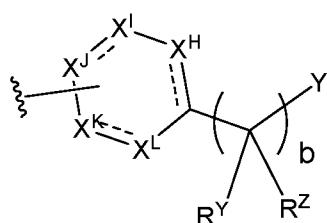


Fórmula I o

em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto;

R^V , R^W , e R^X são, independentemente, hidrogênio, hidroxila, amino opcionalmente substituído, halogênio, tiol, alquila C_1-C_6 opcionalmente substituída, alquenila C_2-C_6 opcionalmente substituída, alquinila C_2-C_6 opcionalmente substituída, heteroalquila C_1-C_6 opcionalmente substituída, heteroalquinila C_2-C_6 opcionalmente substituída, heteroalquenila C_2-C_6 opcionalmente substituída, heteroalquinila C_2-C_6 opcionalmente substituída, carbociclica C_3-C_{10} opcionalmente substituída, arila C_6-C_{10} opcionalmente substituída, C_6-C_{10} aril C_1-C_6 alquila opcionalmente substituída, heteroarila C_2-C_9 opcionalmente substituída, C_2-C_9 heteroaril C_1-C_6 alquila opcionalmente substituída, heterociclica C_2-C_9 opcionalmente substituída, C_2-C_9 heterociclic C_1-C_6 alquila opcionalmente substituída.

55. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o dito grupo de reticulação compreende uma estrutura da fórmula I p:



Fórmula I p

em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto;

as linhas pontilhadas representam ligações duplas opcionais inclusas como necessário para a estrutura ser aromática;

b é 0, 1, ou 2;

Y é um grupo de saída;

R^Y e R^Z são, independentemente, hidrogênio, hidroxila, amino opcionalmente substituído, halogênio, tiol, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, carbociclila C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heteroarila C₂-C₉ opcionalmente substituída, C₂-C₉ heteroaril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heterociclila C₂-C₉ opcionalmente substituída, C₂-C₉ heterocicil C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída;

cada dentre X^H, X^I, X^J, X^K e X^L são, independentemente, ausentes, NR^{AA}, ou CR^{AB}, em que pelo menos cinco dentre X^H, X^I, X^J, X^K e X^L são NR^{AA}, ou CR^{AB};

R^{AA} é ausente ou hidrogênio, hidroxila, amino opcionalmente substituído, halogênio, tiol, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, carbociclila C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heteroarila C₂-C₉ opcionalmente substituída, C₂-C₉ heteroaril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heterociclila C₂-C₉ opcionalmente substituída, ou C₂-C₉ heterocicil C₁-C₆ alquila

opcionalmente substituída; e

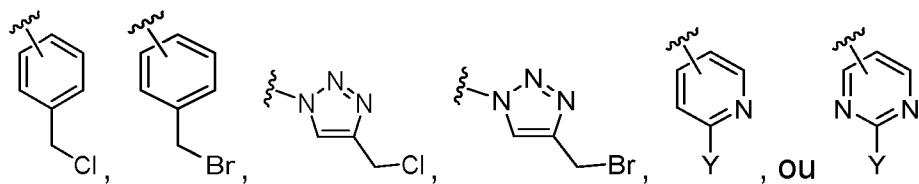
R^{AB} é hidrogênio, nitrila, halogênio, hidroxila opcionalmente substituída, amino opcionalmente substituída, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, carbociclila C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heteroarila C₂-C₉ opcionalmente substituída, C₂-C₉ heteroaril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heterociclila C₂-C₉ opcionalmente substituída, ou C₂-C₉ heterocicil C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída.

56. Composto, de acordo com a reivindicação 55, caracterizado pelo fato de que o pelo menos um R^{AB} é um grupo de retirada de elétron.

57. Composto, de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que um a três R^{AB} são grupos de retirada de elétron.

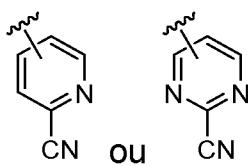
58. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 55 a 57, caracterizado pelo fato de que Y é uma nitrila, um halogênio, um mesilato, um tosilato ou um triflato.

59. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 55 a 58, caracterizado pelo fato de que o dito grupo de reticulação compreende a estrutura:



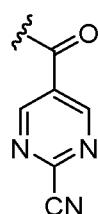
em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto.

60. Composto, de acordo com a reivindicação 59, caracterizado pelo fato de que o dito grupo de reticulação compreende a estrutura:



em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto.

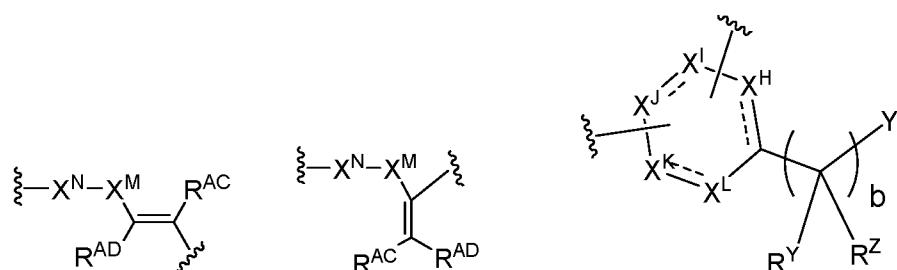
61. Composto, de acordo com a reivindicação 60, caracterizado pelo fato de que o dito grupo de reticulação compreende a estrutura:



em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto.

62. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o dito grupo de reticulação é um grupo de reticulação interno.

63. Composto, de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que o dito grupo de reticulação compreende uma estrutura da Fórmula Iq, Ir ou Is:



Fórmula Iq

Fórmula Ir

Fórmula Is

em que a linha ondulada ilustra o ponto de fixação do grupo de reticulação ao restante do composto;

X^M é $-C(O)-$ ou $-SO_2-$;

X^N é ausente, NR^{AE} ou O ;

R^{AC} e R^{AD} são, independentemente, hidrogênio, nitrila, ha-

logênio, hidroxila opcionalmente substituída, amino opcionalmente substituída, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, carbociclica C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heteroarila C₂-C₉ opcionalmente substituída, C₂-C₉ heteroaril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heterociclica C₂-C₉ opcionalmente substituída, ou C₂-C₉ heterocicil C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída; e

R^{AE} é hidrogênio, hidroxila, amino opcionalmente substituído, halogênio, tiol, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, carbociclica C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heteroarila C₂-C₉ opcionalmente substituída, C₂-C₉ heteroaril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heterociclica C₂-C₉ opcionalmente substituída, ou C₂-C₉ heterocicil C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída;

64. Composto, de acordo com a reivindicação 63, caracterizado pelo fato de que X^N é NR^{AE}, em que R^{AE} é hidrogênio.

65. Composto, de acordo com a reivindicação 63 ou 64, caracterizado pelo fato de que R^{AC} e R^{AD} são hidrogênio.

66. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 63 a 65, caracterizado pelo fato de que X^M é –C(O)–.

67. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 63 a 65, caracterizado pelo fato de que X^M é –SO₂[–].

68. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 67, caracterizado pelo fato de que a interação entre a dita

porção química de ligação de proteína e uma proteína é não covalente.

69. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 67, caracterizado pelo fato de que a interação entre a dita porção química de ligação de proteína e uma proteína é covalente.

70. Composto, caracterizado pelo fato de que compreende uma porção química de ligação de proteína apresentadora e um grupo de reticulação.

71. Composto, de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que a porção química de ligação de proteína apresentadora é capaz de ligar uma proteína codificada por qualquer um dos genes de Tabela 1.

72. Composto, de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que a dita porção química de ligação de proteína apresentadora é uma porção química de ligação de prolil isomerase.

73. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 70 a 72, caracterizado pelo fato de que a dita porção química de ligação de proteína apresentadora é uma porção química de ligação de FKBP, uma porção química de ligação de ciclofilina, ou uma porção química de ligação de PIN1.

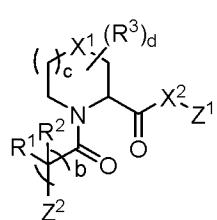
74. Composto, de acordo com a reivindicação 73, caracterizado pelo fato de que a dita porção química de ligação de proteína apresentadora é uma porção química de ligação de FKBP.

75. Composto, de acordo com a reivindicação 74, caracterizado pelo fato de que a dita porção química de ligação de proteína apresentadora é capaz de ligar FKBP12, FKBP12.6, FKBP13, FKBP25, FKBP51 ou FKBP52.

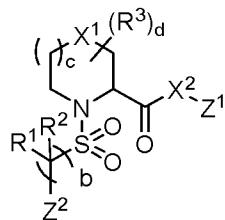
76. Composto, de acordo com a reivindicação 74 ou 75, caracterizado pelo fato de que a dita porção química de ligação de FKBP é uma porção química de ligação de FKBP seletiva.

77. Composto, de acordo com a reivindicação 74 ou 75, caracterizado pelo fato de que a dita porção química de ligação de FKBP é uma porção química de ligação de FKBP não seletiva.

78. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 74 a 77, caracterizado pelo fato de que a dita porção química de ligação de FKBP comprehende a estrutura da Fórmula IIa ou IIb:



Fórmula IIa



Fórmula IIb

em que Z^1 e Z^2 são, cada um, independentemente, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, ou Z^1 e Z^2 se combinam para formar, com os átomos aos quais as mesmas são fixadas, um macrociclo de 10 a 40 membros opcionalmente substituído; e em que pelo menos um dentre Z^1 ou Z^2 comprehende um ponto de fixação ao grupo de reticulação;

b e c são, independentemente, 0, 1, ou 2;

d é 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7;

X^1 e X^2 são, cada um, independentemente, ausente, CH₂, O, S, SO, SO₂ ou NR⁴;

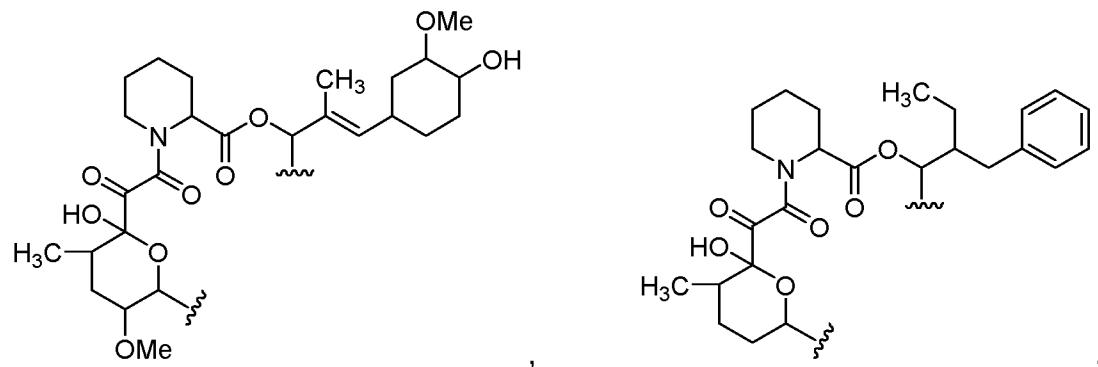
cada R¹ e R² são, independentemente, hidrogênio, hidroxila, amino opcionalmente substituída, halogênio, tiol, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, carbociclila C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heterociclila C₂-C₉ opcionalmente substituída, C₂-C₉ heterocicil C₁-C₆ alquila opcionalmente

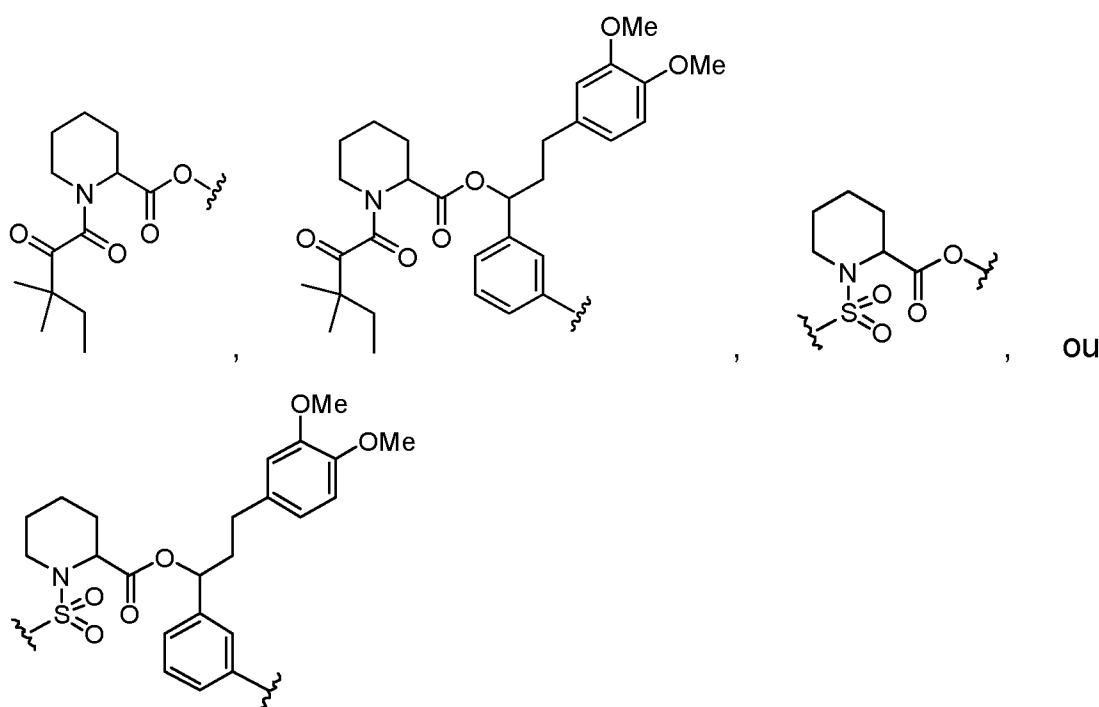
substituída, ou R¹ e R² se combinam com o átomo de carbono ao qual os mesmos são ligados para formar C=O ou R¹ e R² se combinam para formar uma carbociclila C₃-C₁₀ opcionalmente substituída ou heterociclila C₂-C₉ opcionalmente substituída;

cada R³ é, independentemente, hidroxila, amino opcionalmente substituída, halogênio, tiol, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, carbociclila C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heterociclila C₂-C₉ opcionalmente substituída, ou C₂-C₉ heterociclil C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída ou dois R⁸ se combinam para formar uma carbociclila C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, ou heteroarila C₂-C₉ opcionalmente substituída; e

cada R⁴ é, independentemente, hidrogênio, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, arila opcionalmente substituída, carbociclila C₃-C₇, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, e C₃-C₇ carbociclil C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída.

79. Composto, de acordo com a reivindicação 78, caracterizado pelo fato de que a dita porção química de ligação de proteína apresentadora comprehende a estrutura:





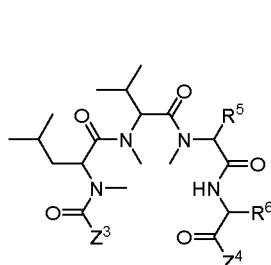
80. Composto, de acordo com a reivindicação 73, caracterizado pelo fato de que a dita porção química de ligação de proteína apresentadora é uma porção química de ligação de ciclofilina.

81. Composto, de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que a dita porção química de ligação de proteína apresentadora é capaz de ligar PP1A, CYPB, CYPC, CYP40, CYPE, CYPD, NKTR, SRCyp, CYPH, CWC27, CYPL1, CYP60, CYPJ, PPIL4, PPIL6, RANBP2, ou PPWD1.

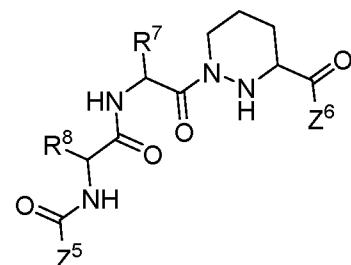
82. Composto, de acordo com a reivindicação 80 ou 81, caracterizado pelo fato de que a dita porção química de ligação de ciclofilina é uma porção química de ligação de ciclofilina seletiva.

83. Composto, de acordo com a reivindicação 80 ou 81, caracterizado pelo fato de que a dita porção química de ligação de ciclofilina é uma porção química de ligação de ciclofilina não seletiva.

84. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 80 a 83, caracterizado pelo fato de que a dita porção química de ligação de ciclofilina compreende a estrutura da Fórmula III ou IV:



Fórmula III



Fórmula IV

em que Z^3 , Z^4 , Z^5 , e Z^6 são, cada um, independentemente, hidroxila, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, ou Z^3 e Z^4 ou Z^5 e Z^6 se combinam para formar, com os átomos aos quais as mesmas são fixadas, um macrociclo de 10 a 40 membros opcionalmente substituído;

pelo menos um dentre Z^3 , Z^4 , Z^5 , Z^6 ou R^5 compreende um ponto de fixação ao grupo de reticulação;

e é 0, 1, 2, 3, ou 4;

R^5 é alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, carbociclila C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heterociclila C₂-C₉ opcionalmente substituída, ou C₂-C₉ heterociclil C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída;

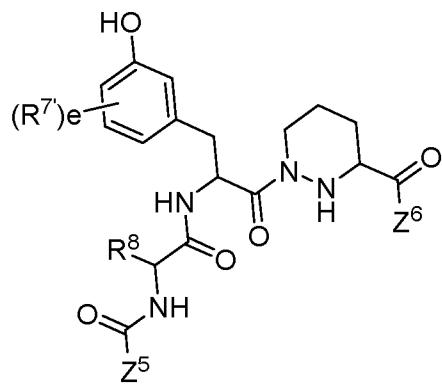
R^6 é alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída;

cada R^7 é, independentemente, hidroxila, ciano, amino opcionalmente substituída, halogênio, tiol, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, carbociclila C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heterociclila C₂-C₉ opcionalmente

substituída, ou C₂-C₉ heterociclíl C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída; e

R⁸ é hidrogênio, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, arila opcionalmente substituída, carbociclíl C₃-C₇, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, e C₃-C₇ carbociclíl C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída.

85. Composto, de acordo com a reivindicação 84, **caracterizado** pelo fato de que a porção química de ligação de ciclofilina inclui a estrutura da Fórmula IVa:

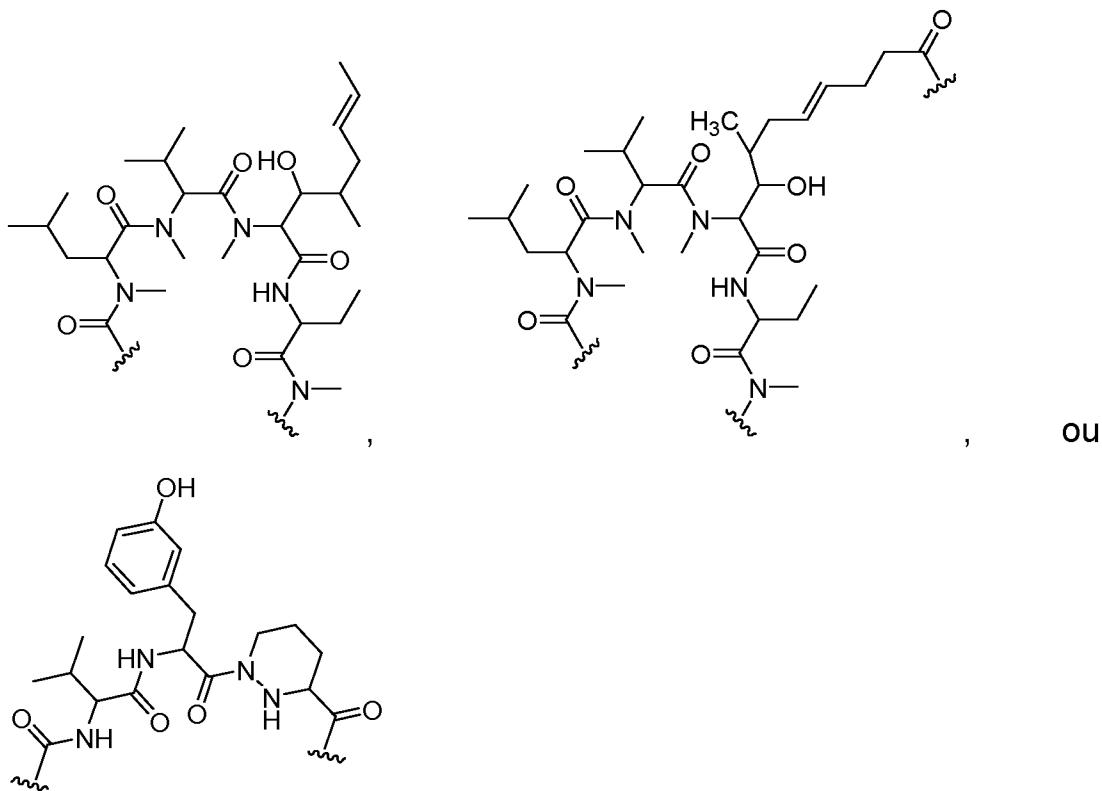


Fórmula IVa

em que cada R⁷ é, independentemente, hidroxila, ciano, amino opcionalmente substituída, halogênio, tiol, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, carbociclíl C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heterociclíl C₂-C₉ opcionalmente substituída (por exemplo, heteroarila C₂-C₉ opcionalmente substituída), ou C₂-C₉ heterociclíl C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída (por exemplo, C₂-C₉ heteroaril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída).

86. Composto, de acordo com a reivindicação 84 ou 85, **caracterizado** pelo fato de que a dita porção química de ligação de prote-

ína apresentadora compreende a estrutura:



87. Composto caracterizado pelo fato de que compreende uma porção química de ligação de proteína-alvo e um grupo de reticulação.

88. Composto, de acordo com a reivindicação 87, caracterizado pelo fato de que a dita proteína-alvo é uma GTPase, proteína de ativação de GTPase, fator de troca de nucleotídeo de Guanina, uma proteína de choque térmico, um canal iônico, uma proteína de bobina em espiral, uma quinase, uma fosfatase, uma ligase de ubiquitina, um fator de transcrição, um modificador/remodelador de cromatina, ou uma proteína com motivos e domínios de interação de proteína-proteína clássica.

89. Composto, de acordo com a reivindicação 87 ou 88, caracterizado pelo fato de que a dita proteína-alvo compreende uma superfície indestrutível.

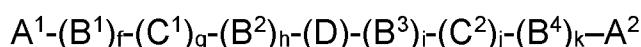
90. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 87 a 89, caracterizado pelo fato de que a dita proteína-alvo não

tem um bolso de ligação tradicional.

91. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 90, caracterizado pelo fato de que a dita porção química de ligação de proteína e o dito grupo de reticulação são unidos através de um ligante.

92. Composto, de acordo com a reivindicação 91, caracterizado pelo fato de que o dito ligante é 1 a 20 átomos de comprimento.

93. Composto, de acordo com a reivindicação 91 ou 92, caracterizado pelo fato de que o dito ligante tem a estrutura da Fórmula V:

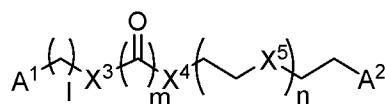


Fórmula V

em que A^1 é uma ligação entre o ligante e a porção química de ligação de proteína; A^2 é uma ligação entre o grupo de reticulação e o ligante; B^1 , B^2 , B^3 e B^4 são, cada um, independentemente selecionados a partir de alquila C_{1-2} opcionalmente substituída, heteroalquila C_{1-3} opcionalmente substituída, O, S, e NR^N ; R^N é hidrogênio, alquila C_{1-4} opcionalmente substituída, alquenila C_{2-4} opcionalmente substituída, alquinila C_{2-4} opcionalmente substituída, heterociclila C_{2-6} opcionalmente substituída, arila C_{6-12} opcionalmente substituída, ou heteroalquila C_{1-7} opcionalmente substituída; C^1 e C^2 são, cada um, independentemente, selecionados a partir de carbonila, tiocarbonila, sulfonila ou fosforila; f , g , h , i , j , e k são, cada um, independentemente, 0 ou 1; e D é alquila C_{1-10} opcionalmente substituída, alquenila C_{2-10} opcionalmente substituída, alquinila C_{2-10} opcionalmente substituída, heterociclila C_{2-6} opcionalmente substituída, arila C_{6-12} opcionalmente substituída, polietileno glicol C_2-C_{10} opcionalmente substituído, ou heteroalquila C_{1-10} opcionalmente substituída, ou uma ligação química ligando $A^1-(B^1)-f-(C^1)_g-(B^2)_h-$ a $-(B^3)-i-(C^2)_j-(B^4)_k-A^2$

94. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindica-

ções 91 a 93, caracterizado pelo fato de que o dito ligante compreende a estrutura da Fórmula VI:



em que A^1 é uma ligação entre o ligante e a porção química de ligação de proteína;

A^2 é uma ligação entre o grupo de reticulação e o ligante;

I é 0, 1, 2, ou 3;

m é 0 ou 1;

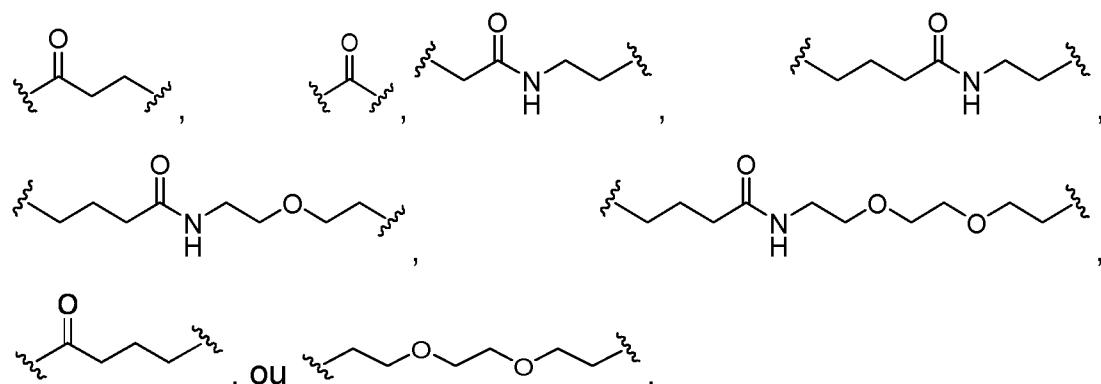
n é 0, 1, ou 2; e

X^3 , X^4 , e X^5 são, cada um, independentemente, ausente, O,

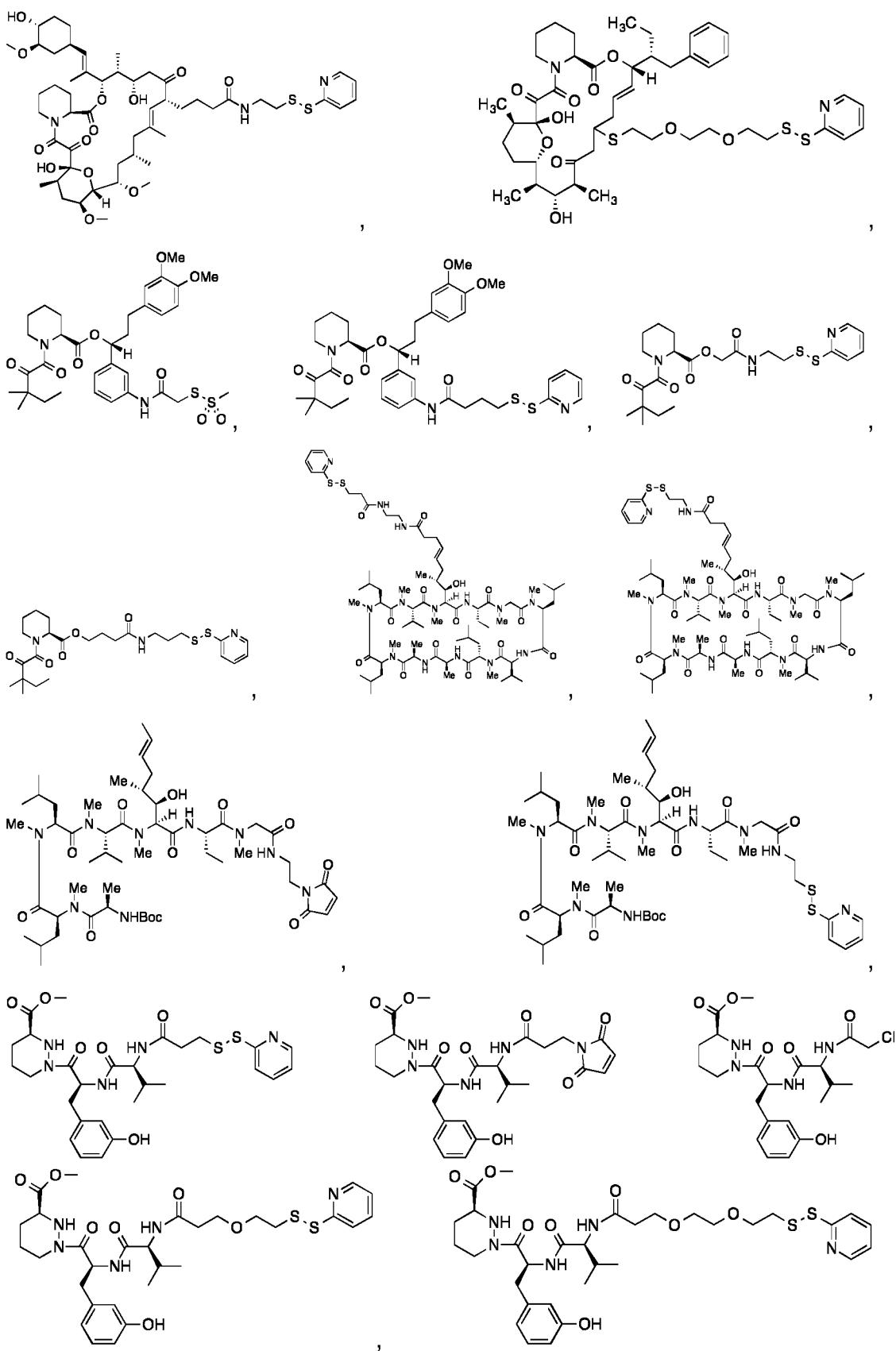
S, $-\text{C}\equiv\text{C}-$, CR^9R^{10} ou NR^{11} ; e

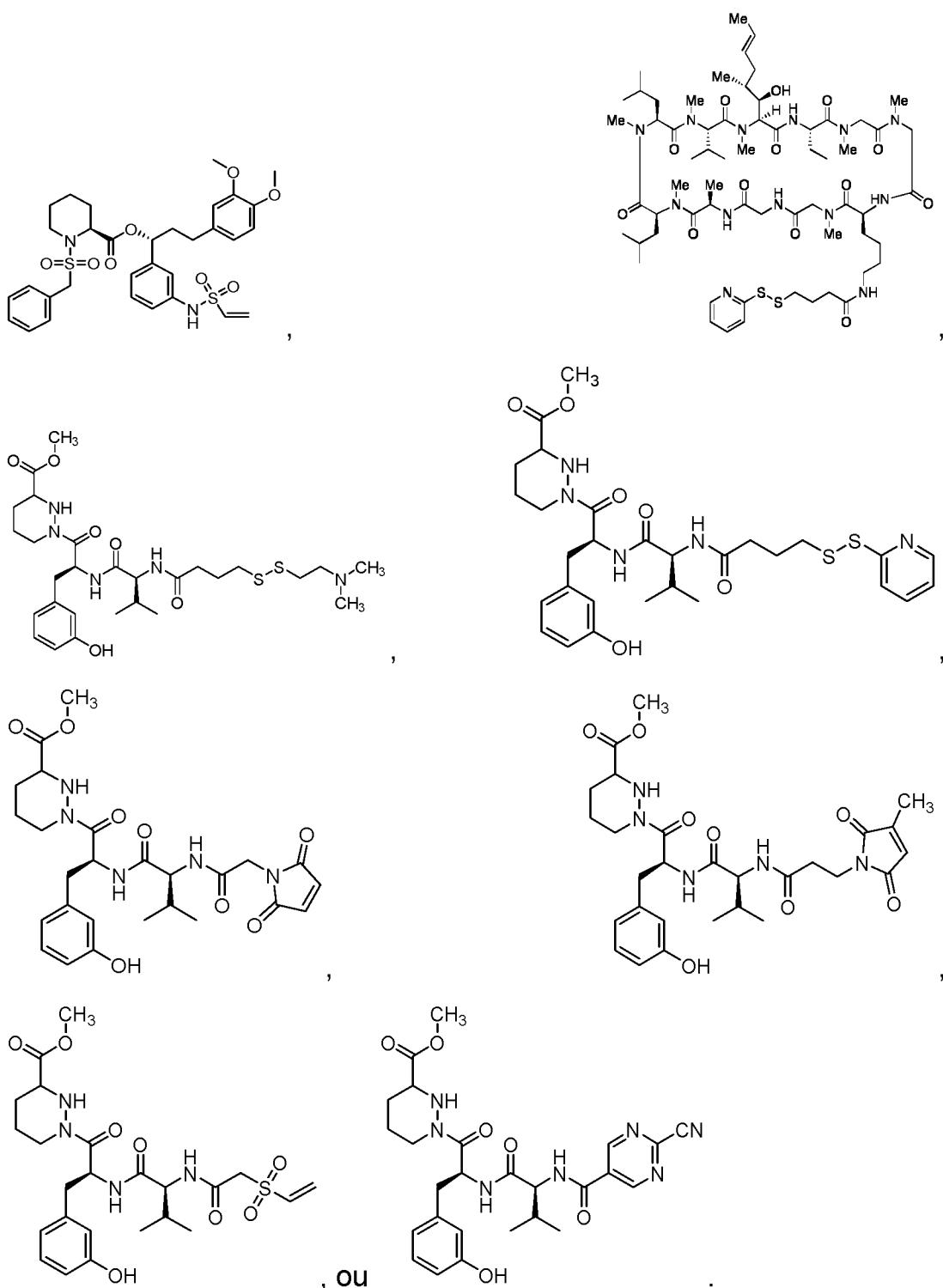
cada R^9 , R^{10} , e R^{11} são, independentemente, hidrogênio, alquila $\text{C}_1\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, alquenila $\text{C}_2\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, alquinila $\text{C}_2\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, arila opcionalmente substituída, carbociclila $\text{C}_3\text{-C}_7$, $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ aril $\text{C}_1\text{-C}_6$ alquila opcionalmente substituída, e $\text{C}_3\text{-C}_7$ carbocicil C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída.

95. Composto, de acordo com a reivindicação 94, caracterizado pelo fato de que o dito ligante compreende a estrutura:



96. Composto, caracterizado pelo fato de que tem a estrutura:





97. Conjugado, caracterizado pelo fato de que compreende uma porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada a uma proteína-alvo.

98. Conjugado, de acordo com a reivindicação 97, caracterizado pelo fato de que a porção química de ligação de proteína apre-

sentadora do dito conjugado é capaz de interação não covalente com uma proteína apresentadora.

99. Conjugado, de acordo com a reivindicação 97, caracterizado pelo fato de que a porção química de ligação de proteína apresentadora do dito conjugado é capaz de interação covalente com uma proteína apresentadora.

100. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 97 a 99, caracterizado pelo fato de que a dita porção química de ligação de proteína apresentadora é capaz de ligar uma proteína codificada por qualquer um dos genes da Tabela 1.

101. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 97 a 99, caracterizado pelo fato de que a dita porção química de ligação de proteína apresentadora é uma porção química de ligação de prolil isomerase.

102. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 97 a 101, caracterizado pelo fato de que a dita porção química de ligação de proteína apresentadora é uma porção química de ligação de FKBP, uma porção química de ligação de ciclofilina ou uma porção química de ligação de PIN1.

103. Conjugado, de acordo com a reivindicação 102, caracterizado pelo fato de que a dita porção química de ligação de proteína apresentadora é uma porção química de ligação de FKBP.

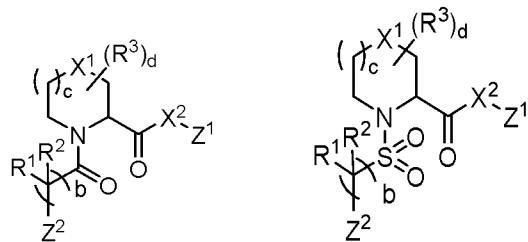
104. Conjugado, de acordo com a reivindicação 103, caracterizado pelo fato de que a dita porção química de ligação de proteína apresentadora é capaz de ligar FKBP12, FKBP12.6, FKBP13, FKBP25, FKBP51 ou FKBP52.

105. Conjugado, de acordo com a reivindicação 103 ou 104, caracterizado pelo fato de que a dita porção química de ligação de FKBP é uma porção química de ligação de FKBP seletiva.

106. Conjugado, de acordo com a reivindicação 103 ou

104, caracterizado pelo fato de que a dita porção química de ligação de FKBP é uma porção química de ligação de FKBP não seletiva.

107. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 103 a 106, caracterizado pelo fato de que a dita porção química de ligação de FKBP comprehende a estrutura da Fórmula IIa ou IIb:



Fórmula IIa

Fórmula IIb

em que Z^1 e Z^2 são, cada um, independentemente, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, ou Z^1 e Z^2 se combinam para formar, com os átomos aos quais as mesmas são fixadas, um macrociclo de 10 a 30 membros opcionalmente substituído; e em que pelo menos um dentre Z^1 ou Z^2 comprehende um ponto de fixação à proteína-alvo;

b e c são, independentemente, 0, 1, ou 2;

d é 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7;

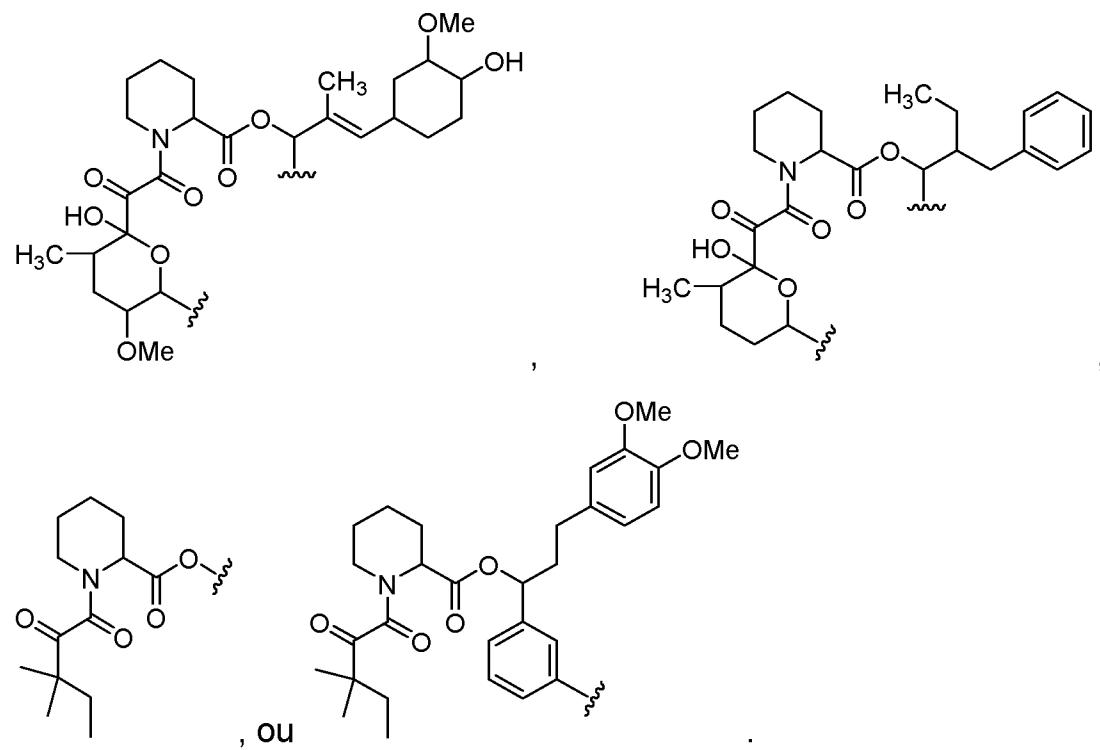
X^1 e X^2 são, cada um, independentemente, ausente, CH₂, O, S, SO, SO₂ ou NR¹³;

cada R¹ e R² são, independentemente, hidrogênio, hidroxiла, amino opcionalmente substituída, halogênio, tiol, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, carbociclila C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heterociclila C₂-C₉ opcionalmente substituída, C₂-C₉ heterocicil C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, ou R¹ e R² se combinam com o átomo de carbono ao qual

os mesmos são ligados para formar C=O ou R¹ e R² se combinam para formar uma carbociclila C₃-C₁₀ opcionalmente substituída ou heterociclila C₂-C₉ opcionalmente substituída; e

cada R^3 é, independentemente, hidroxila, amino opcionalmente substituída, halogênio, tiol, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, carbociclila C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heterociclila C₂-C₉ opcionalmente substituída, ou C₂-C₉ heterociclil C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída ou dois R^8 se combinam para formar uma carbociclila C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, ou heteroarila C₂-C₉ opcionalmente substituída;

108. Conjugado, de acordo com a reivindicação 107, caracterizado pelo fato de que a dita porção química de ligação de proteína apresentadora compreende a estrutura:



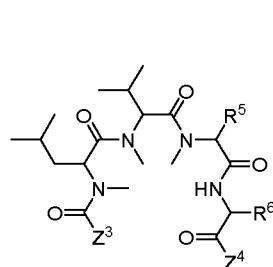
109. Composto, de acordo com a reivindicação 102, caracterizado pelo fato de que a dita porção química de ligação de proteína apresentadora é uma porção química de ligação de ciclofilina.

110. Composto, de acordo com a reivindicação 109, caracterizado pelo fato de que a dita porção química de ligação de proteína apresentadora é capaz de ligar PP1A, CYPB, CYPC, CYP40, CYPE, CYPD, NKTR, SRCyp, CYPH, CWC27, CYPL1, CYP60, CYPJ, PPIL4, PPIL6, RANBP2, ou PPWD1.

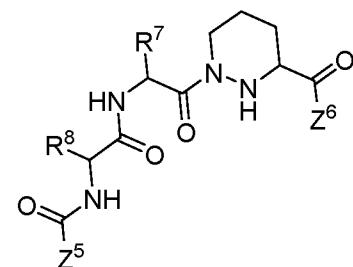
111. Composto, de acordo com a reivindicação 109 ou 110, caracterizado pelo fato de que a dita porção química de ligação de ciclofilina é uma porção química de ligação de ciclofilina seletiva.

112. Composto, de acordo com a reivindicação 109 ou 110, caracterizado pelo fato de que a dita porção química de ligação de ciclofilina é uma porção química de ligação de ciclofilina não seletiva.

113. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 109 a 112, caracterizado pelo fato de que a dita porção química de ligação de ciclofilina compreende a estrutura da Fórmula III ou IV:



Fórmula III



Fórmula IV

em que Z^3 , Z^4 , Z^5 , e Z^6 são, cada um, independentemente, hidroxila, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, ou Z^3 e Z^4 ou Z^5 e Z^6 se combinam para formar, com os átomos aos quais as mesmas são fixadas, um macrociclo de 10 a 40 membros opcionalmente substituído;

pelo menos um dentre Z^3 , Z^4 , Z^5 , Z^6 ou R^5 compreende um ponto de fixação ao grupo de reticulação;

d é 0, 1, 2, 3, ou 4;

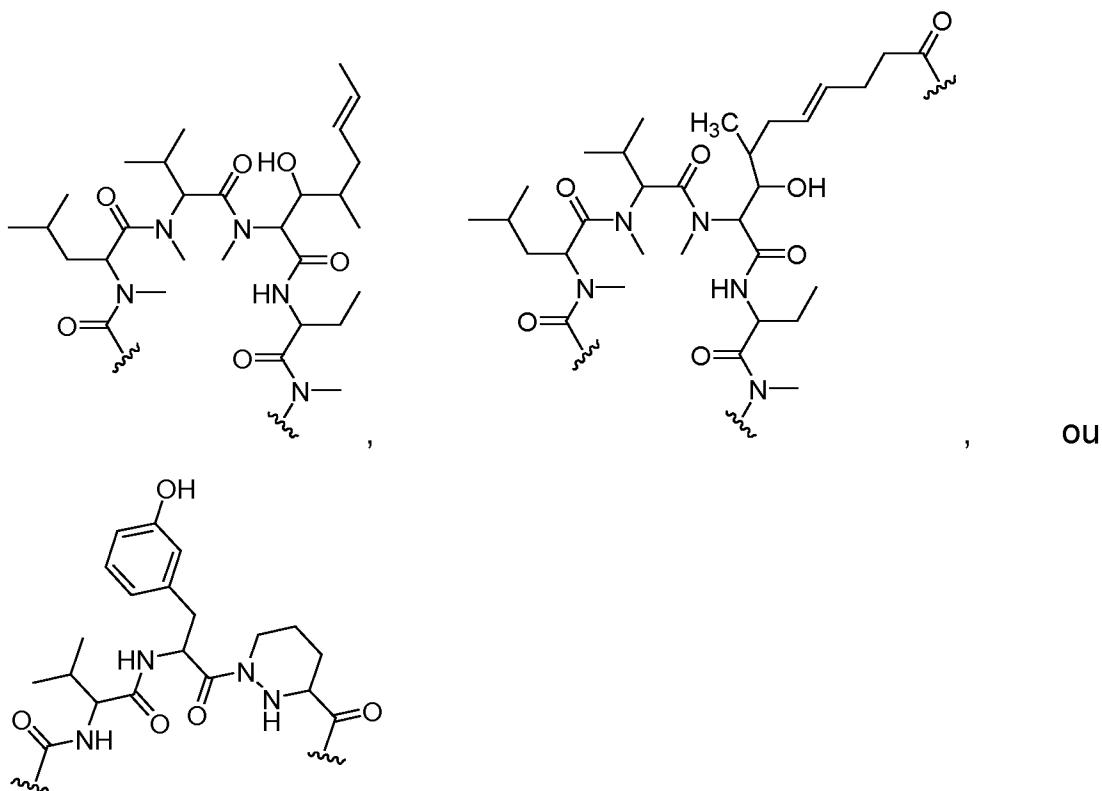
R⁵ é alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, carbociclila C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heterociclila C₂-C₉ opcionalmente substituída, ou C₂-C₉ heterociclil C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída;

R⁶ é alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída;

cada R⁷ é, independentemente, hidroxila, ciano, amino opcionalmente substituída, halogênio, tiol, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, carbociclila C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heterociclila C₂-C₉ opcionalmente substituída, ou C₂-C₉ heterociclil C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída; e

R⁸ é hidrogênio, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, arila opcionalmente substituída, carbociclila C₃-C₇, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, e C₃-C₇ carbocicil C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída.

114. Composto, de acordo com a reivindicação 113, **caracterizado** pelo fato de que a dita porção química de ligação de proteína apresentadora comprehende a estrutura:



115. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 97 a 114, caracterizado pelo fato de que a dita proteína-alvo é uma GTPase, proteína de ativação de GTPase, fator de troca de nucleotídeo de Guanina, uma proteína de choque térmico, um canal iônico, uma proteína de bobina em espiral, uma quinase, uma fosfatase, uma ligase de ubiquitina, um fator de transcrição, um modificador/remodelador de cromatina, ou uma proteína com motivos e domínios de interação de proteína-proteína clássica.

116. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 97 a 115, caracterizado pelo fato de que a dita proteína-alvo compreende uma superfície indestrutível.

117. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 97 a 116, caracterizado pelo fato de que a dita proteína-alvo não tem um bolso de ligação tradicional.

118. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 97 a 117, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos da dita proteína-alvo foi modificada para substituir pelo me-

nos um aminoácido nativo com um aminoácido reativo.

119. Conjugado, de acordo com a reivindicação 118, caracterizado pelo fato de que o dito aminoácido reativo é um aminoácido natural.

120. Conjugado, de acordo com a reivindicação 119, caracterizado pelo fato de que o dito aminoácido reativo é uma cisteína, lisina, tirosina, ácido aspártico, ácido glutâmico ou serina.

121. Conjugado, de acordo com a reivindicação 118, caracterizado pelo fato de que o dito aminoácido reativo é um aminoácido não natural.

122. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 97 a 121, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos da dita proteína-alvo foi modificada para substituir pelo menos um aminoácido reativo nativo com um aminoácido não reativo.

123. Conjugado, de acordo com a reivindicação 122, caracterizado pelo fato de que o pelo menos um aminoácido reativo nativo é uma cisteína, lisina, tirosina, ácido aspártico, ácido glutâmico ou serina.

124. Conjugado, de acordo com a reivindicação 122 ou 123, caracterizado pelo fato de que o dito pelo menos um aminoácido reativo nativo é um aminoácido exposto a solvente.

125. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 122 a 124, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos da dita proteína-alvo é modificada para substituir todos os aminoácidos reativos com um aminoácido não reativo.

126. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 122 a 125, caracterizado pelo fato de que o dito aminoácido não reativo é um aminoácido natural.

127. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 118 a 126, caracterizado pelo fato de que a dita substituição é

uma substituição conservativa.

128. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 121 a 127, caracterizado pelo fato de que o dito aminoácido reativo é substituído por uma serina, valina, alanina, isoleucina, treonina, tirosina, ácido aspártico, ácido glutâmico ou leucina.

129. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 121 a 124, caracterizado pelo fato de que o dito aminoácido não reativo é um aminoácido não natural.

130. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 97 a 129, caracterizado pelo fato de que a dita porção química de ligação de proteína apresentadora e a dita proteína-alvo são conjugadas através de um ligante.

131. Conjugado, de acordo com a reivindicação 130, caracterizado pelo fato de que o dito ligante é 1 a 20 átomos de comprimento.

132. Conjugado, de acordo com a reivindicação 130 ou 131, caracterizado pelo fato de que o dito ligante tem a estrutura da Fórmula III:

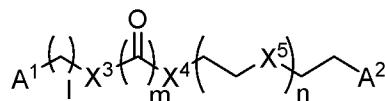


Fórmula V

em que A^1 é uma ligação entre o ligante e a porção química de ligação de proteína; A^2 é uma ligação entre o grupo de reticulação e o ligante; B^1 , B^2 , B^3 e B^4 são, cada um, independentemente selecionados a partir de alquila C_1-C_2 opcionalmente substituída, heteroalquila C_1-C_3 opcionalmente substituída, O, S, e NR^N ; R^N é hidrogênio, alquila C_{1-4} opcionalmente substituída, alquenila C_{2-4} opcionalmente substituída, alquinila C_{2-4} opcionalmente substituída, heterociclila C_{2-6} opcionalmente substituída, arila C_{6-12} opcionalmente substituída, ou heteroalquila C_{1-7} opcionalmente substituída; C^1 e C^2 são, cada um, independentemente, selecionados a partir de carbonila, tiocarbonila, sulfonila ou fos-

forila; f, g, h, I, j, e k são, cada um, independentemente, 0 ou 1; e D é alquila C₁₋₁₀ opcionalmente substituída, alquenila C₂₋₁₀ opcionalmente substituída, alquinila C₂₋₁₀ opcionalmente substituída, heterociclica C₂₋₆ opcionalmente substituída, arila C₆₋₁₂ opcionalmente substituída, polietileno glicol C_{2-C₁₀} opcionalmente substituído, ou heteroalquila C₁₋₁₀ opcionalmente substituída, ou uma ligação química ligando A¹-(B¹)_f-(C¹)_g-(B²)_h- a -(B³)_i-(C²)_j-(B⁴)_k-A²

133. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 130 a 132, caracterizado pelo fato de que o dito ligante compreende a estrutura da Fórmula IV:



Fórmula VI

em que A¹ é uma ligação entre o ligante e a porção química de ligação de proteína;

A² é uma ligação entre o grupo de reticulação e o ligante;

I é 0, 1, 2, ou 3;

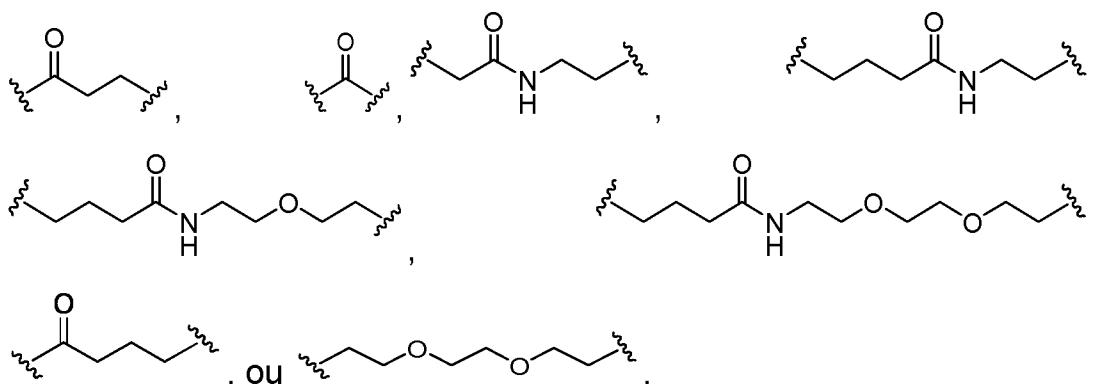
m é 0 ou 1;

n é 0, 1, ou 2; e

X³, X⁴, e X⁵ são, cada um, independentemente, ausente, O, S, -C≡C-, CR⁹R¹⁰ ou NR¹¹; e

cada R⁹, R¹⁰, e R¹¹ são, independentemente, hidrogênio, alquila C_{1-C₆} opcionalmente substituída, alquenila C_{2-C₆} opcionalmente substituída, alquinila C_{2-C₆} opcionalmente substituída, arila opcionalmente substituída, carbociclica C_{3-C₇}, C_{6-C₁₀} aril C_{1-C₆} alquila opcionalmente substituída, e C_{3-C₇} carbocicil C_{1-C₆} alquila opcionalmente substituída.

134. Conjugado, de acordo com a reivindicação 133, caracterizado pelo fato de que o dito ligante compreende a estrutura:



135. Método para produzir um conjugado que compreende uma porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada a uma proteína-alvo, caracterizado pelo fato de que o método compreende reagir (a) um composto que compreende uma porção química de ligação de proteína apresentadora e um grupo de reticulação com (b) uma proteína-alvo sob condições que permite a produção do dito conjugado.

136. Método para produzir um conjugado que compreende uma porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada a um proteína-alvo, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

fornecer (a) um composto que compreende uma porção química de ligação de proteína apresentadora e um grupo de reticulação; (b) uma proteína-alvo; e (c) uma proteína apresentadora; e

reagir o dito composto com a dita proteína-alvo sob condições que permitem a produção do dito conjugado.

137. Método, de acordo com a reivindicação 136, caracterizado pelo fato de que a dita proteína apresentadora se liga ao dito composto na ausência da dita proteína-alvo.

138. Método, de acordo com a reivindicação 136, caracterizado pelo fato de que a dita proteína apresentadora não se liga substancialmente ao dito composto na ausência da dita proteína-alvo.

139. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 136 a 138, caracterizado pelo fato de que o dito composto e a

dita proteína-alvo não reagem substancialmente na ausência da dita proteína apresentadora.

140. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 136 a 138, caracterizado pelo fato de que o dito composto e a dita proteína-alvo reagem na ausência da dita proteína apresentadora.

141. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 135 a 140, caracterizado pelo fato de que as ditas condições não compreendem um reagente redutor.

142. Complexo, caracterizado pelo fato de que compreende (i) um conjugado que compreende uma porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada a uma proteína-alvo e (ii) uma proteína apresentadora.

143. Complexo, de acordo com a reivindicação 142, caracterizado pelo fato de que a dita proteína apresentadora é uma proteína codificada por qualquer um dos genes da Tabela 1.

144. Complexo, de acordo com a reivindicação 142, caracterizado pelo fato de que a dita proteína apresentadora é um prolil isomerase.

145. Complexo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 142 a 144, caracterizado pelo fato de que a dita prolil isomerase é um membro da família de FKBP, um membro da família de ciclofilina, ou PIN1.

146. Complexo, de acordo com a reivindicação 145, caracterizado pelo fato de que o dito membro da família de FKBP é FKBP12, FKBP12.6, FKBP13, FKBP25, FKBP51 ou FKBP52.

147. Complexo, de acordo com a reivindicação 145, caracterizado pelo fato de que o dito membro da família de ciclofilina é PP1A, CYPB, CYPC, CYP40, CYPE, CYPD, NKTR, SRCyp, CYPH, CWC27, CYPL1, CYP60, CYPJ, PPIL4, PPIL6, RANBP2 ou PPWD1.

148. Método para produzir um complexo, caracterizado pelo

fato de que compreende (i) um conjugado que compreende uma porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada a uma proteína-alvo e (ii) uma proteína apresentadora, sendo que o dito método compreende combinar um conjugado que compreende uma porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada a uma proteína-alvo e uma proteína apresentadora sob condições que permitem a produção do dito complexo.

149. Método para produzir um complexo, caracterizado pelo fato de que compreende (i) um conjugado que compreende uma porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada a uma proteína-alvo e (ii) uma proteína apresentadora, sendo que o dito método compreende:

fornecer (a) um composto que compreende uma porção química de ligação de proteína apresentadora e um grupo de reticulação; (b) uma proteína-alvo; e (c) uma proteína apresentadora; e

reagir o dito composto com a dita proteína-alvo sob condições que permitem a produção do dito complexo.

150. Método, de acordo com a reivindicação 149, caracterizado pelo fato de que a dita proteína apresentadora se liga ao dito composto na ausência da dita proteína-alvo.

151. Método, de acordo com a reivindicação 149, caracterizado pelo fato de que a dita proteína apresentadora não se liga substancialmente ao dito composto na ausência da dita proteína-alvo.

152. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 149 a 151, caracterizado pelo fato de que o dito composto e a dita proteína-alvo não reagem substancialmente na ausência da dita proteína apresentadora.

153. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 149 a 151, caracterizado pelo fato de que o dito composto e a dita proteína-alvo reagem na ausência da dita proteína apresentadora.

154. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 148 a 153, caracterizado pelo fato de que as ditas condições não compreendem um reagente redutor.

155. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 148 a 154, caracterizado pelo fato de que as ditas condições compreendem um excesso da proteína apresentadora.

156. Conjugado, caracterizado pelo fato de que compreende uma porção química de ligação de proteína-alvo conjugada a uma proteína apresentadora.

157. Conjugado, de acordo com a reivindicação 156, caracterizado pelo fato de que a porção química de ligação de proteína-alvo do dito conjugado é capaz de interação não covalente com uma proteína-alvo.

158. Conjugado, de acordo com a reivindicação 156, caracterizado pelo fato de que a porção química de ligação de proteína-alvo do dito conjugado é capaz de interação covalente com uma proteína-alvo.

159. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 156 a 158, caracterizado pelo fato de que a dita proteína-alvo é uma GTPase, proteína de ativação de GTPase, fator de troca de nucleotídeo de Guanina, uma proteína de choque térmico, um canal iônico, uma proteína de bobina em espiral, uma quinase, uma fosfatase, uma ligase de ubiquitina, um fator de transcrição, um modificador/remodelador de cromatina, ou uma proteína com motivos e domínios de interação de proteína-proteína clássica.

160. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 156 a 159, caracterizado pelo fato de que a dita proteína-alvo compreende uma superfície indestrutível.

161. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 156 a 160, caracterizado pelo fato de que a dita proteína-alvo

não tem um bolso de ligação tradicional.

162. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 156 a 161, caracterizado pelo fato de que a dita proteína apresentadora é uma proteína codificada por qualquer um dos genes da Tabela 1.

163. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 156 a 161, caracterizado pelo fato de que a dita proteína apresentadora é uma prolil isomerase.

164. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 156 a 163, caracterizado pelo fato de que a dita proteína apresentadora é um membro da família de FKBP, um membro da família de ciclofilina ou PIN1.

165. Conjugado, de acordo com a reivindicação 164, caracterizado pelo fato de que o dito membro da família de FKBP é FKBP12, FKBP12.6, FKBP13, FKBP25, FKBP51 ou FKBP52.

166. Conjugado, de acordo com a reivindicação 164, caracterizado pelo fato de que o dito membro da família de ciclofilina é PP1A, CYPB, CYPC, CYP40, CYPE, CYPD, NKTR, SRCyp, CYPH, CWC27, CYPL1, CYP60, CYPJ, PPIL4, PPIL6, RANBP2 ou PPWD1.

167. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 156 a 166, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos da dita proteína apresentadora foi modificada para substituir pelo menos um aminoácido com um aminoácido reativo.

168. Conjugado, de acordo com a reivindicação 167, caracterizado pelo fato de que o dito aminoácido reativo é um aminoácido natural.

169. Conjugado, de acordo com a reivindicação 168, caracterizado pelo fato de que o dito aminoácido reativo é uma cisteína, lisina, tirosina, ácido aspártico, ácido glutâmico ou serina.

170. Conjugado, de acordo com a reivindicação 167, carac-

terizado pelo fato de que o dito aminoácido reativo é um aminoácido não natural.

171. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 156 a 170, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos da dita proteína apresentadora foi modificada para substituir pelo menos um aminoácido reativo nativo com um aminoácido não reativo.

172. Conjugado, de acordo com a reivindicação 171, caracterizado pelo fato de que o pelo menos um aminoácido reativo nativo é uma cisteína, lisina, tirosina, ácido aspártico, ácido glutâmico ou serina.

173. Conjugado, de acordo com a reivindicação 171 ou 172, caracterizado pelo fato de que o dito pelo menos um aminoácido reativo nativo é um aminoácido exposto a solvente.

174. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 171 a 173, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos da dita proteína apresentadora é modificada para substituir todos os aminoácidos reativos com um aminoácido não reativo.

175. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 171 a 174, caracterizado pelo fato de que o dito aminoácido não reativo é um aminoácido natural.

176. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 167 a 175, caracterizado pelo fato de que a dita substituição é uma substituição conservativa.

177. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 171 a 176, caracterizado pelo fato de que o dito aminoácido reativo é substituído por uma serina, valina, alanina, isoleucina, treonina, tirosina, ácido aspártico, ácido glutâmico ou leucina.

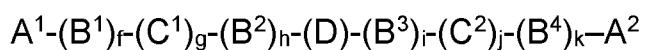
178. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 171 a 174, caracterizado pelo fato de que o dito aminoácido

não reativo é um aminoácido não natural.

179. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 156 a 178, caracterizado pelo fato de que a dita porção química de ligação de proteína-alvo e a dita proteína apresentadora são unidas através de um ligante.

180. Conjugado, de acordo com a reivindicação 179, caracterizado pelo fato de que o dito ligante é 1 a 20 átomos de comprimento.

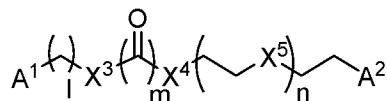
181. Conjugado, de acordo com a reivindicação 179 ou 180, caracterizado pelo fato de que o dito ligante tem a estrutura da Fórmula V:



Fórmula V

em que A^1 é uma ligação entre o ligante e a porção química de ligação de proteína; A^2 é uma ligação entre o grupo de reticulação e o ligante; B^1 , B^2 , B^3 e B^4 são, cada um, independentemente selecionados a partir de alquila C_{1-2} opcionalmente substituída, heteroalquila C_{1-3} opcionalmente substituída, O, S, e NR^N ; R^N é hidrogênio, alquila C_{1-4} opcionalmente substituída, alquenila C_{2-4} opcionalmente substituída, alquinila C_{2-4} opcionalmente substituída, heterociclila C_{2-6} opcionalmente substituída, arila C_{6-12} opcionalmente substituída, ou heteroalquila C_{1-7} opcionalmente substituída; C^1 e C^2 são, cada um, independentemente, selecionados a partir de carbonila, tiocarbonila, sulfonila ou fosforila; f , g , h , i , j , e k são, cada um, independentemente, 0 ou 1; e D é alquila C_{1-10} opcionalmente substituída, alquenila C_{2-10} opcionalmente substituída, alquinila C_{2-10} opcionalmente substituída, heterociclila C_{2-6} opcionalmente substituída, arila C_{6-12} opcionalmente substituída, polietileno glicol $C_{2-C_{10}}$ opcionalmente substituído, ou heteroalquila C_{1-10} opcionalmente substituída, ou uma ligação química ligando $A^1-(B^1)_f-(C^1)_g-(B^2)_h-$ a $-(B^3)_i-(C^2)_j-(B^4)_k-A^2$

182. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 179 a 181, caracterizado pelo fato de que o dito ligante compreende a estrutura da Fórmula IV:



Fórmula VI

em que A^1 é uma ligação entre o ligante e a porção química de ligação de proteína;

A^2 é uma ligação entre o grupo de reticulação e o ligante;

I é 0, 1, 2, ou 3;

m é 0 ou 1;

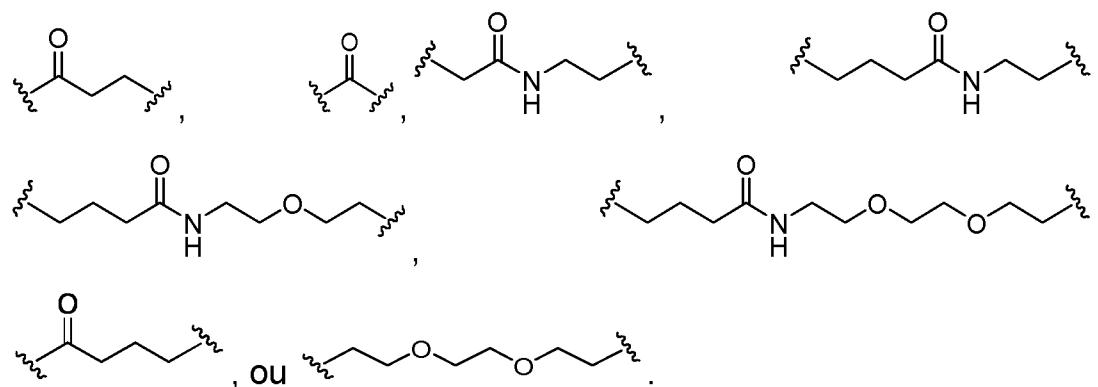
n é 0, 1, ou 2; e

X^3 , X^4 , e X^5 são, cada um, independentemente, ausente, O,

S, $-\text{C} \equiv \text{C}-$, CR^9R^{10} ou NR^{11} ; e

cada R^9 , R^{10} , e R^{11} são, independentemente, hidrogênio, alquila $\text{C}_1\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, alquenila $\text{C}_2\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, alquinila $\text{C}_2\text{-C}_6$ opcionalmente substituída, arila opcionalmente substituída, carbociclila $\text{C}_3\text{-C}_7$, $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ aril $\text{C}_1\text{-C}_6$ alquila opcionalmente substituída, e $\text{C}_3\text{-C}_7$ carbocicil C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída.

183. Conjugado, de acordo com a reivindicação 182, caracterizado pelo fato de que o dito ligante compreende a estrutura:



184. Método para produzir um conjugado que compreende

uma porção química de ligação de proteína-alvo conjugada a uma proteína apresentadora, caracterizado pelo fato de que o método compreende reagir (a) um composto que compreende uma porção química de ligação de proteína-alvo e um grupo de reticulação com (b) uma proteína apresentadora sob condições que permite a produção do dito conjugado.

185. Método para produzir um conjugado que compreende uma porção química de ligação de proteína-alvo conjugada a uma proteína apresentadora, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

fornecer (a) um composto que compreende uma porção química de ligação de proteína-alvo e um grupo de reticulação; (b) uma proteína apresentadora; e (c) uma proteína-alvo; e

reagir o dito composto com a dita proteína apresentadora sob condições que permitem a produção do dito conjugado.

186. Método, de acordo com a reivindicação 185, caracterizado pelo fato de que a dita proteína-alvo se liga ao dito composto na ausência da dita proteína apresentadora.

187. Método, de acordo com a reivindicação 185, caracterizado pelo fato de que a dita proteína-alvo não se liga substancialmente ao dito composto na ausência da dita proteína apresentadora.

188. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 185 a 187, caracterizado pelo fato de que o dito composto e a dita proteína apresentadora não reagem substancialmente na ausência da dita proteína-alvo.

189. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 185 a 187, caracterizado pelo fato de que o dito composto e a dita proteína apresentadora reagem na ausência da dita proteína-alvo.

190. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 184 a 189, caracterizado pelo fato de que as ditas condições não

compreendem um reagente redutor.

191. Complexo, caracterizado pelo fato de que compreende (i) um conjugado que compreende uma porção química de ligação de proteína-alvo conjugada a uma proteína apresentadora e (ii) uma proteína-alvo.

192. Complexo, de acordo com a reivindicação 191, caracterizado pelo fato de que a dita proteína-alvo é uma GTPase, proteína de ativação de GTPase, fator de troca de nucleotídeo de Guanina, uma proteína de choque térmico, um canal iônico, uma proteína de bobina em espiral, uma quinase, uma fosfatase, uma ligase de ubiquitina, um fator de transcrição, um modificador/remodelador de cromatina, ou uma proteína com motivos e domínios de interação de proteína-proteína clássica.

193. Complexo, de acordo com a reivindicação 191 ou 192, caracterizado pelo fato de que a dita proteína-alvo compreende uma superfície indestrutível.

194. Complexo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 191 a 193, caracterizado pelo fato de que a dita proteína-alvo não tem um bolso de ligação tradicional.

195. Método para produzir um complexo, caracterizado pelo fato de que compreende (i) um conjugado que compreende uma porção química de ligação de proteína-alvo conjugada a uma proteína apresentadora e (ii) uma proteína-alvo, sendo que o dito método compreende combinar um conjugado que compreende uma porção química de ligação de proteína-alvo conjugada a uma proteína apresentadora e uma proteína-alvo sob condições que permitem a produção do dito complexo.

196. Método para produzir um complexo, caracterizado pelo fato de que compreende (i) um conjugado que compreende uma porção química de ligação de proteína-alvo conjugada a uma proteína

apresentadora e (ii) uma proteína-alvo, sendo que o dito método compreende:

fornecer (a) um composto que compreende uma porção química de ligação de proteína-alvo e um grupo de reticulação; (b) uma proteína apresentadora; e (c) uma proteína-alvo; e

reagir o dito composto com a dita proteína apresentadora sob condições que permitem a produção do dito complexo.

197. Método, de acordo com a reivindicação 196, caracterizado pelo fato de que a dita proteína-alvo se liga ao dito composto na ausência da dita proteína apresentadora.

198. Método, de acordo com a reivindicação 196, caracterizado pelo fato de que a dita proteína-alvo não se liga substancialmente ao dito composto na ausência da dita proteína apresentadora.

199. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 196 a 198, caracterizado pelo fato de que o dito composto e a dita proteína apresentadora não reagem substancialmente na ausência da dita proteína-alvo.

200. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 196 a 198, caracterizado pelo fato de que o dito composto e a dita proteína apresentadora reagem na ausência da dita proteína-alvo.

201. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 195 a 200, caracterizado pelo fato de que as ditas condições não compreendem um reagente redutor.

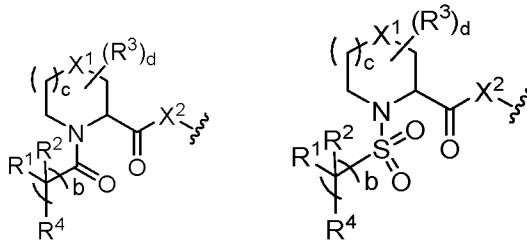
202. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 196 a 201, caracterizado pelo fato de que as ditas condições compreendem um excesso da proteína-alvo.

203. Composto, caracterizado pelo fato de que tem a estrutura da Fórmula VII:

A-L-B

Fórmula VII

em que A compreende a estrutura da Fórmula VIIIa ou VIIIb:



Fórmula VIIIa

Fórmula VIIIb

em que b e c são independentemente 0, 1, ou 2;

d é 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7;

X¹ e X² são, cada um, independentemente, ausente, CH₂, O, S, SO, SO₂ ou NR¹³;

cada R¹ e R² são, independentemente, hidrogênio, hidroxila, amino opcionalmente substituída, halogênio, tiol, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, carbociclila C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heterociclila C₂-C₉ opcionalmente substituída, C₂-C₉ heterocicil C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, ou R¹ e R² se combinam com o átomo de carbono ao qual os mesmos são ligados para formar C=O ou R¹ e R² se combinam para formar uma carbociclila C₃-C₁₀ opcionalmente substituída ou heterociclila C₂-C₉ opcionalmente substituída; e

cada R³ é, independentemente, hidroxila, amino opcionalmente substituída, halogênio, tiol, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, heteroalquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, carbociclila C₃-C₁₀ opcionalmente substituída-

da, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, heterociclila C₂-C₉ opcionalmente substituída, ou C₂-C₉ heterocicil C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída ou dois R⁸ se combinam para formar uma carbociclila C₃-C₁₀ opcionalmente substituída, arila C₆-C₁₀ opcionalmente substituída, heterociclila C₂-C₉ opcionalmente substituída ou heteroarila C₂-C₉ opcionalmente substituída; e

R⁴ é alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída;

L é um ligante opcional; e

B é uma porção química de ligação de proteína-alvo.

204. Composto, de acordo com a reivindicação 203, caracterizado pelo fato de que a interação entre a dita porção química de ligação de proteína-alvo e uma proteína-alvo é não covalente.

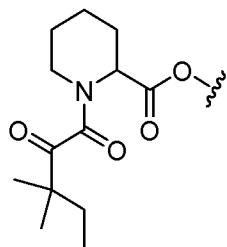
205. Composto, de acordo com a reivindicação 203, caracterizado pelo fato de que a interação entre a dita porção química de ligação de proteína-alvo e uma proteína-alvo é covalente.

206. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 203 a 205, caracterizado pelo fato de que a dita proteína-alvo é uma GTPase, proteína de ativação de GTPase, fator de troca de nucleotídeo de Guanina, uma proteína de choque térmico, um canal iônico, uma proteína de bobina em espiral, uma quinase, uma fosfatase, uma ligase de ubiquitina, um fator de transcrição, um modificador/remodelador de cromatina, ou uma proteína com motivos e domínios de interação de proteína-proteína clássica.

207. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 203 a 206, caracterizado pelo fato de que a dita proteína-alvo compreende uma superfície indestrutível.

208. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 203 a 207, caracterizado pelo fato de que a dita proteína-alvo não tem um bolso de ligação tradicional.

209. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 203 a 208, caracterizado pelo fato de que A compreende a estrutura:



210. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 203 a 209, caracterizado pelo fato de que a dita porção química de ligação de proteína-alvo e a dita proteína apresentadora são conjugados através de um ligante.

211. Composto, de acordo com a reivindicação 210, caracterizado pelo fato de que o dito ligante é 1 a 20 átomos de comprimento.

212. Composto, de acordo com a reivindicação 210 ou 211, caracterizado pelo fato de que o dito ligante tem a estrutura da Fórmula V:

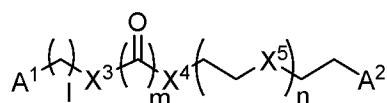


Fórmula V

em que A^1 é uma ligação entre o ligante e a porção química de ligação de proteína; A^2 é uma ligação entre o grupo de reticulação e o ligante; B^1 , B^2 , B^3 e B^4 são, cada um, independentemente selecionados a partir de alquila C_1-C_2 opcionalmente substituída, heteroalquila C_1-C_3 opcionalmente substituída, O, S, e NR^N ; R^N é hidrogênio, alquila C_{1-4} opcionalmente substituída, alquenila C_{2-4} opcionalmente substituída, alquinila C_{2-4} opcionalmente substituída, heterociclica C_{2-6} opcionalmente substituída, arila C_{6-12} opcionalmente substituída, ou heteroalquila C_{1-7} opcionalmente substituída; C^1 e C^2 são, cada um, independentemente, selecionados a partir de carbonila, tiocarbonila, sulfonyla ou fosforila; f , g , h , i , j , e k são, cada um, independentemente, 0 ou

1; e D é alquila C₁₋₁₀ opcionalmente substituída, alquenila C₂₋₁₀ opcionalmente substituída, alquinila C₂₋₁₀ opcionalmente substituída, heterociclica C₂₋₆ opcionalmente substituída, arila C₆₋₁₂ opcionalmente substituída, polietileno glicol C_{2-C10} opcionalmente substituído, ou heteroalquila C₁₋₁₀ opcionalmente substituída, ou uma ligação química ligando A¹-(B¹)_r-(C¹)_g-(B²)_h- a -(B³)_i-(C²)_j-(B⁴)_k-A²

213. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 210 a 212, caracterizado pelo fato de que o dito ligante compreende a estrutura da Fórmula IV:



Fórmula VI

em que A^1 é uma ligação entre o ligante e a porção química de ligação de proteína;

A^2 é uma ligação entre o grupo de reticulação e o ligante;

l é 0, 1, 2, ou 3;

$m \in \{0, 1\}$

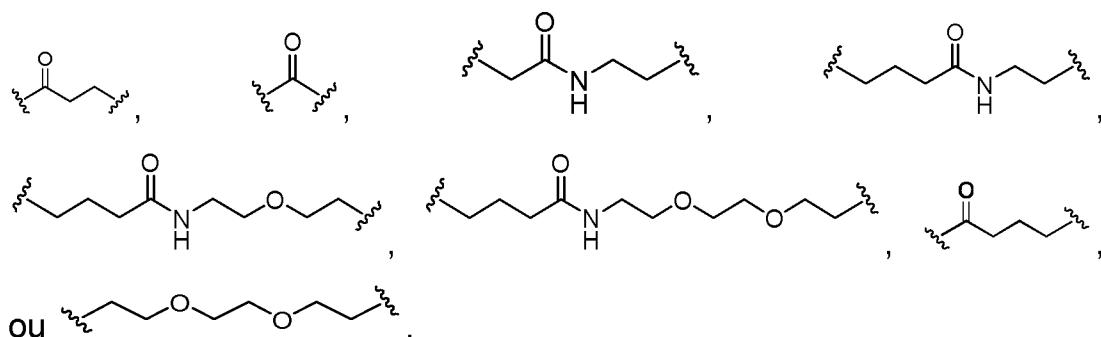
$n \in 0, 1, \text{ ou } 2; e$

X^3 , X^4 , e X^5 são, cada um, independentemente, ausente. O.

S, -C \equiv C-, CR⁹R¹⁰ ou NR¹¹; e

cada R⁹, R¹⁰, e R¹¹ são, independentemente, hidrogênio, alquila C₁-C₆ opcionalmente substituída, alquenila C₂-C₆ opcionalmente substituída, alquinila C₂-C₆ opcionalmente substituída, arila opcionalmente substituída, carbociclila C₃-C₇, C₆-C₁₀ aril C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída, e C₃-C₇ carbociclil C₁-C₆ alquila opcionalmente substituída.

214. Composto, de acordo com a reivindicação 213, caracterizado pelo fato de que o dito ligante compreende a estrutura:



215. Complexo, caracterizado pelo fato de que compreende (i) um composto, como definido na reivindicação 203; (ii) uma proteína-alvo; e (iii) uma proteína apresentadora.

216. Complexo, de acordo com a reivindicação 215, caracterizado pelo fato de que a dita proteína-alvo é uma GTPase, proteína de ativação de GTPase, fator de troca de nucleotídeo de Guanina, uma proteína de choque térmico, um canal iônico, uma proteína de bobina em espiral, uma quinase, uma fosfatase, uma ligase de ubiquitina, um fator de transcrição, um modificador/remodelador de cromatina, ou uma proteína com motivos e domínios de interação de proteína-proteína clássica.

217. Complexo, de acordo com a reivindicação 215 ou 216, caracterizado pelo fato de que a dita proteína-alvo compreende uma superfície indestrutível.

218. Complexo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 215 a 217, caracterizado pelo fato de que a dita proteína-alvo não tem um bolso de ligação tradicional.

219. Complexo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 215 a 218, caracterizado pelo fato de que a dita proteína apresentadora é uma proteína codificada por qualquer um dos genes da Tabela 1.

220. Complexo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 215 a 218, caracterizado pelo fato de que a dita proteína apresentadora é uma prolil isomerase.

221. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 215 a 220, caracterizado pelo fato de que a dita proteína apresentadora é um membro da família de FKBP, um membro da família de ciclofilina ou PIN1.

222. Composto, de acordo com a reivindicação 221, caracterizado pelo fato de que o dito membro da família de FKBP é FKBP12, FKBP12.6, FKBP13, FKBP25, FKBP51 ou FKBP52.

223. Complexo, de acordo com a reivindicação 221, caracterizado pelo fato de que o dito membro da família de ciclofilina é PP1A, CYPB, CYPC, CYP40, CYPE, CYPD, NKTR, SRCyp, CYPH, CWC27, CYPL1, CYP60, CYPJ, PPIL4, PPIL6, RANBP2 ou PPWD1.

224. Método para identificar um conjugado que comprehende uma porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada a um proteína-alvo capaz de formar um complexo com uma proteína apresentadora, caracterizado pelo fato de que o método comprehende:

(a) fornecer (i) um conjugado que comprehende uma porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada a uma proteína-alvo e (ii) uma proteína apresentadora.

(b) combinar o dito conjugado e a dita proteína apresentadora sob condições adequadas para permitir a formação de complexo se o dito conjugado for capaz de formar um complexo com a proteína apresentadora; e

(c) determinar se o dito conjugado e a dita proteína apresentadora formam um complexo,

em que se o dito conjugado e a dita proteína apresentadora formam um complexo, o dito conjugado é identificado como um conjugado capaz de formar um complexo com uma proteína apresentadora.

Identificar, assim, um conjugado que comprehende uma porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada a um

proteína-alvo capaz de formar um complexo com uma proteína apresentadora.

225. Método para identificar uma proteína-alvo que se liga a uma proteína apresentadora, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

(a) fornecer (i) um conjugado que compreende uma porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada a uma proteína-alvo e (ii) uma proteína apresentadora.

(b) combinar o dito conjugado e a dita proteína apresentadora sob condições adequadas para permitir a formação de complexo se o dito conjugado for capaz de formar um complexo com a proteína apresentadora; e

(c) determinar se a dita proteína-alvo se liga à dita proteína apresentadora no dito complexo,

em que se a dita proteína-alvo se liga à dita proteína apresentadora, a dita proteína-alvo é identificada como ligação à proteína apresentadora,

identificar, assim, uma proteína-alvo que se liga a uma proteína apresentadora.

226. Método para identificar uma proteína-alvo capaz de reagir com um composto na presença de uma proteína apresentadora, em que o composto compreende uma porção química de ligação de proteína apresentadora e uma porção química de reticulação, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

(a) fornecer (i) um composto que compreende uma porção química de ligação de proteína apresentadora e uma porção química de reticulação; (ii) uma proteína-alvo; e (iii) uma proteína apresentadora;

(b) combinar o dito composto, a dita proteína-alvo, e a dita proteína apresentadora sob condições adequadas para permitir a for-

mação de complexo se o dito composto for capaz de formar um complexo com a proteína apresentadora; e

(c) determinar se a dita proteína-alvo e o dito composto reagem durante a formação do dito complexo para formar um conjugado,

em que se a dita proteína-alvo e o dito composto reagirem durante a formação do dito complexo para formar um conjugado, a dita proteína-alvo é identificada como uma proteína-alvo capaz de reagir com o composto na presença de uma proteína apresentadora,

Identificar, assim, uma proteína-alvo capaz de reagir com um composto que compreende uma porção química de ligação de proteína apresentadora e uma porção química de reticulação na presença de uma proteína apresentadora.

227. Método para identificar uma proteína-alvo que se liga a uma proteína apresentadora, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

(a) fornecer (i) um composto que compreende uma porção química de ligação de proteína apresentadora e uma porção química de reticulação; (ii) uma proteína-alvo; e (iii) uma proteína apresentadora;

(b) combinar o dito composto, a dita proteína-alvo, e a dita proteína apresentadora sob condições adequadas para permitir a formação de complexo se o dito composto for capaz de formar um complexo com a proteína apresentadora; e

(c) determinar se a dita proteína-alvo se liga à dita proteína apresentadora no dito complexo,

em que se a dita proteína-alvo se liga à dita proteína apresentadora, a dita proteína-alvo é identificada como uma proteína-alvo que se liga a uma proteína apresentadora,

identificar, assim, uma proteína-alvo que se liga a uma proteína apresentadora.

228. Método para identificar uma proteína-alvo capaz de formar um complexo com uma proteína apresentadora, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

(a) fornecer (i) um composto, como definido na reivindicação 181; (ii) uma proteína-alvo; e (iii) uma proteína apresentadora.

(b) combinar o dito composto, a dita proteína-alvo, e a dita proteína apresentadora sob condições adequadas para permitir a formação de complexo se o dito composto for capaz de formar um complexo com a proteína apresentadora; e

(c) determinar se o dito composto, a dita proteína-alvo e a dita proteína apresentadora formam um complexo,

em que se o dito composto, a dita proteína-alvo, e a dita proteína apresentadora formarem um complexo, a dita proteína-alvo é identificada como uma proteína-alvo capaz de formar um complexo com uma proteína apresentadora,

Identificar, assim, uma proteína-alvo capaz de formar um complexo com uma proteína apresentadora.

229. Método para identificar uma proteína-alvo que se liga a uma proteína apresentadora, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

(a) fornecer (i) um composto, como definido na reivindicação 181; (ii) uma proteína-alvo; e (iii) uma proteína apresentadora.

(b) combinar o dito composto, a dita proteína-alvo, e a dita proteína apresentadora sob condições adequadas para permitir a formação de complexo se o dito composto for capaz de formar um complexo com a proteína apresentadora; e

(c) determinar se a dita proteína-alvo se liga à dita proteína apresentadora no dito complexo,

em que se a dita proteína-alvo se liga à dita proteína apresentadora, a dita proteína-alvo é identificada como uma proteína-alvo

que se liga a uma proteína apresentadora,

identificar, assim, uma proteína-alvo que se liga a uma proteína apresentadora.

230. Método para identificar uma localização numa proteína-alvo para formar um conjugado com uma porção química de ligação de proteína apresentadora, conjugado o qual é capaz de formar um complexo com uma proteína apresentadora, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

(a) fornecer (i) um conjugado que compreende uma porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada a uma proteína-alvo numa localização e (ii) uma proteína apresentadora.

(b) combinar o dito conjugado e a dita proteína apresentadora sob condições adequadas para permitir a formação de complexo se o dito conjugado for capaz de formar um complexo com a proteína apresentadora;

(c) determinar se o dito conjugado e a dita proteína apresentadora formam um complexo; e

(d) repetir as etapas (a) a (c) com a dita porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada em diferentes localizações na dita proteína-alvo até que um conjugado e a dita proteína apresentadora formem um complexo,

em que uma localização numa proteína-alvo para formar um conjugado com uma porção química de ligação de proteína apresentadora, conjugado o qual é capaz de formar um complexo com uma proteína apresentadora é identificado se o dito conjugado e a dita proteína apresentadora formarem um complexo,

identificar, assim, uma localização numa proteína-alvo para formar um conjugado capaz de formar um complexo com uma proteína apresentadora.

231. Método para identificar uma localização numa proteí-

na-alvo para formar um conjugado com uma porção química de ligação de proteína apresentadora, conjugado o qual é capaz de formar um complexo com uma proteína apresentadora, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

(a) fornecer (i) um composto que compreende uma porção química de ligação de proteína apresentadora e um grupo de reticulação; (ii) uma proteína-alvo; e (iii) uma proteína apresentadora;

(b) combinar o dito composto com a dita proteína-alvo na presença da dita proteína apresentadora sob condições que permitem a formação de um conjugado que compreende uma porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada a uma proteína-alvo numa localização;

(c) determinar se o dito conjugado e a dita proteína apresentadora formam um complexo; e

(d) repetir as etapas (a) a (c) em que a dita porção química de ligação de proteína apresentadora é conjugada em diferentes localizações na dita proteína-alvo até que um conjugado e a dita proteína apresentadora formem um complexo;

em que uma localização numa proteína-alvo para formar um conjugado o qual é capaz de formar um complexo com uma proteína apresentadora é identificado se o dito conjugado e a dita proteína apresentadora formarem um complexo,

identificar, assim, uma localização numa proteína-alvo para formar um conjugado com uma porção química de ligação de proteína apresentadora, conjugado o qual é capaz de formar um complexo com uma proteína apresentadora.

232. Método, de acordo com a reivindicação 230 ou 231, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos da dita proteína-alvo foi modificada para substituir pelo menos um aminoácido com um aminoácido reativo.

233. Método, de acordo com a reivindicação 232, caracterizado pelo fato de que o dito aminoácido reativo é um aminoácido natural.

234. Método, de acordo com a reivindicação 233, caracterizado pelo fato de que o dito aminoácido reativo é uma cisteína, lisina, tirosina, ácido aspártico, ácido glutâmico ou serina.

235. Método, de acordo com a reivindicação 232, caracterizado pelo fato de que o dito aminoácido reativo é um aminoácido não natural.

236. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 230 a 235, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos da dita proteína-alvo foi modificada para substituir pelo menos um aminoácido reativo nativo com um aminoácido não reativo.

237. Método, de acordo com a reivindicação 236, caracterizado pelo fato de que o pelo menos um aminoácido reativo nativo é uma cisteína, lisina, tirosina, ácido aspártico, ácido glutâmico ou serina.

238. Método, de acordo com a reivindicação 236 ou 237, caracterizado pelo fato de que o dito pelo menos um aminoácido reativo nativo é um aminoácido exposto a solvente.

239. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 236 a 238, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos da dita proteína-alvo é modificada para substituir todos os aminoácidos reativos com um aminoácido não reativo.

240. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 236 a 239, caracterizado pelo fato de que o dito aminoácido não reativo é um aminoácido natural.

241. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 230 a 240, caracterizado pelo fato de que a dita substituição é uma substituição conservativa.

242. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 232 a 241, caracterizado pelo fato de que o dito aminoácido reativo é substituído por uma serina, valina, alanina, isoleucina, treonina, tirosina, ácido aspártico, ácido glutâmico ou leucina.

243. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 232 a 242, caracterizado pelo fato de que o dito aminoácido não reativo é um aminoácido não natural.

244. Método para identificar um composto capaz de se ligar de modo covalente a uma proteína-alvo na presença de uma proteína apresentadora, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

(a) fornecer uma amostra que compreende (i) um composto que compreende uma porção química de ligação de proteína apresentadora e um grupo de reticulação; (ii) uma proteína-alvo; e (iii) uma proteína apresentadora; e

(b) determinar se o dito composto e a dita proteína-alvo formam uma ligação covalente por meio do grupo de reticulação do dito composto na dita amostra,

em que um composto é identificado como ligando de modo covalente a uma proteína-alvo na presença de uma proteína apresentadora se o dito composto e a dita proteína-alvo reagirem na dita amostra.

245. Método para identificar um composto capaz de ligação covalente e seletiva a uma proteína-alvo na presença de uma proteína apresentadora, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

(a) fornecer uma primeira amostra que compreende (i) um composto que compreende uma porção química de ligação de proteína apresentadora e a grupo de reticulação; (ii) a proteína-alvo; e (iii) uma proteína apresentadora e uma segunda amostra que compreende (i) o mesmo composto que compreende uma porção química de ligação de proteína apresentadora e um grupo de reticulação como na

primeira amostra e (ii) a mesma proteína-alvo como na primeira amostra; e

(b) determinar a extensão à qual o dito composto e a dita proteína-alvo reagem na dita primeira amostra em comparação à dita segunda amostra,

em que um composto é identificado como ligando de modo covalente e seletivo a uma proteína-alvo na presença de uma proteína apresentadora se o dito composto e a dita proteína-alvo reagirem na dita primeira amostra mais que na dita segunda amostra.

246. Método, de acordo com a reivindicação 245, caracterizado pelo fato de que um composto é identificado como ligando de modo covalente e seletivo a uma proteína-alvo na presença de uma proteína apresentadora se o dito composto e a dita proteína-alvo reagirem na dita primeira amostra pelo menos 5 vezes mais que na dita segunda amostra.

247. Método, de acordo com a reivindicação 245 ou 246, caracterizado pelo fato de que um composto é identificado como ligando de modo covalente e seletivo a uma proteína-alvo na presença de uma proteína apresentadora se o dito composto e a dita proteína-alvo reagirem na dita primeira amostra, mas não reage substancialmente na dita segunda amostra.

248. Método para identificar um conjugado capaz de formar um complexo com uma proteína apresentadora, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

(a) fornecer (i) um conjugado que compreende uma porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada a uma proteína-alvo e (ii) uma proteína apresentadora; e

(b) combinar o dito conjugado e a dita proteína apresentadora sob condições adequadas para permitir a formação de complexo se o dito conjugado for capaz de formar um complexo com a proteína

apresentadora;

(c) determinar se o dito conjugado e a dita proteína apresentadora formam um complexo,

em que um conjugado é identificado como capaz de formar um complexo com uma proteína apresentadora se o dito conjugado e a dita proteína apresentadora formarem um complexo,

identificar, assim, um conjugado capaz de formar um complexo com uma proteína apresentadora.

249. Método para determinar a estrutura de uma interface num complexo que compreende uma proteína apresentadora e uma proteína-alvo, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

(a) fornecer (i) um conjugado que compreende uma porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada a uma proteína-alvo e (ii) uma proteína apresentadora.

(b) combinar o dito conjugado e a dita proteína apresentadora sob condições adequadas para permitir a formação de complexo se o dito conjugado for capaz de formar um complexo com a proteína apresentadora; e

(c) determinar a estrutura de cristal do dito complexo,

em que a estrutura da interface compreende pelo menos a porção da estrutura cristal entre a dita proteína apresentadora e a dita proteína-alvo,

determinar, assim, a estrutura de uma interface num complexo que compreende uma proteína apresentadora e uma proteína-alvo.

250. Método para determinar a estrutura de uma interface num complexo que compreende uma proteína apresentadora e uma proteína-alvo, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

(a) fornecer (i) um composto que compreende uma porção química de ligação de proteína apresentadora e uma porção química

de reticulação; (ii) uma proteína-alvo; e (iii) uma proteína apresentadora;

(b) combinar o dito composto, a dita proteína-alvo, e a dita proteína apresentadora sob condições adequadas para permitir a formação de complexo se o dito composto for capaz de formar um complexo com a proteína apresentadora; e

(c) determinar a estrutura de cristal do dito complexo, em que a estrutura da interface compreende pelo menos a porção da estrutura cristal entre a dita proteína apresentadora e a dita proteína-alvo,

determinar, assim, a estrutura de uma interface num complexo que compreende uma proteína apresentadora e uma proteína-alvo.

251. Método para determinar a estrutura de uma interface num complexo que compreende uma proteína apresentadora e uma proteína-alvo, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

(a) fornecer (i) um composto, como definido na reivindicação 203; (ii) uma proteína-alvo; e (iii) uma proteína apresentadora.

(b) combinar o dito composto, a dita proteína-alvo, e a dita proteína apresentadora sob condições adequadas para permitir a formação de complexo se o dito composto for capaz de formar um complexo com a proteína apresentadora; e

(c) determinar a estrutura de cristal do dito complexo, em que a estrutura da interface compreende pelo menos a porção da estrutura cristal entre a dita proteína apresentadora e a dita proteína-alvo;

determinar, assim, a estrutura de uma interface num complexo que compreende uma proteína apresentadora e uma proteína-alvo.

252. Método, de acordo com qualquer uma das reivindica-

ções 249 a 251, caracterizado pelo fato de que a dita interface num complexo que compreende uma proteína apresentadora e uma proteína-alvo é um bolso de ligação.

253. Método para obter coordenadas de cristal de raios X para um complexo, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

(a) fornecer (i) um conjugado que compreende uma porção química de ligação de proteína apresentadora conjugada a uma proteína-alvo e (ii) uma proteína apresentadora.

(b) combinar o dito conjugado e a dita proteína apresentadora sob condições adequadas para permitir a formação de complexo se o dito conjugado for capaz de formar um complexo com a proteína apresentadora; e

(c) determinar a estrutura de cristal do dito complexo, obter, assim, as coordenadas de cristal de raios X para o dito complexo.

254. Método para obter coordenadas de cristal de raios X para um complexo, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

(a) fornecer (i) um composto que compreende uma porção química de ligação de proteína apresentadora e uma porção química de reticulação; (ii) uma proteína-alvo; e (iii) uma proteína apresentadora;

(b) combinar o dito composto, a dita proteína-alvo, e a dita proteína apresentadora sob condições adequadas para permitir a formação de complexo se o dito composto for capaz de formar um complexo com a proteína apresentadora; e

(c) determinar a estrutura de cristal do dito complexo, obter, assim, as coordenadas de cristal de raios X para o dito complexo.

255. Método para obter coordenadas de cristal de raios X para um complexo, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

(a) fornecer (i) um composto, como definido na reivindicação 203; (ii) uma proteína-alvo; e (iii) uma proteína apresentadora.

(b) combinar o dito composto, a dita proteína-alvo, e a dita proteína apresentadora sob condições adequadas para permitir a formação de complexo se o dito composto for capaz de formar um complexo com a proteína apresentadora; e

(c) determinar a estrutura de cristal do dito complexo, obter, assim, as coordenadas de cristal de raios X para o dito complexo.

256. Método para determinar os resíduos sobre uma proteína-alvo que participa na ligação com uma proteína apresentadora, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

(a) fornecer coordenadas de cristal de raios X de um complexo obtido por um método, como definido em qualquer uma das reivindicações 253 a 255;

(b) identificar os resíduos da dita proteína-alvo que compreendem um átomo dentro de 4 Å de um átomo na dita proteína apresentadora;

determinar, assim, os resíduos sobre uma proteína-alvo que participa na ligação com uma proteína apresentadora.

257. Método para determinar propriedades bioquímicas e/ou biofísicas de um complexo, como definido em qualquer uma das reivindicações 142 a 147, 191 a 194, ou 215 a 223, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

(a) fornecer coordenadas de cristal de raios X de um complexo, como definido em qualquer uma das reivindicações 142 a 147, 191 a 194, ou 215 a 223 obtidas por um método, como definido

em qualquer uma das reivindicações 253 a 255;

(b) calcular uma propriedade bioquímica e/ou biofísica do dito complexo;

determinar, assim, propriedades bioquímicas e/ou biofísicas de um complexo de proteína apresentadora/proteína-alvo.

258. Método, de acordo com a reivindicação 257, caracterizado pelo fato de que as ditas propriedades bioquímicas e/ou biofísicas compreendem a energia livre de ligação do dito complexo, o K_d do dito complexo, o K_i do dito complexo, o K_{inact} do dito complexo, e/ou o K_i/K_{inact} do dito complexo.

259. Método, de acordo com a reivindicação 258, caracterizado pelo fato de que as ditas propriedades bioquímicas e/ou biofísicas compreendem a energia livre de ligação do dito complexo.

260. Método, de acordo com a reivindicação 259, caracterizado pelo fato de que a dita energia livre de ligação do dito complexo é determinado por calorimetria de titulação isotérmica.

261. Método, de acordo com a reivindicação 258, caracterizado pelo fato de que as ditas propriedades bioquímicas e/ou biofísicas compreendem o K_d do dito complexo.

262. Método, de acordo com a reivindicação 261, caracterizado pelo fato de que o dito K_d do dito complexo é determinado por ressonância plasmônica de superfície.

263. Método, de acordo com a reivindicação 258, caracterizado pelo fato de que as ditas propriedades bioquímicas e/ou biofísicas compreendem o K_i do dito complexo, o K_{inact} do dito complexo, e/ou o K_i/K_{inact} do dito complexo.

264. Método, de acordo com a reivindicação 263, caracterizado pelo fato de que o dito K_i do dito complexo, o dito K_{inact} do dito complexo, e/ou o dito K_i/K_{inact} do dito complexo é determinado por espectrometria de massa.

265. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um composto, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 98 ou 203 a 214 e um veículo adequado.

266. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um composto, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 98 ou 203 a 214, e um veículo farmaceuticamente aceitável.

267. Método para modular uma proteína-alvo, caracterizado pelo fato de que método compreende contatar a dita proteína-alvo com uma quantidade de modulação de um composto, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 98 ou 203 a 214 ou uma composição, como definida na reivindicação 265 ou 266.

268. Método para modular uma proteína-alvo, caracterizado pelo fato de que o método compreende formar um complexo, como definido em qualquer uma das reivindicações 142 a 147, 191 a 194, ou 215 a 223 numa célula, contatando-se a dita célula com uma quantidade eficaz, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 98 ou 203 a 214 ou uma composição, como definida na reivindicação 265 ou 266.

269. Método para modular uma proteína-alvo, caracterizado pelo fato de que o método compreende contatar a dita proteína-alvo com um conjugado, como definido em qualquer uma das reivindicações 155 a 183.

270. Método para inibir atividade de prolil isomerase, caracterizado pelo fato de que o método compreende contatar uma célula que expressa a dita prolil isomerase com um composto, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 98 ou 203 a 214 ou uma composição, como definida na reivindicação 265 ou 266 sob condições que permitem a formação de um complexo entre o dito composto e a dita prolil isomerase, inibindo, assim, a atividade de prolil isomera-

se.

271. Método para formar um complexo, como definido em qualquer uma das reivindicações 142 a 147, 191 a 194 ou 215 a 223 numa célula, caracterizado pelo fato de que o método compreende contatar uma célula que expressa a proteína apresentadora com um composto, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 98 ou 203 a 214 ou uma composição, como definida na reivindicação 265 ou 266 sob condições que permitem a formação de um complexo entre o dito composto e a dita proteína apresentadora.

272. Método para identificar uma proteína-alvo capaz de formar um complexo com uma proteína apresentadora, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) fornecer (i) uma ou mais proteínas-alvo, (ii) um composto, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 98; e (iii) uma proteína apresentadora que compreende uma marca;

(b) combinar a dita uma ou mais proteínas-alvo, o dito composto, e a dita proteína apresentadora sob condições adequadas para permitir a formação complexa se a dita proteína-alvo for capaz de formar um complexo com a dita proteína apresentadora; e

(c) determinar se uma ou mais proteínas-alvo formam um complexo com o dito composto e a dita proteína apresentadora;

em que as proteínas-alvo que formam um complexo com o dito composto e a dita proteína apresentadora são identificadas como proteínas-alvo capaz de formar um complexo com uma proteína apresentadora.

273. Método, de acordo com a reivindicação 272, caracterizado pelo fato de que a dita proteína apresentadora compreende uma marca de afinidade.

274. Método, de acordo com a reivindicação 272 ou 273, caracterizado pelo fato de que a dita etapa de determinação compre-

ende utilizar a dita marca da dita proteína apresentadora para isolar seletivamente as proteínas-alvo que formaram um complexo com a dita proteína apresentadora.

275. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 272 a 274, caracterizado pelo fato de que o dito método compreende adicionalmente (d) identificar a dita proteína-alvo num complexo formado entre uma ou mais proteínas-alvo e a dita proteína apresentadora.

276. Método, de acordo com a reivindicação 275, caracterizado pelo fato de que a dita identificação da estrutura da dita proteína-alvo compreende realizar a espectrometria de massa no dito complexo.

277. Método para identificar uma proteína-alvo capaz de formar um complexo com uma proteína apresentadora, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

(a) fornecer (i) duas ou mais proteínas-alvo, (ii) um composto, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 98; e (iii) uma proteína apresentadora que compreende uma marca de afinidade;

(b) combinar a dita duas ou mais proteínas-alvo, o dito composto, e a dita proteína apresentadora sob condições adequadas para permitir a formação complexa se a dita proteína-alvo for capaz de formar um complexo com a dita proteína apresentadora;

(c) isolar seletivamente um ou mais complexos de uma proteína-alvo, o dito composto, e a dita proteína apresentadora formada na etapa (b); e

(d) determinar a estrutura da dita proteína-alvo no dito um ou mais complexos isolados na etapa (c) por espectrometria de massa;

identificar, assim, uma proteína-alvo capaz de formar um complexo com uma proteína apresentadora.

FIG. 1

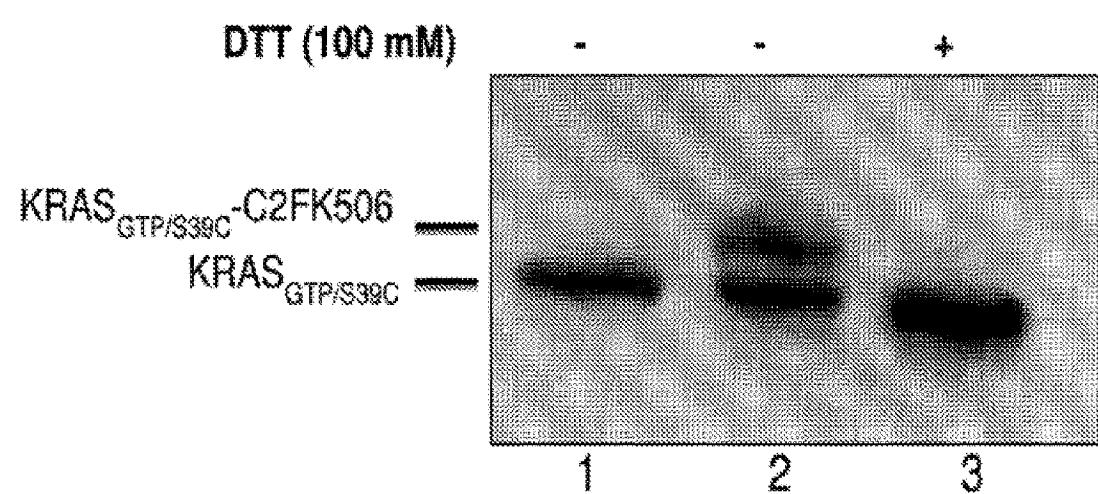


FIG. 2

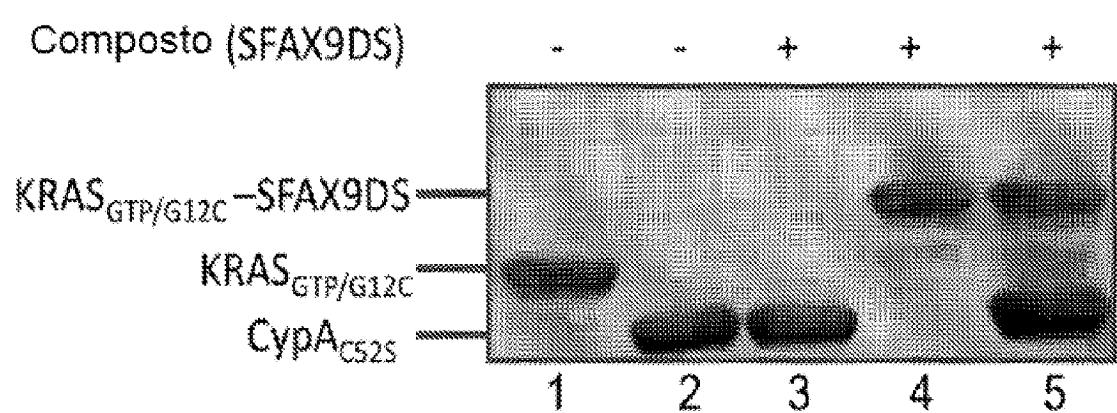
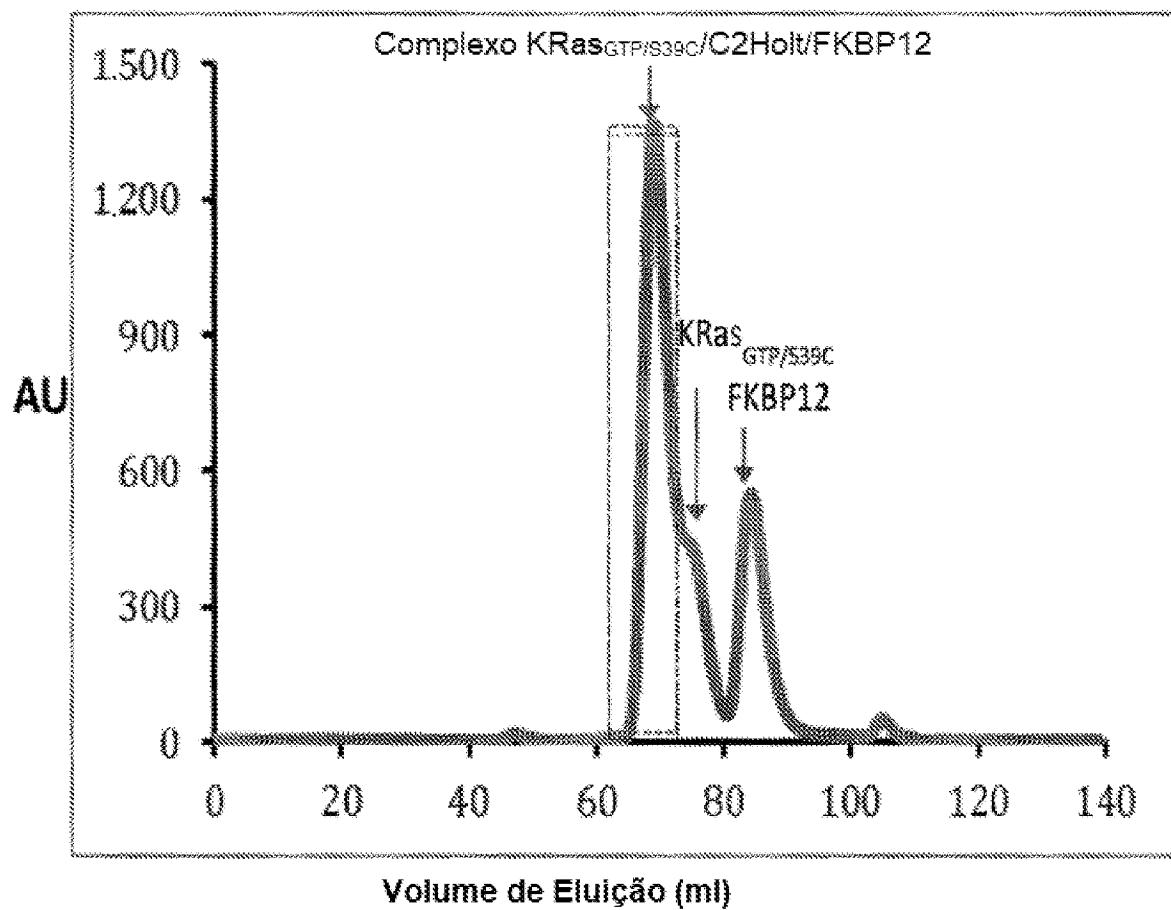


FIG. 3A



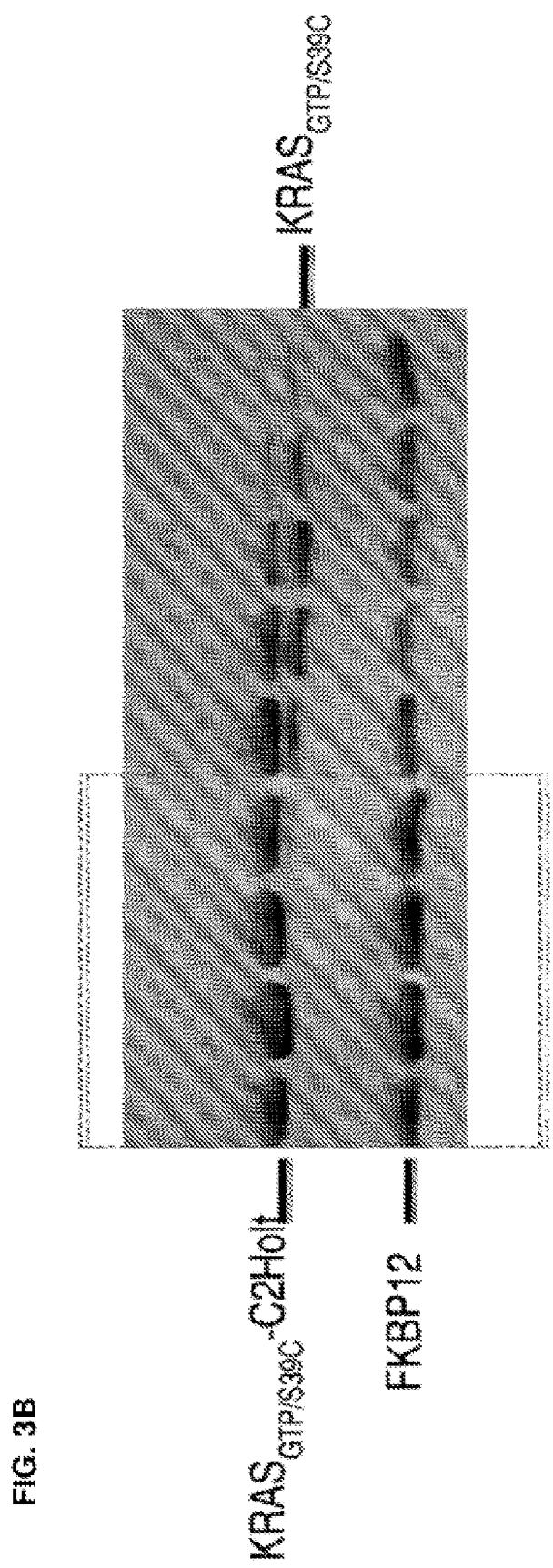


FIG. 3B

FIG. 4

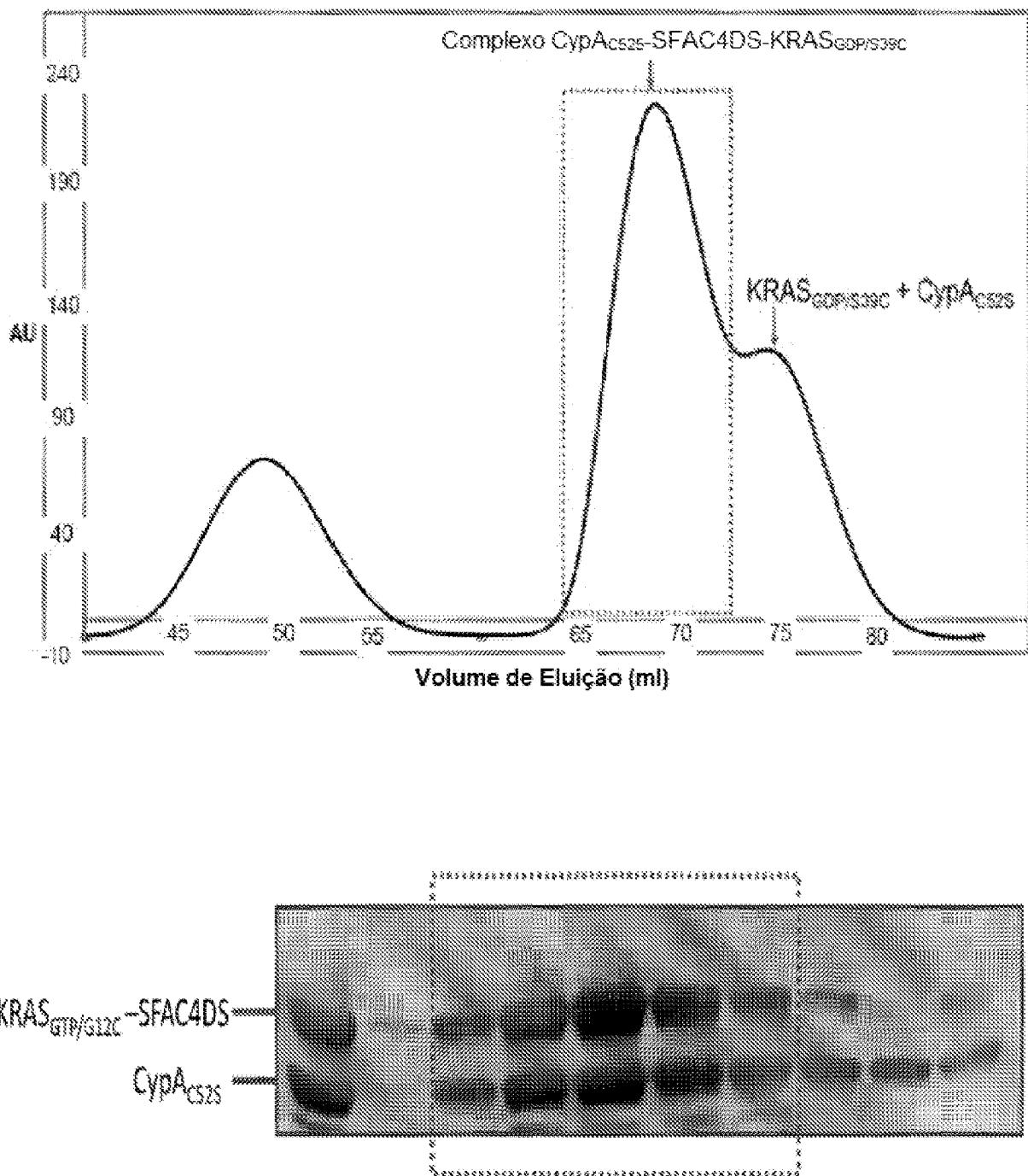


FIG. 5A

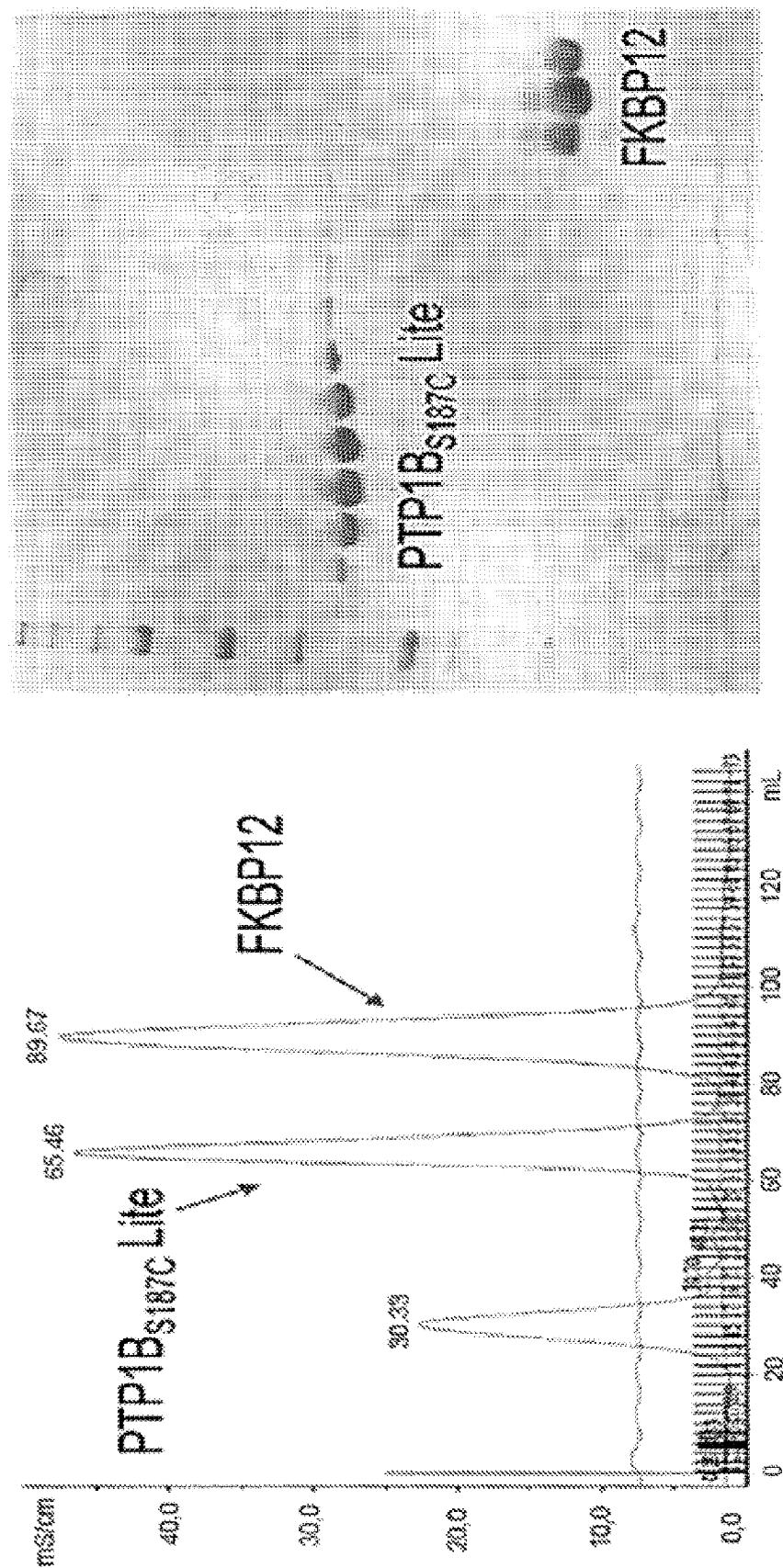


FIG. 5B

Complexo PTP1B_{S187C} Lite/ C3-SLF/FKBP12

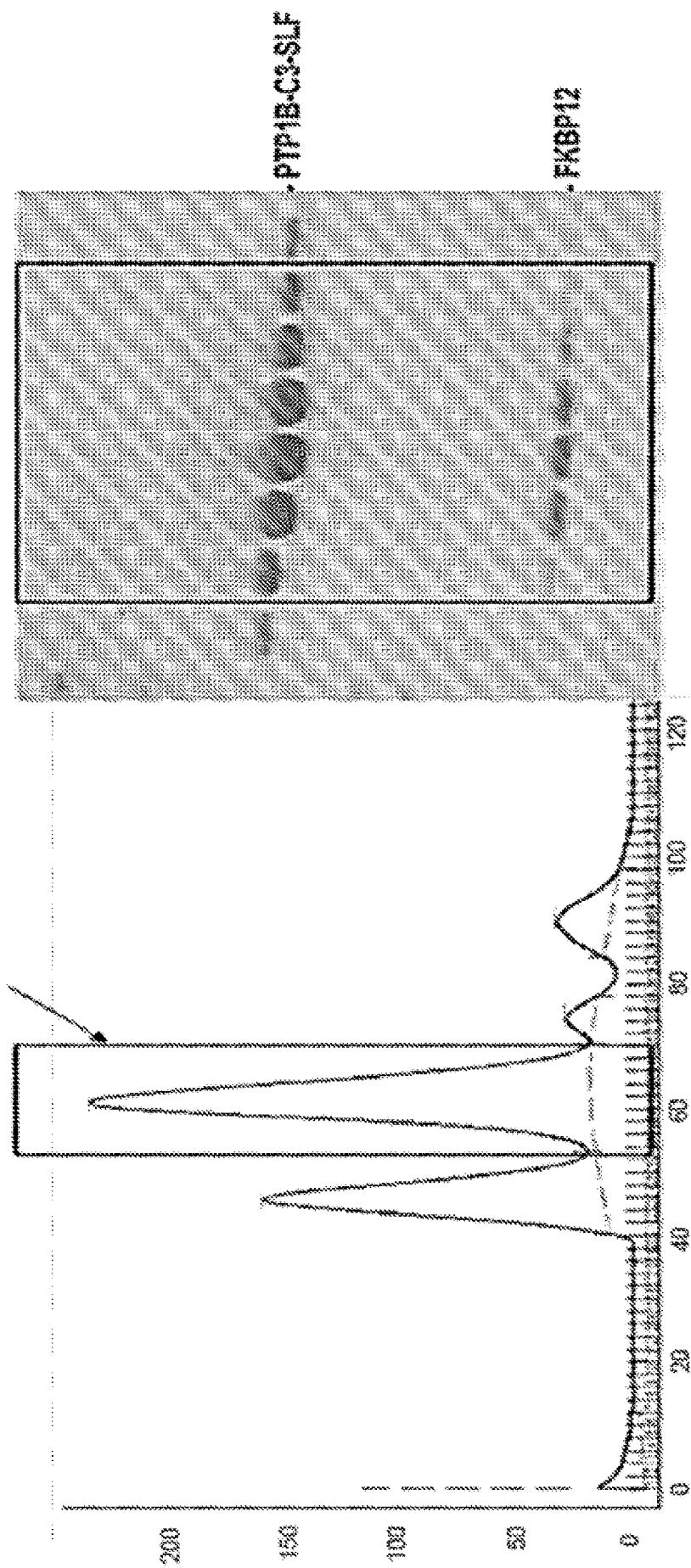


FIG. 6

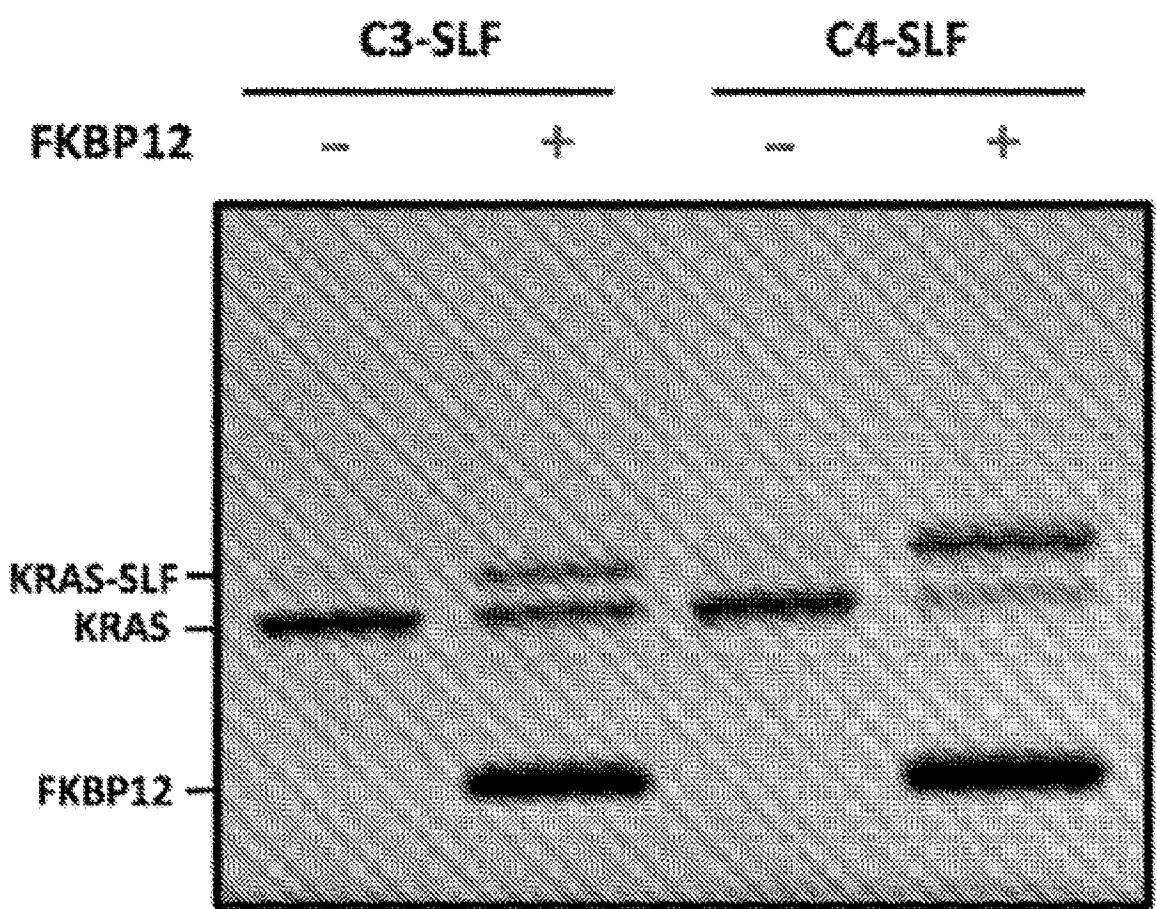


FIG. 7A

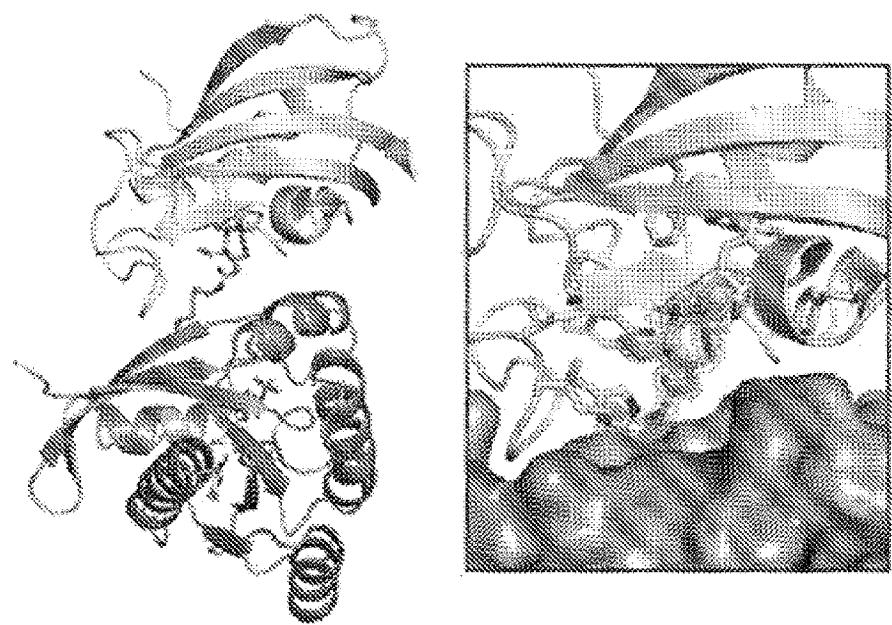
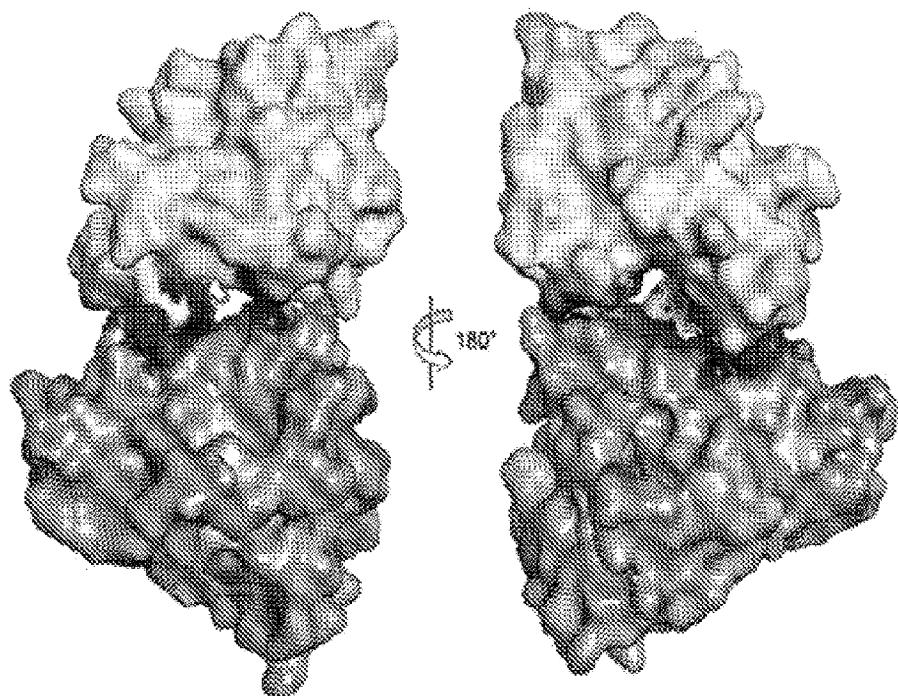


FIG. 7B



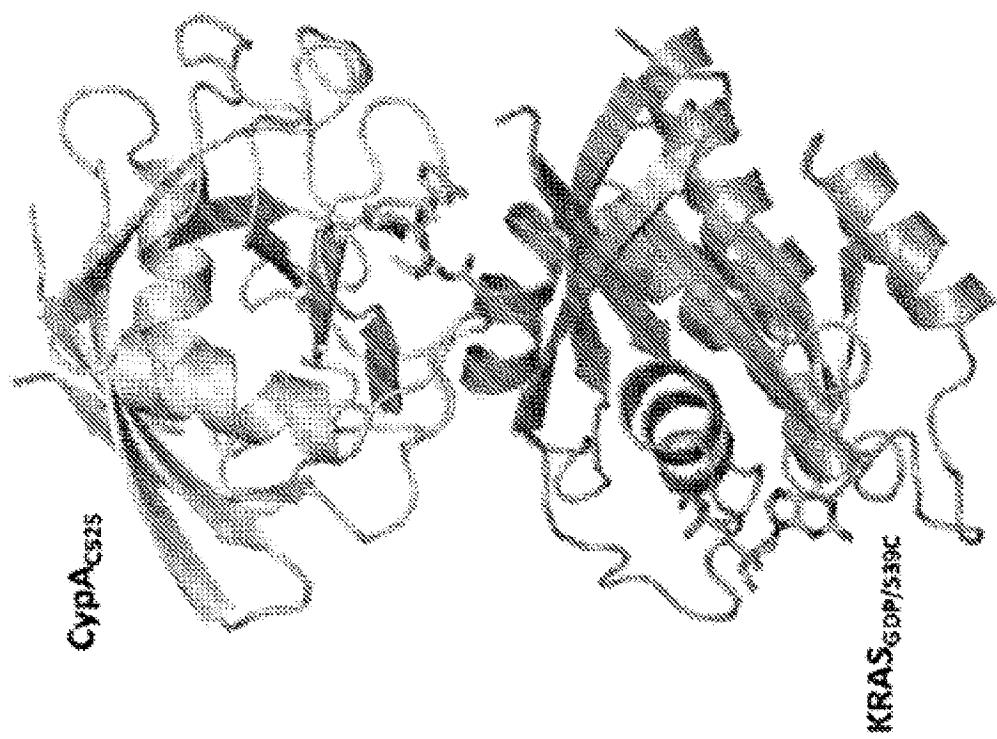
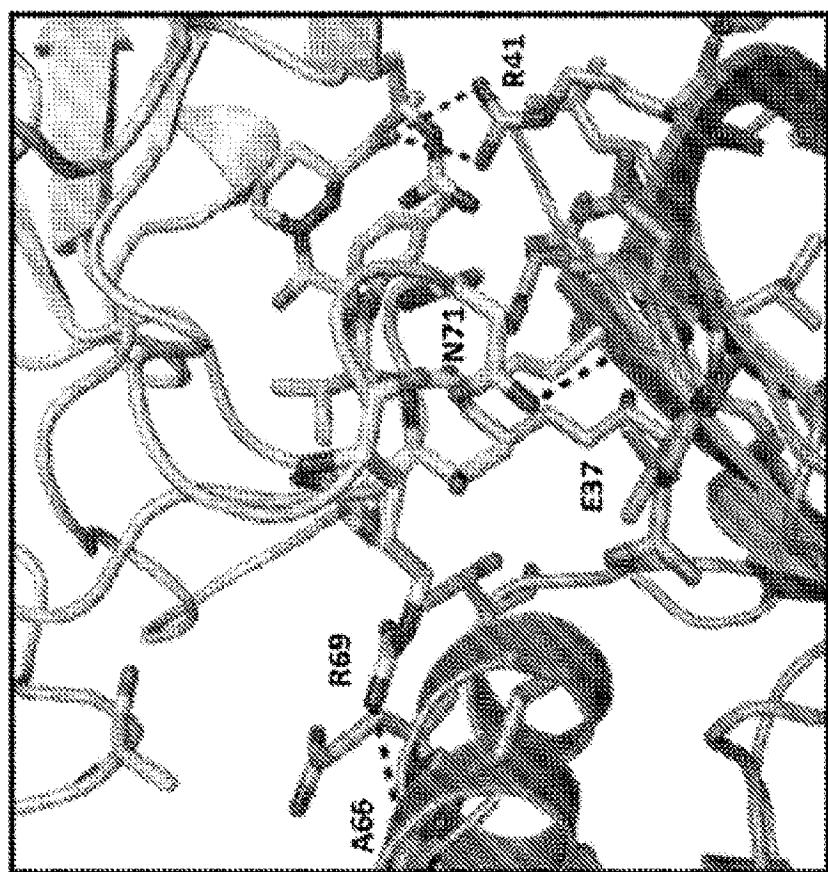


FIG. 8

FIG. 9A

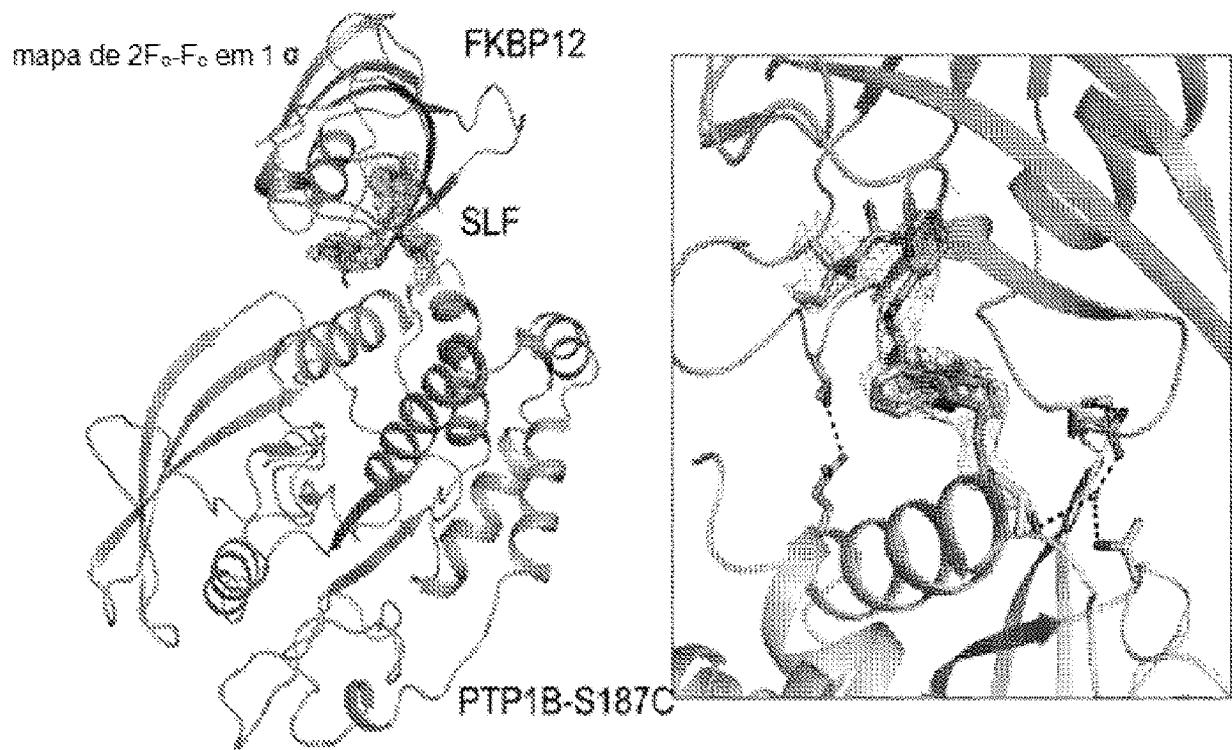
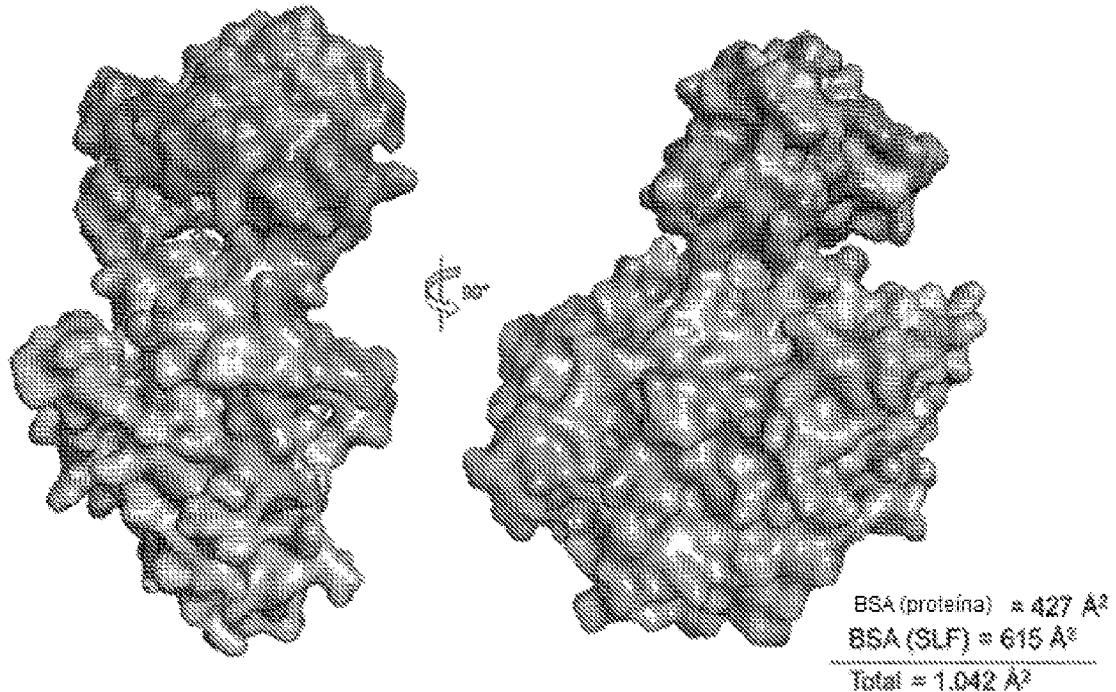


FIG. 9B



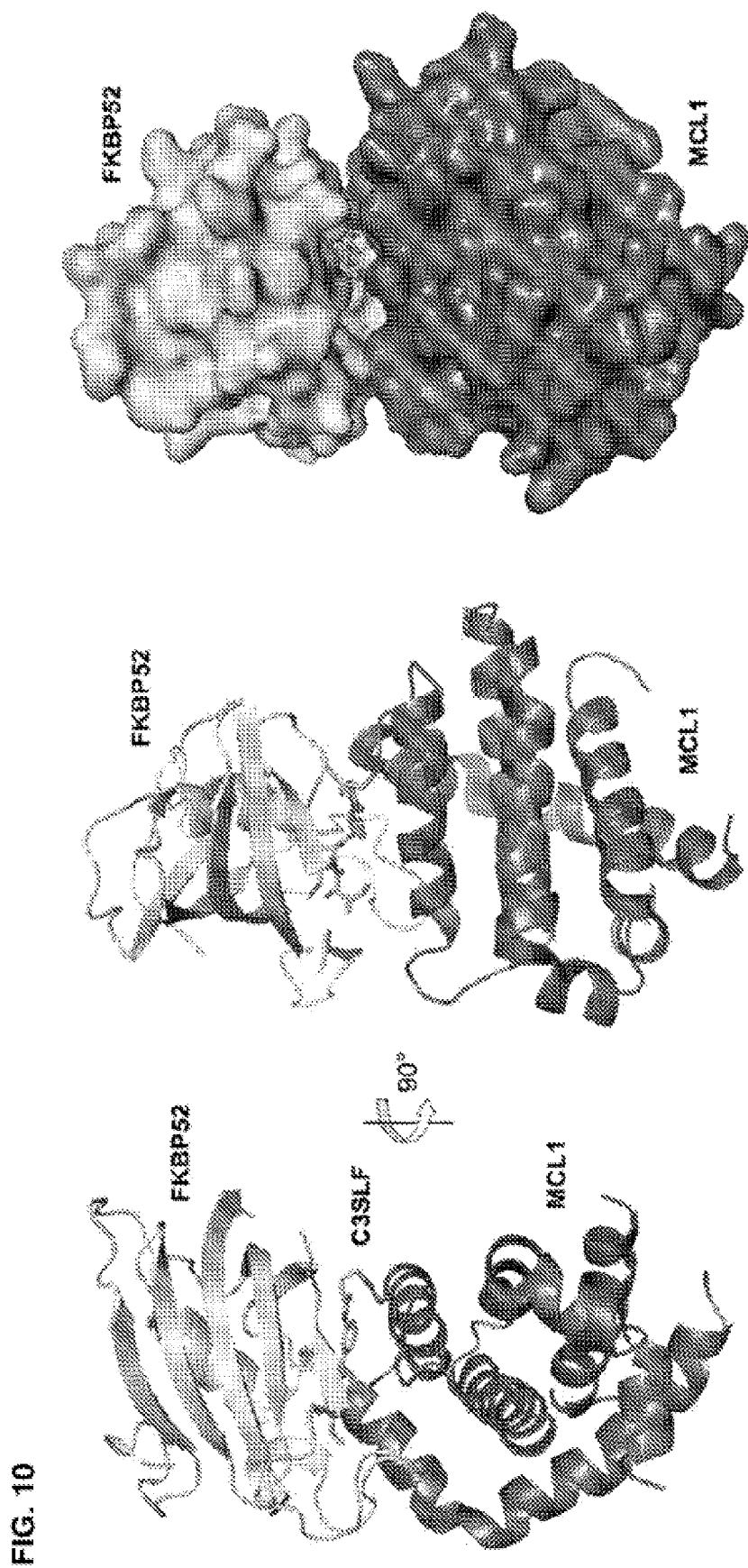


FIG. 11

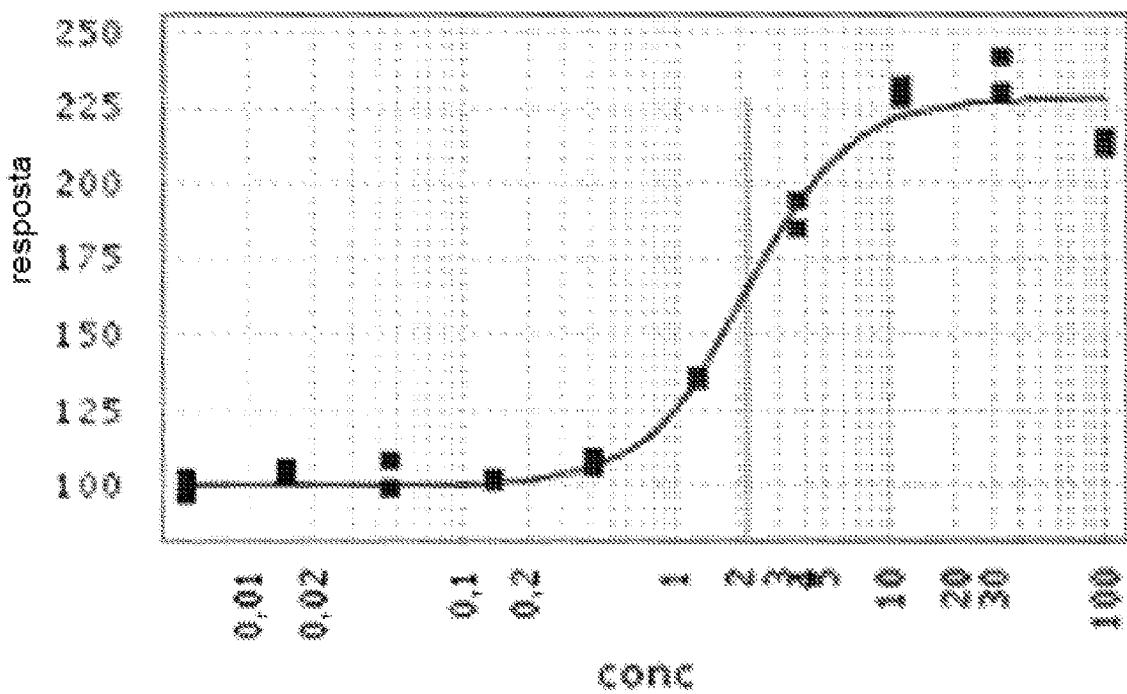


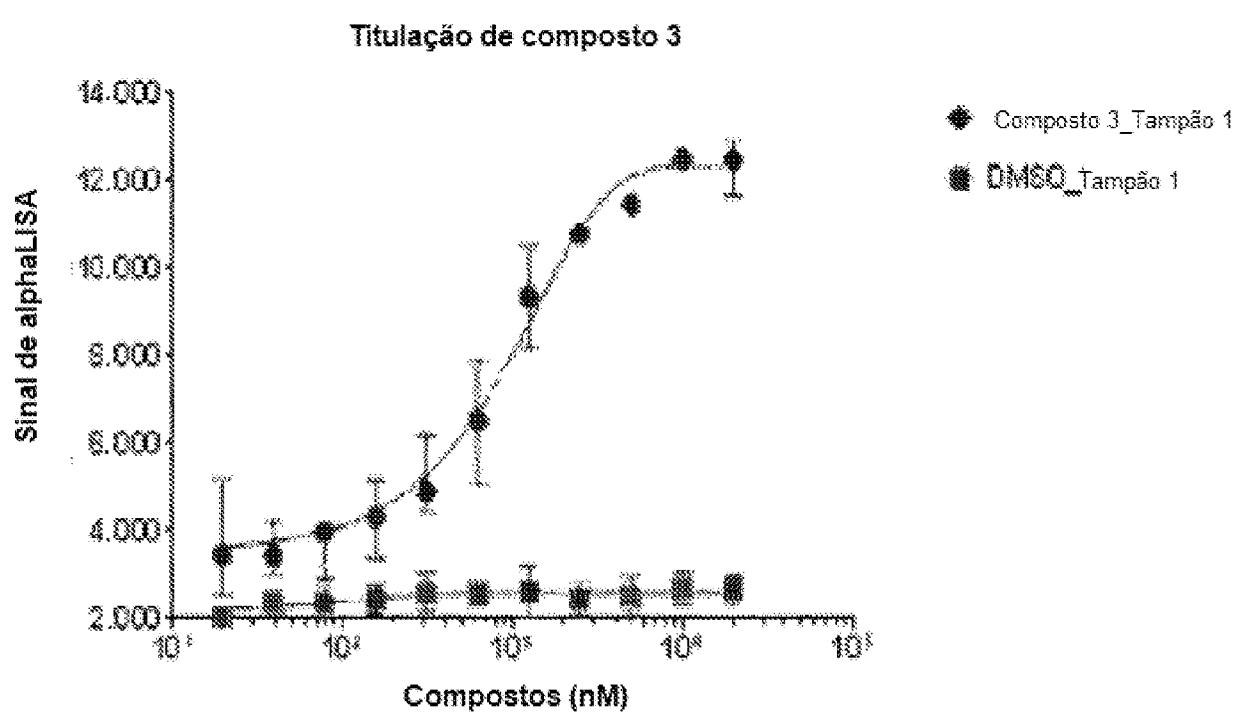
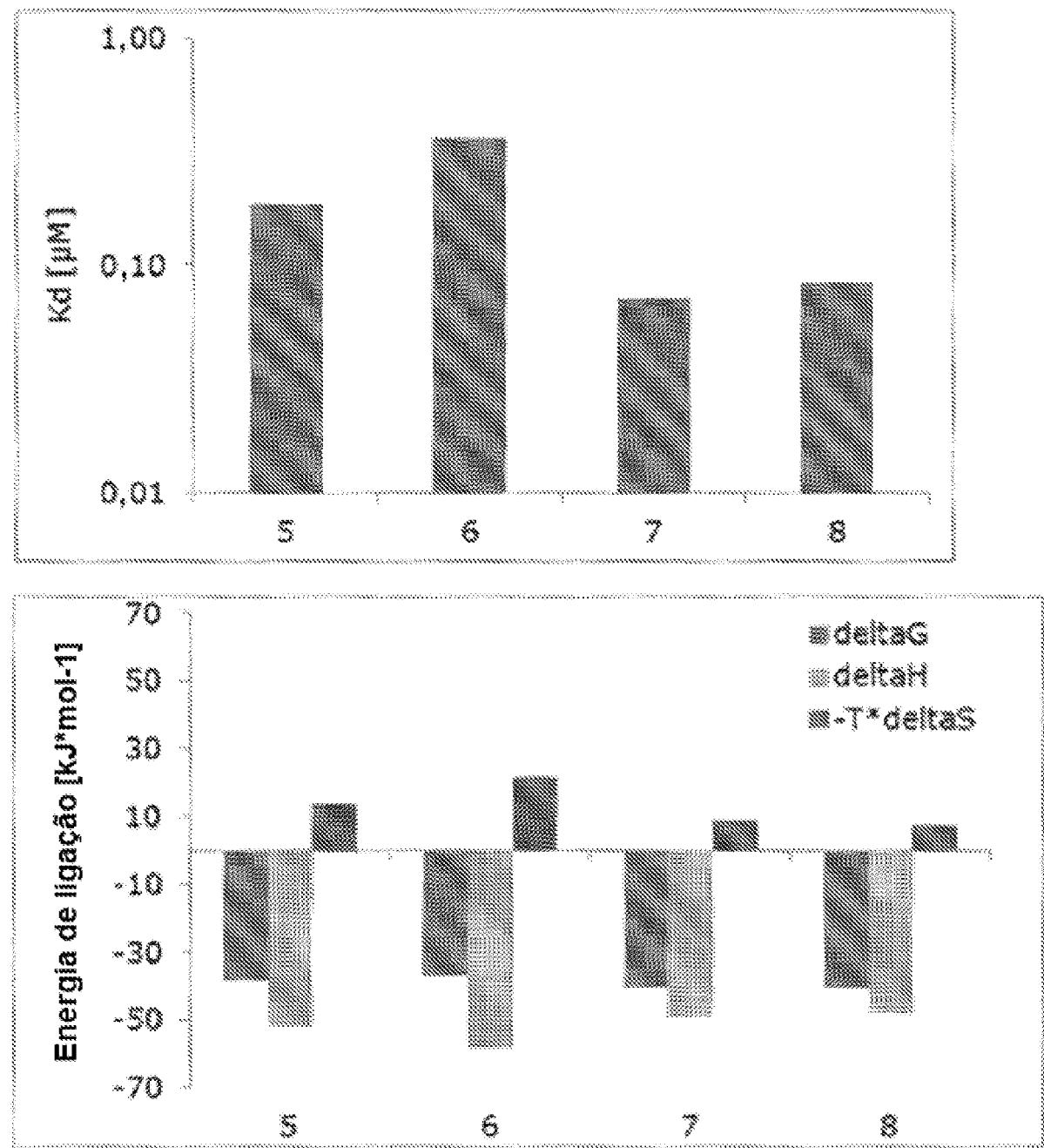
FIG. 12

FIG. 13



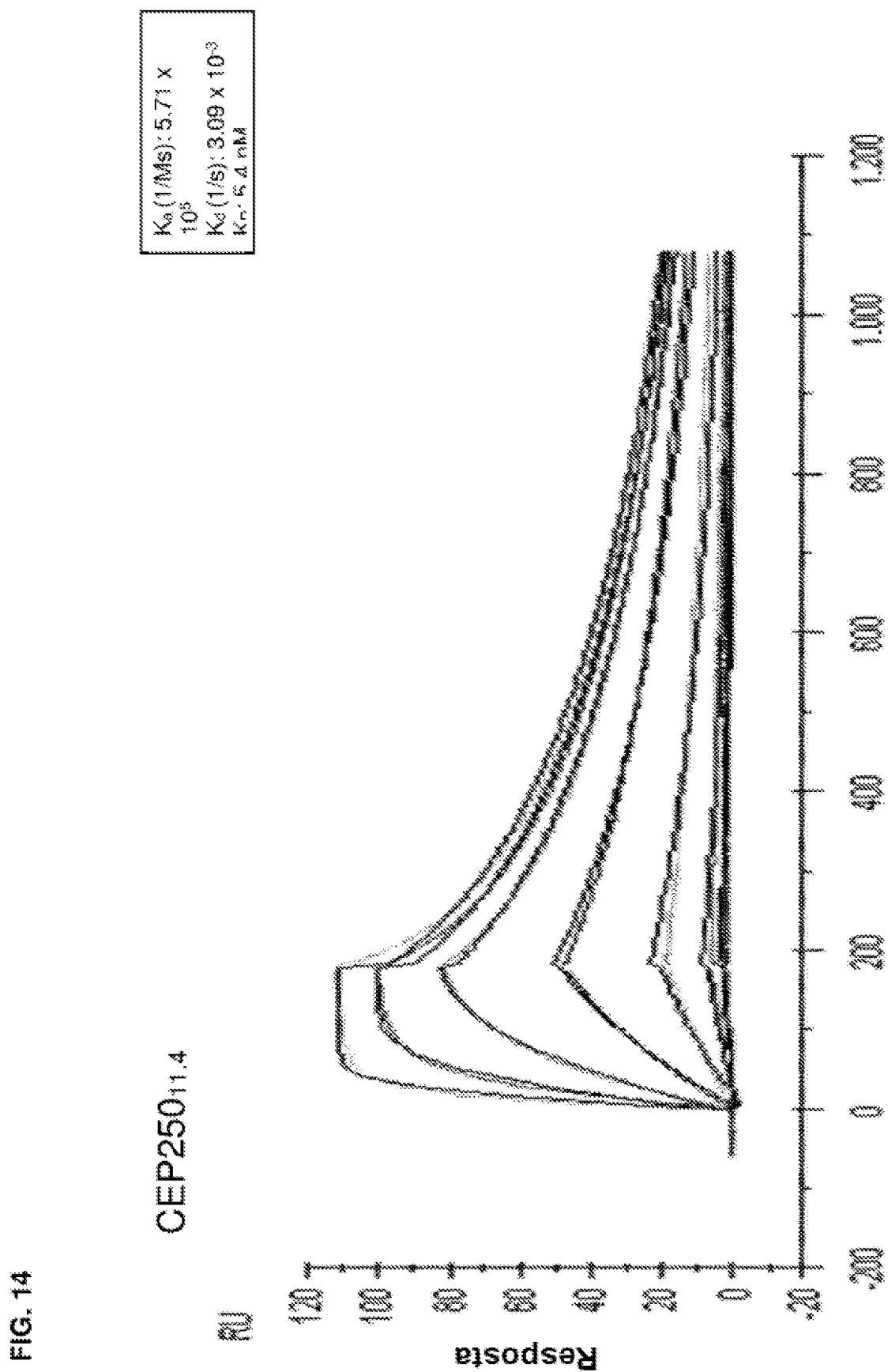


FIG. 14 (continuação)

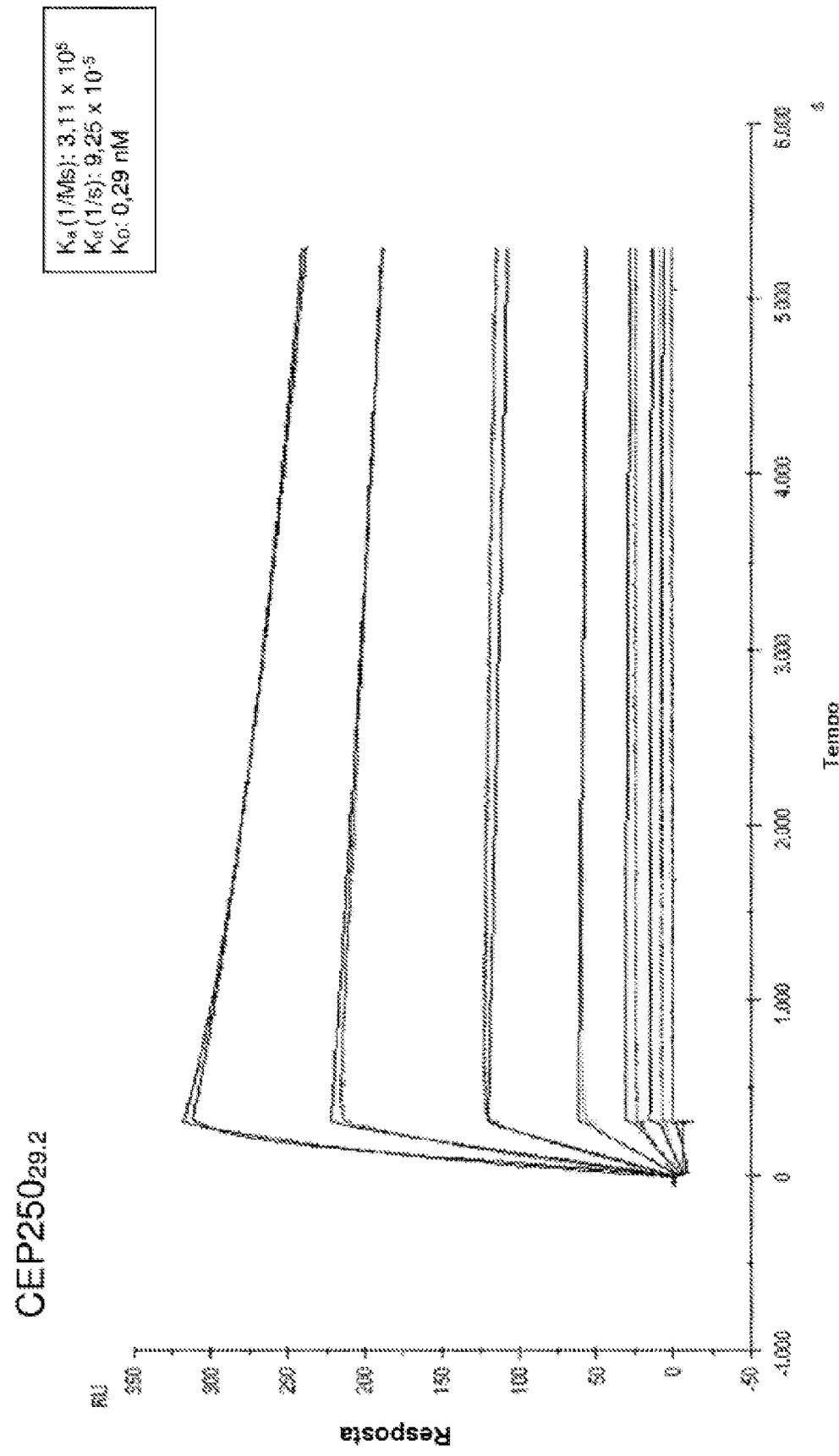


FIG. 1*n*

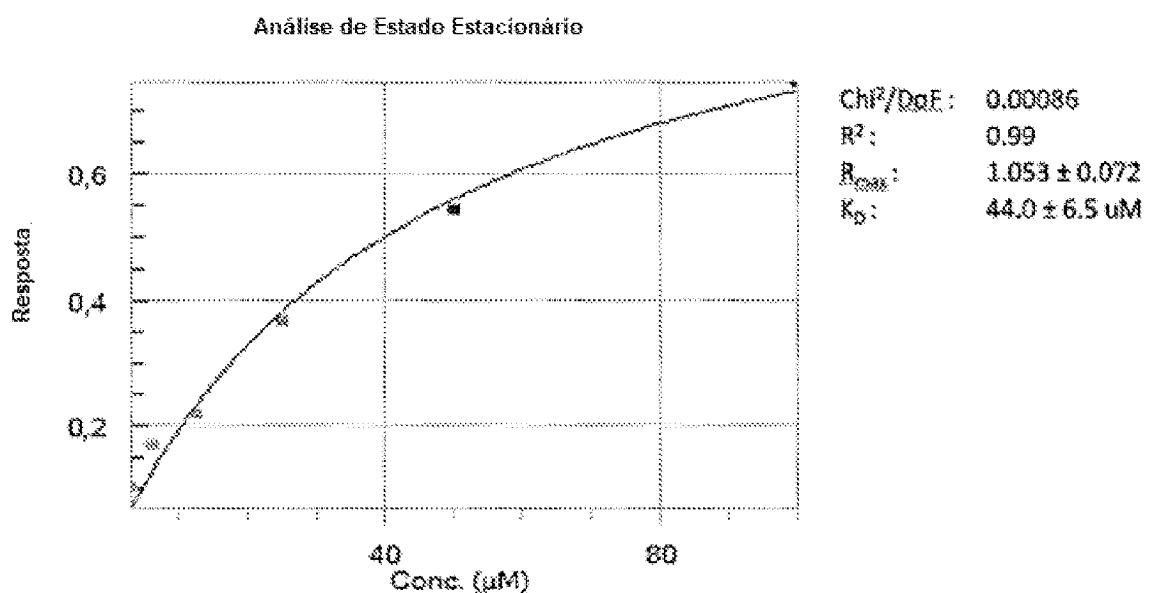
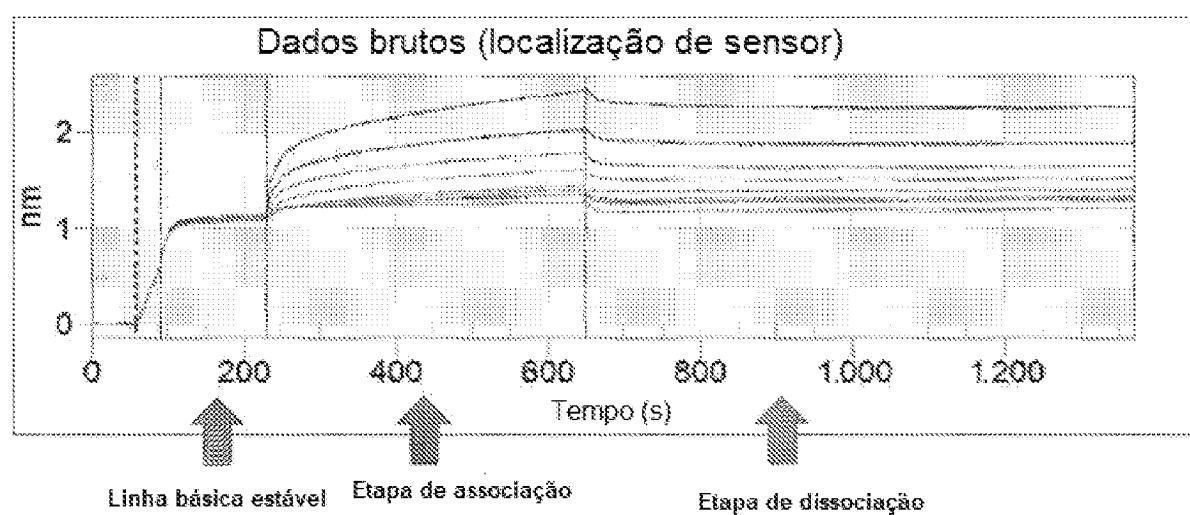
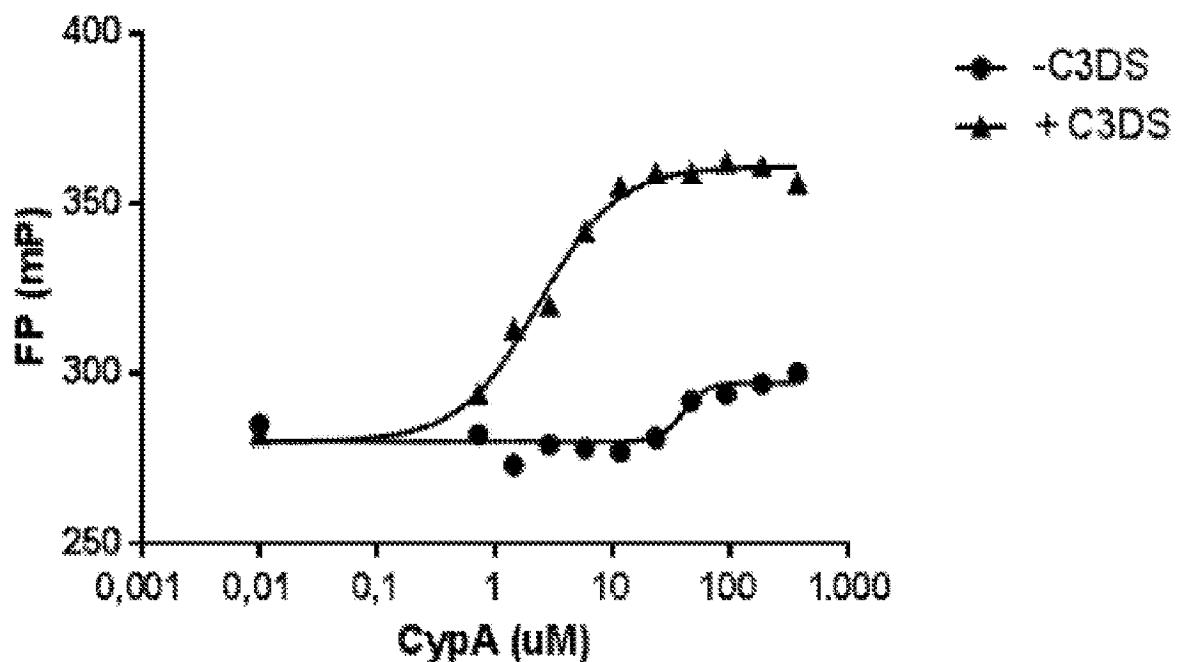


FIG. 16

Ligaçāo de Kras (Mant-GMP-PNP) a Avi-CypA



Vista de ajuste

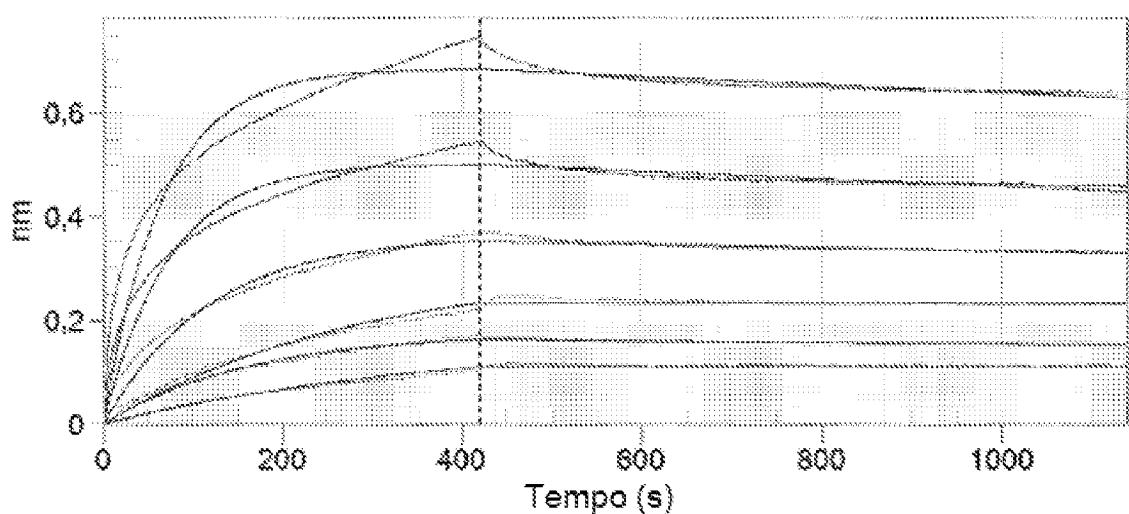


FIG. 17A

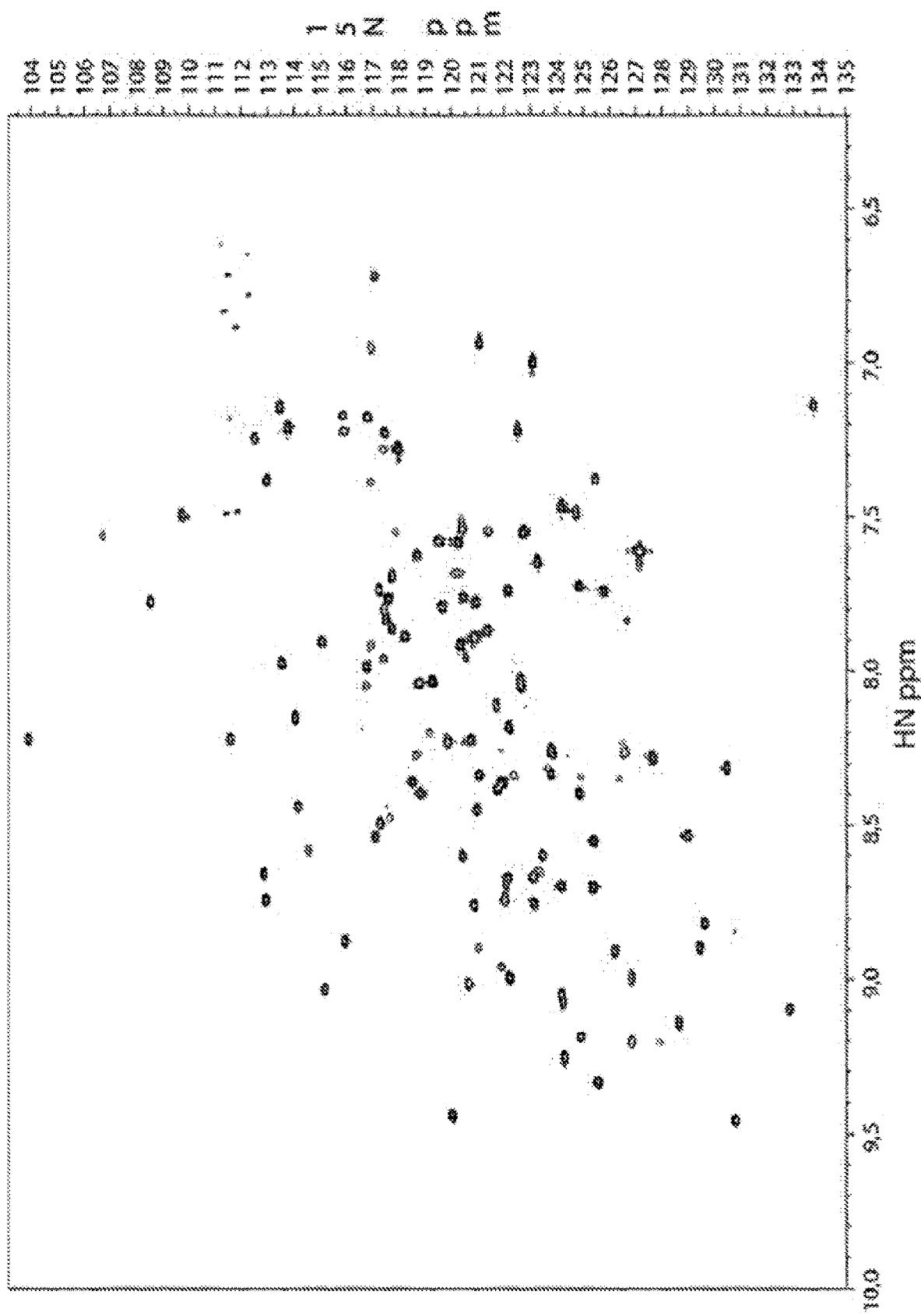


FIG. 17B

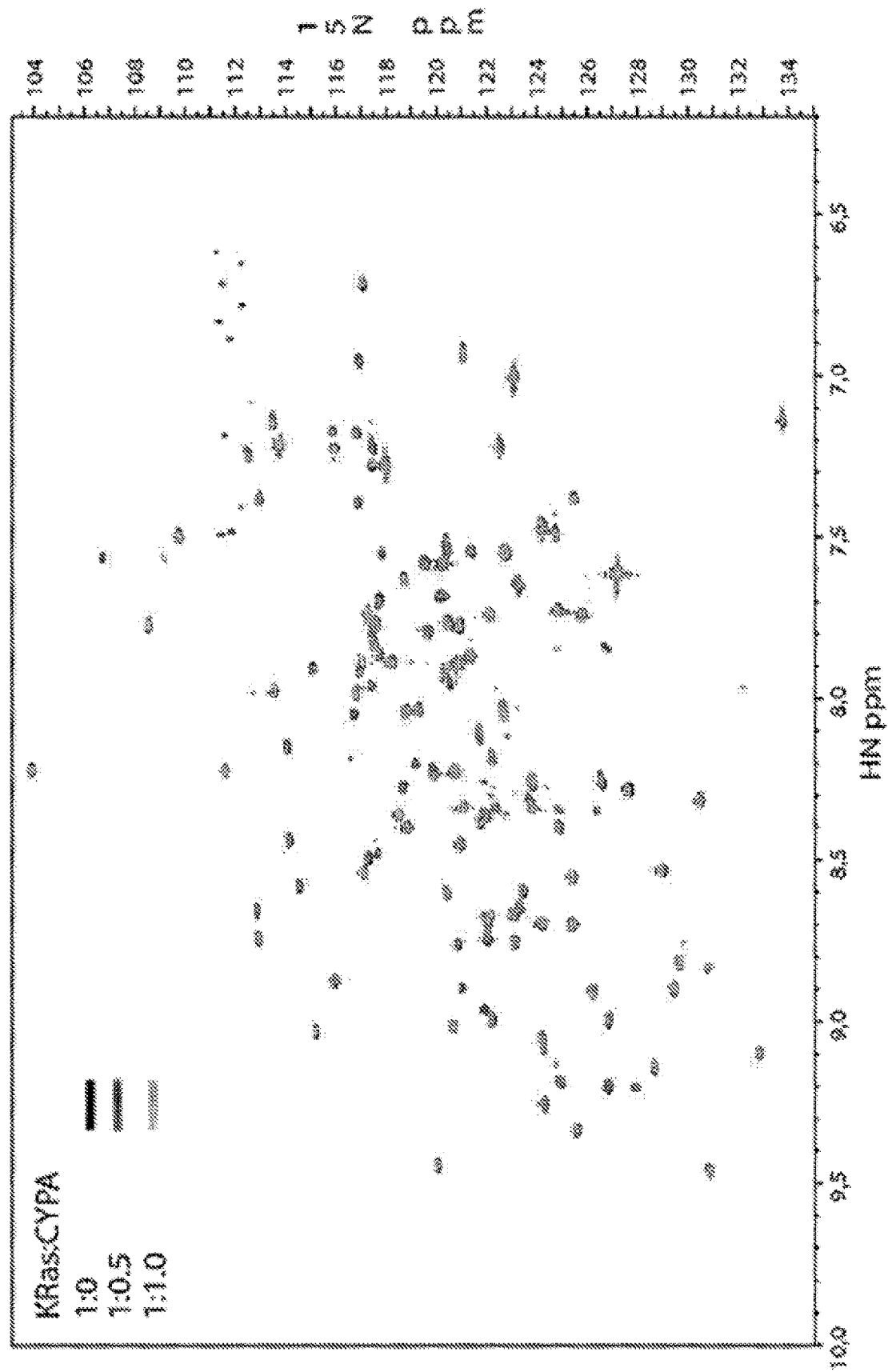
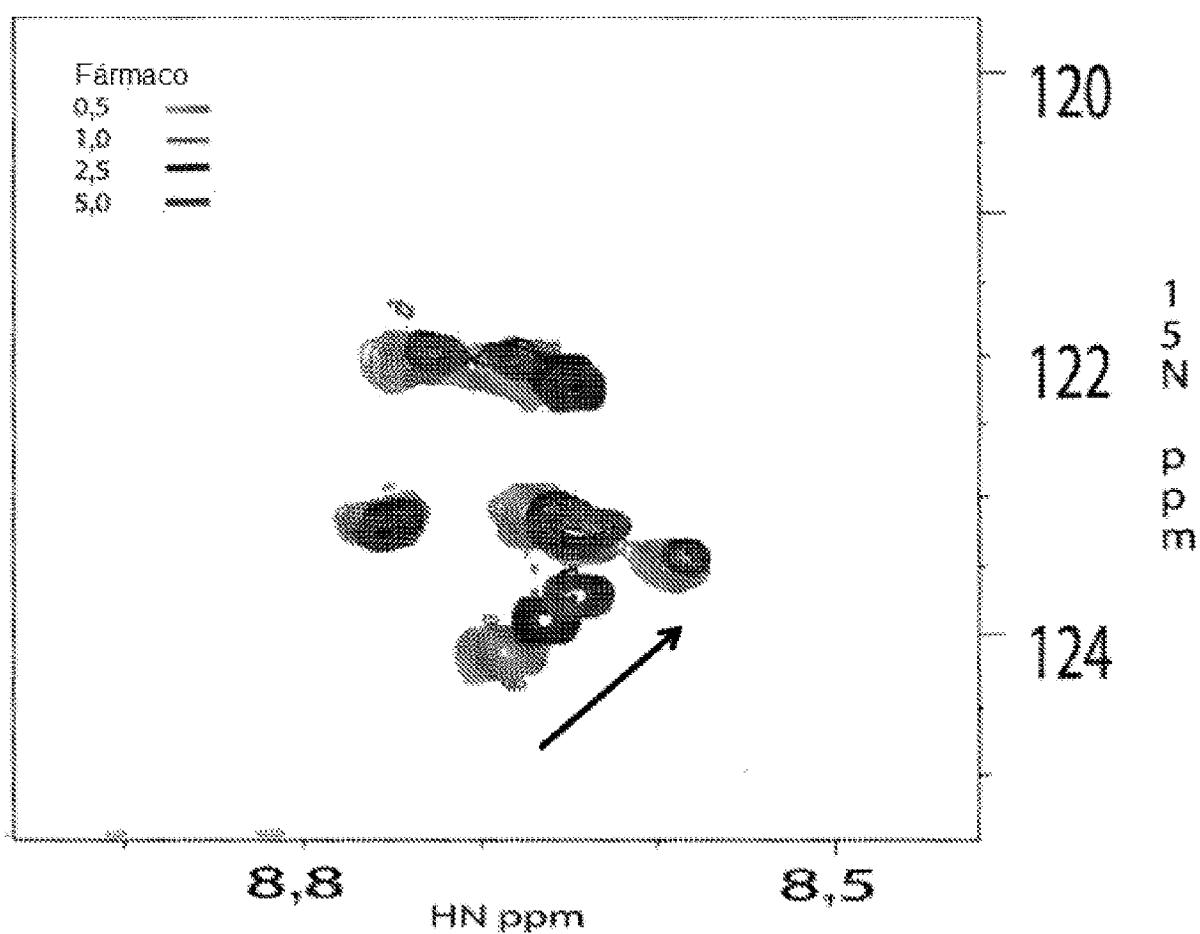


FIG. 17C



RESUMO

Patente de Invenção: "**MÉTODOS E REAGENTES PARA ANALISAR INTERFACES DE PROTEÍNA-PROTEÍNA**".

A presente revelação fornece métodos e reagentes úteis para analisar interfaces de proteína-proteína como interfaces entre uma proteína apresentadora (por exemplo, um membro da família de FKBP, um membro da família de ciclofilina, ou PIN1) e uma proteína-alvo. Em algumas modalidades, as proteínas-alvo e/ou apresentadoras são proteínas intracelulares. Em algumas modalidades, as proteínas-alvo e/ou apresentadoras são proteínas mamíferas.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P242832 ListSeq (JUNTADA TRADUÇÃO).txt
- Data de Geração do Código: 03/12/2019
- Hora de Geração do Código: 15:06:48
- Código de Controle:
 - Campo 1: FE77B15B1615F95E
 - Campo 2: 4A909E21E9BAA5C4