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

(21) BR 112021004656-9 A2

(22) Data do Depósito: 25/09/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 01/06/2021

(54) Título: CONJUGADO FÁRMACO-LIGANTE DE ANÁLOGO EXATECANO, MÉTODO PARA PREPARAR O MESMO E APLICAÇÃO DO MESMO

(51) Int. Cl.: A61K 47/68; A61K 47/65; A61K 47/54; A61K 38/07; A61P 35/00; (...).

(30) Prioridade Unionista: 26/09/2018 CN 201811123833.1.

(71) Depositante(es): JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.; SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD..

(72) Inventor(es): JIANYAN XU; YING ZHANG; XIAOFENG CAI; BOLEI QU; JINDONG LIANG; LIANSHAN ZHANG; FENG HE; WEIKANG TAO.

(86) Pedido PCT: PCT CN2019107873 de 25/09/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/063676 de 02/04/2020

(85) Data da Fase Nacional: 11/03/2021

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a um conjugado fármaco-ligante de um análogo de exatecano, um método para preparar o mesmo e uma aplicação do mesmo. Especificamente, a presente invenção fornece um conjugado fármaco-ligante possuindo uma estrutura mostrada na fórmula (-D), um método para preparação desse fim, uma composição farmacêutica contendo o mesmo e seu uso na preparação de fármacos para o tratamento de câncer por meio de regulação do receptor. A definição de cada substituinte na fórmula (-D) é a mesma que na descrição.

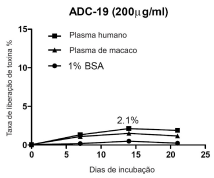
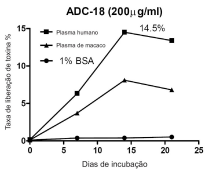


Fig 1B



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"CONJUGADO FÁRMACO-LIGANTE DE ANÁLOGO EXATECANO, MÉTODO PARA PREPARAR O MESMO E APLICAÇÃO DO MESMO".**

CAMPO DE INVENÇÃO

[001] A presente invenção refere-se a um conjugado fármaco-ligante de análogo exatecan com uma nova estrutura. Especificamente, a presente invenção refere-se a um conjugado fármaco-ligante de análogo exatecan com uma unidade estrutural Y, um método para preparar o mesmo, uma composição farmacêutica que compreende o conjugado e um uso do conjugado ou da composição farmacêutica.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] A quimioterapia continua sendo uma das terapias anticâncer mais importantes, juntamente com a cirurgia, a radioterapia e a terapia direcionada. Embora existam muitos tipos de citotoxinas altamente eficientes, a diferença entre as células tumorais e as células normais é muito pequena, o que limita a ampla aplicação clínica desses compostos anticâncer devido ao efeito colateral tóxico. Os fármacos com anticorpos tornaram-se os fármacos de linha de frente para a terapia antitumoral devido à especificidade do anticorpo monoclonal antitumoral para o antígeno de superfície de células tumorais. No entanto, quando o anticorpo é usado sozinho como fármaco antitumoral, a eficácia é frequentemente insatisfatória.

[003] Conjugados de anticorpo e fármaco (ADCs) permitem a combinação de um anticorpo monoclonal ou um fragmento de anticorpo com uma citotoxina biologicamente ativa através de um ligador quimicamente estável, aproveitando a especificidade da ligação do anticorpo aos antígenos de superfície de células normais ou células tumorais e a alta eficiência da citotoxina, evitando a baixa eficácia do anticorpo e o efeito colateral tóxico da citotoxina. Isso significa que, em comparação com fármacos convencionais de quimioterapia, conjugados de fármacos

de anticorpo podem se ligar com precisão às células tumorais e reduzir o efeito sobre as células normais (Mullard A, (2013) *Nature Reviews Drug Discovery*, 12: 329-332; DiJoseph JF, Armellino DC, (2004) *Blood*, 103: 1807-1814).

[004] Em 2000, o primeiro conjugado de anticorpo e fármaco Mylotarg (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals) foi aprovado pela Food e Drug Administration (FDA) dos EUA para o tratamento de leucemia mieloide aguda (*Drugs de the Future* (2000) 25 (7): 686; US4970198; US 5079233; US 5585089; US 5606040; US 5693762; US 5739116; US 5767285; US 5773001).

[005] Em agosto de 2011, a ADCetris (brentuximab vedotin, Seattle Genetics Inc.) foi aprovado pelo FDA Fast Track dos EUA para o tratamento de linfoma de Hodgkin e linfoma anaplásico recidivante de grandes células (Nat. Biotechnol (2003) 21 (7): 778-784; WO2004010957; WO2005001038; US7090843A; US7659241; WO2008025020). Adcetris® é um novo fármaco ADC alvo, que permite que o fármaco atue diretamente no CD30 alvo da célula do linfoma, desencadeie a endocitose e, consequentemente, induza a apoptose das células tumorais.

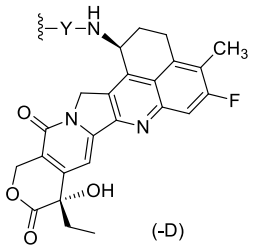
[006] Ambos Mylotarg e Adcetris são terapias alvo para tumores hematológicos, cuja estrutura organizacional é relativamente simples em comparação com os tumores sólidos. Em fevereiro de 2013, Kadcyla (ado-trastuzumab emtansina, T-DM1) foi aprovado pela FDA para o tratamento de pacientes com câncer de mama avançado ou metastático que são HER2-positivos com Trastuzumab (nome comercial: Herceptina)-resistente e paclitaxel-resistente (WO2005037992; US8088387). Kadcyla é um primeiro fármaco ADC aprovada pela FDA para o tratamento de tumores sólidos.

[007] Existem vários tipos de pequenas moléculas citotóxicas usadas no conjugado anticorpo fármaco, um dos quais é derivado de camp-

totecina, que mostra efeito antitumoral por inibir a topoisomerase I. Documentos relatando o uso do derivado de camptotecina, exatecan (nome químico:
(1S,9S)-1-amino-9-etil-5-fluoro-2,3-di-hidro-9-hidróxi-4-metil-1H, 12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]imidazo[1,2-b]quinolina-10,13(9H,15H)-diona) em conjugado de fármaco anticorpo (ADC) compreende WO2014057687, *Clinical Cancer Research* (2016) 22 (20): 5097-5108, e *Cancer Sci* (2016) 107: 1039-1046. No entanto, um maior desenvolvimento de fármaco ADC com melhor eficácia ainda é necessário.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[008] A fim de melhorar o ligante, especialmente o efeito de acoplamento entre o anticorpo e o fármaco, a presente invenção fornece um conjugado fármaco-ligante ou um sal ou solvato farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que o conjugado fármaco-ligante compreende uma estrutura de fórmula (-D):



(-D)

em que:

[009] Y é selecionado a partir do grupo consistindo em -O-(CR^aR^b)m-CR^1R^2-C(O)-, -O-CR^1R^2- (CR^aR^b)m-, -O-CR^1R^2-, -NH-(CR^aR^b)m-CR^1R^2-C(O)- e -S-(CR^aR^b)m-CR^1R^2-C(O)-;

[010] R^a e R^b são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, átomo de deutério, halogênio, alquila, haloalquila, alquila deuterada, alcóxi, hidróxi, amino, ciano, nitro, hidroxialquila, cicloalquila e heterociclila;

[011] ou, R^a e R^b juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma cicloalquila ou heterociclila;

[012] R^1 é selecionado a partir do grupo consistindo em halogênio, alquila deuterada, cicloalquila, cicloalquilalquila, heterociclila, arila e heteroarila;

[013] R^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, halogênio, haloalquila, alquila deuterada, cicloalquila, cicloalquilalquila, alcoxialquila, heterociclila, arila e heteroarila;

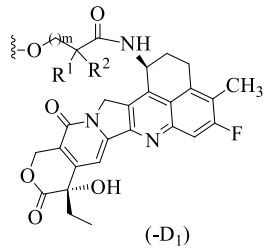
[014] ou, R^1 e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma cicloalquila ou heterociclila;

[015] ou, R^a e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma cicloalquila ou heterociclila;

[016] em que, a linha ondulada em -D representa um átomo de hidrogênio, ou uma ligação covalente a uma unidade ligador ou um anticorpo que se liga ao antígeno expresso pela célula alvo;

[017] m é um inteiro de 0 a 4.

[018] Em algumas modalidades da presente invenção, o conjugado fármaco-ligante fornecido ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo é um composto com a Fórmula ($-D_1$) ou um conjugado fármaco-ligante do mesmo ou um sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo:



($-D_1$)

em que:

[019] R^1 é uma cicloalquilalquila ou cicloalquila, e preferivelmente C_{3-6} cicloalquilalquila ou C_{3-6} cicloalquila;

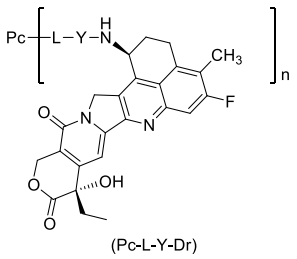
[020] R^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, haloalquila e C_{3-6} cicloalquila, e preferivelmente átomo de hidrogênio;

[021] ou, R^1 e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma C_{3-6} cicloalquila;

[022] a linha ondulada na Fórmula -D_1 representa um átomo de hidrogênio, ou uma ligação covalente a uma unidade ligador ou um anticorpo que se liga ao antígeno expresso pela célula alvo;

[023] m é 0 ou 1.

[024] Em algumas modalidades da presente invenção, o conjugado fármaco-ligante fornecido ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo é um conjugado fármaco-ligante de Fórmula (Pc-L-Y-Dr) ou um sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo:



(Pc-L-Y-Dr)

em que:

[025] Y é selecionado a partir do grupo consistindo em -O-$(CR^aR^b)_m$-CR^1R^2-C(O)-, -O-CR^1R^2-$(CR^aR^b)_m$-, -O-CR^1R^2-, -NH-$(CR^aR^b)_m$-CR^1R^2-C(O)- e -S-$(CR^aR^b)_m$-CR^1R^2-C(O)-;

[026] R^a e R^b são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, átomo de deutério, halogênio, alquila, haloalquila, alquila deuterada, alcóxi, hidróxi, amino, ciano, nitro, hidroxialquila, cicloalquila e heterociclila;

[027] ou, R^a e R^b juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma cicloalquila ou heterociclila;

[028] R^1 é selecionado a partir do grupo consistindo em halogênio, haloalquila, alquila deuterada, cicloalquila, cicloalquilalquila, alcoxialquila, heterociclila, arila e heteroarila;

[029] R^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de

hidrogênio, halogênio, haloalquila, alquila deuterada, cicloalquila, cicloalquilalquila, alcoxialquila, heterociclila, arila e heteroarila;

[030] ou, R^1 e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma cicloalquila ou heterociclila;

[031] ou, R^a e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma cicloalquila ou heterociclila;

[032] m é um inteiro de 0 a 4;

[033] n é 1 a 10, que pode ser um inteiro ou um decimal;

[034] Pc é um ligante; e L é uma unidade ligadora.

[035] Em algumas modalidades da presente invenção, no conjugado fármaco-ligante fornecido ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo,

[036] -Y- é -O-(CR^aR^b)m-CR^1R^2-C(O)-;

[037] R^a e R^b são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, átomo de deutério, halogênio e alquila;

[038] R^1 é uma C_{3-6} cicloalquilalquila ou C_{3-6} cicloalquila;

[039] R^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, haloalquila e C_{3-6} cicloalquila, e preferivelmente átomo de hidrogênio;

[040] ou, R^1 e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma C_{3-6} cicloalquila;

[041] m é 0 ou 1.

[042] Em algumas modalidades da presente invenção, no conjugado fármaco-ligante fornecido ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo, a unidade estrutural -Y- é -O-(CH_2)m-CR^1R^2-C(O)-;

[043] R^1 é uma C_{3-6} cicloalquilalquila ou C_{3-6} cicloalquila;

[044] R^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, haloalquila e C_{3-6} cicloalquila;

[045] ou, R^1 e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma C_{3-6} cicloalquila;

[046] m é 0 ou 1.

[047] Em algumas modalidades da presente invenção, no conjugado fármaco-ligante fornecido ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo, a unidade estrutural -Y- é -O-(CH_2)m-CR^1R^2-C(O)-;

[048] R^1 é uma C_{3-6} cicloalquilalquila ou C_{3-6} cicloalquila;

[049] R^2 é um átomo de hidrogênio;

[050] ou, R^1 e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma C_{3-6} cicloalquila;

[051] m é 0 ou 1.

[052] Em algumas modalidades da presente invenção, no conjugado fármaco-ligante fornecido ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo, a unidade estrutural -Y- é -O-(CH_2)m-CR^1R^2-C(O)-;

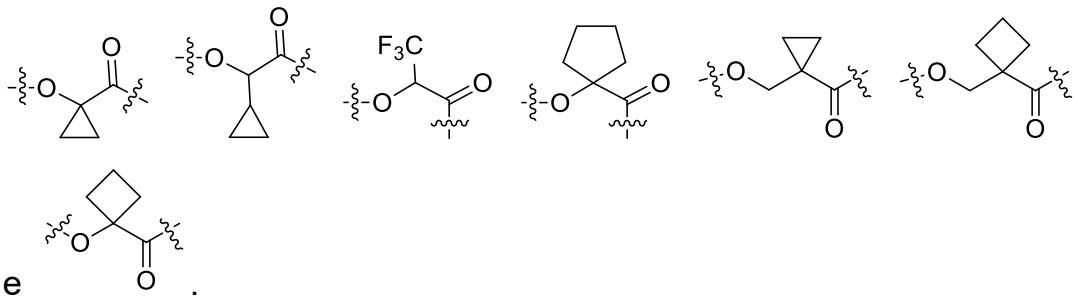
[053] R^1 é uma C_{3-6} cicloalquilalquila ou C_{3-6} cicloalquila;

[054] R^2 é um átomo de hidrogênio;

[055] ou, R^1 e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma C_{3-6} cicloalquila;

[056] m é 0.

[057] Em algumas outras modalidades da presente invenção, no conjugado fármaco-ligante fornecido ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo, a unidade estrutural -Y- é selecionada a partir do grupo consistindo em:

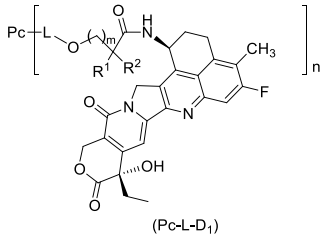


e .

[058] Em algumas outras modalidades da presente invenção, no

conjugado fármaco-ligante fornecido ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo, o terminal O de -Y- é conectado à unidade ligadora L.

[059] Em algumas outras modalidades da presente invenção, o conjugado fármaco-ligante fornecido ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo é um conjugado fármaco-ligante de Fórmula (Pc-L-D1) ou um sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo:



(Pc-L-D$_1$)

em que:

[060] R^1 é uma cicloalquilalquila ou cicloalquila, e preferivelmente C_{3-6} cicloalquilalquila ou C_{3-6} cicloalquila;

[061] R^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, haloalquila e C_{3-6} cicloalquila, e preferivelmente átomo de hidrogênio;

[062] ou, R^1 e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma C_{3-6} cicloalquila;

[063] m é 0 ou 1;

[064] n é 1 a 10, que pode ser um inteiro ou um decimal;

[065] Pc é um ligante; e L é uma unidade ligadora.

[066] Em outra modalidade preferida da presente invenção, no conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo de acordo com a presente invenção, n é 2 a 8, que pode ser um inteiro ou um decimal; e preferivelmente n é 3 a 8, que pode ser um inteiro ou um decimal.

[067] Em outra modalidade preferida da presente invenção, no conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo de acordo com a presente invenção, a unidade ligadora

L é $-L^1-L^2-L^3-L^4-$,

[068] L^1 é selecionado a partir do grupo consistindo em -(succinimida-3-il-*N*)-W-C(O)-, $-CH_2-C(O)-NR^3-W-C(O)-$ e -C(O)-W-C(O)-, em que W é selecionado a partir do grupo consistindo em C_{1-8} alquila, C_{1-8} alquil-cicloalquila e heteroalquila linear compreendendo 1 a 8 átomo(s), a heteroalquila compreende 1 a 3 heteroátomo(s) selecionados a partir do grupo consistindo em N, O e S, em que a C_{1-8} alquila, cicloalquila e heteroalquila linear são cada uma independente, opcional e ainda substituídas por um ou mais substituinte(s) selecionados a partir do grupo consistindo em halogênio, hidróxi, ciano, amino, alquila, cloroalquila, alquila deuterada, alcóxi e cicloalquila;

[069] L^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em $-NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2CH_2C(O)-$, $-NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2C(O)-$, $-S(CH_2)p^1C(O)-$ e uma ligação química, em que p^1 é um inteiro de 1 a 20; e L^2 é preferivelmente uma ligação química;

[070] L^3 é um resíduo de peptídeo composto de 2 a 7 aminoácidos, em que os aminoácidos são opcional e ainda substituídos por um ou mais substituinte(s) selecionados a partir do grupo consistindo em halogênio, hidróxi, ciano, amino, alquila, cloroalquila, alquila deuterada, alcóxi e cicloalquila;

[071] L^4 é selecionado a partir do grupo consistindo em $-NR^5(CR^6R^7)_t-$, $-C(O)NR^5$, $-C(O)NR^5(CH_2)_t-$ e uma ligação química, em que t é um inteiro de 1 a 6; e L^4 é preferivelmente $-NR^5(CR^6R^7)t-$;

[072] R^3, R^4 e R^5 são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, alquila, haloalquila, alquila deuterada e hidroxialquila;

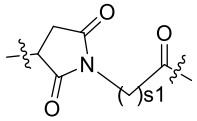
[073] R^6 e R^7 são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, halogênio, alquila, haloalquila, alquila deuterada e hidroxialquila.

[074] Em algumas outras modalidades da presente invenção, no conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo, a unidade ligadora L^1 é selecionado a partir do grupo consistindo em -(succinimida-3-il-*N*)-$(CH_2)s^1$-C(O)-, -(succinimida-3-il-*N*)-CH_2-ciclohexil-C(O)-, -(succinimida-3-il-*N*)-$(CH_2CH_2O)s^2$-CH_2CH_2-C(O)-, -CH_2-C(O)-NR^3-$(CH_2)s^3$-C(O)- e -C(O)-$(CH_2)s^4$C(O)-, em que s^1 é um inteiro de 2 a 8, s^2 é um inteiro de 1 a 3, s^3 é um inteiro de 1 a 8, e s^4 é um inteiro de 1 a 8; e s^1 é preferivelmente 5.

[075] Em algumas outras modalidades da presente invenção, no conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo, a unidade ligadora L^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em -$NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2C(O)$- e uma ligação química, em que p^1 é um inteiro de 6 a 12.

[076] Em algumas outras modalidades da presente invenção, no conjugado fármaco-ligante fornecido ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo, L^4 é selecionado a partir de -$NR^5(CR^6R^7)$t-, R^5 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio e alquila, R^6 e R^7 são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio e alquila, t é 1 ou 2, e preferivelmente 2; L^4 é preferivelmente -$NR^5CR^6R^7$-; e L^4 é mais preferivelmente -$NHCH_2$-.

[077] Em algumas outras modalidades da presente invenção, no conjugado fármaco-ligante fornecido ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo, a unidade ligadora -L- é -L^1-L^2-L^3-L^4-,

[078] L^1 é  , e s^1 é um inteiro de 2 a 8;

[079] L^2 é uma ligação química;

[080] L^3 é um resíduo de tetrapeptídeo;

[081] L^4 é -$NR^5(CR^6R^7)$t-, R^5 é selecionado a partir do grupo con-

sistindo em átomo de hidrogênio e alquila, R^6 e R^7 são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio e alquila, e t é 1 ou 2.

[082] Em algumas outras modalidades da presente invenção, no conjugado fármaco-ligante fornecido ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo, a unidade ligadora -L- é $-L^1-L^2-L^3-L^4-$,

[083] L^1 é -(succinimida-3-il-*N*)-CH_2-ciclohexil-C(O)-;

[084] L^2 é $-NR^4(CH_2CH_2O)_9CH_2C(O)-$;

[085] L^3 é um resíduo de tetrapeptídeo;

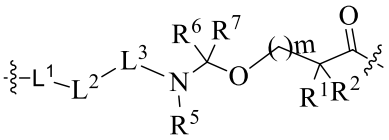
[086] L^4 é $-NR^5(CR^6R^7)t-$, R^5 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio e alquila, R^6 e R^7 são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio e alquila, e t é 1 ou 2.

[087] Em algumas outras modalidades da presente invenção, no conjugado fármaco-ligante fornecido ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo, o resíduo de peptídeo de L^3 é um resíduo de aminoácido composto de um, dois ou mais aminoácido(s) selecionados a partir do grupo consistindo em fenilalanina (E), glicina (G), valina (V), lisina (K), citrulina, serina (S), ácido glutâmico (E) e ácido aspártico (N), preferivelmente um resíduo de aminoácido composto de um, dois ou mais aminoácido(s) selecionados a partir do grupo consistindo em fenilalanina e glicina, mais preferivelmente o resíduo de tetrapeptídeo, e o mais preferivelmente o resíduo de tetrapeptídeo de GGFG (glicina-glicina-fenilalanina-glicina).

[088] Em algumas outras modalidades da presente invenção, no conjugado fármaco-ligante fornecido ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo, o L^1 terminal de uma unidade ligadora -L- é conectado ao ligante, e o L^4 terminal de uma unidade ligadora -L- é conectado a Y.

[089] Em algumas outras modalidades da presente invenção, no

conjugado fármaco-ligante fornecido ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo, -L-Y- é:



[090] L^1 é selecionado a partir do grupo consistindo em -(succinimida-3-il-*N*)-$(CH_2)s^1$-C(O)- e -(succinimida-3-il-*N*)-CH_2-ciclohexil-C(O)-;

[091] L^2 é $-NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2C(O)-$ ou uma ligação química, e p^1 é um inteiro de 6 a 12;

[092] L^3 é um resíduo de tetrapeptídeo de GGFG;

[093] R^1 é uma cicloalquilalquila ou cicloalquila, e preferivelmente C_{3-6} cicloalquilalquila ou C_{3-6} cicloalquila;

[094] R^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, haloalquila e C_{3-6} cicloalquila, e preferivelmente átomo de hidrogênio;

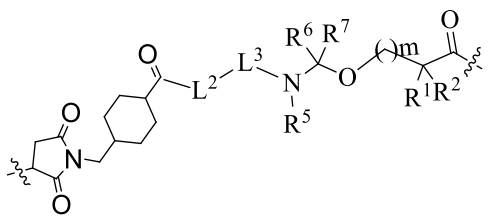
[095] ou, R^1 e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma C_{3-6} cicloalquila;

[096] R^5 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio e alquila, e R^6 e R^7 são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio e alquila;

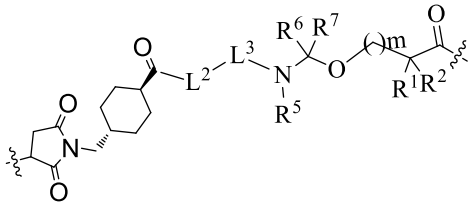
[097] s^1 é um inteiro de 2 a 8, e preferivelmente 5;

[098] m é um inteiro de 0 a 4.

[099] Em algumas outras modalidades da presente invenção, no conjugado fármaco-ligante fornecido ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo, -L-Y- é:



e preferivelmente é:



[100] L^2 é $-NR^4(CH_2CH_2O)_9CH_2C(O)-$;

[101] L^3 é um resíduo de tetrapeptídeo de GGFG;

[102] R^1 é uma cicloalquilalquila ou cicloalquila, e preferivelmente C_{3-6} cicloalquilalquila ou C_{3-6} cicloalquila;

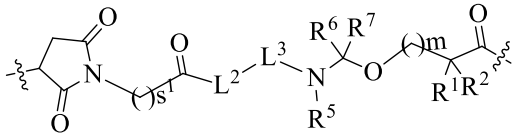
[103] R^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, haloalquila e C_{3-6} cicloalquila, e preferivelmente átomo de hidrogênio;

[104] ou, R^1 e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma C_{3-6} cicloalquila;

[105] R^5 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio e alquila, e R^6 e R^7 são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio e alquila;

[106] m é um inteiro de 0 a 4.

[107] Em algumas outras modalidades da presente invenção, no conjugado fármaco-ligante fornecido de Fórmula (Pc-L-Y-Dr) ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo, -L-Y- is



[108] L^2 é uma ligação química;

[109] L^3 é um resíduo de tetrapeptídeo de GGFG;

[110] R^1 é uma cicloalquilalquila ou cicloalquila, e preferivelmente C_{3-6} cicloalquilalquila ou C_{3-6} cicloalquila;

[111] R^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, haloalquila e C_{3-6} cicloalquila, e preferivelmente átomo de hidrogênio;

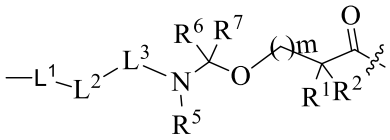
[112] ou, R^1 e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma C_{3-6} cicloalquila;

[113] R^5 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio e alquila, e R^6 e R^7 são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio e alquila;

[114] s^1 é um inteiro de 2 a 8, e preferivelmente 5;

[115] m é um inteiro de 0 a 4.

[116] Outro aspecto da presente invenção fornece um conjugado fármaco-ligante ou um sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo, em que um conjugado fármaco-ligante contém uma estrutura de Fórmula (-L-Y-):



[117] que pode ser usada para formar um conjugado fármaco-ligante conectando o fármaco e o ligante via um fragmento de ligador;

em que:

[118] L^1 é selecionado a partir do grupo consistindo em -(succinimida-3-il-*N*)-$(CH_2)s^1$-C(O)- e -(succinimida-3-il-*N*)-CH_2-ciclohexil-C(O)-;

[119] L^2 é $-NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2C(O)-$ ou uma ligação química, e p^1 é um inteiro de 1 a 20;

[120] L^3 é um resíduo de tetrapeptídeo de GGFG;

[121] R^1 é uma cicloalquilalquila ou cicloalquila, e preferivelmente C_{3-6} cicloalquilalquila ou C_{3-6} cicloalquila;

[122] R^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, haloalquila e C_{3-6} cicloalquila, e preferivelmente átomo de hidrogênio;

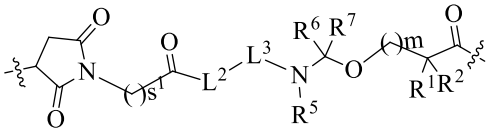
[123] ou, R^1 e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma C_{3-6} cicloalquila;

[124] R^5, R^6 e R^7 são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio e alquila;

[125] s^1 é um inteiro de 2 a 8;

[126] m é um inteiro de 0 a 4.

[127] Outro aspecto da presente invenção fornece um conjugado fármaco-ligante ou um sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo, em que um conjugado fármaco-ligante compreende contém uma estrutura de Fórmula (-L-Y-):



(-L-Y-)

[128] em que:

[129] L^2 é uma ligação química;

[130] L^3 é um resíduo de tetrapeptídeo de GGFG;

[131] R^1 é uma cicloalquilalquila ou cicloalquila, e preferivelmente C_{3-6} cicloalquilalquila ou C_{3-6} cicloalquila;

[132] R^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, haloalquila e C_{3-6} cicloalquila, e preferivelmente átomo de hidrogênio;

[133] ou, R^1 e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma C_{3-6} cicloalquila;

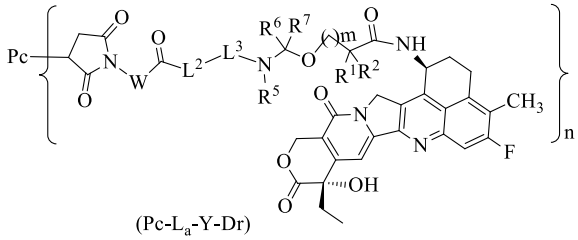
[134] R^5 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio e alquila, e R^6 e R^7 são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio e alquila;

[135] s^1 é um inteiro de 2 a 8;

[136] m é um inteiro de 0 a 4.

[137] Em algumas outras modalidades da presente invenção, o conjugado fármaco-ligante fornecido de Fórmula (Pc-L-Y-Dr) ou o sal

farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo é um conjugado fármaco-ligante de Fórmula (Pc-L_a-Y-Dr) ou um sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo:



(Pc-L_a-Y-Dr)

em que:

[138] W é selecionado a partir do grupo consistindo em C_{1-8} alquila, C_{1-8} alquil-cicloalquila e heteroalquila linear compreendendo 1 a 8 átomo(s), a heteroalquila compreende 1 a 3 heteroátomo(s) selecionados a partir do grupo consistindo em N, O e S, em que a C_{1-8} alquila, cicloalquila e heteroalquila linear são cada uma independente, opcional e ainda substituídas por um ou mais substituinte(s) selecionados a partir do grupo consistindo em halogênio, hidróxi, ciano, amino, alquila, cloroalquila, alquila deuterada, alcóxi e cicloalquila;

[139] L^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em -$NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2CH_2C(O)$-, -$NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2C(O)$-, -$S(CH_2)p^1C(O)$- e uma ligação química, em que p^1 é um inteiro de 1 a 20;

[140] L^3 é um resíduo de peptídeo composto de 2 a 7 aminoácidos, o aminoácido pode ser substituído ou não substituído, quando substituído, o grupo(s) substituinte pode ser substituído em qualquer ponto de conexão disponível, o grupo(s) substituinte é um ou mais grupo(s) independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em halogênio, hidróxi, ciano, amino, alquila, cloroalquila, alquila deuterada, alcóxi e cicloalquila;

[141] R^1 é selecionado a partir do grupo consistindo em halogênio, cicloalquilalquila, alquila deuterada, cicloalquila, heterociclila, arila e heteroarila, preferivelmente cicloalquilalquila ou cicloalquila, e mais preferivelmente C_{3-6} cicloalquilalquila ou C_{3-6} cicloalquila;

[142] R^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, halogênio, haloalquila, alquila deuterada, cicloalquila, heterociclila, arila e heteroarila, e preferivelmente átomo de hidrogênio; ou, R^1 e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma cicloalquila ou heterociclila;

[143] R^4 e R^5 são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, alquila, haloalquila, alquila deuterada e hidroxialquila;

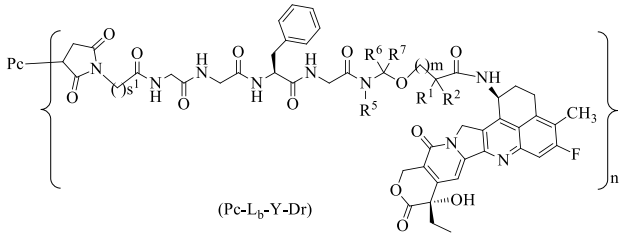
[144] R^6 e R^7 são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, halogênio, alquila, haloalquila, alquila deuterada e hidroxialquila;

[145] m é um inteiro de 0 a 4;

[146] n é um inteiro diferente de zero ou decimal a partir de 0 a 10, preferivelmente um inteiro ou decimal a partir de 1 a 10;

[147] Pc é um ligante.

[148] Em algumas outras modalidades da presente invenção, o conjugado fármaco-ligante fornecido de Fórmula (Pc-La-Y-Dr) ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo é um conjugado fármaco-ligante de Fórmula (Pc-L_b-Y-Dr) ou um sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo:



(Pc-L_b-Y-Dr)

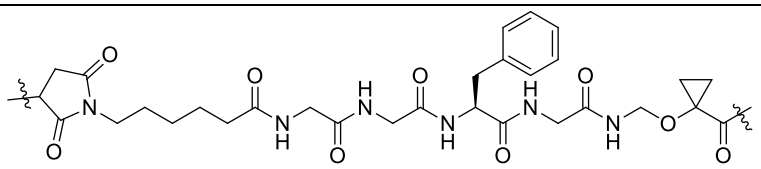
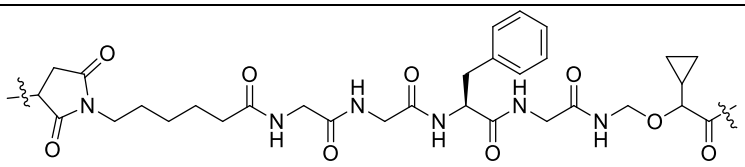
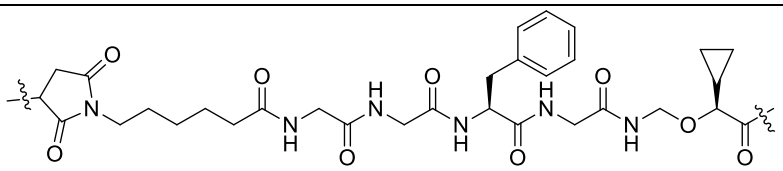
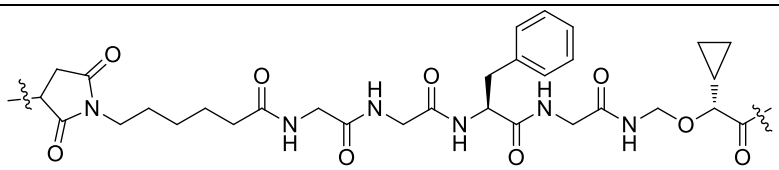
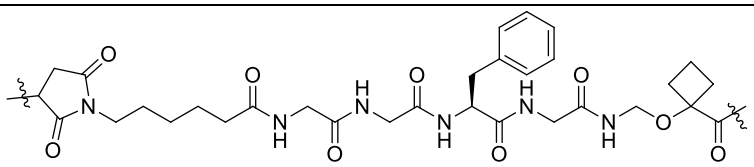
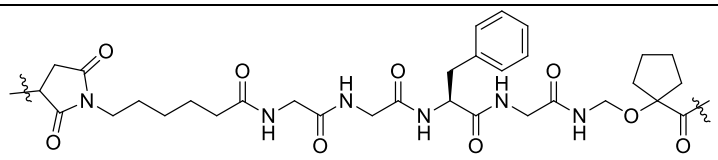
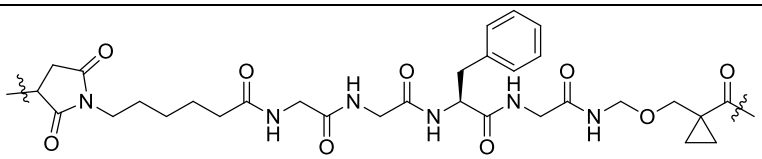
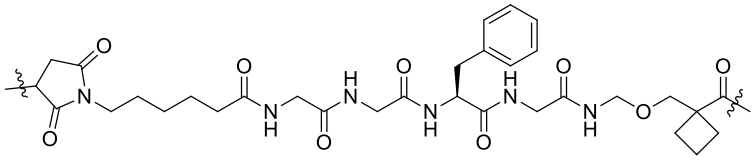
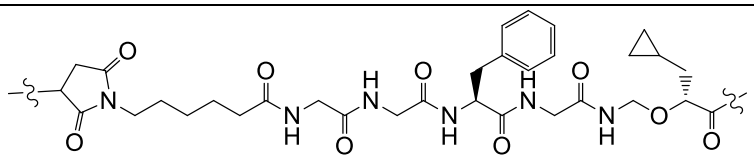
em que:

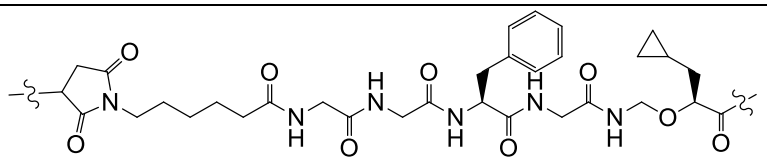
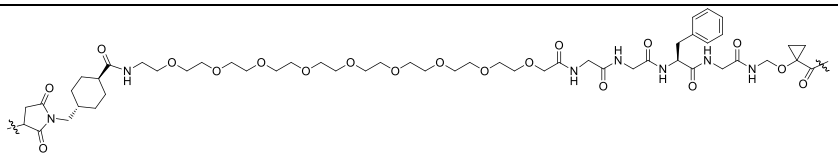
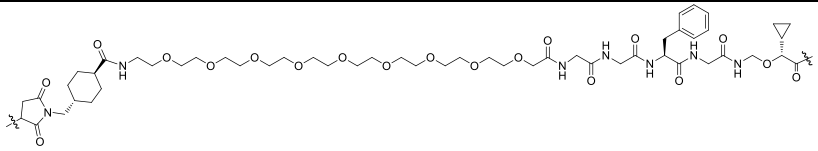
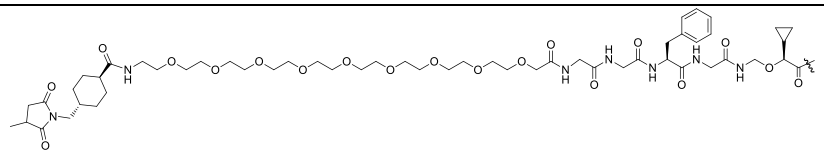
[149] s^1 é um inteiro de 2 a 8, e preferivelmente 5;

[150] Pc, R^1, R^2, R^5~R^7, m e n são como definidos na Fórmula (Pc-La-Y-Dr).

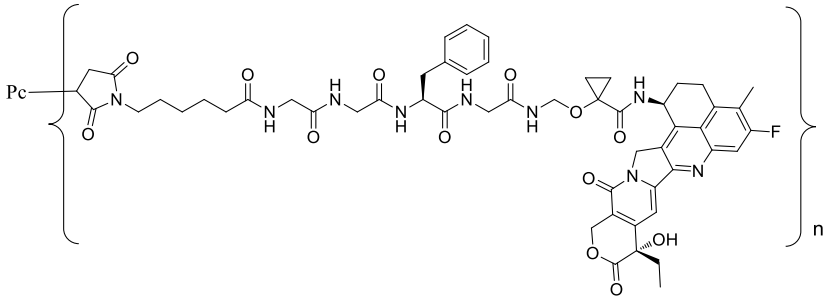
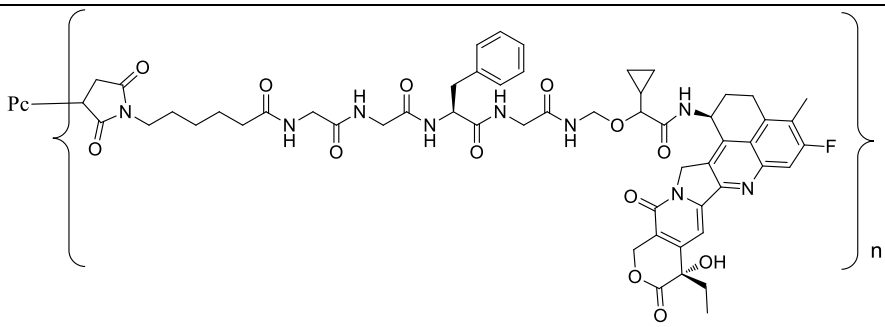
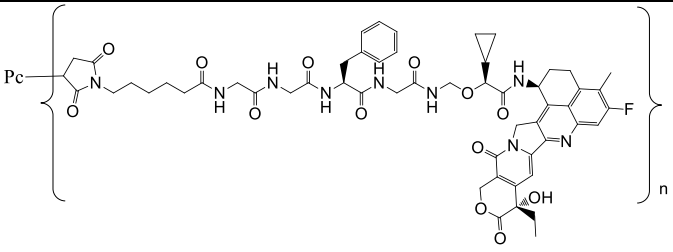
[151] A unidade ligadora -L-Y- do conjugado fármaco-ligante da

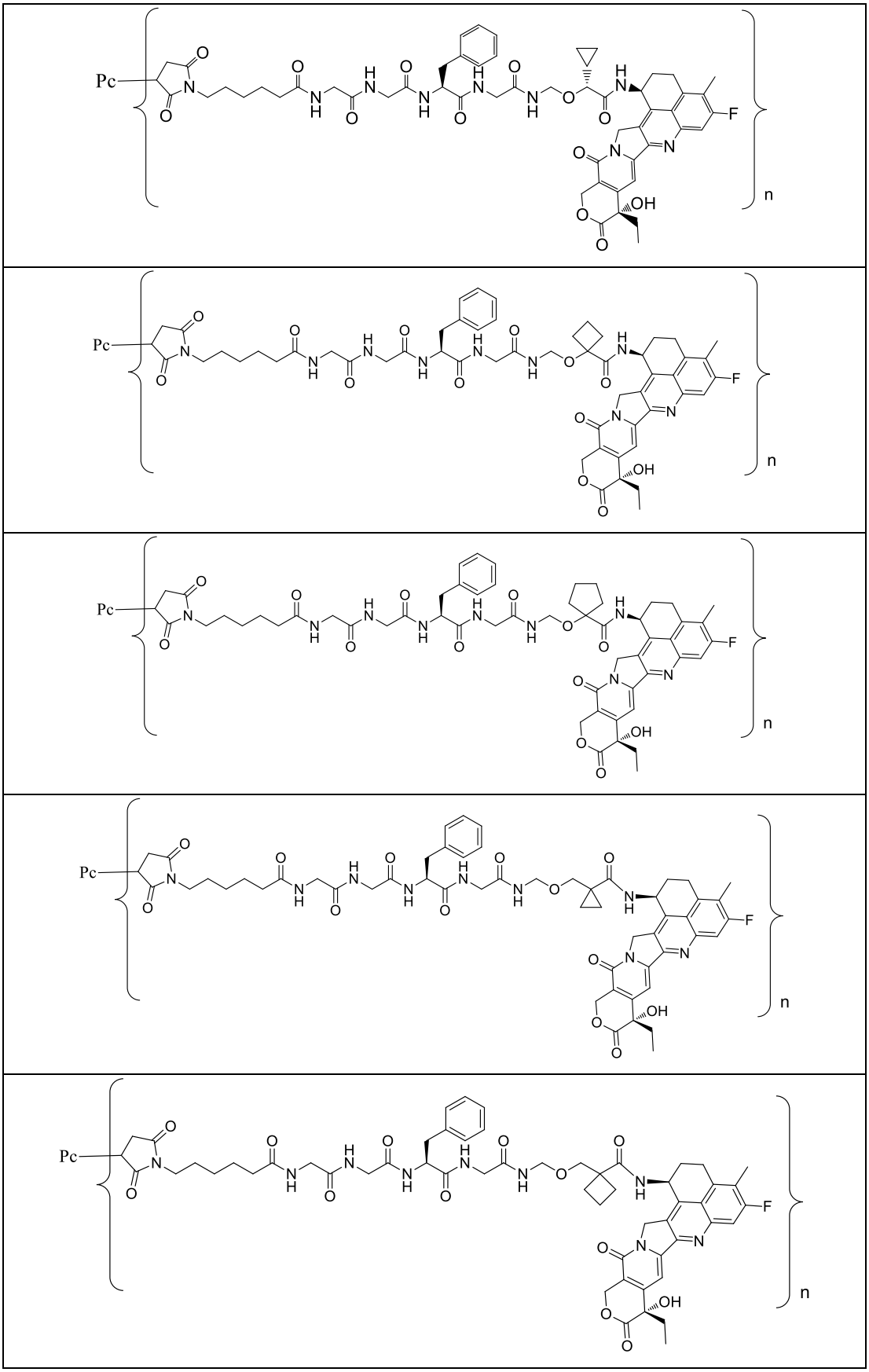
presente invenção inclui, mas não é limitada a:

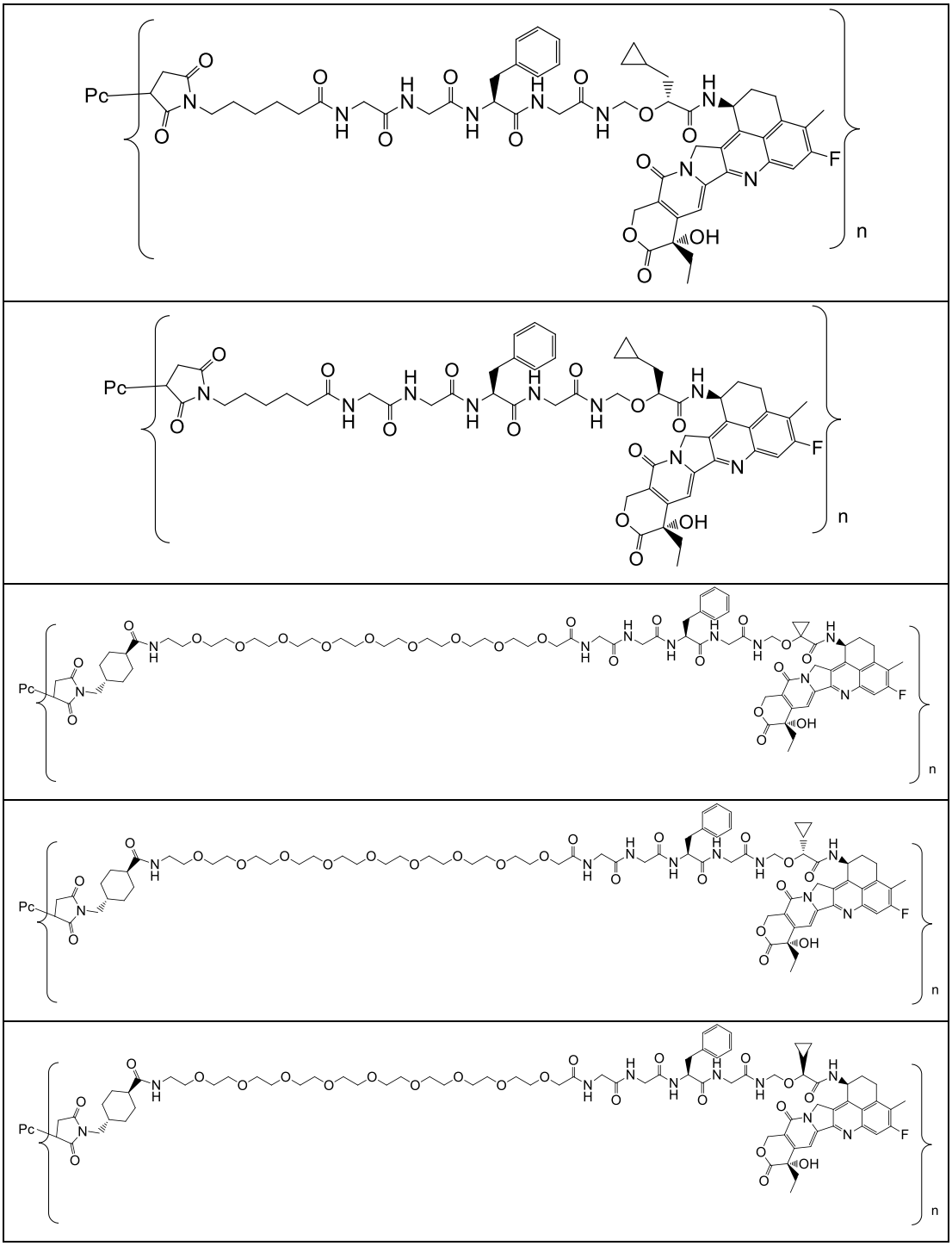
No.	Estrutura
-L-Y^2-	
-L-Y^3-	
-L-Y^{3-A}-	
-L-Y^{3-B}-	
-L-Y^6-	
-L-Y^7-	
-L-Y^8-	
-L-Y^9-	
-L-Y^{10}-	

-L-Y^{11}-	
-L-Y^{12}-	
-L-Y^{13}-	
-L-Y^{14}-	

[152] Os conjugados fármaco-ligante de Fórmula (Pc-L-Y-Dr) da presente invenção incluem, mas não são limitados a:

Estrutura





Pc
F
OH
n



em que Pc e n são como definidos na Fórmula (Pc-La-Y-Dr).

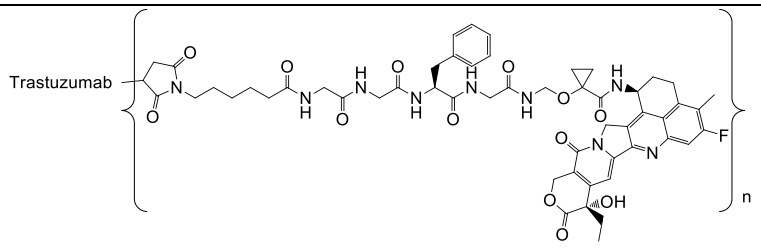
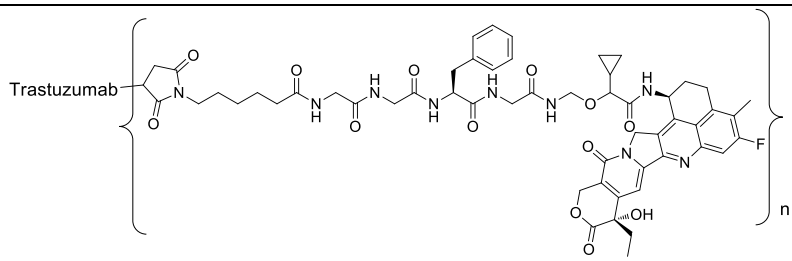
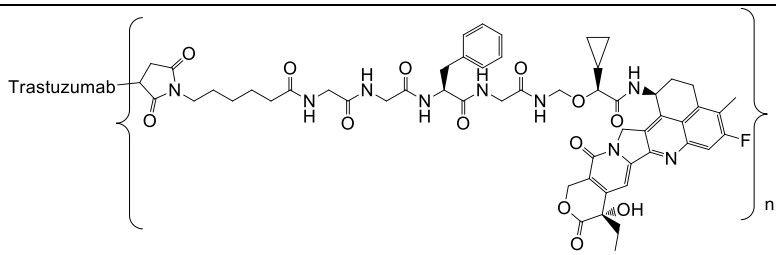
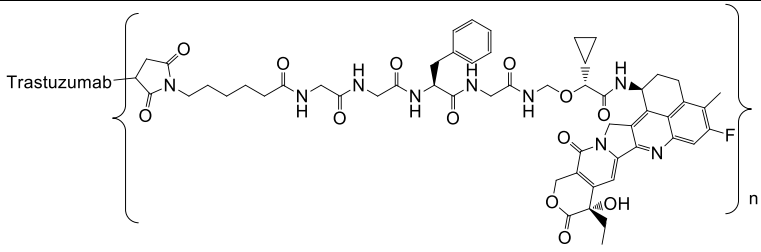
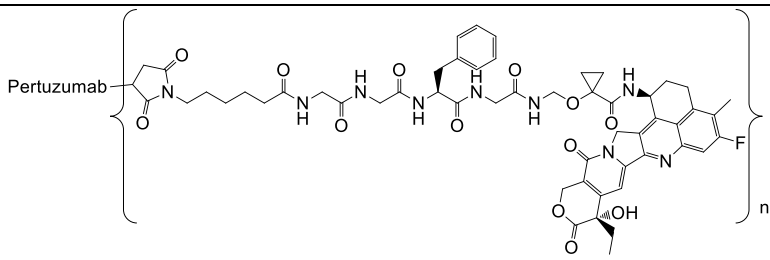
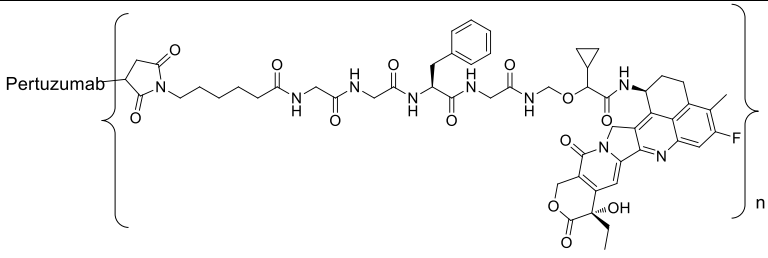
[153] Em algumas outras modalidades da presente invenção, no conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo, Pc é um anticorpo ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo, o anticorpo é selecionado a partir do grupo consistindo

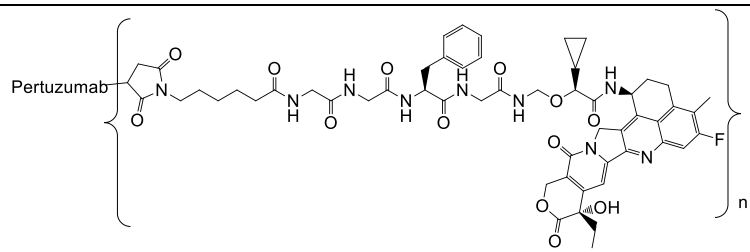
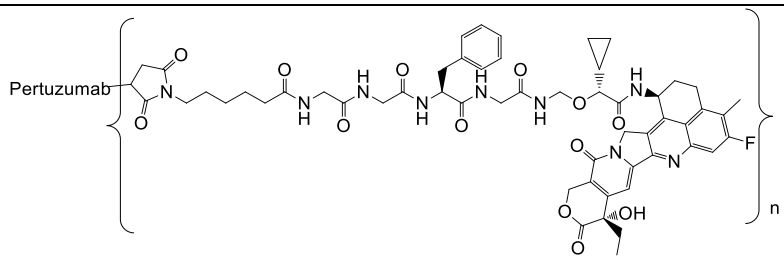
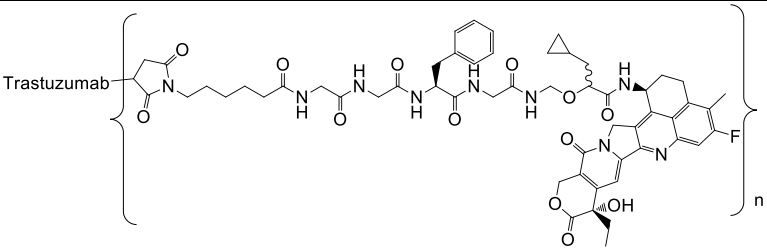
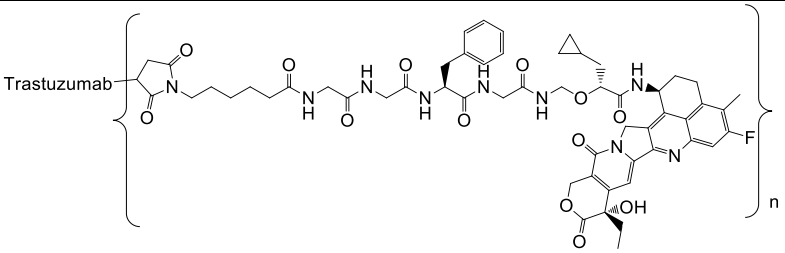
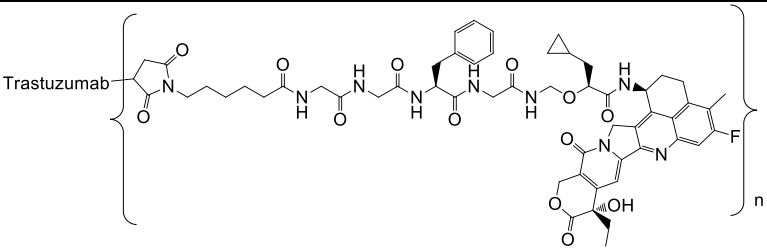
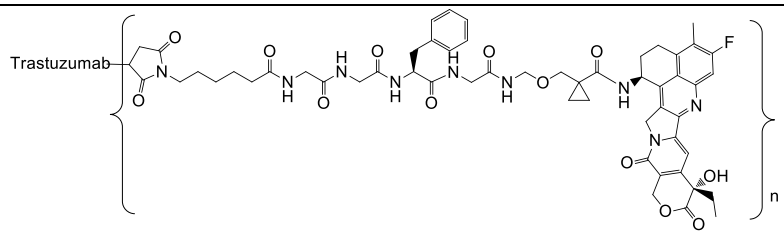
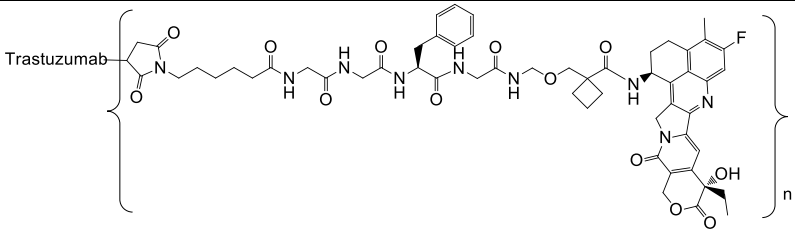
em anticorpo quimérico, anticorpo humanizado e anticorpo completamente humanizado, e preferivelmente um anticorpo monoclonal.

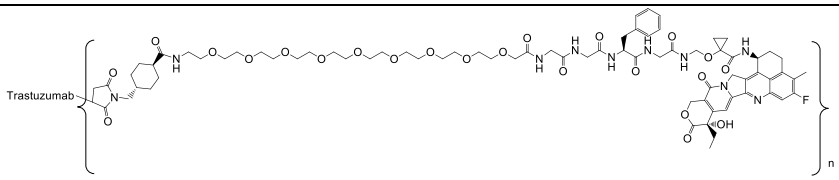
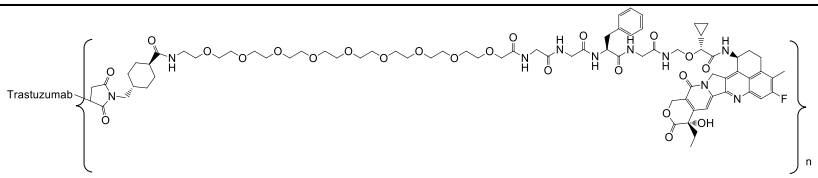
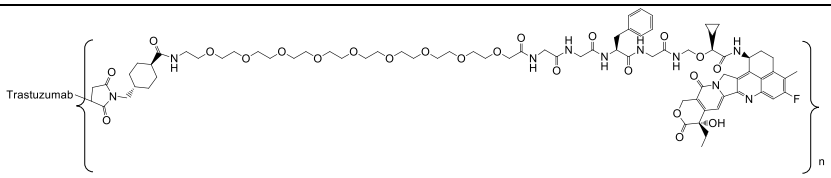
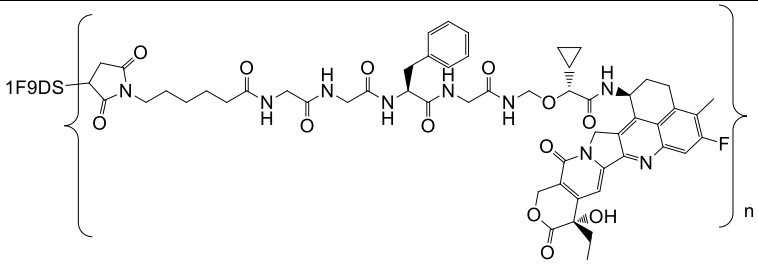
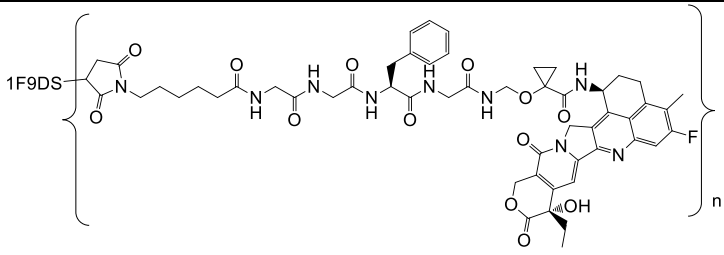
[154] Em algumas outras modalidades da presente invenção, no conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo, o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo é selecionado a partir do grupo consistindo em anticorpo anti-HER2 (ErbB2), anticorpo anti-EGFR, anticorpo anti-B7-H3, anticorpo anti-c-Met, anticorpo anti-HER3 (ErbB3), anticorpo anti-HER4 (ErbB4), anticorpo anti-CD20, anticorpo anti-CD22, anticorpo anti-CD30, anticorpo anti-CD33, anticorpo anti-CD44, anticorpo anti-CD56, anticorpo anti-CD70, anticorpo anti-CD73, anticorpo anti-CD105, anticorpo anti-CEA, anticorpo anti-A33, anticorpo anti-Cripto, anticorpo anti-EphA2, anticorpo anti-G250, anticorpo anti-MUCl, anticorpo anti-Lewis Y, anticorpo anti-VEGFR, anticorpo anti-GPNMB, anticorpo antiintegrina, anticorpo anti-PSMA, anticorpo anti-Tenascin-C, anticorpo anti-SLC44A4 e anticorpo anti-Mesotelina, e fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos.

[155] Em algumas outras modalidades da presente invenção, no conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo, o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo é selecionado a partir do grupo consistindo em Trastuzumab, Pertuzumab, Nimotuzumab, Enoblituzumab, Emibetuzumab, Inotuzumab, Pinatuzumab, Brentuximab, Gemtuzumab, Bivatuzumab, Lorvotuzumab, cBR96 e Glematumamab, e fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos.

[156] Os conjugados fármaco-ligante de Fórmula (Pc-L-Y-Dr) da presente invenção incluem, mas não são limitados às seguintes Fórmulas:

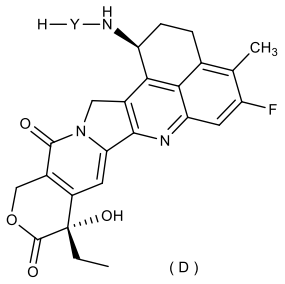
ADC Exemplar	Estrutura
ADC-3	
	
ADC-6	
ADC-4/ ADC-5/ ADC-17/ ADC-19/	
ADC-7	
	

	
	
ADC-10/ ADC-11	
	
	
ADC-12	
ADC-13	

ADC-14	
ADC-15	
ADC-16	
ADC-25/ ADC-27/ ADC-29	
ADC-31	

em que, n é um inteiro diferente de zero ou decimal a partir de 0 a 10, preferivelmente n é um inteiro ou decimal a partir de 1 a 10; mais preferivelmente n é 2 a 8, que pode ser um inteiro ou um decimal; e o mais preferivelmente n é 3 a 8, que pode ser um inteiro ou um decimal.

[157] Outro aspecto da presente invenção fornece um composto de Fórmula (D) ou um tautômero, mesômero, racemato, enantiômero, diastereômero do mesmo, ou mistura dos mesmos, ou um sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos,



(D)

em que:

[158] Y é selecionado a partir do grupo consistindo em -O-(CR^aR^b)m-CR^1R^2-C(O)-, -O-CR^1R^2- (CR^aR^b)m -, -O-CR^1R^2-, -NH-(CR^aR^b)m-CR^1R^2-C(O)- e -S-(CR^aR^b)m-CR^1R^2-C(O)-;

[159] R^a e R^b são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, átomo de deutério, halogênio, alquila, haloalquila, alquila deuterada, alcóxi, hidróxi, amino, ciano, nitro, hidroxialquila, cicloalquila e heterociclila;

[160] ou, R^a e R^b juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma cicloalquila ou heterociclila;

[161] R^1 é selecionado a partir do grupo consistindo em halogênio, cicloalquilalquila, alquila deuterada, cicloalquila, alcoxialquila, heterociclila, arila e heteroarila;

[162] R^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, halogênio, haloalquila, alquila deuterada, cicloalquila, cicloalquilalquila, alcoxialquila, heterociclila, arila e heteroarila;

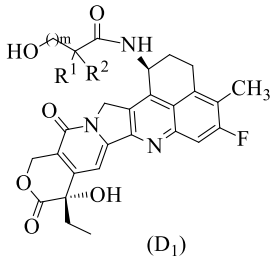
[163] ou, R^1 e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma cicloalquila ou heterociclila;

[164] ou, R^a e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma cicloalquila ou heterociclila;

[165] m é um inteiro de 0 a 4.

[166] Em uma modalide preferida de outro aspecto da presente invenção, o composto fornecido de Fórmula (D) ou o tautômero, mesômero, racemato, enantiômero, diastereômero do mesmo, ou mistura dos

mesmos, ou o sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, é um composto de Fórmula (D_1) ou um tautômero, mesômero, racemato, enantiômero, diastereômero do mesmo, ou mistura dos mesmos, ou um sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos,



(D_1)

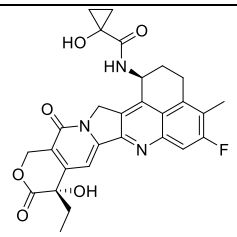
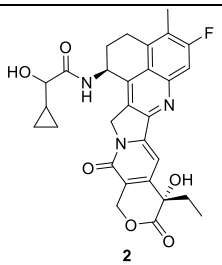
[167] em que: R^1 é uma C_{3-6} cicloalquilalquila ou C_{3-6} cicloalquila;

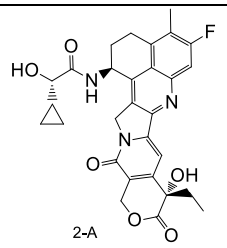
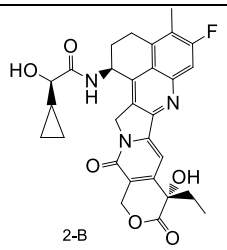
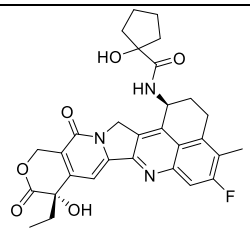
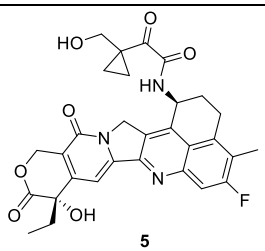
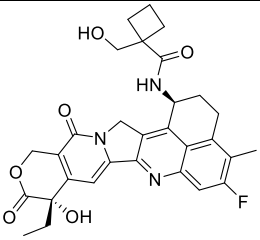
[168] R^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, haloalquila e C_{3-6} cicloalquila;

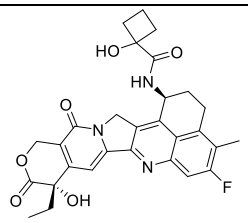
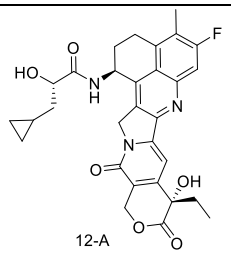
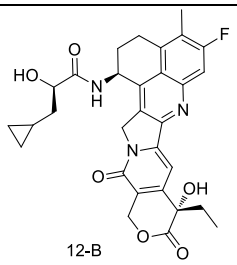
[169] ou, R^1 e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma C_{3-6} cicloalquila;

[170] m é 0 ou 1.

[171] Os compostos de Fórmula (D) da presente invenção incluem, mas não são limitados a:

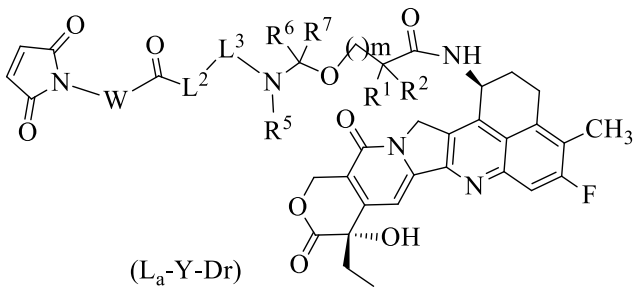
No.	Estrutura
1	 **1**
	N-((1*S*,9*S*)-9-Etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)-1-hidroxiciclopropano-1-carboxamida **1**
2	 **2**
	2-Ciclopropil-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-1,2,3,9,10,12,13,15-octahidrobenzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)-2-hidroxiacetamida **2**

2-A	 2-A
	(*S*)-2-Ciclopropil-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-1,2,3,9,10,12,13,15-octahidrobenzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)-2-hidroxiacetamida **2-A**
2-B	 2-B
	(*R*)-2-Ciclopropil-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-1,2,3,9,10,12,13,15-octahidrobenzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)-2-hidroxiacetamida **2-B**
4	 **4**
	N-((1*S*,9*S*)-9-Etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)-1-hidroxiciclopentano-1-carboxamida **4**
5	 **5**
	N-((1*S*,9*S*)-9-Etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)-1-(hidroximetil)ciclopropano-1-carboxamida **5**
6	 **6**
	N-((1*S*,9*S*)-9-Etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)-1-(hidroximetil)ciclobutano-1-carboxamida **6**

7	 **7**
	N-((1*S*,9*S*)-9-Etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)-1-hidroxiciclobutano-1-carboxamida **7**
12-A	 12-A
	(*S*)-3-Ciclopropil-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)-2-hidroxipropanamida **12-A**
12-B	 12-B
	(*R*)-3-Ciclopropil-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)-2-hidroxipropanamida **12-B**

[172] ou um tautômero, mesômero, racemato, enantiômero, diastereômero do mesmo, ou mistura dos mesmos, ou um sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos.

[173] Uma modalidade preferida de outro aspecto da presente invenção fornece um composto de Fórmula (L_a-Y-Dr) ou um tautômero, mesômero, racemato, enantiômero, diastereômero do mesmo, ou mistura dos mesmos, ou um sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos:



(L_a-Y-Dr)

em que

[174] W é selecionado a partir do grupo consistindo em C_{1-8} alquila, C_{1-8} alquil-cicloalquila e heteroalquila linear compreendendo 1 a 8 átomo(s), a heteroalquila compreende 1 a 3 heteroátomo(s) selecionados a partir do grupo consistindo em N, O e S, em que a C_{1-8} alquila, cicloalquila e heteroalquila linear são cada uma independente, opcional e ainda substituídas por um ou mais substituinte(s) selecionados a partir do grupo consistindo em halogênio, hidróxi, ciano, amino, alquila, cloroalquila, alquila deuterada, alcóxi e cicloalquila;

[175] L^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em -$NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2CH_2C(O)$-, -$NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2C(O)$-, -$S(CH_2)p^1C(O)$- e uma ligação química, em que p^1 é um inteiro de 1 a 20;

[176] L^3 é um resíduo de peptídeo composto de 2 a 7 aminoácidos, em que os aminoácidos são opcional e ainda substituídos por um ou mais substituinte(s) selecionados a partir do grupo consistindo em halogênio, hidróxi, ciano, amino, alquila, cloroalquila, alquila deuterada, alcóxi e cicloalquila, quando substituído, o grupo(s) substituinte pode ser substituído em qualquer ponto de conexão disponível, o grupo(s) substituinte é um ou mais grupo(s) independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em halogênio, hidróxi, ciano, amino, alquila, cloroalquila, alquila deuterada, alcóxi e cicloalquila;

[177] R^1 é selecionado a partir do grupo consistindo em halogênio, cicloalquilalquila, alquila deuterada, cicloalquila, alcoxialquila, heterociclila, arila e heteroarila;

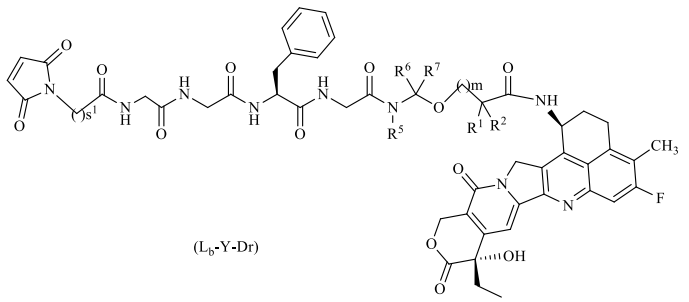
[178] R^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, halogênio, haloalquila, alquila deuterada, cicloalquila, cicloalquilalquila, alcoxialquila, heterociclila, arila e heteroarila; ou, R^1 e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma cicloalquila ou heterociclila;

[179] R^4 e R^5 são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, alquila, haloalquila, alquila deuterada e hidroxialquila;

[180] R^6 e R^7 são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, halogênio, alquila, haloalquila, alquila deuterada e hidroxialquila;

[181] m é um inteiro de 0 a 4.

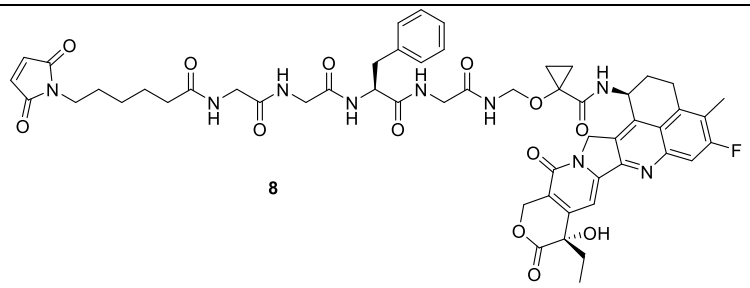
[182] Em uma modalide preferida de outro aspecto da presente invenção, o composto fornecido de Fórmula (L_a-Y-Dr) ou o tautômero, mesômero, racemato, enantiômero, diastereômero do mesmo, ou mistura dos mesmos, ou o sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, é um composto de Fórmula (L_b-Y-Dr) ou um tautômero, mesômero, racemato, enantiômero, diastereômero do mesmo, ou mistura dos mesmos, ou um sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos:

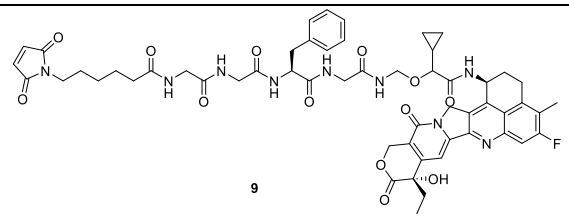
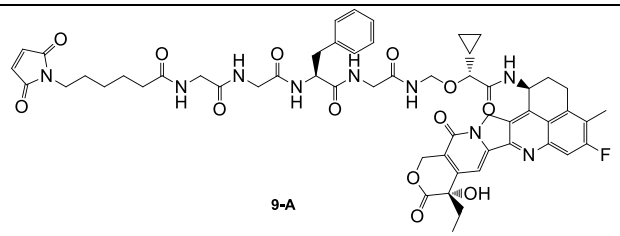
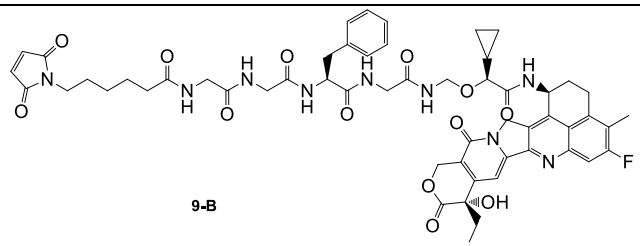
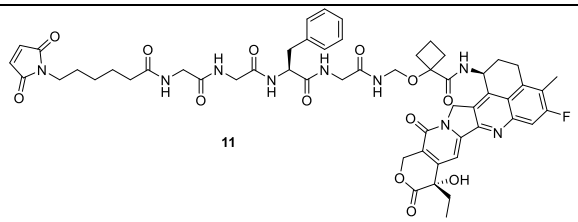
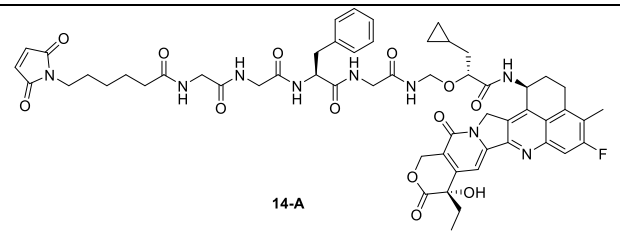


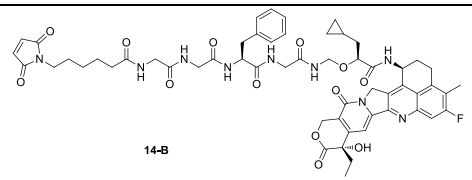
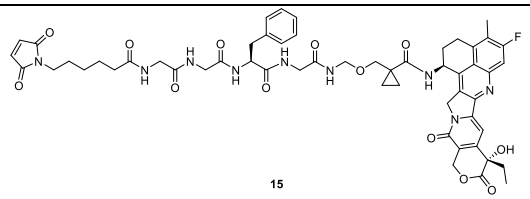
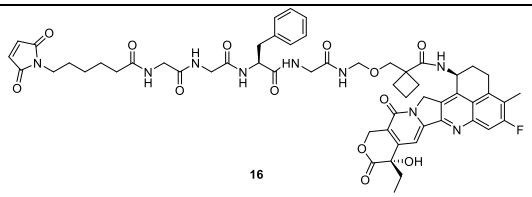
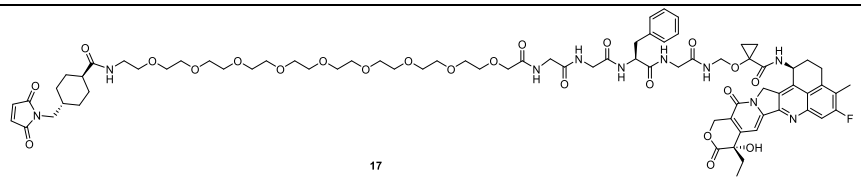
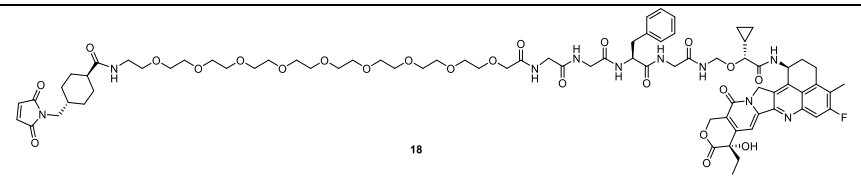
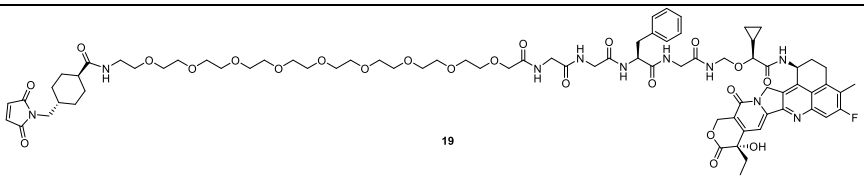
(L_b-Y-Dr)

[183] em que R^1, R^2, R^5~R^7, s^1 e m são como definidos na Fórmula (L_a-Y-Dr).

[184] Os compostos de Fórmula (L_a-Y-Dr) da presente invenção incluem, mas não são limitados a:

No.	Estrutura
8	 **8**

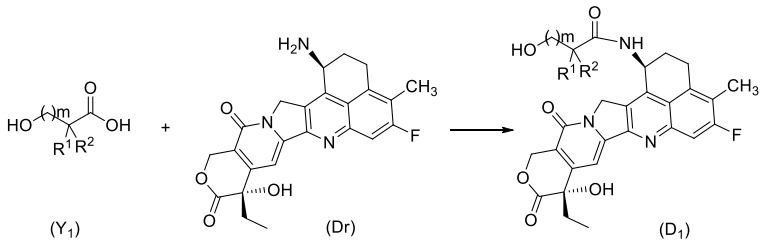
	1-(((*S*)-7-Benzil-20-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-3,6,9,12,15-pentaoxo-2,5,8,11,14-penta-azaicosil)óxi)-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)ciclopropano-1-carboxamida **8**
9	 **9** *N*-((10*S*)-10-Benzil-2-ciclopropil-1-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-1,6,9,12,15-pentaoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetra-azahexadecan-16-il)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamida **9**
9-A	 **9-A** *N*-((2*R*,10*S*)-10-Benzil-2-ciclopropil-1-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-1,6,9,12,15-pentaoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetra-azahexadecan-16-il)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamida **9-A**
9-B	 **9-B** *N*-((2*S*,10*S*)-10-Benzil-2-ciclopropil-1-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-1,6,9,12,15-pentaoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetra-azahexadecan-16-il)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamida **9-B**
11	 **11** 1-(((*S*)-7-Benzil-20-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-3,6,9,12,15-pentaoxo-2,5,8,11,14-penta-azaicosil)óxi)-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)ciclobutano-1-carboxamida **11**
14-A	 **14-A** *N*-((2*R*,10*S*)-10-Benzil-2-(ciclopropilmetil)-1-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-1,6,9,12,15-pentaoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetra-azahexadecan-16-il)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamida **14-A**

14-B	 14-B
	N-((2*S*,10*S*)-10-Benzil-2-(ciclopropilmetil)-1-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-1,6,9,12,15-pentaoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetra-azahexadecan-16-il)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamida **14-B**
15	 15
	1-((*S*)-9-Benzil-22-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-5,8,11,14,17-pentaoxo-2-oxa-4,7,10,13,16-penta-azadocosil)-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3,4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)ciclopropano-1-carboxamida **15**
16	 16
	1-((*S*)-9-Benzil-22-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-5,8,11,14,17-pentaoxo-2-oxa-4,7,10,13,16-penta-azadocosil)-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)ciclobutano-1-carboxamida **16**
17	 17
	(1*r*,4*r*)-*N*-((*S*)-7-Benzil-1-(1-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)carbamoil)ciclopropóxi)-3,6,9,12,15-pentaoxo-17,20,23,26,29,32,35,38,41-nonaoxa-2,5,8,11,14-penta-azatritetracontan-43-il)-4-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)metil)ciclohexano-1-carboxamida **17**
18	 18
	(1*r*,4*r*)-*N*-((2*R*,10*S*)-10-Benzil-2-ciclopropil-1-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-1,6,9,12,15,18-hexaoxo-3,20,23,26,29,32,35,38,41,44-decaoxa-5,8,11,14,17-penta-azahexatetracontan-46-il)-4-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)metil)ciclohexano-1-carboxamida **18**
19	 19
	(1*r*,4*r*)-*N*-((2*S*,10*S*)-10-Benzil-2-ciclopropil-1-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-1,6,9,12,15,18-hexaoxo-3,20,23,26,29,32,35,38,41,44-decaoxa-5,8,11,14,17-penta-azahexatetracontan-46-il)-4-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)metil)ciclohexano-1-carboxamida **19**

[185] ou um tautômero, mesômero, racemato, enantiômero, dias-

tereômero do mesmo, ou mistura dos mesmos, ou um sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos.

[186] Outro aspecto da presente invenção fornece um método para preparar o composto de Fórmula (D_1) ou o tautômero, mesômero, racemato, enantiômero, diastereômero do mesmo, ou mistura dos mesmos, ou o sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, compreendendo a seguinte etapa de:

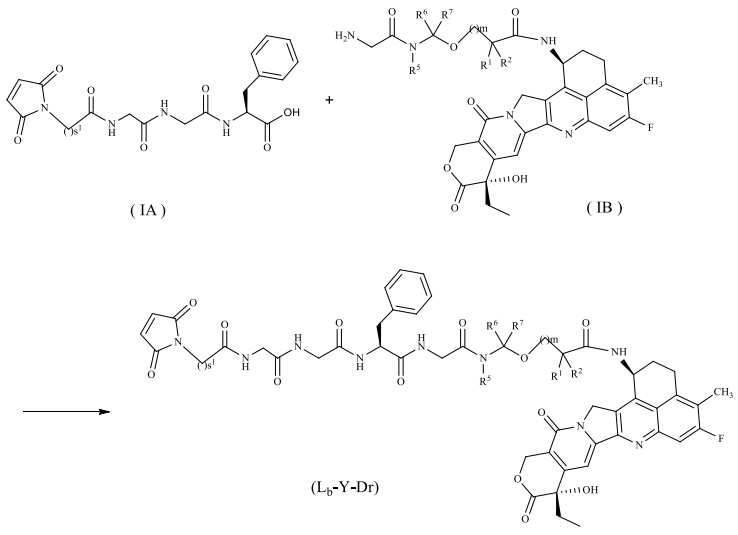


(Y_1) (Dr) (D_1)

condensando o composto de Fórmula (Y_1) e o composto de Fórmula (Dr) para obter o composto de Fórmula (D_1),

em que: R^1, R^2 e m são como definidos na Fórmula (D_1).

[187] Outro aspecto da presente invenção fornece um método para preparar o composto de Fórmula (L_b-Y-Dr) ou o tautômero, mesômero, racemato, enantiômero, diastereômero do mesmo, ou mistura dos mesmos, ou o sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, compreendendo a seguinte etapa de:



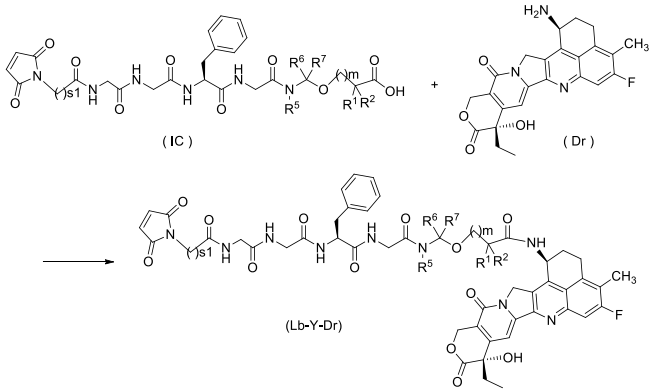
(IA) (IB)

(L_b-Y-Dr)

condensando o composto de Fórmula (IA) e o composto de Fórmula (IB) para obter o composto de Fórmula (L_b-Y-Dr),

em que: R^1, R^2, R^5~R^7, s^1 e m são como definidos na Fórmula (L_b-Y-Dr).

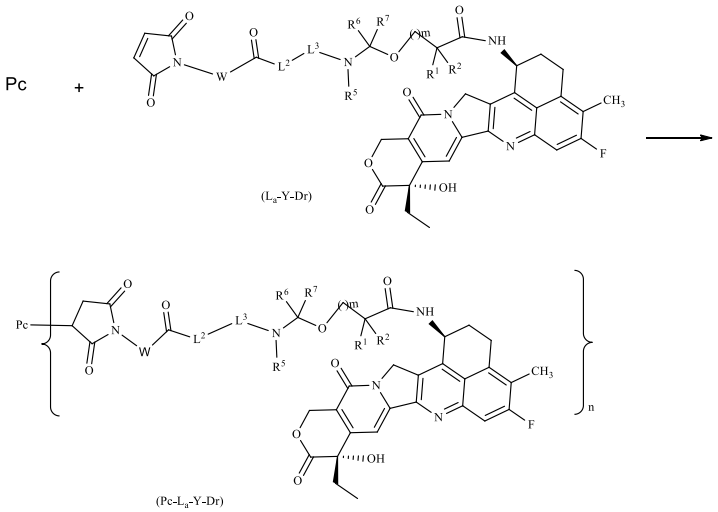
[188] Outro aspecto da presente invenção fornece um método para preparar o composto de Fórmula (L_b-Y-Dr) ou o tautômero, mesômero, racemato, enantiômero, diastereômero do mesmo, ou mistura dos mesmos, ou o sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, compreendendo a seguinte etapa de:



condensando o composto de Fórmula (IA) e o composto de Fórmula (IB) para obter o composto de Fórmula (L_b-Y-Dr),

em que: R^1, R^2, R^5~R^7, s^1 e m são como definidos na Fórmula (L_b-Y-Dr).

[189] Outro aspecto da presente invenção fornece um método para preparar o conjugado fármaco-ligante de Fórmula (Pc-L_a-Y-Dr) ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo, compreendendo a seguinte etapa de:



[190] Pc é acoplado ao composto de Fórmula (L_a-Y-Dr) após redução para dar o composto de Fórmula (Pc-L_a-Y-Dr); o agente redutor é preferivelmente TCEP;

em que:

[191] Pc é um ligante;

[192] W, L^2, L^3, R^1, R^2, R^5~R^7, m e n são como definidos na Fórmula (Pc-L_a-Y-Dr).

[193] Outro aspecto da presente invenção ainda refere-se a a composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz do conjugado fármaco-ligante ou composto ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo de acordo com a presente invenção, e um ou mais veículo(s), diluente(s) ou excipiente(s) farmaceuticamente aceitáveis.

[194] Outro aspecto da presente invenção ainda refere-se a a composição farmacêutica compreendendo o composto de Fórmula (D) ou o tautômero, mesômero, racemato, enantiômero, diastereômero do mesmo, ou mistura dos mesmos, ou o sal farmaceuticamente aceitável do mesmo de acordo com a presente invenção, e um ou mais veículo(s), diluente(s) ou excipiente(s) farmaceuticamente aceitáveis.

[195] Outro aspecto da presente invenção ainda refere-se a um conjugado fármaco-ligante ou um sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo compreendendo um ligante e um fármaco ligada ao ligante, em que um fármaco é selecionada a partir do grupo consistindo no composto de Fórmula (D), o composto de Fórmula (L_a-Y-Dr), ou o tautômero, mesômero, racemato, enantiômero, diastereômero do mesmo, ou mistura dos mesmos, ou o sal farmaceuticamente aceitável do mesmo de acordo com a presente invenção, o fármaco é preferivelmente ligada ao ligante via um ligador, e o ligante é preferivelmente um anticorpo monoclonal.

[196] Outro aspecto da presente invenção ainda refere-se a um

método para preparar um conjugado fármaco-ligante ou um sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo, compreendendo uma etapa de ligar o composto de Fórmula (D), o composto de Fórmula (L_a-Y-Dr), ou o tautômero, mesômero, racemato, enantiômero, diastereômero do mesmo, ou mistura dos mesmos, ou o sal farmaceuticamente aceitável do mesmo de acordo com a presente invenção ao ligante, preferivelmente via um ligador, e o ligante é preferivelmente um anticorpo monoclonal.

[197] Outro aspecto da presente invenção ainda refere-se a o conjugado fármaco-ligante ou composto, ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo de acordo com a presente invenção, para uso como um fármaco.

[198] Outro aspecto da presente invenção ainda refere-se a um uso do conjugado fármaco-ligante ou composto, ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo, ou a composição farmacêutica compreendendo o mesmo de acordo com a presente invenção na preparação de um medicamento para tratar ou prevenir um tumor, e preferivelmente o tumor é um câncer relacionado à expressão de HER2, HER3 ou EGFR.

[199] Outro aspecto da presente invenção ainda refere-se a um uso do conjugado fármaco-ligante ou composto, ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo, ou a composição farmacêutica compreendendo o mesmo de acordo com a presente invenção na preparação de um medicamento para tratar ou prevenir um câncer, o câncer é preferivelmente selecionado a partir do grupo consistindo em câncer de mama, câncer de ovário, câncer cervical, câncer uterino, câncer de próstata, câncer de rim, câncer de uretra, câncer de bexiga, câncer de fígado, câncer de estômago, câncer de endométrio, câncer de glândula salivar, câncer de esôfago, melanoma, glioma, neuroblastoma, sarcoma, câncer de pulmão (por exemplo, câncer de pulmão de células

pequenas e câncer de pulmão de células não pequenas), câncer de cólon, câncer retal, câncer colorretal, leucemia (por exemplo, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia mieloide crônica, leucemia linfocítica crônica), câncer ósseo, câncer de pele, câncer de tireoide, câncer de pâncreas, câncer de próstata e linfoma (por exemplo, linfoma de Hodgkin, Linfoma não-Hodgkin, ou linfoma anaplásico recorrente de células grandes).

[200] Outro aspecto da presente invenção ainda refere-se a um método para tratar and/or prevenir um tumor, compreendendo administrar a um paciente em necessidade do mesmo uma quantidade terapeuticamente eficaz do conjugado fármaco-ligante ou composto, ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo, ou a composição farmacêutica compreendendo o mesmo de acordo com a presente invenção, e preferivelmente o tumor é um câncer relacionado à expressão de HER2, HER3 ou EGFR.

[201] Outro aspecto da presente invenção ainda refere-se a um método para tratar ou prevenir um câncer, compreendendo administrar a um paciente em necessidade do mesmo uma quantidade terapeuticamente eficaz do conjugado fármaco-ligante ou composto, ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo, ou a composição farmacêutica compreendendo o mesmo de acordo com a presente invenção, o câncer é preferivelmente selecionado a partir do grupo consistindo em câncer de mama, câncer de ovário, câncer cervical, câncer uterino, câncer de próstata, câncer de rim, câncer de uretra, câncer de bexiga, câncer de fígado, câncer de estômago, câncer de endométrio, câncer de glândula salivar, câncer de esôfago, melanoma, glioma, neuroblastoma, sarcoma, câncer de pulmão (por exemplo, câncer de pulmão de células pequenas e câncer de pulmão de células não pequenas), câncer de cólon, câncer retal, câncer colorretal, leucemia (por exemplo,

leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia mieloide crônica, leucemia linfocítica crônica), câncer ósseo, câncer de pele, câncer de tireoide, câncer pancreático e linfoma (por exemplo, linfoma de Hodgkin, linfoma não-Hodgkin, ou linfoma anaplásico recorrente de grandes células).

[202] A dosagem do composto ou composição utilizada no método de tratamento da presente invenção irá geralmente variar de acordo com a gravidade da doença, o peso do paciente e a eficácia relativa do composto. No entanto, como um guia geral, uma dose unitária adequada pode ser de 0,1 a 1000 mg.

[203] Além do composto ativo, a composição farmacêutica da presente invenção também pode compreender um ou mais auxiliares, incluindo preenchedores (diluente), aglutinante, agente umectante, desintegrante, excipiente e similares. Dependendo do modo de administração, a composição pode compreender 0,1 a 99% em peso do composto ativo.

[204] A composição farmacêutica contendo o ingrediente ativo pode estar em uma forma adequada para administração oral, por exemplo, um comprimido, trocisco, pastilha, suspensão aquosa ou oleosa, pó dispersível ou grânulo, emulsão, cápsula dura ou mole, xarope ou elixir. Uma composição oral pode ser preparada de acordo com qualquer método conhecido na técnica para a preparação de composição farmacêutica. Tal composição pode compreender aglutinantes, preenchedores, lubrificantes, desintegrantes ou agentes umectantes farmaceuticamente aceitáveis e similares. Tal composição também pode compreender um ou mais componentes selecionados do grupo que consiste em adoçantes, agentes aromatizantes, corantes e conservantes, a fim de fornecer uma formulação farmacêutica agradável e saborosa.

[205] Uma suspensão aquosa compreende um ingrediente ativo em mistura com excipientes adequados para a fabricação de uma suspensão aquosa. A suspensão aquosa também pode compreender um

ou mais conservantes, um ou mais corantes, um ou mais agentes aromatizantes e um ou mais adoçantes.

[206] Uma suspensão de óleo pode ser formulada suspendendo o ingrediente ativo em um óleo vegetal. A suspensão de óleo pode compreender um espessante. Os adoçantes e agentes aromatizantes acima mencionados podem ser adicionados para fornecer uma formulação saborosa.

[207] A composição farmacêutica também pode ser um pó dispersível e grânulo para a preparação de uma suspensão aquosa, que fornece o ingrediente ativo pela adição de água para misturar com um ou mais dispersante (s), agente (s) umectante (s), agente (s) de suspensão ou conservante (s). Outros excipientes, tais como agentes adoçantes, agentes aromatizantes e agentes corantes também podem ser adicionados. Estas composições podem ser preservadas adicionando antioxidantes, como ácido ascórbico.

[208] A composição farmacêutica da presente invenção também pode estar na forma de uma emulsão de óleo em água.

[209] A composição farmacêutica pode estar na forma de uma solução aquosa injetável estéril. Os veículos ou solventes aceitáveis que podem ser usados são água, solução de Ringer ou solução isotônica de cloreto de sódio. A formulação injetável estéril pode ser uma microemulsão de óleo em água injetável estéril na qual o ingrediente ativo é dissolvido em uma fase de óleo. Por exemplo, o ingrediente ativo é dissolvido em uma mistura de óleo de soja e lecitina. A solução de óleo é então adicionada a uma mistura de água e glicerina e processada para formar uma microemulsão. A solução injetável ou microemulsão pode ser introduzida na corrente sanguínea de um paciente por injeção em bolus local. Alternativamente, a solução e a microemulsão são preferivelmente administradas de uma maneira que mantém uma concentração circulante

constante do composto da presente invenção. A fim de manter esta concentração constante, um dispositivo de administração intravenosa contínua pode ser usado. Um exemplo de tal dispositivo é Deltec CADD-PLUS. TM. Bomba de injeção intravenosa de 5400.

[210] A composição farmacêutica pode estar na forma de uma suspensão aquosa ou oleosa injetável estéril para administração intramuscular e subcutânea. Tal suspensão pode ser formulada com dispersantes adequados ou agentes molhantes e agentes de suspensão como descrito acima de acordo com técnicas conhecidas. A formulação injetável estéril também pode ser uma solução ou suspensão injetável estéril preparada em um diluente ou solvente não tóxico parentericamente aceitável. Além disso, óleos fixos estéreis podem ser facilmente usados como um solvente ou meio de suspensão.

[211] O composto da presente invenção pode ser administrado na forma de um supositório para administração retal. Estas composições farmacêuticas podem ser preparadas misturando o fármaco com um excipiente não irritante adequado que é sólido a temperaturas normais, mas líquido no reto, fundindo-se assim no reto para liberar o fármaco. Esses materiais incluem manteiga de cacau, gelatina de glicerina, óleo vegetal hidrogenado, uma mistura de polietilenoglicóis de vários pesos moleculares e seus ésteres de ácidos graxos.

[212] É bem conhecido pelos versados na técnica que a dosagem de um medicamento depende de uma variedade de fatores, incluindo, mas não se limitando aos seguintes fatores: atividade de um composto específico, idade do paciente, peso do paciente, saúde geral do paciente, comportamento do paciente, dieta do paciente, tempo de administração, via de administração, taxa de excreção, combinação de fármacos e similares. Além disso, o tratamento ideal, tal como modo de tratamento, dose diária do composto de fórmula (I) ou o tipo de sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, pode ser verificado de acordo com

regimes terapêuticos tradicionais.

DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[213] Figura 1A: Resultados de teste de estabilidade de plasma de ADC-19 da presente invenção.

[214] Figura 1B: Resultados de teste de estabilidade de plasma de ADC-18 da presente invenção.

[215] Figura 1C: Resultados de teste de estabilidade de plasma de ADC-20 da presente invenção.

[216] Figura 2: Avaliação da eficácia de ADC-21 e ADC-24 da presente invenção em camundongos portando tumor JIMT-1.

[217] Figura 3: Avaliação da eficácia de ADC da presente invenção em tumr de xenoenxerto de célula SK-BR-3 de câncer de mama humano em camundongos nus.

[218] Figura 4: Resultados de teste de estabilidade de plasma de ADC-25 da presente invenção.

[219] Figura 5: Eficácia de ADC da presente invenção em tumor de xenoenxerto de U87NG astroblastoma cerebral humano em camundongos nus.

[220] Figura 6: Eficácia de ADC da presente invenção em tumor de xenoenxerto Detroit 562 de células metastáticas de fluido pleural de carcinoma faringeal humano em camundongos nus.

[221] Figura 7: Eficácia de ADC da presente invenção em tumor de xenoenxerto U87MG de glioma humano em camundongos nus.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Definições

[222] A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento são consistentes com o entendimento comum daqueles versados na técnica ao qual pertence a presente invenção. Embora quaisquer métodos e materiais similares ou

equivalentes aos descritos neste documento possam ser usados na prática ou teste da presente invenção, métodos e materiais preferidos são descritos neste documento. Ao descrever e prever a presente invenção, os seguintes termos são usados de acordo com as seguintes definições.

[223] Quando um nome comercial é usado na presente invenção, o requerente pretende incluir as preparações, o fármaco genérica e os ingredientes ativos do produto sob o nome comercial.

[224] Salvo indicação em contrário, os termos usados na especificação e reivindicações têm os significados descritos abaixo.

[225] "Ligante" refere-se a um composto de macromolécula capaz de reconhecer e se ligar a um antígeno ou receptor associado a uma célula alvo. O papel do ligante é entregar o fármaco à população de células alvo que se liga ao ligante. Esses ligantes incluem, mas não estão limitados a, hormônios proteicos, lectinas, fatores de crescimento, anticorpos ou outras moléculas que podem se ligar às células. Em uma modalidade da presente invenção, o ligante é representado por Pc. O ligante pode formar uma ligação com a unidade de ligação por meio de um heteroátomo no ligante. O ligante é preferivelmente um anticorpo ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo. O anticorpo é selecionado a partir do grupo que consiste em anticorpo quimérico, anticorpo humanizado, anticorpo totalmente humanizado ou anticorpo murino e, preferivelmente, um anticorpo monoclonal.

[226] O termo "fármaco" refere-se a um fármaco citotóxica, que é representada por Dr, sendo uma molécula química que pode interromper fortemente o crescimento normal das células tumorais. Em princípio, todas os fármacos citotóxicas podem matar células tumorais em uma concentração suficientemente alta. No entanto, pode causar a apoptose de células normais e efeitos colaterais graves ao matar células tumorais devido à falta de especificidade. Este termo inclui toxinas, tais como to-

xinas de moléculas pequenas ou toxinas enzimaticamente ativas de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, radioisótopos (por exemplo, radioisótopos de At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32} and Lu), fármacos tóxicas, fármacos quimioterápicas, antibióticos e enzimas nucleolíticas e, preferivelmente, fármacos tóxicas.

[227] O termo "unidade ligadora", "fragmento de ligação" ou "unidade de ligação" refere-se a um fragmento estrutural químico ou ligação, que está ligada a um ligante em uma extremidade e ligada a um fármaco em outra extremidade, ou ligada a outros ligadores e então ligado à fármaco. As modalidades preferidas da presente invenção são representadas por L e L^1 a L^4, em que a extremidade L^1 está ligada ao ligante e a extremidade L^4 está ligada à fármaco (Dr) através da unidade estrutural Y.

[228] O ligador, incluindo unidade de extensão, unidade espaçadora e unidade de aminoácido, pode ser sintetizado por métodos conhecidos na técnica, tais como aqueles descritos em US 2005-0238649A1. O ligador pode ser um "ligador clivável" que facilita a liberação do fármaco na célula. Por exemplo, um ligador lábil a ácido (por exemplo, hidrazona), um ligador sensível à protease (por exemplo, sensível à peptidase), um ligador lábil à luz, um ligador de dimetila ou um ligador contendo dissulfeto pode ser usado (Chari *et al*, *Cancer Research* 52: 127-131 (1992); Patente US No. 5.208.020).

[229] O termo "conjugado fármaco-ligante" significa que um ligante está ligado a um fármaco biologicamente ativa por meio de uma unidade de ligação estável. Na presente invenção, o "conjugado fármaco-ligante" é preferivelmente um conjugado anticorpo-fármaco (ADC), o que significa que um anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo está ligado a um fármaco tóxica com atividade biológica por meio de uma unidade de ligação estável.

[230] Os códigos de três letras e os códigos de uma letra para os

aminoácidos usados na presente invenção são conforme descritos em J. biol. Chem, 243, p3558 (1968).

[231] O termo "anticorpo" refere-se a imunoglobulina, uma estrutura de cadeia de quatro peptídeos conectada entre si por uma ligação dissulfeto intercadeia entre duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias leves idênticas. Diferentes regiões constantes de cadeia pesada de imunoglobulina exibem diferentes composições e sequências de aminoácidos, portanto, apresentam antigenicidade diferente. Consequentemente, as imunoglobulinas podem ser divididas em cinco tipos, ou chamados de isotipos de imunoglobulina, a saber IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, com a cadeia pesada correspondente μ, δ, γ, α e ε, respectivamente. De acordo com a composição de aminoácidos da região de dobradiça e o número e localização das ligações dissulfeto da cadeia pesada, o mesmo tipo de Ig pode ainda ser dividido em diferentes subtipos, por exemplo, IgG pode ser dividida em IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. A cadeia leve pode ser dividida em cadeia κ ou λ com base em diferentes regiões constantes. Cada cinco tipos de Ig podem ter uma cadeia κ ou λ. Os anticorpos descritos na presente invenção são preferivelmente anticorpos específicos contra os antígenos de superfície celular nas células alvo, exemplos não limitativos são um ou mais dos seguintes anticorpos: anticorpo anti-HER2 (ErbB2), anticorpo anti-EGFR, anticorpo anti-B7-H3, anticorpo anti-c-Met, anticorpo anti-HER3 (ErbB3), anticorpo anti-HER4 (ErbB4), anticorpo anti-CD20, anticorpo anti-CD22, anticorpo anti-CD30, anti Anticorpo CD33, anticorpo anti-CD44, anticorpo anti-CD56, anticorpo anti-CD70, anticorpo anti-CD73, anticorpo anti-CD105, anticorpo anti-CEA, anticorpo anti-A33, anticorpo anti-Cripto, anticorpo anti-EphA2, anti Anticorpo G250, anticorpo anti-MUCl, anticorpo anti-Lewis Y, anticorpo anti-VEGFR, anticorpo anti-GPNMB, anticorpo antiintegrina, anticorpo anti-PSMA, anticorpo anti-Tenascin-C, anticorpo anti-SLC44A4 ou anticorpo anti-mesotelina e, preferivelmente,

Trastuzumab (nome comercial Herceptin), Pertuzumab (também conhecido como 2C4, nome comercial Perjeta), Nimotuzumab (nome comercial Taixinsheng), Enoblituzumab, Emibetuzumab, Inotuzumab, Pinatuzumab, Brentuximab, Gemtuzumab, Bivatuzumab, Lorvotuzumab, cBR96 e Glematumamab.

[232] A sequência de cerca de 110 aminoácidos adjacente ao terminal N das cadeias pesadas ou cadeias leves do anticorpo é altamente variável, conhecida como região variável (região Fv); o restante da sequência de aminoácidos adjacente ao terminal C é relativamente estável, conhecido como região constante. A região variável inclui três regiões hipervariáveis (HVR) e quatro regiões de estrutura relativamente conservadoras (FR). As três regiões hipervariáveis, que determinam a especificidade do anticorpo, também são conhecidas como regiões determinantes de complementaridade (CDR). Cada região variável de cadeia leve (LCVR) ou cada região variável de cadeia pesada (HCVR) consiste em três regiões CDR e quatro regiões FR, com ordem sequencial do terminal amino ao terminal carboxila na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. As três regiões CDR da cadeia leve referem-se a LCDR1, LCDR2 e LCDR3; e as três regiões CDR da cadeia pesada referem-se a HCDR1, HCDR2 e HCDR3.

[233] Os anticorpos da presente invenção incluem anticorpos murinos, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados e anticorpos totalmente humanizados e, preferivelmente, anticorpos humanizados e anticorpos totalmente humanizados.

[234] O termo "anticorpo murino" na presente invenção refere-se ao anticorpo preparado a partir de murino de acordo com o conhecimento e habilidades da área. Durante a preparação, o objeto de teste é injetado com antígeno específico, e então um hibridoma expressando o anticorpo que possui a sequência desejada ou características funcionais é isolado.

[235] O termo "anticorpo quimérico" é um anticorpo obtido pela fusão de uma região variável de um anticorpo murino com uma região constante de um anticorpo humano, e o anticorpo quimérico pode aliviar a resposta imune induzida por anticorpo murino. Para estabelecer um anticorpo quimérico, é estabelecido um anticorpo monoclonal específico murino secretor de hibridoma e um gene de região variável é clonado a partir da célula de hibridoma murino; em seguida, um gene de região constante de anticorpo humano é clonado de acordo com o requisito; e o gene da região constante de humano está conectado ao gene da região variável de murino para formar um gene quimérico, que é subsequentemente inserido em um vetor de expressão; finalmente, a molécula de anticorpo quimérico é expressa em um sistema eucariótico ou procariótico.

[236] O termo "anticorpo humanizado", que também é conhecido como anticorpo enxertado com CDR, refere-se a um anticorpo gerado por enxerto de sequências de CDR murinas na estrutura da região variável de anticorpo humano, ou seja, um anticorpo produzido em diferentes tipos de sequências de estrutura de anticorpo da linhagem germinativa humana. O anticorpo humanizado pode superar as respostas heterólogas induzidas por um grande número de componentes da proteína murina transportados pelo anticorpo quimérico. Essas sequências estruturais podem ser obtidas a partir de um banco de dados público de DNA cobrindo sequências de genes de anticorpos da linhagem germinativa ou referências publicadas. Por exemplo, sequências de DNA de linhagem germinativa de genes de região variável de cadeia leve e pesada humana podem ser encontradas no banco de dados de sequência de linhagem germinativa humana "VBase" (disponível na world wide web em: www.mrccpe.com.ac.uk/vbase), também como em Kabat, E A, *et al*. 1991 Sequences de Proteins de Immunological Interest, 5ª Ed. Para evitar uma diminuição na atividade causada pela imunogenicidade

diminuída, as sequências estruturais na região variável do anticorpo humano podem ser submetidas a mutações reversas mínimas ou mutações reversas para manter a atividade. O anticorpo humanizado da presente invenção também compreende anticorpo humanizado no qual a maturação de afinidade de CDR é realizada por exibição de fago. Documentos que ainda descrevem métodos de uso de anticorpos murinos envolvidos na humanização incluem, por exemplo, Queen *et al*., Proc., Natl.Acad.Sci.USA, 88, 2869, 1991 e método de Winter e colegas [Jones *et al*., Nature, 321, 522 (1986), Riechmann *et al*., Nature, 332, 323-327 (1988), Verhoeyen *et al*., Science, 239, 1534 (1988)].

[237] O termo "anticorpo totalmente humanizado" também é conhecido como "anticorpo monoclonal totalmente humanizado", em que a região variável e a região constante do anticorpo são ambas de origem humana, eliminando a imunogenicidade e os efeitos colaterais. O desenvolvimento do anticorpo monoclonal passou por quatro estágios, a saber: anticorpo monoclonal murino, anticorpo monoclonal quimérico, anticorpo monoclonal humanizado e anticorpo monoclonal totalmente humanizado. O anticorpo da presente invenção é um anticorpo monoclonal totalmente humanizado. As tecnologias relacionadas de preparação de anticorpo totalmente humanizado incluem principalmente tecnologia de hibridoma humano, tecnologia de linfócitos B transformados por EBV, tecnologia de exibição de fago, tecnologia de preparação de anticorpo transgênico de camundongo, tecnologia de preparação de anticorpo de célula B única e similares.

[238] O termo "fragmento de ligação a antígeno" refere-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo que retém a capacidade de ligação específica ao antígeno. Foi demonstrado que fragmentos de anticorpo de comprimento total podem ser usados para atingir a função de ligação com um antígeno. Os exemplos de fragmentos de ligação no termo "fragmento de ligação a antígeno" incluem (i) fragmento Fab, um fragmento

monovalente composto de domínios VL, VH, CL e CH1; (ii) fragmento F(ab')2, um fragmento bivalente que compreende dois fragmentos Fab conectados por uma ligação dissulfeto na região de dobradiça; (iii) fragmento Fd, que consiste nos domínios VH e CH1; (iv) fragmento Fv, que consiste em domínios VH e VL de anticorpo de um braço; (v) domínio único ou fragmento dAb (Ward *et al*. (1989) Nature 341:544-546) composto de domínio VH; e (vi) uma região determinante de complementaridade (CDR) isolada ou (vii) uma combinação de duas ou mais CDRs isoladas opcionalmente conectadas por um ligador sintético. Além disso, embora o domínio VL e o domínio VH do fragmento Fv sejam codificados por dois genes separados, eles podem ser conectados por um ligador sintético usando métodos recombinantes, gerando assim uma única cadeia de proteína de uma molécula monovalente formada pelo emparelhamento do domínio VL e VH (referido como Fv de cadeia simples (scFv); vide, por exemplo, Bird *et al*. (1988) Science: 242: 423-426, e Huston *et al*. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85: 5879-5883). Este anticorpo de cadeia única também se destina a ser incluído no termo "fragmento de ligação a antígeno" do anticorpo. Tais fragmentos de anticorpo são obtidos usando técnicas convencionais conhecidas pelos versados na técnica, e rastreados para fragmentos funcionais usando o mesmo método que para um anticorpo intacto. Os sítios de ligação a antígeno podem ser produzidos por tecnologia de DNA recombinante ou por ruptura enzimática ou química de uma imunoglobulina intacta. Os anticorpos podem ser anticorpos de diferentes isotipos, por exemplo, IgG (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3 ou subtipo IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE ou anticorpo IgM.

[239] Fab é um fragmento de anticorpo obtido pelo tratamento de uma molécula de anticorpo IgG com uma papaína (que cliva o resíduo de aminoácido na posição 224 da cadeia H). O fragmento Fab tem um

peso molecular de cerca de 50.000 e tem atividade de ligação a antígeno, em que cerca de metade do lado terminal N de cadeia H e toda a cadeia L é unida através de uma ligação dissulfeto.

[240] F(ab')2 é um fragmento de anticorpo obtido por digestão da parte a jusante das duas ligações dissulfeto na região de dobradiça de IgG com pepsina, que tem um peso molecular de cerca de 100.000 e tem atividade de ligação a antígeno e compreende duas regiões Fab que são ligadas na posição de dobradiça.

[241] Fab 'é um fragmento de anticorpo obtido pela clivagem da ligação dissulfeto na região de dobradiça de F(ab')2 acima, que tem um peso molecular de cerca de 50.000 e tem atividade de ligação a antígeno.

[242] Além disso, Fab' pode ser produzido através da inserção de DNA que codifica o fragmento Fab' do anticorpo em um vetor de expressão procariótica ou vetor de expressão eucariótica que é então introduzido em um procariota ou eucariota para expressar o Fab'.

[243] O termo "anticorpo de cadeia simples", "Fv de cadeia simples" ou "scFv" refere-se a uma molécula que compreende um domínio variável de cadeia pesada de anticorpo (ou região; VH) e um domínio variável de cadeia leve de anticorpo (ou região; VL) conectado por um ligador. Tais moléculas de scFv podem ter a estrutura geral de NH2-VL-ligador-VH-COOH ou NH2-VH-ligador-VL-COOH. Um ligador adequado na técnica anterior consiste em sequência de aminoácidos GGGGS repetida ou variante da mesma, por exemplo, usando uma variante com 1-4 repetições (Holliger *et al*. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448). Outros ligadores que podem ser usados para a presente invenção são descritos por Alfthan *et al*. (1995), Protein Eng. 8: 725-731, Choi *et al*. (2001), Eur. J. Immunol. 31: 94-106, Hu *et al*. (1996), Cancer Res. 56: 3055-3061, Kipriyanov *et al*. (1999), J. Mol. Biol. 293: 41-56 e Roovers *et al*. (2001), Cancer Immunol.

[244] O termo "CDR" refere-se a uma das seis regiões hipervariáveis dentro do domínio variável de um anticorpo que contribui principalmente para a ligação a antígeno. Uma das definições mais comumente usadas para as seis CDRs é fornecida por Kabat E. A. *et al*. (1991) Sequences de protein de immunological interest. Publicação NIH 91-3242. Tal como no presente documento utilizado, a definição Kabat de CDR aplica-se apenas a CDR1, CDR2 e CDR3 do domínio variável de cadeia leve (CDR L1, CDR L2, CDR L3 ou L1, L2, L3), bem como CDR2 e CDR3 do domínio variável de cadeia pesada (CDR H2, CDR H3 ou H2, H3).

[245] O termo "estrutura de anticorpo" refere-se a uma porção do domínio variável VL ou VH, que serve como uma estrutura para o loop de ligação a antígeno (CDR) do domínio variável. Essencialmente, é um domínio variável sem CDR.

[246] O termo "epítopo" ou "determinante antigênico" refere-se a um sítio de um antígeno ao qual uma imunoglobulina ou anticorpo especificamente se liga. Os epítopos incluem tipicamente pelo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 aminoácidos contíguos ou não contíguos em uma conformação espacial única. Vide, por exemplo, Epitope Mapping Protocols in Metods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

[247] Os termos "ligação específica", "ligação seletiva", "ligar seletivamente" e "ligar especificamente" referem-se à ligação de um anticorpo a um epítopo em um antígeno predeterminado. Normalmente, o anticorpo se liga com uma afinidade (KD) de menos do que cerca de 10^{-7} M, tal como aproximadamente menos do que cerca de 10^{-8} M, 10^{-9} M ou $10^{-1}0$ M ou menos.

[248] O termo "molécula de ácido nucleico" refere-se a uma molécula de DNA e uma molécula de RNA. A molécula de ácido nucleico pode ser de filamento simples ou duplo, mas é preferivelmente um DNA

de filamento duplo. Um ácido nucleico é "efetivamente ligado" quando é colocado em uma relação funcional com outra sequência de ácido nucleico. Por exemplo, se um promotor ou intensificador afeta a transcrição de uma sequência de codificação, o promotor ou intensificador é efetivamente ligado à sequência de codificação.

[249] O termo "vetor" refere-se a uma molécula de ácido nucleico capaz de transportar outro ácido nucleico ao qual foi ligada. Em uma modalidade, o vetor é um "plasmídeo" que se refere a um loop de DNA de filamento duplo circular na qual um segmento de DNA adicional pode ser ligado. Em outra modalidade, o vetor é um vetor viral, em que um segmento de DNA adicional pode ser ligado ao genoma viral. Os vetores descritos neste documento são capazes de se autorreplicar em uma célula hospedeira na qual foram introduzidos (por exemplo, um vetor bacteriano tendo uma origem de replicação bacteriana e um vetor epissomal de mamífero) ou podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira após introdução na célula hospedeira, sendo assim replicada juntamente com o genoma do hospedeiro (por exemplo, um vetor mamífero não epissomal).

[250] Métodos para produzir e purificar anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno são bem conhecidos na técnica, tais como Cold Spring Harbor Antibody Technical Guide, Capítulos 5-8 e 15. O fragmento de ligação a antígeno também pode ser preparado por métodos convencionais. Os anticorpos ou fragmentos de ligação a antígeno da invenção são geneticamente modificados para adicionar uma ou mais regiões FR humanas em regiões CDR não humanas. A (s) sequência (s) da linhagem germinativa FR humana podem ser obtidas alinhando bancos de dados de genes de linhagens germinativas variáveis de anticorpos humanos IMGT e software MOE do site ImMunoGeneTics (IMGT) em http://imgt.cines.fr ou do Journal de Immunoglobulins 20011SBN012441351.

[251] O termo "célula hospedeira" refere-se a uma célula na qual um vetor de expressão foi introduzido. As células hospedeiras podem incluir células bacterianas, microbianas, vegetais ou animais. As bactérias suscetíveis de serem transformadas incluem membros de *Enterobacteriaceae*, tais como cepas de *Escherichia coli* ou *Salmonella*; *Bacillaceae*, tais como *Bacillus subtilis; Pneumococo; Streptococcus* e *Haemophilus influenzae*. Os micro-organismos adequados incluem *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*. As linhagens de células hospedeiras de animais adequadas incluem CHO (linhagem de células de ovário de hamster chinês) e células NS0.

[252] O anticorpo construído geneticamente ou fragmento de ligação a antígeno da presente invenção pode ser preparado e purificado por métodos convencionais. Por exemplo, as sequências de cDNA que codificam uma cadeia pesada e uma cadeia leve podem ser clonadas e recombinadas em um vetor de expressão GS. O vetor de expressão de imunoglobulina recombinante pode ser transfectado de forma estável em células CHO. Como uma tecnologia existente mais recomendada, os sistemas de expressão de mamíferos podem resultar na glicosilação de anticorpos, particularmente no sítio terminal N altamente conservado da região Fc. Os clones positivos são expandidos em meio sem soro em um biorreator para produzir anticorpos. O meio de cultura contendo o anticorpo secretado pode ser purificado por técnica convencional. Por exemplo, a purificação é realizada usando uma coluna A ou G Sepharose FF que contém um tampão ajustado. Os componentes não especificamente ligados são removidos por eluição. O anticorpo ligado é eluído por um método de gradiente de pH e os fragmentos de anticorpo são detectados por SDS-PAGE e coletados. O anticorpo pode ser filtrado e concentrado por um método convencional. O agregado solúvel e os multímeros também podem ser removidos por métodos convencionais,

como exclusão por tamanho ou troca iônica. O produto resultante precisa ser congelado imediatamente, como a -70 ºC, ou liofilização.

[253] O termo "peptídeo" refere-se a um fragmento composto entre o aminoácido e a proteína, consistindo em duas ou mais moléculas de aminoácidos conectadas entre si por meio de ligações peptídicas. Os peptídeos são fragmentos estruturais e funcionais de proteínas. Hormônios, enzimas e similares são essencialmente peptídeos.

[254] O termo "sacarídeo" refere-se a uma macromolécula biológica composta por três elementos de C, H e O, que podem ser divididos em monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos.

[255] O termo "sonda fluorescente" refere-se a um tipo de moléculas fluorescentes com fluorescência característica na região ultravioleta-visível-infravermelho próximo. A propriedade de fluorescência da sonda fluorescente (comprimentos de onda de excitação e emissão, intensidade, vida útil e polarização, etc.) pode variar sensivelmente de acordo com a propriedade do ambiente, como polaridade, índice de refração, viscosidade, etc. Interação não covalente entre a sonda fluorescente e ácido nucleico (DNA ou RNA), proteína ou outra estrutura macromolecular permite a alteração de uma ou mais propriedades fluorescentes, que podem ser usadas para estudar a propriedade e o comportamento da substância macromolecular.

[256] O termo "fármaco tóxica" refere-se a uma substância que inibe ou interrompe a função das células e/ou causa a morte ou destruição celular. Fármacos tóxicas incluem toxinas e outros compostos que podem ser usados no tratamento de tumores.

[257] O termo "toxina" refere-se a qualquer substância que pode ter um efeito prejudicial no crescimento ou proliferação de células. As toxinas podem ser toxinas de moléculas pequenas e seus derivados de bactérias, fungos, plantas ou animais, incluindo derivados de camptotecina, como exatecano, maitansinoide e seus derivados (CN101573384),

como DM1, DM3, DM4, auristatina F (AF) e seus derivados, como MMAF, MMAE, 3024 (WO 2016/127790 A1, composto 7), toxina da difteria, exotoxina, cadeia A de ricina, cadeia A de abrina, modeccina, α-sarcina, proteína tóxica de Aleutites fordii, proteína tóxica de diantina, proteína tóxica de Phytolaca americana (PAPI, PAPII e PAP-S), inibidor de Momordica charantia, curcina, crotina, inibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrocina, fenomicina, enomicina e tricotecenos.

[258] O termo "fármaco quimioterápica" refere-se a um composto químico que pode ser usado para tratar tumores. Essa definição também inclui agentes anti-hormonais que atuam para modular, reduzir, bloquear ou inibir os efeitos dos hormônios que promovem o crescimento do câncer, que geralmente estão na forma de terapia sistêmica ou holística. Eles podem ser hormônios. Exemplos de fármacos quimioterapêuticas incluem agentes alquilantes, tais como tiotepa; ciclosfamida (CYTOXAN™); sulfonato de alquila, tal como busulfan, improsulfan e piposulfan; aziridina tais como benaodopa, carboquona, meturedopa e uredopa; aziridina e metilamelamina incluindo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida e trimetilolomelamina; mustardas de nitrogeno tais como clorambucila, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, cloridrato de nitrobina; melfalan, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, uramustina; nitrosureias tais como carmustina, clorozotocin, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibiótico tais como aclacinomicina, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicina, cactinomicina C, calicheamicina, carabicina, cromomicina, carzinophilin, cromomicina, actinomicina D, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-óxi-L-norleucina, doxorrubicina, epirubicina, esorrubicina, idarubicina, marcellomicina, mitomicina, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicina, pe-

plomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina; estreptozocina, tuberculocidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabólitos tais como metotrexato, 5-fluorouracil (5-FU); análogos de ácido fólico tais como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de pterina tais como f1udarabina, 6-mercaptopterina, tiometopterina, tioguanopterin; análogos de pirimidina tais como ancitabina, azacitidina, 6-azuridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxitluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andogênios tais como calusterona, dromostanolong propionato, epitiostanol, mepitiostano, testolactona; anti-adrenalinas tais como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; suplementos de ácido fólico tais como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamidaglicosídeo; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucil; biasntreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfomitina; acetato de eliptínio; etoglucídeo; nitrato de gálio; hidroxiureia; lentinan; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pintostatin; fenamet; pirarubicin; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazina; PSK®; razoxano; sizofiran; espirogermânio; ácido tenuazônico; triaziquona; 2,2',2"-triclorrotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; dibromodulcitol; pipobroman; gacitosina; arabinosícdeo ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxanos tais como paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) e docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); clorambucil; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de plantina tais como cisplatina e carboplatina; vinblastina; platina; etoposídeo (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; teniposídeo; daunorrubicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inibidor de topoisomerase RFS2000; difluorometilornitina (DMFO); esperamicinas de ácido retinoico; capecitabina; e sal, ácido ou derivado farmaceuticamente aceitá-

vel de qualquer uma das substâncias acima. Esta definição também inclui agentes anti-hormonais que podem modular ou inibir os efeitos dos hormônios em tumores, como anti-estrogênios, incluindo tamoxifeno, raloxifeno, inibidor de aromatase 4 (5) -imidazol, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristone e Fareston; e anti-andrógenos, tais como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida e goserelina; e sal, ácido ou derivado farmaceuticamente aceitável de qualquer uma das substâncias acima.

[259] O termo “alquila” refere-se a um grupo hidrocarboneto alifático saturado, que é um grupo de cadeia reta ou ramificada compreendendo 1 a 20 átomos de carbono, preferivelmente uma alquila tendo 1 a 12 átomos de carbono, mais preferivelmente uma alquila tendo 1 a 10 átomos de carbono, e o mais preferivelmente uma alquila tendo 1 a 6 átomos de carbono. Exemplos não limitantes incluem metila, etila, *n*-propila, isopropila, *n*-butila, isobutila, *terc*-butila, *sec*-butila, *n*-pentila, 1,1-dimetilpropila, 1,2-dimetilpropila, 2,2-dimetilpropila, 1-etilpropila, 2-metilbutila, 3-metilbutila, *n*-hexila, 1-etil-2-metilpropila, 1,1,2-trimetilpropila, 1,1-dimetilbutila, 1,2-dimetilbutila, 2,2-dimetilbutila, 1,3-dimetilbutila, 2-etilbutila, 2-metilpentila, 3-metilpentila, 4-metilpentila, 2,3-dimetilbutila, *n*-heptila, 2-metilhexila, 3-metilhexila, 4-metilhexila, 5-metilhexila, 2,3-dimetilpentila, 2,4-dimetilpentila, 2,2-dimetilpentila, 3,3-dimetilpentila, 2-etilpentila, 3-etilpentila, *n*-octila, 2,3-dimetilhexila, 2,4-dimetilhexila, 2,5-dimetilhexila, 2,2-dimetilhexila, 3,3-dimetilhexila, 4,4-dimetilhexila, 2-etilhexila, 3-etilhexila, 4-etilhexila, 2-metil-2-etilpentila, 2-metil-3-etilpentila, *n*-nonila, 2-metil-2-etilhexila, 2-metil-3-etilhexila, 2,2-dietilpentila, *n*-decila, 3,3-dietilhexila, 2,2-dietilhexila, e vários isômeros ramificados do mesmo. Mais preferivelmente, o grupo alquila é uma alquila inferior tendo 1 a 6 átomos de carbono, e exemplos não limitantes incluem metila, etila, *n*-propila, isopropila, *n*-butila, isobutila, *terc*-butila, *sec*-butila,

n-pentila, 1,1-dimetilpropila, 1,2-dimetilpropila, 2,2-dimetilpropila, 1-etilpropila, 2-metilbutila, 3-metilbutila, *n*-hexila, 1-etil-2-metilpropila, 1,1,2-trimetilpropila, 1,1-dimetilbutila, 1,2-dimetilbutila, 2,2-dimetilbutila, 1,3-dimetilbutila, 2-etilbutila, 2-metilpentila, 3-metilpentila, 4-metilpentila, 2,3-dimetilbutila e similares. A alquila pode ser substituída ou unsubstitunão substituída. Quando substituído, o grupo(s) substituinte pode ser substituído em qualquer ponto de conexão disponível. O grupo(s) substituinte é preferivelmente um ou mais grupos independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em alquila, alquenila, alquinila, alcóxi, alquiltio, alquilamino, halogênio, tiol, hidróxi, nitro, ciano, cicloalquila, heterociclila, arila, heteroarila, cicloalcóxi, heterocicloalcóxi, cicloalquiltio, heterocicliltio e oxo.

[260] O termo “heteroalquila” refere-se a uma alquila contendo uma ou mais heteroátomo(s) selecionados a partir do grupo consistindo em N, O e S, em que a alquila é como definido acima.

[261] O termo “alquileno” refere-se a um grupo hidrocarboneto alifático linear ou ramificado saturado tendo dois resíduos derivados a partir da remoção de dois átomos de hidrogênio a partir ddo mesmo átomo de carbon ou dois átomos de carbono diferentes do alcano parental. O alquileno é um grupo linear ou ramificado tendo 1 a 20 átomos de carbono, preferivelmente 1 a 12 átomos de carbono, e mais preferivelmente 1 a 6 átomos de carbono. Exemplos não limitantes de alquileno incluem, mas não são limitados a, metileno (-CH_2-), 1,1-etileno (-$CH(CH_3)$-), 1,2-etileno (-CH_2CH_2)-, 1,1-propileno (-$CH(CH_2CH_3)$-), 1,2-propileno (-$CH_2CH(CH_3)$-), 1,3-propileno (-$CH_2CH_2CH_2$-), 1,4-butileno (-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-), 1,5-pentileno (-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-), e similares. O alquileno pode ser substituído ou não substituído. Quando substituído, o grupo(s) substituinte pode ser substituído em qualquer ponto de conexão disponível. O grupo(s) substituinte é preferivelmente um ou mais grupos independente e opcionalmente selecionados a partir do grupo

consistindo em alquila, alquenila, alquinila, alcóxi, alquiltio, alquilamino, halogênio, tiol, hidróxi, nitro, ciano, cicloalquila, heterociclila, arila, heteroarila, cicloalcóxi, heteroalcóxi, cicloalquiltio, heterociclíltio e oxo.

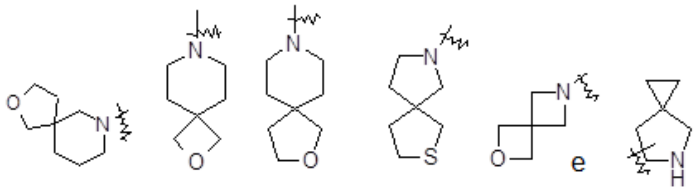
[262] O termo “alcóxi” refere-se a um grupo -O-(alquila) ou um -O-(cicloalquila não substituída), em que a alquila e cicloalquila são como definidos acima. Exemplos não limitantes de alcóxi incluem metóxi, etóxi, propóxi, butóxi, ciclopropilóxi, ciclobutilóxi, ciclopentilóxi, ciclohexilóxi. O alcóxi pode ser opcionalmente substituído ou não substituído. Quando substituído, o grupo(s) substituinte é preferivelmente um ou mais grupo(s) independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em alquila, alquenila, alquinila, alcóxi, alquiltio, alquilamino, halogênio, tiol, hidróxi, nitro, ciano, cicloalquila, heterociclila, arila, heteroarila, cicloalcóxi, heterocicloalcóxi, cicloalquiltio e heterociclíltio.

[263] O termo “cicloalquila” refere-se a um grupo substituinte de hidrocarboneto monocíclico ou policíclico saturado ou parcialmente insaturado tendo 3 a 20 átomos de carbono, preferivelmente 3 a 12 átomos de carbono, mais preferivelmente 3 a 10 átomos de carbono, e o mais preferivelmente 3 a 8 átomos de carbono. Exemplos não limitantes de cicloalquila monocíclica incluem ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila, ciclopentenila, ciclohexila, ciclohexenila, ciclohexadienila, cicloheptila, cicloheptatrienila, ciclo-octila e similares. Cicloalquila policíclica inclui uma cicloalquila tendo um anel espiro, anel fundido ou anel em ponte.

[264] O termo “heterociclila” refere-se a um um grupo hidrocarboneto monocíclico ou policíclico saturado ou parcialmente insaturado de 3 a 20 membros, em que um ou mais átomos do anel são heteroátomos selecionados a partir do grupo consistindo em N, O e $S(O)_m$ (em que m é um inteiro de 0 a 2), mas excluindo -O-O-, -O-S- ou -S-S- no anel, com os átomos do anel restantes sendo átomos de carbono. Preferivelmente, a a heterociclila tem 3 a 12 átomos no anel em que 1 a 4 átomos são heteroátomos; e mais preferivelmente, 3 a 10 átomos no anel. Exemplos

não limitantes de heterociclila monocíclica incluem pirrolidinila, piperidinila, piperazinila, morfolinila, tiomorfolinila, homopiperazinila e similares. Heterociclila policíclica inclui a heterociclila tendo um anel espiro, anel fundido ou anel em ponte.

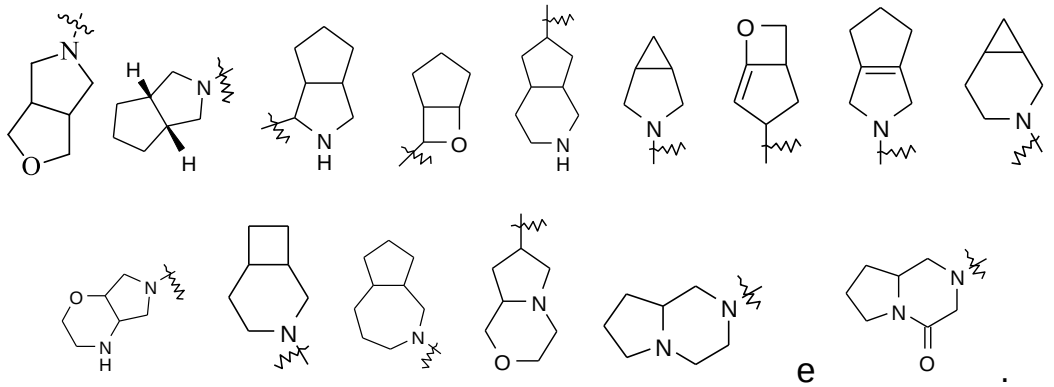
[265] O termo “espiro heterociclila” refere-se a um grupo heterociclica policiclíca de 5 a 20 membros com aneis individuais conectados através de um átomo compartilhado (camado um átomo espiro), em que um ou mais átomos do anel são heteroátomos selecionados a partir do grupo consistindo em N, O e $S(O)_m$ (em que m é um inteiro de 0 a 2), com os átomos do anel restantes sendo átomos de carbono, onde os aneis podem conter uma ou mais ligações duplas, mas nenhum dos aneis tem um sistema conjugado completamente π-elétron. A espiro heterociclila é preferivelmente uma espiro heterociclila de 6 a 14 membroa, e mais preferivelmente uma espiro heterociclila de 7 a 10 membros. De acordo com o número dos átomos espiro compartilhados entre os aneis, a espiro heterociclila pode ser dividida em um mono-espiro heterociclila, di-espiro heterociclila, ou poli-espiro heterociclila, e a espiro heterociclila é preferivelmente a mono-espiro heterociclila ou di-espiro heterociclila, e mais preferivelmente uma mono-espiro heterociclila de 4-membros/4-membros, 4-membros/5-membros, 4-membros/6-membros, 5-membros/5-membros, ou 5-membros/6-membros. Exemplos não limitantes de espiro heterociclila incluem:



.

[266] O termo “heterociclila fundida” refere-se a um grupo heterociclica policiclíca de 5 a 20 membros, em que cada anel no sistema compartilha um par adjacente de átomos com outro anel, em que uma ou mais aneis podem conter uma ou mais ligações duplas, mas nenhum

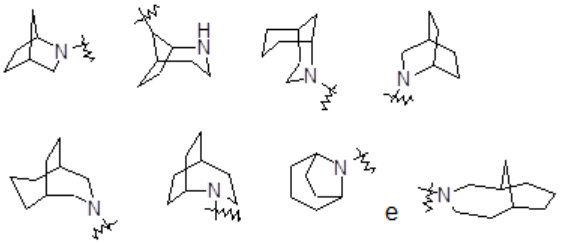
dos aneis tem um sistema conjugado completamente π-elétron, e em que um ou mais átomos do anel são heteroátomos selecionados a partir do grupo consistindo em N, O e $S(O)_m$ (em que m é um inteiro de 0 a 2), com os átomos do anel restantes sendo átomos de carbono. A heterociclila fundida é preferivelmente uma heterociclila fundida de 6 a 14 membros, e mais preferivelmente uma heterociclila fundida de 7 a 10 membros. De acordo com o número de membros no anel, a heterociclila fundida pode ser dividida em uma heterociclila fundida bicíclica, tricíclica, tetracíclica ou policíclica, e a heterociclila fundida é preferivelmente uma heterociclila fundida bicíclica ou tricíclica, e mais preferivelmente um heterociclila fundida bicíclica de 5-membros/5-membros ou 5-membros/6-membros. Exemplos não limitantes de heterociclila fundida incluem:



e .

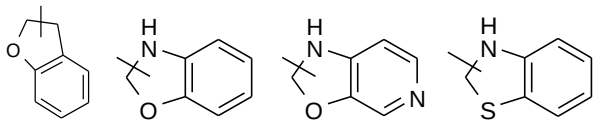
[267] O termo “heterociclila em ponte” refere-se a um grupo heterociclila de 5 a 14 membros policíclico, em que cada dois aneis no sistema compartilha dois átomos desconectados, em que os aneis podem ter uma ou mais ligações duplas, mas nenhum dos aneis tem um sistema conjugado completamente π-elétron, e em que um ou mais átomos do anel são heteroátomos selecionados a partir do grupo consistindo em N, O e $S(O)_m$ (em que m é um inteiro de 0 a 2), com os átomos do anel restantes sendo átomos de carbono. A heterociclila em ponte é preferivelmente uma heterociclila em ponte de 6 a 14 membros, e mais preferivelmente uma heterociclila em ponte de 7 to 10 membros. De acordo com o número de membros no anel, a heterociclila em ponte

pode ser dividida em uma heterociclila em ponte bicíclica, tricíclica, tetracíclica ou policíclica, e a heterociclila em ponte é preferivelmente uma heterociclila em ponte bicíclica, tricíclica ou tetracíclica, e mais preferivelmente uma heterociclila em ponte bicíclica ou tricíclica. Exemplos não limitantes de heterociclila em ponte incluem:



.

[268] O anel heterociclila pode ser fundido ao anel de arila, heteroarila ou cicloalquila, em que um anel ligado à estrutura parental é heterociclila. Exemplos não limitantes do mesmo incluem:

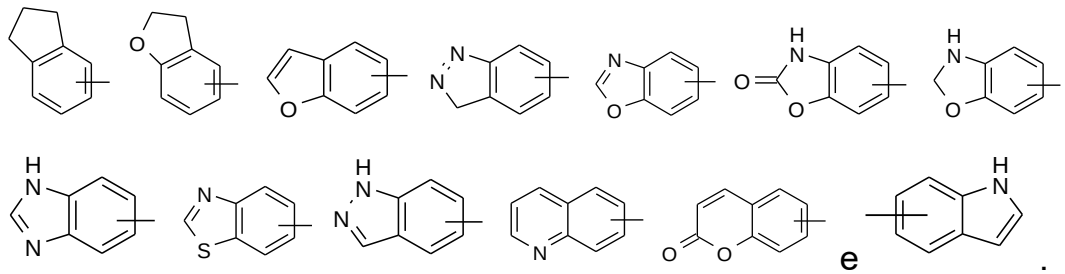


e similares.

[269] A heterociclila pode ser opcionalmente substituída ou não substituída. Quando substituída, o grupo(s) substituinte é preferivelmente um ou mais grupo(s) independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em alquila, alquenila, alquinila, alcóxi, alquiltio, alquilamino, halogênio, tiol, hidróxi, nitro, ciano, cicloalquila, heterociclila, arila, heteroarila, cicloalcóxi, heterocicloalcóxi, cicloalquiltio, heterocicliltio e oxo.

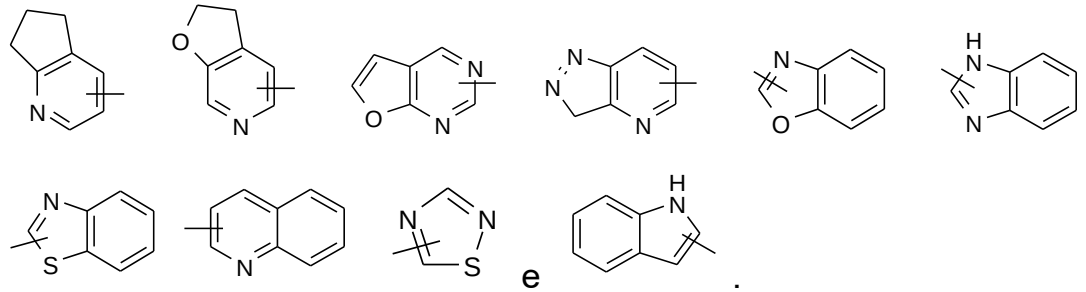
[270] O termo “arila” refere-se a um anel monocíclico todo de carbono de 6 a 14 membros ou anel fundido policíclico (i.e. cada anel no sistema compartilha um par adjacente de átomos de carbono com outro anel no sistema) tendo um sitema π-elétron conjugado, preferivelmente uma arila de 6 a 10 membros, por exemplo, fenila e naftila, e preferivelmente fenila. O anel arila pode ser fundido ao anel de heteroarila, heterociclila ou cicloalquila, em que um anel ligado à estrutura parental é

anel arila. Exemplos não limitantes do mesmo incluem:



[271] The arila pode ser substituída ou não substituída. Quando substituída, o grupo(s) substituinte é preferivelmente um ou mais grupo(s) independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em alquila, alquenila, alquinila, alcóxi, alquiltio, alquilamino, halogênio, tiol, hidróxi, nitro, ciano, cicloalquila, heterociclila, arila, heteroarila, cicloalcóxi, heterocicloalcóxi, cicloalquiltio e heterocicliltio.

[272] O termo “heteroarila” refere-se a um sistema heteroaromático de 5 a 14 membros tendo 1 a 4 heteroátomos selecionados a partir do grupo consistindo em O, S e N. A heteroarila é preferivelmente uma heteroarila de 5 a 10 membros, mais preferivelmente uma heteroarila de 5 ou 6 membros, por exemplo furila, tienila, piridila, pirrolila, N-alquilpirrolila, pirimidinila, pirazinila, imidazolila, tetrazolila e similares. O anel heteroarila pode ser fundido ao anel de arila, heterociclila ou cicloalquila, em que um anel ligado à estrutura parental é anel heteroarila. Exemplos não limitantes do mesmo incluem:



[273] A heteroarila pode ser opcionalmente substituído ou não substituído. Quando substituído, o grupo(s) substituinte é preferivelmente um ou mais grupo(s) independentemente selecionados a partir

do grupo consistindo em alquila, alquenila, alquinila, alcóxi, alquiltio, alquilamino, halogênio, tiol, hidróxi, nitro, ciano, cicloalquila, heterociclila, arila, heteroarila, cicloalcóxi, heterocicloalcóxi, cicloalquiltio e heterocicliltio.

[274] O termo “grupo protetor amino” refere-se a um grupo que previne um grupo amino da reação quando outras partes da molécula são submetidas a uma reação, e pode ser facilmente removido. Exemplos não limitantes incluem 9-fluorenilmetiloxicarbonila, *terc*-butoxicarbonila, acetila, benzila, allila, *p*-metoxibenzila e similares. Esses grupos podem ser opcionalmente substituídos por um a três substituintes(s) selecionados a partir do grupo consistindo em halogênio, alcóxi e nitro. O grupo protetor amino é preferivelmente 9-fluorenilmetiloxicarbonila.

[275] O termo “cicloalquilalquila” refere-se a um grupo alquila substituído por uma ou mais, preferivelmente uma, cicloalquila(s), em que a alquila e cicloalquila são como definidas acima.

[276] O termo “haloalquila” refere-se a um grupo alquila substituído por um ou mais halogênio(s), em que a alquila é como definida acima.

[277] O termo “alquila deuterada” refere-se a um grupo alquila substituído por um ou mais átomo de deutério(s), em que a alquila é como definido acima.

[278] O termo “hidróxi” refere-se a um grupo -OH.

[279] O termo “halogênio” refere-se um flúor, cloro, bromo ou iodo.

[280] O termo “amino” refere-se a um grupo -NH_2.

[281] O termo “nitro” refere-se a um grupo -NO_2.

[282] O termo “amida” refere-se a um grupo -C(O)N(alquila) ou -C(O)N(cicloalquila), em que a alquila e cicloalquila são como definidas acima.

[283] O termo “alcoxicarbonila” refere-se a um grupo -C(O)O(alquila) ou -C(O)O(cicloalquila), em que a alquila e cicloalquila são como definidas acima.

[284] A presente invenção também compreende os compostos de fórmula (I) em várias formas deuteradas. Cada um dos átomos de hidrogênio disponíveis ligados ao átomo de carbono pode ser substituído independentemente por um átomo de deutério. Os versados na técnica podem sintetizar um composto de fórmula (I) em uma forma deuterada com referência às literaturas relevantes. O composto de fórmula (I) na forma deuterada pode ser preparado usando matérias-primas deuteradas disponíveis comercialmente, ou podem ser sintetizados por técnicas convencionais com reagentes deuterados incluindo, mas não se limitando a, borano deuterado, borano trideuterado em tetrahidrofuranoo, lítio de alumínio deuterado hidreto, iodoetano deuterado, iodometano deuterado e similares.

[285] “Opcional” ou “opcionalmente” significa que o evento ou circunstância descrito subsequentemente pode, mas não precisa, ocorrer, e tal descrição inclui a situação na qual o evento ou circunstância ocorre ou não ocorre. Por exemplo, "a heterociclila opcionalmente substituída por uma alquila" significa que um grupo alquila pode estar, mas não precisa estar, presente, e tal descrição inclui a situação da heterociclila sendo substituída por uma alquila e a heterociclila não sendo substituída por um alquila.

[286] "Substituído" refere-se a um ou mais átomos de hidrogênio em um grupo, preferivelmente até 5, e mais preferivelmente 1 a 3 átomos de hidrogênio, independentemente substituídos por um número correspondente de substituintes. Nem é preciso dizer que os substituintes só existem em suas possíveis posições químicas. O especialista na técnica é capaz de determinar se a substituição é possível ou impossível por meio de experimentos ou teoria sem esforço excessivo. Por exemplo, a combinação de amino ou hidróxi tendo hidrogênio livre e átomos de carbono tendo ligações insaturadas (tais como olefínicos) pode ser instável.

[287] O termo "composição farmacêutica" refere-se a uma mistura de um ou mais dos compostos descritos neste documento ou seus sais ou pró-fármacos fisiologicamente/farmaceuticamente aceitáveis com outros componentes químicos e outros componentes tais como veículos e excipientes fisiológica/farmaceuticamente aceitáveis. A finalidade da composição farmacêutica é facilitar a administração de um composto a um organismo, que conduza à absorção do ingrediente ativo de modo a apresentar atividade biológica.

[288] O termo "sal farmaceuticamente aceitável" ou "sal farmacêutico" refere-se a um sal do conjugado fármaco-ligante da presente invenção ou um sal do composto da presente invenção, que é seguro e eficaz em mamíferos e tem a atividade biológica desejada. O conjugado fármaco-ligante da presente invenção contém pelo menos um amino, de modo que pode formar um sal com um ácido. Exemplos não limitativos de sais farmaceuticamente aceitáveis incluem cloridrato, hidrobrometo, hidroiodeto, sulfato, bisulfato, citrato, acetato, succinato, ascorbato, oxalato, nitrato, sorbato, hidrogênio fosfato, dihidrogênio fosfato, salicylato, hidrogênio citrato, tartrato, maleato, fumarato, formato, benzoato, metanossulfonato, etanossulfonato, benzenossulfonato, p-toluenossulfonato.

[289] O termo "solvato" refere-se a um solvato farmaceuticamente aceitável formado por um conjugado fármaco-ligante da presente invenção com uma ou mais moléculas de solvente. Exemplos não limitativos de moléculas de solvente incluem água, etanol, acetonitrila, isopropanol, DMSO, acetato de etila.

[290] O termo "carregamento de fármaco" refere-se ao número médio de fármacos citotóxicas carregadas em cada ligante no composto de fórmula (I) e também pode ser expresso como a razão entre o número de fármaco e o número de anticorpos. A carga do fármaco pode variar de 0 a 12, de preferência de 1 a 10 fármacos citotóxicas (D) por

ligante (Pc). Em uma modalidade da presente invenção, a carga do fármaco é expressa como n, e os valores exemplares podem ser uma média de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10. O número médio de fármacos por molécula de ADC após a reação de acoplamento pode ser determinado por métodos convencionais, tais como espectroscopia UV/visível, espectrometria de massa, teste ELISA e caracterização por HPLC.

[291] Em uma modalidade da presente invenção, o fármaco citotóxica é conjugada com o amino terminal N e/ou o ε-amino de resíduos de lisina do ligante através de uma unidade de ligação. Normalmente, o número de moléculas de fármaco conjugadas ao anticorpo em uma reação de acoplamento será menor do que o máximo teórico.

[292] Os seguintes métodos não limitativos podem ser usados para controlar a carga dos conjugados fármaco-ligante citotóxica:

(1) controlar a razão molar do reagente de ligação para o anticorpo monoclonal,

(2) controlar o tempo de reação e a temperatura,

(3) selecionar diferentes reagentes de reação.

[293] A preparação de composições farmacêuticas convencionais pode ser encontrada na Farmacopoeia Chinesa.

[294] O termo "veículo" usado na composição da presente invenção refere-se a um sistema que pode alterar a maneira como um fármaco entra no corpo humano e distribuição, controle e taxa de çliberação do fármaco ao órgão alvo. Liberação de veículo de fármaco e os sistemas de direcionamento podem reduzir a degradação e a perda de fármaco, reduzir os efeitos colaterais e melhorar a biodisponibilidade. Por exemplo, os surfactantes poliméricos que podem ser usados como veículos podem ser automontados para formar várias formas de agregados devido à sua estrutura anfifílica única. Os exemplos preferidos incluem micelas, microemulsões, géis, cristais líquidos, vesículas e similares. Esses agregados têm a capacidade de encapsular moléculas

de dorgas, embora tenham boa permeabilidade à membrana, e podem ser usados como um excelente veículo de fármaco.

[295] O termo “excipiente” é um adjunto em uma formulação farmacêutica diferente de um fármaco principal, que também pode ser referido como um adjuvante, tais como adesivos, preenchedores, desintegrantes, lubrificantes em comprimidos; partes da matriz nas preparações semissólidas, pomadas e cremes; conservantes, antioxidantes, agentes aromatizantes, fragrâncias, cossolventes, emulsionantes, solubilizantes, reguladores de pressão osmótica, corantes em preparações líquidas e similares.

[296] O termo "diluente", também conhecido como preenchedores, tem como objetivo principal aumentar o peso e o volume do comprimido. A adição de diluente garante um determinado volume, reduz o desvio de dose dos componentes principais e melhora o perfil de compressão do fármaco. Quando o comprimido contém um componente oleoso, um absorvente é adicionado para absorver a substância oleosa, mantendo assim o estado “seco” para facilitar a formação do comprimido. Por exemplo, o diluente inclui amido, lactose, sais inorgânicos de cálcio, celulose microcristalina e similares.

[297] A composição farmacêutica pode estar na forma de uma solução aquosa injetável estéril. Os veículos ou solventes aceitáveis que podem ser utilizados são água, solução de Ringer ou solução isotônica de cloreto de sódio. A formulação injetável estéril pode ser uma microemulsão óleo em água injetável estéril em que o ingrediente ativo é dissolvido na fase de óleo. Por exemplo, o ingrediente ativo é dissolvido em uma mistura de óleo de soja e lecitina. A solução de óleo é então adicionada a uma mistura de água e glicerina e processada para formar uma microemulsão. A solução injetável ou microemulsão pode ser introduzida na corrente sanguínea de um paciente por injeção em bolus local.

Alternativamente, a solução e a microemulsão são preferivelmente administradas de uma maneira que mantém uma concentração circulante constante do composto da presente invenção. A fim de manter essa concentração constante, um dispositivo de administração intravenosa contínua pode ser usado. Um exemplo de tal dispositivo é Deltec CADD-PLUS. TM. Bomba de injeção intravenosa de 5400.

[298] A composição farmacêutica pode estar na forma de uma suspensão aquosa ou oleosa injetável estéril para administração intramuscular e subcutânea. Tal suspensão pode ser formulada com dispersantes adequados ou agentes umectantes e agentes de suspensão como descrito acima de acordo com técnicas conhecidas. A formulação injetável estéril também pode ser uma solução ou suspensão injetável estéril preparada em um diluente ou solvente não tóxico parentericamente aceitável, por exemplo, uma solução preparada em 1,3-butanodiol. Além disso, óleos fixos estéreis podem ser facilmente usados como um solvente ou meio de suspensão. Para este propósito, qualquer mistura de óleos fixos incluindo mono- ou di-glicerídeo sintético pode ser usada. Além disso, ácidos graxos, tais como ácido oleico, também podem ser usados na preparação de uma injeção.

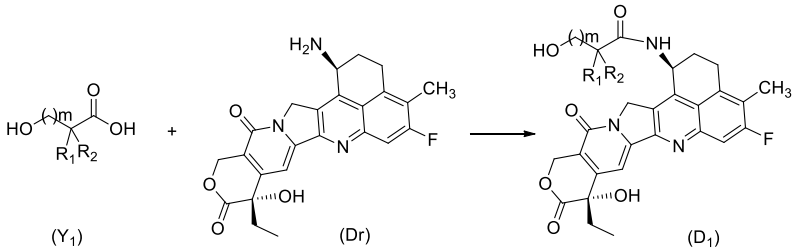
[299] A presente invenção se refere a um braço ligador clivável com uma estrutura específica e uma substância ativa com uma estrutura específica e um conjugado anticorpo-fármaco (ADC) composto por um braço ligador, uma substância ativa e um anticorpo. Este ADC é um complexo formado pela ligação de uma substância tóxica a um anticorpo por meio de um espaçador. O conjugado anticorpo-fármaco (ADC) é degradado no corpo para liberar moléculas ativas, apresentando assim um efeito antitumoral.

Método de Síntese da Presente invenção

[300] A fim de alcançar o objetivo da presente invenção, a presente invenção aplica as seguintes soluções técnicas:

[301] Esquema I:

[302] Um método para preparar o composto de Fórmula (D1) ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo da presente invenção, compreende a seguinte etapa de:



reagir o composto de Fórmula (Y1) e o composto de Fórmula (Dr) na presença de um agente de condensação e opcionalmente sob uma condição alcalina para obter o composto de Fórmula (D1),

em que: R^1, R^2 e m são como definidos na Fórmula (D1).

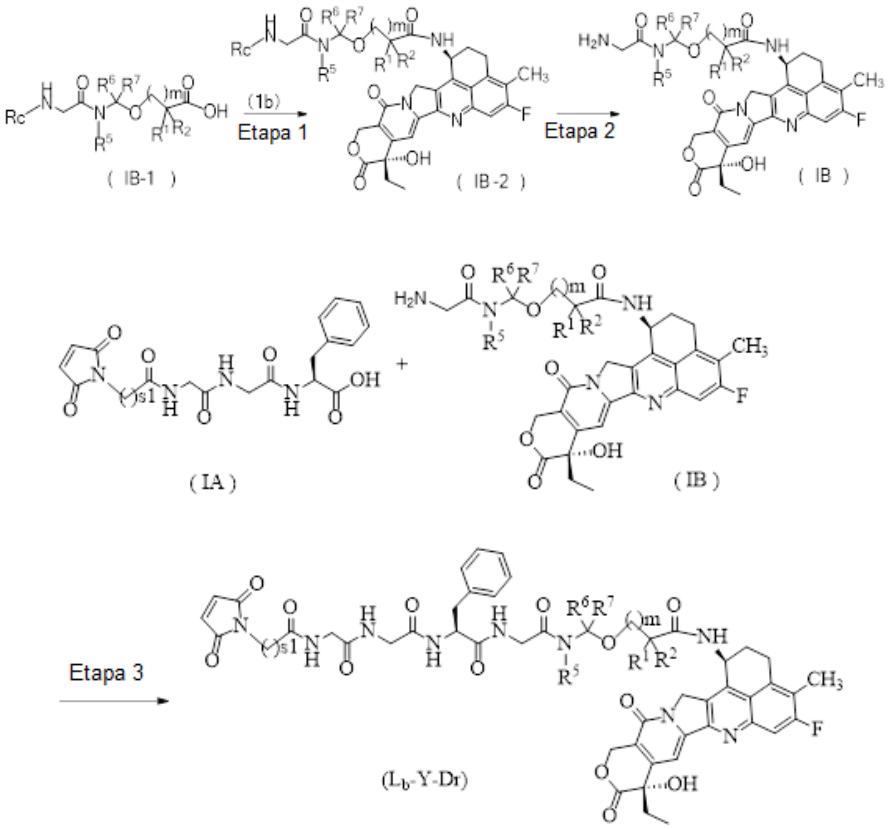
[303] O reagente que fornece uma condição alcalina inclui bases orgânicas e bases inorgânicas. As bases orgânicas incluem, mas não são limitadas a, trietilamina, dietilamina, *N*-metilmorfolina, piridina, hexahidropiridina, *N*,*N*-diisopropiletilamina, *n*-butila lítio, lítio diisopropilamida, acetato de potássio, terc-butóxido de sóido e terc-butóxido de potássio. As bases inorgânicas incluem, mas não são limitadas a, hidreto de sódio, fosfato de potássio, carbonato de sódio, carbonato de potássio, carbonato de césio, hidróxido de sódio e hidróxido de lítio.

[304] O agente de condensação pode ser selecionado a partir do grupo consistindo em cloreto de 4-(4,6-dimetóxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio, 1-hidroxibenzotriazol, cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida, N,N'-diciclohexilcarbodiimida, N,N'-diisopropilcarbodiimida, tetrafluoroborato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametilureia, 1-hidroxibenzotriazol, 1-hidróxi-7-azobenzotriazol, hexafluorofosfato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametilureia, hexafluorofosfato de 2-(7-azobenzotriazol)-N,N,N',N'-tetrametilureia, hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)pfosfônio e hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinila fosforoso, e preferivelmente cloreto de 4-

(4,6-dimetóxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio, 1-hidroxibenzotriazol e cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida.

Esquema II:

[305] Um método para preparar o composto de Fórmula (L_b-Y-Dr) ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo da presente invenção, compreende as seguintes etapas de:



[306] Etapa 1: o composto de Fórmula (IB-1) e metanossulfonato de exatecano (1b) são reagidos na presença de um agente de condensação e opcionalmente sob uma condição alcalina para obter o composto de Fórmula (IB-2);

[307] Etapa 2: o composto de Fórmula (IB-2) é desprotegido para obter o composto de Fórmula (IB);

[308] Etapa 3: o composto de Fórmula (IA) e o composto de Fórmula (IB) são reagidos na presença de um agente de condensação e opcionalmente sob uma condição alcalina para obter o composto de Fórmula (L_b-Y-Dr),

em que:

[309] R^c é um grupo protetor amino, e preferivelmente 9-fluorenil-metiloxicarbonila (Fmoc);

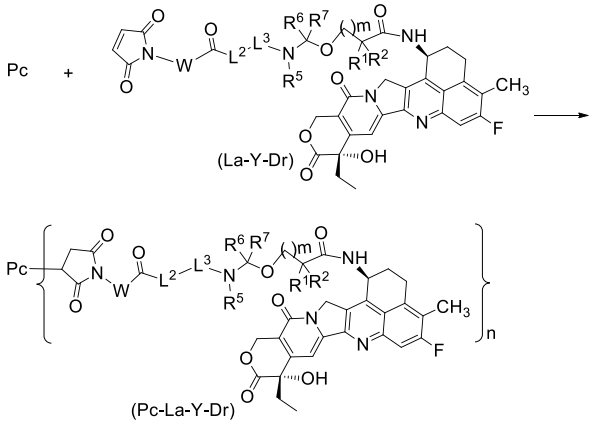
[310] R^1, R^2, R^5~R^7, s^1 e m são como definidos na Fórmula (L_b-Y-Dr).

[311] O reagente que fornece uma condição alcalina inclui bases orgânicas e bases inorgânicas. As bases orgânicas incluem, mas não são limitadas a, trietilamina, dietilamina, *N*-metilmorfolina, piridina, hexahidropiridina, *N*,*N*-diisopropiletilamina, *n*-butila lítio, lítio diisopropilamida, acetato de potássio, terc-butóxido de sóido e terc-butóxido de potássio. As bases inorgânicas incluem, mas não são limitadas a, hidreto de sódio, fosfato de potássio, carbonato de sódio, carbonato de potássio, carbonato de césio, hidróxido de sódio e hidróxido de lítio.

[312] O agente de condensação é selecionado a partir do grupo consistindo em cloreto de 4-(4,6-dimetóxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio, 1-hidroxibenzotriazol, cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida, N,N'-diciclohexilcarbodiimida, N,N'-diisopropilcarbodiimida, tetrafluoroborato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametilureia, 1-hidroxibenzotriazol, 1-hidróxi-7-azobenzotriazol, hexafluorofosfato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametilureia, hexafluorofosfato de 2-(7-azobenzotriazol)-N,N,N',N'-tetrametilureia, hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)pfosfônio e hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinila fosforoso, e preferivelmente cloreto de 4-(4,6-dimetóxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio, 1-hidroxibenzotriazol e cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida.

Esquema III:

[313] A método para preparar o composto de Fórmula (Pc-L_a-Y-Dr) da presente invenção, compreende a seguinte etapa de:



[314] Pc é reagido com o composto de Fórmula (L_a-Y-Dr) após redução para obter o composto de Fórmula (Pc-L_a-Y-Dr); o agente redutor é preferivelmente TCEP, particularmente, é preferível reduzir a ligação dissulfeto no anticorpo;

em que:

[315] Pc é um ligante;

[316] W, L^2, L^3, R^1, R^2, R^5~R^7, m e n são como definidos na Fórmula (Pc-L_a-Y-Dr).

[317] A presente invenção será ainda descrita com referência aos seguintes exemplos, mas os exemplos não devem ser considerados como limitantes do escopo da presente invenção.

[318] Os métodos experimentais nos exemplos da presente invenção para os quais as condições específicas não são indicadas foram realizados de acordo com as condições convencionais ou as condições recomendadas pelos fabricantes do material ou produto. Os reagentes para os quais as fontes específicas não são indicadas são reagentes convencionais adquiridos no mercado.

EXEMPLOS

[319] As estruturas dos compostos são identificadas por ressonância magnética (RMN) ou espectrometria de massa (MS). A RMN é determinada por uma máquina Bruker AVANCE-400. Os solventes para determinação são dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6), clorofórmio deuterado ($CDCl_3$) e metanol deuterado (CD_3OD), sendo que o padrão

interno é tetrametilsilano (TMS). Os desvios químicos são dados em 10^{-6} (ppm).

[320] MS é determinada por um espectrômetro de massa FINNIGAN LCQAd (ESI) (fabricante: Thermo, tipo: Finnigan LCQ Advantage MAX).

[321] UPLC é determinado por um cromatógrafo líquido/espectrômetro de massa Waters Acquity UPLC SQD.

[322] Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é determinada em um cromatógrafo líquido de alta pressão Agilent 1200DAD (coluna cromatográfica Sunfire C18 150 × 4,6 mm) e em um cromatógrafo líquido de alta pressão Waters 2695-2996 (coluna cromatográfica Gimini C18 150 × 4,6 mm).

[323] UV-HPLC é determinada em um espectrofotômetro Thermo nanodrop2000 UV.

[324] As taxas de inibição da proliferação e os valores de IC_{50} são determinados por um leitor de microplacas FERA starFS (BMG Co., Alemanha).

[325] A placa de sílica gel Yantai Huanghai HSGF254 ou Qingdao GF254 é usada como a placa de cromatografia em sílica gel em camada de estanho (TLC). A dimensão da placa de sílica gel usada em TLC é de 0,15 mm a 0,2 mm, e a dimensão da placa de sílica gel usada na purificação do produto é de 0,4 mm a 0,5 mm.

[326] Gel de sílica Yantai Huanghai 200 a 300 mesh é geralmente usado como um veículo para cromatografia em coluna.

[327] Os materiais de partida conhecidos da presente invenção podem ser preparados pelos métodos conhecidos na técnica, ou podem ser adquiridos na ABCR GmbH & Co. KG, Acros Organnics, Aldrich Chemical Company, Accela ChemBio Inc., Dari Chemical Company etc.

[328] Salvo indicação em contrário, as reações são realizadas sob atmosfera de argônio ou atmosfera de nitrogênio.

[329] "Atmosfera de argônio" ou "atmosfera de nitrogênio" significa que um frasco de reação é equipado com um frasco de argônio ou nitrogênio (cerca de 1 L).

[330] “Atmosfera de hidrogênio” significa que um frasco de reação é equipado com um frasco de hidrogênio (cerca de 1 L).

[331] A reação de hidrogenação pressurizada é realizada em um instrumento de hidrogenação Parr 3916EKX e um gerador de hidrogênio Qinglan QL-500 ou instrumento de hidrogenação HC2-SS.

[332] Nas reações de hidrogenação, o sistema de reação é geralmente aspirado e preenchido com hidrogênio, e a operação acima é repetida três vezes.

[333] O reator de micro-ondas do tipo CEM Discover-S 908860 é usado em reações de micro-ondas.

[334] Salvo indicação em contrário, a solução da reação refere-se a uma solução aquosa.

[335] Salvo indicação em contrário, a temperatura de reação da reação é a temperatura ambiente.

[336] A temperatura ambiente de 20 ºC a 30 ºC é a temperatura de reação mais adequada.

[337] Preparação de tampão PBS (pH = 6,5) nos exemplos: 8,5 g de KH_2PO_4, 8,56 g de $K_2HPO_4.3H_2O$, 5,85 g de NaCl e 1,5 g de EDTA são ajustados para 2 L em um frasco, a mistura é submetida a ultrassonicação para dissolver completamente e agitar bem para dar o tampão.

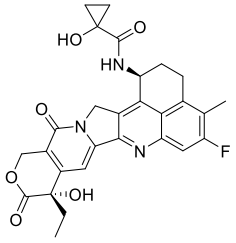
[338] O sistema eluente em cromatografia em coluna e o sistema solvente revelador em cromatografia em estanho para purificação dos compostos incluem: A: sistema diclorometano e isopropanol, B: sistema diclorometano e metanol, C: sistema éter de petróleo e acetato de etila. A razão do volume do solvente é ajustada de acordo com a polaridade dos compostos, e uma pequena quantidade de reagente ácido ou reagente alcalino tais como trietilamina também pode ser adicionada para

ajuste.

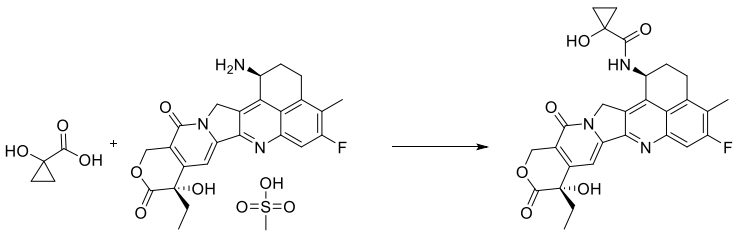
[339] Alguns dos compostos da presente invenção são especificados por Q-TOF LC/MS. Em relação a Q-TOF LC/MS, são usados espectrômetro de massa Agilent 6530 Accurate-Mass Quadrupole-Time de Flight e o Agilent 1290-Infinity UHPLC (Agilent Poroshell 300SB-C8 5 μm, coluna de 2,1 × 75 mm).

Exemplo 1

N-((1*S*,9*S*)-9-Etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)-1-hidroxiciclopropano-1-carboxamida **1**



1



1a **1b** **1**

[340] 1 mL de N,N-dimetilformamida foi adicionado a metanossulfonato de exatecano 1b (2,0 mg, 3,76 μmol, preparado de acordo com o método descrito no pedido de patente “EP0737686A1”), e a solução foi resfriada a 0-5°C em um banho de água gelada. Uma gota de trietilamina foi adicionada em gotas, e a solução de reação foi agitada até clarear. Ácido 1-Hidroxiciclopropilcarboxílico 1a (1,4 mg, 3,7 μmol, preparado de acordo com o método conhecido descrito em “Tetrahedron Letters, 25(12), 1269-72; 1984”) e cloreto de 4-(4,6-dimetóxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio (3,8 mg, 13,7 μmol) foram adicionados sucessivamente à solução de reação. Após finalização da adição, a solução

de reação foi agitada a 0-5°C por 2 horas. 5 mL de água foram adicionados à solução de reação para arrefecer bruscamente a reação, e a solução de reação foi extraída com acetato de etila (8 mL×3). As fases orgânicas foram combinadas, lavadas com solução de cloreto de sódio saturada (5 mL×2), secas sobre sulfato de sódio anidro e filtradas. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida, e os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de camada fina com desenvolvimento do sistema de solvente B para obter o produto do título 1 (1,6 mg, rendimento: 82,1%).

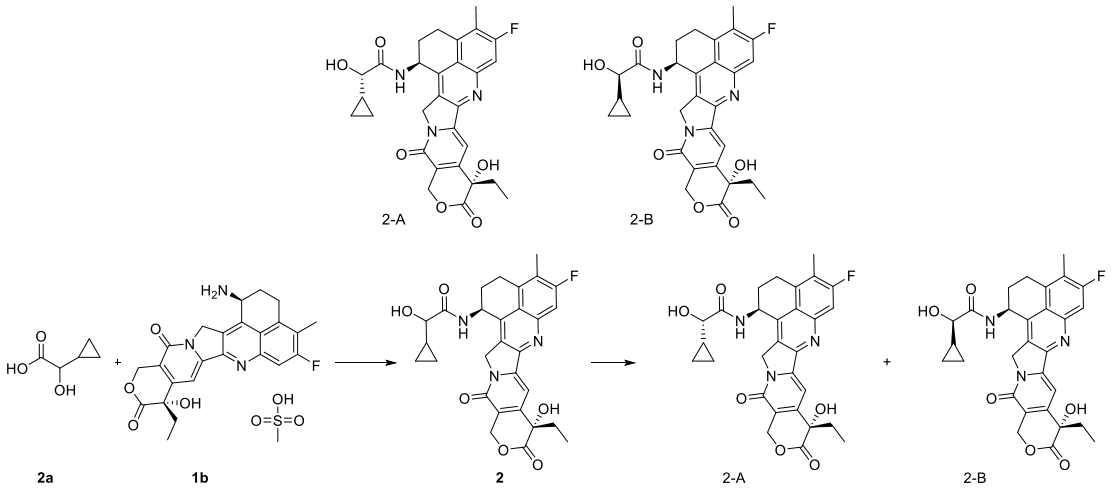
MS m/z (ESI): 520,2 [M+1]

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7,90-7,84 (m, 1H), 7,80-7,68(m, 1H), 5,80-5,70 (m, 1H), 5,62-5,54(m, 2H), 5,44-5,32 (m, 2H), 5,28-5,10(m, 2H), 3,40-3,15 (m, 3H), 2,44 (s, 3H), 2,23(t, 1H), 2,06-1,75 (m, 2H), 1,68-1,56 (m, 1H), 1,22-1,18 (m, 2H), 1,04-0,98 (m, 2H), 0,89 (t, 3H).

Exemplo 2

(*S*)-2-Ciclopropil-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)-2-hidroxiacetamida **2-A**

(*R*)-2-Ciclopropil-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)-2-hidroxiacetamida **2-B**



[341] 2 mL de etanol e 0,4 mL de *N*,*N*-dimetilformamida foram adicionados a **1b** (4 mg, 7,53 μmol). A solução foi purgada com argônio três vezes, e resfriada a 0-5°C em um banho de água gelada. 0,3 mL de *N*-metilmorfolina foi adicionado em gotas, e a solução de reação foi agitada até clarear. Ácido 2-ciclopropil-2-hidroxiacético **2a** (2,3 mg, 19,8 μmol, preparado de acordo com o método descrito no pedido de patente "WO2013106717"), 1-hidroxibenzotriazol (3 mg, 22,4 μmol) e cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (4,3 mg, 22,4 μmol) foram adicionados sucessivamente à solução de reação. Após finalização da adição, a solução de reação foi agitada a 0-5°C por uma hora. O banho de água gelada foi removido, e a solução de reação foi aquecida a 30°C e agitada por 2 horas. A solução de reação foi concentrada sob pressão reduzida, e o composto bruto resultante **2** foi purificado por cromatografia líquida de alto desempenho (condições de separação: coluna: XBridge Prep C18 OBD 5 μm 19*250 mm; fase móvel: A-water (10 mmol NH_4OAc), B-acetonitrila, eluição de gradiente, taxa de fluxo: 18 mL/min). As frações correspondentes foram coletadas, e concentradas sob pressão reduzida para obter o produto do título (2-A: 1,5 mg, 2-B: 1,5 mg).

MS m/z (ESI): 534,0 [M+1].

[342] Composto 2-B com configuração única (tendo tempo de retenção mais curto)

[343] Análise UPLC: tempo de retenção: 1,06 minutos, pureza: 88% (coluna: ACQUITY UPLC BEHC18 1,7 μm 2,1*50mm, fase móvel: A-water (5 mmol NH_4OAc), B-acetonitrila).

^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8,37 (d, 1H), 7,76 (d, 1H), 7,30 (s, 1H), 6,51 (s, 1H), 5,58-5,56 (m, 1H), 5,48 (d, 1H), 5,41 (s, 2H), 5,32-5,29 (m, 2H), 3,60 (t, 1H), 3,19-3,13 (m, 1H), 2,38 (s, 3H), 2,20-2,14 (m, 1H), 1,98 (q, 2H), 1,87-1,83 (m, 1H), 1,50-1,40 (m, 1H), 1,34-1,28 (m, 1H), 0,86 (t, 3H), 0,50-0,39 (m, 4H).

[344] Composto 2-A com configuração única (tendo tempo de retenção mais longo)

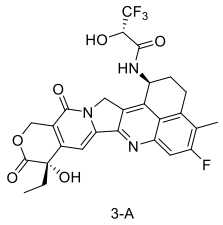
[345] Análise UPLC: tempo de retenção: 1,10 minutos, pureza: 86% (coluna: ACQUITY UPLC BEHC18 1,7 μm 2,1*50mm, fase móvel: A-water (5 mmol NH_4OAc), B-acetonitrila).

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8,35 (d, 1H), 7,78 (d, 1H), 7,31 (s, 1H), 6,52 (s, 1H), 5,58-5,53 (m, 1H), 5,42 (s, 2H), 5,37 (d, 1H), 5,32 (t, 1H), 3,62 (t, 1H), 3,20-3,15 (m, 2H), 2,40 (s, 3H), 2,25-2,16 (m, 1H), 1,98 (q, 2H), 1,87-1,82 (m, 1H), 1,50-1,40 (m, 1H), 1,21-1,14 (m, 1H), 0,87 (t, 3H), 0,47-0,35 (m, 4H).

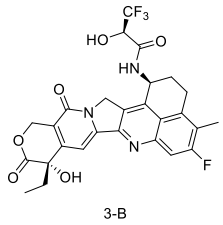
Exemplo 3

(*S*)-*N*-((1*S*,9*S*)-9-Etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxipropanamida **3-A**

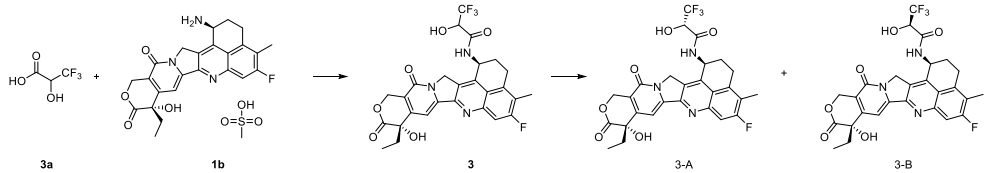
(*R*)-*N*-((1*S*,9*S*)-9-Etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxipropanamida **3-B**



3-A



3-B



3a 1b 3 3-A 3-B

[346] 2 mL de etanol e 0,4 mL de *N*,*N*-dimetilformamida foram adicionados a **1b** (5,0 mg, 9,41 μmol), e a solução foi resfriada a 0-5°C em um banho de água gelada. 0,3 mL de *N*-metilmorfolina foi adicionada em gotas, e a solução de reação foi agitada até clarear. Ácido 3,3,3-Trifluoro-2-hidroxipropiônico **3a** (4,1 mg, 28,4 μmol, fornecedor: Alfa), 1-

hidroxibenzotriazol (3,8 mg, 28,1 μmol) e cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (5,4 mg, 28,2 μmol) foram adicionados sucessivamente à solução de reação. Após finalização da adição, a solução de reação foi agitada a 0-5°C por 10 minutos. O banho de água gelada foi removido, e a solução de reação foi aquecida a 30°C e agitada por 8 horas. A solução de reação foi concentrada sob pressão reduzida, e o composto bruto resultante **3** foi purificado por cromatografia líquida de alto desempenho (condições de separação: coluna: XBridge Prep C18 OBD 5 μm 19*250 mm; fase móvel: A-water (10 mmol NH_4OAc), B-acetonitrila, eluição de gradiente, taxa de fluxo: 18 mL/min). As frações correspondentes foram coletadas, e concentradas sob pressão reduzida para obter o produto do título (1,5 mg, 1,5 mg).

MS m/z (ESI): 561,9 [M+1].

[347] Composto com configuração única (tendo tempo de retenção mais curto)

[348] Análise UPLC: tempo de retenção: 1,11 minutos, pureza: 88% (coluna: ACQUITY UPLC BEHC18 1,7 μm 2,1*50mm, fase móvel: A-water (5 mmol NH_4OAc), B-acetonitrila).

^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8,94 (d, 1H), 7,80 (d, 1H), 7,32 (s, 1H), 7,20 (d, 1H), 6,53 (s, 1H), 5,61-5,55 (m, 1H), 5,45-5,23 (m, 3H), 5,15-5,06 (m, 1H), 4,66-4,57 (m, 1H), 3,18-3,12 (m, 1H), 2,40 (s, 3H), 2,26-2,20 (m, 1H), 2,16-2,08 (m, 1H), 2,02-1,94 (m, 1H), 1,89-1,82 (m, 1H), 1,50-1,40 (m, 1H), 0,87 (t, 3H).

[349] Composto com configuração única (tendo tempo de retenção mais longo)

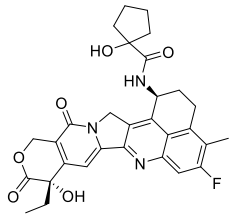
[350] Análise UPLC: tempo de retenção: 1,19 minutos, pureza: 90% (coluna: ACQUITY UPLC BEHC18 1,7 μm 2,1*50mm, fase móvel: A-water (5 mmol NH_4OAc), B-acetonitrila).

^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8,97 (d, 1H), 7,80 (d, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,16 (d, 1H), 6,53 (s, 1H), 5,63-5,55 (m, 1H), 5,45-5,20 (m,

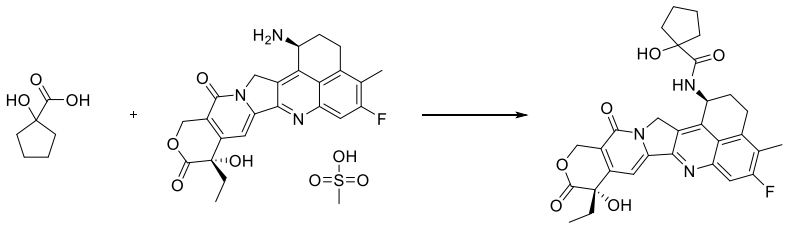
3H), 5,16-5,07 (m, 1H), 4,66-4,57 (m, 1H), 3,18-3,12 (m, 1H), 2,40 (s, 3H), 2,22-2,14 (m, 1H), 2,04-1,95 (m, 2H), 1,89-1,82 (m, 1H), 1,50-1,40 (m, 1H), 0,87 (t, 3H).

Exemplo 4

N-((1*S*,9*S*)-9-Etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)-1-hidroxiciclopentano-1-carboxamida **4**



4



4a **1b** **4**

[351] 1 mL de *N*,*N*-dimetilformamida foi adicionado a **1b** (3,0 mg, 5,64 μmol), e a solução foi resfriada a 0-5°C em um banho de água gelada. Uma gota de trietilamina foi adicionada em gotas, e a solução de reação foi agitada até clarear. Ácido 1-Hidróxi-ciclopentanocarboxílico **4a** (2,2 mg, 16,9 μmol, preparado de acordo com o método descrito no pedido de patente "WO2013106717") e cloreto de 4-(4,6-dimetóxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio (4,7 mg, 16,9 μmol) foram adicionados sucessivamente à solução de reação. Após finalização da adição, a solução de reação foi agitada a 0-5°C por 1 hora. 5 mL de água foram adicionados à solução de reação para arrefecer bruscamente a reação, e a solução de reação foi extraída com acetato de etila (10 mL×3). As fases orgânicas foram combinadas, lavadas com solução de cloreto de sódio saturada (5 mL×2), secas sobre sulfato de sódio anidro e filtradas.

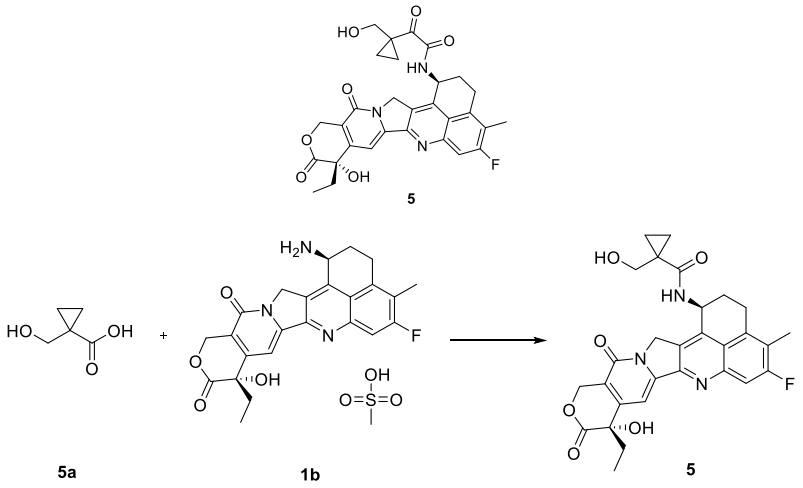
O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida, e os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de camada fina com desenvolvimento do sistema de solvente B para obter o produto do título **4** (2,5 mg, rendimento: 80,9%).

MS m/z (ESI): 548,0 [M+1].

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7,73-7,62 (m, 2H), 5,75-5,62 (m, 1H), 5,46-5,32 (m, 2H), 5,26-5,10 (m, 1H), 3,30-3,10 (m, 1H), 2,43 (s, 3H), 2,28-2,20 (m, 2H), 2,08-1,84 (m, 8H), 1,69-1,58 (m, 2H), 1,04-1,00 (m, 2H), 0,89 (t, 3H).

Exemplo 5

N-((1*S*,9*S*)-9-Etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)-1-(hidroximetil)ciclopropano-1-carboxamida **5**



[352] 1 mL de *N*,*N*-dimetilformamida foi adicionado a **1b** (2,0 mg, 3,76 μmol), e a solução foi resfriada a 0-5°C em um banho de água gelada. Uma gota de trietilamina foi adicionada em gotas, e a solução de reação foi agitada até clarear. Ácido 1-(Hidroximetil)-ciclopentanocarboxílico **5a** (0,87 mg, 7,5 μmol, preparado de acordo com o método descrito no pedido de patente "WO201396771") e cloreto de 4-(4,6-dimetóxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio (2 mg, 7,24 μmol) foram adicionados sucessivamente à solução de reação. Após finalização da adição, a solução de reação foi agitada a 0-5°C por 2 horas. 5 mL de água foram

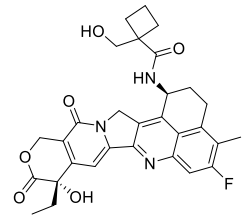
adicionados à solução de reação para arrefecer bruscamente a reação, e a solução de reação foi extraída com acetato de etila (8 mL×3). As fases orgânicas foram combinadas, lavadas com solução de cloreto de sódio saturada (5 mL×2), secas sobre sulfato de sódio anidro e filtradas. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida, e os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de camada fina com desenvolvimento do sistema de solvente B para obter o produto do título **5** (1,0 mg, rendimento: 50%).

MS m/z (ESI): 533,9 [M+1].

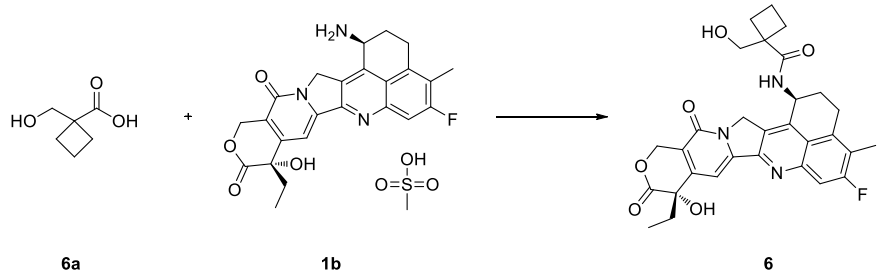
^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8,07 (s, 1H), 7,23-7,18 (m, 2H), 6,71-6,64 (m, 1H), 6,55-6,51 (m, 1H), 5,36-5,27 (m, 2H), 4,67-4,61 (m, 2H), 3,53-3,48 (m, 1H), 3,30-3,22 (m, 2H), 3,18-3,13 (m, 1H), 2,71-2,61 (m, 2H), 2,35-2,28 (m, 1H), 2,04-1,91 (m, 4H), 1,53-1,40 (m, 3H), 0,91-0,75 (m, 4H).

Exemplo 6

N-((1*S*,9*S*)-9-Etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)-1-(hidroximetil)ciclobutano-1-carboxamida **6**



6



6a **1b** **6**

[353] 1 mL de *N*,*N*-dimetilformamida foi adicionado a **1b** (3,0 mg, 5,64 μmol), e a solução foi resfriada a 0-5°C em um banho de água gelada. Uma gota de trietilamina foi adicionada em gotas, e a solução

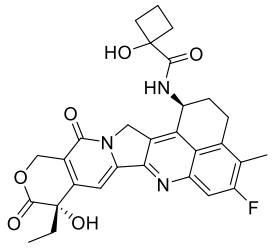
de reação foi agitada até clarear. Ácido 1-(Hidroximetil)ciclobutano-1-carboxílico **6a** (2,2 mg, 16,9 μmol, preparado de acordo com o método conhecido descrito em "*Journal de the American Chemical Society, 2014, vol,136, #22, p,8138-8142*") e cloreto de 4-(4,6-dimetóxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio (4,7 mg, 16,9 μmol) foram adicionados sucessivamente à solução de reação. Após finalização da adição, a solução de reação foi agitada a 0-5°C por 1 hora. 5 mL de água foram adicionados à solução de reação para arrefecer bruscamente a reação, e a solução de reação foi extraída com acetato de etila (10 mL×3). As fases orgânicas foram combinadas, lavadas com solução de cloreto de sódio saturada (5 mL×2), secas sobre sulfato de sódio anidro e filtradas. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida, e os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de camada fina com desenvolvimento do sistema de solvente B para obter o produto do título **6** (2,1 mg, rendimento: 67,9%).

MS m/z (ESI): 548,0 [M+1].

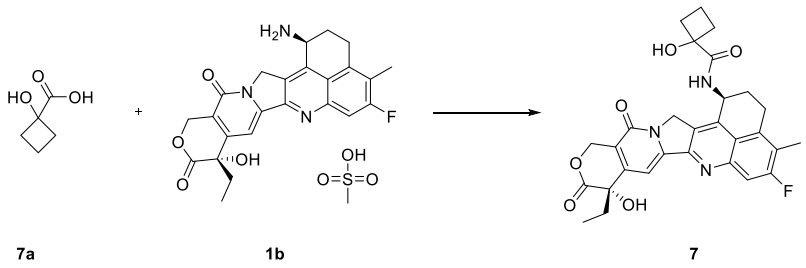
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6): δ 7,85-7,62 (m, 1H), 6,88 (br，1H), 5,87-5,48 (m，2H), 5,47-5,33 (m，1H), 5,31-5,06 (m，1H), 4,25-3,91 (m, 2H), 3,25 (br, 1H), 2,60-2,32 (m, 3H), 2,23 (t, 1H), 2,15-1,95 (m, 3H), 1,70-1,56 (m, 2H), 1,41-1,17 (m, 9H), 1,03 (s, 1H), 0,95-0,80 (m, 2H).

Exemplo 7

N-((1*S*,9*S*)-9-Etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)-1-hidroxiciclobutano-1-carboxamida **7**



7



7a 1b 7

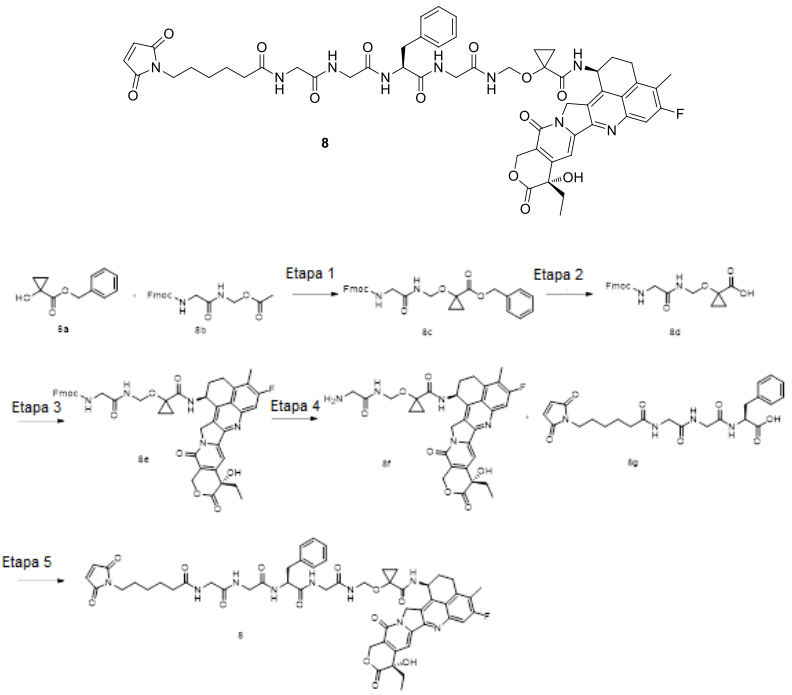
[354] 2 mL de etanol e 0,4 mL de *N*,*N*-dimetilformamida foram adicionados a **1b** (3,0 mg, 5,64 μmol), e a solução foi resfriada a 0-5°C em um banho de água gelada. 0,3 mL de *N*-metilmorfolina foi adicionada em gotas, e a solução de reação foi agitada até clarear. Ácido 1-hidroxiciclobutanocarboxílico **7a** (2,0 mg, 17,22 μmol, fornecedor: Pharma-Block Sciences), 1-hidroxibenzotriazol (2,3 mg, 17,0 μmol) e cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (3,2 mg, 16,7 μmol) foram adicionados sucessivamente à solução de reação. Após finalização da adição, a solução de reação foi agitada a 0-5°C por 10 minutos. O banho de água gelada foi removido, e a solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 2 horas. A solução de reação foi concentrada sob pressão reduzida, e o resíduo resultante foi purificado por cromatografia de camada fina com desenvolvimento do sistema de solvente B para obter o produto do título **7** (2,5 mg, rendimento: 83,1%).

MS m/z (ESI): 534,0 [M+1].

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8,28 (d, 1H), 7,75 (d, 1H), 7,29 (s, 1H), 6,51 (s, 1H), 6,12 (s, 1H), 5,59-5,51 (m, 1H), 5,41 (s, 2H), 5,20-5,01 (m, 2H), 3,27-3,17 (m, 1H), 3,15-3,05 (m, 1H), 2,71-2,63 (m, 1H), 2,37 (s, 3H), 2,12-2,05 (m, 1H), 2,03-1,94 (m, 2H), 1,92-1,78 (m, 4H), 1,50-1,42 (m, 1H), 0,90-0,83 (m, 4H).

Exemplo 8

1-(((*S*)-7-Benzil-20-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-3,6,9,12,15-pentaoxo-2,5,8,11,14-penta-azaicosil)óxi)-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)ciclopropano-1-carboxamida **8**



Etapa 1

1-((2-((((9*H*-Fluoren-9-il)metóxi)carbonil)amino)acetamido)metóxi)ciclopropano-1-carboxilato de benzila **8c**

[355] 1-hidroxiciclopropano-1-carboxilato de benzila **8a** (104 mg, 0,54 mmol, preparado de acordo com o método descrito no pedido de patente “US2005/20645”) e

acetato de (2-((((9*H*-fluoren-9-il)metóxi)carbonil)amino)acetamido)metil **8b** (100 mg, 0,27 mmol, preparado de acordo com o método descrito no pedido de patente “CN105829346A”) foram adicionados ao frasco de reação, seguido pela adição de 5 mL de tetrahidrofurano. A solução de reação foi purgada com argônio três vezes e resfriada a 0-5°C em um banho de água gelada, seguido pela adição de terc-butóxido de potássio (61 mg, 0,54 mmol). O banho de água gelada foi removido, e a solução de reação foi aquecida à temperatura ambiente e agitada por 10 minutos. 20 mL de água gelada foram adicionados à solução de reação, que foi em seguida extraída com acetato de etila (5 mL×2) e clorofórmio (5 mL×5). As fases orgânicas foram combinadas e concentradas. Os resíduos resultantes foram dissolvidos em 3 mL de 1,4-dioxano. 0,6 mL de

água, bicarbonato de sódio (27 mg, 0,32 mmol) e cloroformiato de 9-fluoreno metila (70 mg, 0,27 mmol) foram adicionados, e a solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 1 hora. 20 mL de água foram adicionados, e a solução de reação foi extraída com acetato de etila (8 mL×3). A fase orgânica foi lavada com solução de cloreto de sódio saturada (20 mL), seca sobre sulfato de sódio anidro e filtrada. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida, e os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de coluna em sílica gel com desenvolvimento do sistema de solvente B para obter o produto do título **8c** (100 mg, rendimento: 73,6%).

MS m/z (ESI): 501,0 [M+1]

Etapa 2

Ácido 1-((2-((((9*H*-Fluoren-9-il)metóxi)carbonil)amino)acetamido)metóxi)ciclopropano-1-carboxílico **8d**

[356] **8c** (50 mg, 0,10 mmol) foi dissolvido em 3 mL de um solvente misturado de tetrahidrofurano e acetato de etila (V:V=2:1), seguido pela adição de paládio sobre carbono (25 mg, teor: 10%). A solução de reação foi purgada com hidrogênio três vezes e agitada à temperatura ambiente por 1 hora. A solução de reação foi filtrada através de celite, e o bolo do filtro foi lavado com tetrahidrofurano. O filtrado foi concentrado para obter o produto do título **8d** (41 mg, rendimento: 100%).

MS m/z (ESI): 411,0 [M+1].

Etapa 3

(9*H*-Fluoren-9-il)metil (2-(((1-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)carbamoil)ciclopropóxi)metil)amino)-2-oxoetil)carbamato **8e**

[357] **1b** (7 mg, 0,013 mmol) foi adicionado ao frasco de reação, seguido pela adição de 1 mL de *N*,*N*-dimetilformamida. A solução foi purgada com argônio três vezes, e resfriada a 0-5°C em um banho de

água gelada. Uma gota de trietilamina, **8d** (7 mg, 0,017 mmol) in 0,5 mL de *N*,*N*-dimetilformamida, e cloreto de 4-(4,6-dimetóxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio (7 mg, 0,026 mmol) foram adicionados, e a solução de reação foi agitada em um banho gelado por 35 minutos. 10 mL de água foram adicionados, e a solução de reação foi extraída com acetato de etila (5 mL×3). A fase orgânica foi lavada com solução de cloreto de sódio saturada (10 mL), seca sobre sulfato de sódio anidro e filtrada. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida, e os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de camada fina com desenvolvimento do sistema de solvente B para obter o produto do título **8e** (8,5 mg, rendimento: 78,0%).

MS m/z (ESI): 828,0 [M+1].

Etapa 4

1-((2-Aminoacetamido)metóxi)-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)ciclopropano-1-carboxamida **8f**

[358] **8e** (4 mg, 4,84 μmol) foi dissolvido em 0,2 mL de diclorometano, seguido pela adição de 0,1 mL de dietilamina. A solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 2 horas. A solução de reação foi concentrada sob pressão reduzida. 2 mL de tolueno foram adicionados e a solução foi concentrada sob pressão reduzida, o que foi repetido duas vezes. 3 mL de n-hexano foram adicionados para polpar, e a camada de cima de hexano foi vertida, o que foi repetido três vezes. A solução foi concentrada sob pressão reduzida para obter o produto do título bruto **8f** (2,9 mg), que foi usado diretamente na próxima etapa sem purificação.

MS m/z (ESI): 606,0 [M+1].

Etapa 5

1-(((*S*)-7-Benzil-20-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-3,6,9,12,15-

pentaoxo-2,5,8,11,14-penta-azaicosil)óxi)-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)ciclopropano-1-carboxamida **8**

[359] O composto bruto **8f** (2,9 mg, 4,84 μmol) foi dissolvido em 0,5 mL de *N*,*N*-dimetilformamida. A solução foi purgada com argônio três vezes, e resfriada a 0-5°C em um banho de água gelada. Ácido (S)-2(-2-(-2-(6-(2,5-dioxo-1H-pirrol-1-il)hexanamido)acetamido)acetamido)-3-fenilpropiônico **8g** (2,7 mg, 5,80 μmol, preparado de acordo com o método descrito no pedido de patente "EP2907824") in 0,3 mL de *N*,*N*-dimetilformamida, e cloreto de 4-(4,6-dimetóxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metil-morfolínio (2,7 mg, 9,67 μmol) foram adicionados, e a solução de reação foi agitada em um banho gelado por 30 minutos. O banho gelado foi removido, e a solução de reação foi aquecida à temperatura ambiente e agitada por 15 minutos. A solução de reação foi purificada por cromatografia líquida de alto desempenho (condições de separação: coluna: XBridge Prep C18 OBD 5 μm 19*250 mm; fase móvel: A-water (10 mmol NH_4OAc), B-acetonitrila, eluição de gradiente, taxa de fluxo: 18 mL/min). As frações correspondentes foram coletadas, e concentradas sob pressão reduzida para obter o produto do título **8** (2 mg, rendimento: 39,0%).

MS m/z (ESI): 1060,0 [M+1].

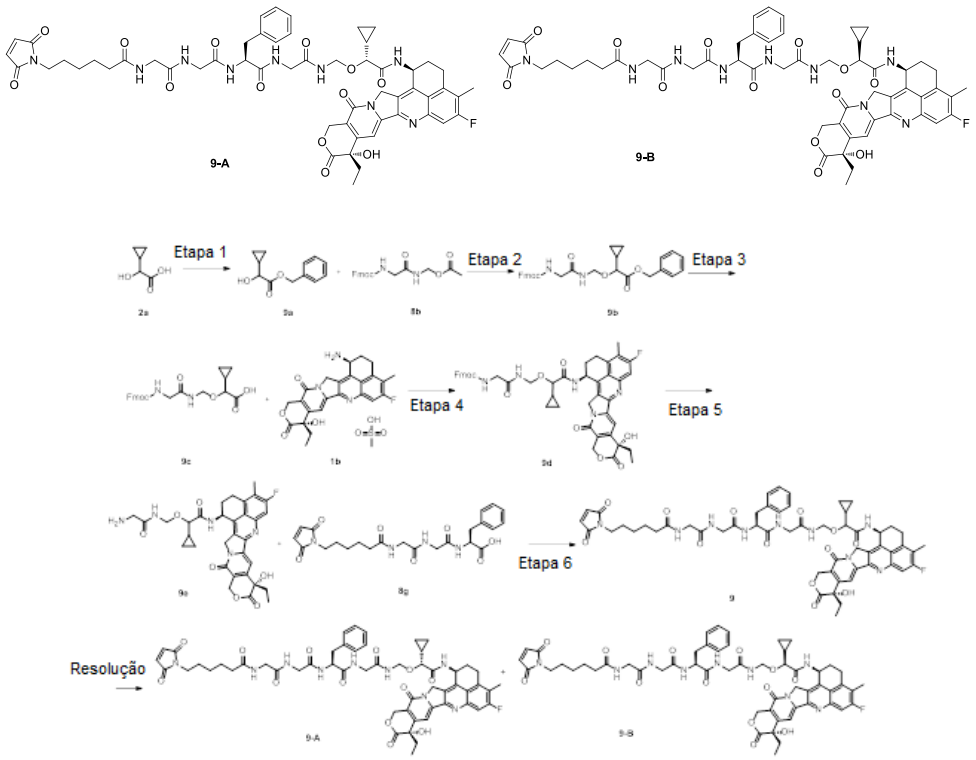
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6): δ 9,01 (d, 1H), 8,77 (t, 1H), 8,21 (t, 1H), 8,08-7,92 (m, 2H), 7,73 (d, 1H), 7,28 (s, 1H), 7,24-7,07 (m, 4H), 6,98 (s, 1H), 6,50 (s, 1H), 5,61 (q, 1H), 5,40 (s, 2H), 5,32 (t, 1H), 5,12 (q, 2H), 4,62 (t, 1H), 4,52 (t, 1H), 4,40-4,32 (m, 1H), 3,73-3,47 (m, 8H), 3,16-3,04 (m, 2H), 2,89 (dd, 1H), 2,69-2,55 (m, 2H), 2,37-2,23 (m, 4H), 2,12-1,93 (m, 4H), 1,90-1,74 (m, 2H), 1,52-1,38 (m, 4H), 1,33-1,11 (m, 5H), 0,91-0,81 (m, 4H).

Exemplo 9

N-((2*R*,10*S*)-10-Benzil-2-ciclopropil-1-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-

4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-1,6,9,12,15-pentaoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetra-azahexadecan-16-il)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamida **9-A**

N-((2*S*,10*S*)-10-Benzil-2-ciclopropil-1-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-1,6,9,12,15-pentaoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetra-azahexadecan-16-il)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamida **9-B**



Etapa 1

2-Ciclopropil-2-hidroxiacetato de benzila **9a**

[360] **2a** (1,3 g, 11,2 mmol, preparado de acordo com o método descrito no pedido de patente “WO2013/106717”) foi dissolvido em 50 mL de acetonitrila, e em seguida adicionado com carbonato de potássio (6,18 g, 44,8 mmol), brometo de benzila (1,33 mL, 11,2 mmol) e iodeto de tetrabutilamônio (413 mg, 1,1 mmol) sucessivamente. A solução de

reação foi agitada à temperatura ambiente por 48 horas, e filtrada através de celite. O bolo do filtro foi lavado com acetato de etila (10 ml), e os filtrados foram combinados e concentrados sob pressão reduzida. Os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de coluna em sílica gel com desenvolvimento do sistema de solvente C para obter o produto do título **9a** (2 g, rendimento: 86,9%).

Etapa 2

Benzila 10-ciclopropil-1-(9*H*-fluoren-9-il)-3,6-dioxo-2,9-dioxa-4,7-diazaundecan-11-oato **9b**

[361] **9a** (120,9 mg, 0,586 mmol) e **8b** (180 mg, 0,489 mmol) foram adicionados ao frasco de reação, seguido pela adição de 4 mL de tetrahidrofurano. A solução de reação foi purgada com argônio três vezes e resfriada a 0-5°C em um banho de água gelada. Terc-butóxido de potássio (109 mg, 0,98 mmol) foi adicionado e o banho de água gelada foi removido. A solução de reação foi aquecida à temperatura ambiente e agitada por 40 minutos. 10 mL de água gelada foram adicionados à solução de reação, que foi em seguida extraída com acetato de etila (20 mL×2) e clorofórmio (10 mL×5). As fases orgânicas foram combinadas e concentradas. Os resíduos resultantes foram dissolvidos em 4 mL de dioxano. 2 mL de água, bicarbonato de sódio (49,2 mg, 0,586 mmol) e cloroformiato de 9-fluoreno metila (126 mg, 0,49 mmol) foram adicionados, e a solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 2 horas. 20 mL de água foram adicionados, e a solução de reação foi extraída com acetato de etila (10 mL×3). A fase orgânica foi lavada com solução de cloreto de sódio saturada (20 mL), seca sobre sulfato de sódio anidro e filtrada. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida. Os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de coluna em sílica gel com desenvolvimento do sistema de solvente C para obter o produto do título **9b** (48 mg, rendimento: 19%).

MS m/z (ESI): 515,0 [M+1].

Etapa 3

Ácido 10-Ciclopropil-1-(9*H*-fluoren-9-il)-3,6-dioxo-2,9-dioxa-4,7-diazaundecan-11-oico **9c**

[362] **9b** (20 mg, 0,038 mmol) foi dissolvido em 4,5 mL de um solvente misturado de tetrahidrofurano e acetato de etila (V:V=2:1), seguido pela adição de paládio sobre carbono (12 mg, teor: 10%, seco). A solução de reação foi purgada com hidrogênio três vezes e agitada à temperatura ambiente por 1 hora. A solução de reação foi filtrada através de celite, e o bolo do filtro foi lavado com acetato de etila. O filtrado foi concentrado para obter o produto do título bruto **9c** (13 mg), que foi usado diretamente na próxima etapa sem purificação.

MS m/z (ESI): 424,9 [M+1].

Etapa 4

(9*H*-Fluoren-9-il)metil (2-(((1-ciclopropil-2-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-2-oxoetóxi)metil)amino)-2-oxoetil)carbamato **9d**

[363] **1b** (10 mg, 18,8 μmol) foi adicionado ao frasco de reação, seguido pela adição de 1 mL de *N*,*N*-dimetilformamida. A solução foi purgada com argônio três vezes, e resfriada a 0-5°C em um banho de água gelada. Uma gota de trietilamina, composto bruto **9c** (13 mg, 30,6 μmol) e cloreto de 4-(4,6-dimetóxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio (16,9 mg, 61,2 μmol) foram adicionados, e a solução de reação foi agitada em um banho gelado por 40 minutos. 10 mL de água foram adicionados, e a solução de reação foi extraída com acetato de etila (10 mL×3). As fases orgânicas foram combinadas. A fase orgânica foi lavada com solução de cloreto de sódio saturada (10 mL×2), seca sobre sulfato de sódio anidro e filtrada. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida. Os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de camada fina com desenvolvimento do sistema de solvente B para obter o produto

do título **9d** (19 mg, rendimento: 73,6%).

MS m/z (ESI): 842,1[M+1].

Etapa 5

2-((2-Aminoacetamido)metóxi)-2-ciclopropil-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)acetamida **9e**

[364] **9d** (19 mg, 22,6 μmol) foi dissolvido em 2 mL de diclorometano, seguido pela adição de 1 mL de dietilamina. A solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 2 horas. A solução de reação foi concentrada sob pressão reduzida. 1 mL de tolueno foram adicionados e a solução foi concentrada sob pressão reduzida, o que foi repetido duas vezes. 3 mL de n-hexano foram adicionados aos resíduos para polpar, e o sobrenadante foi vertido após permanecer para reter o sólido. Os resíduos sólidos foram concentrados sob pressão reduzida por uma bomba de óleo até secura para obter o produto do título bruto **9e** (17 mg), que foi usado diretamente na próxima etapa sem purificação.

MS m/z (ESI): 638,0[M+18].

Etapa 6

N-((2*R*,10*S*)-10-Benzil-2-ciclopropil-1-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-1,6,9,12,15-pentaoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetra-azahexadecan-16-il)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamida **9-A**

N-((2*S*,10*S*)-10-Benzil-2-ciclopropil-1-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-1,6,9,12,15-pentaoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetra-azahexadecan-16-il)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamida **9-B**

[365] O composto bruto **9e** (13,9 mg, 22,4 μmol) foi dissolvido em 0,6 mL de *N*,*N*-dimetilformamida. A solução foi purgada com argônio três

vezes, e resfriada a 0-5°C em um banho de água gelada. **8g** (21,2 mg, 44,8 μmol) em 0,3 mL de *N*,*N*-dimetilformamida, e cloreto de 4-(4,6-dimetóxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio (18,5 mg, 67,3 μmol) foram adicionados, e a solução de reação foi agitada em um banho gelado por 10 minutos. O banho gelado foi removido, e a solução de reação foi aquecida à temperatura ambiente e agitada por 1 hora para obter composto **9**. A solução de reação foi purificada por cromatografia líquida de alto desempenho (condições de separação: coluna: XBridge Prep C18 OBD 5 μm 19*250 mm; fase móvel: A-water (10 mmol NH_4OAc), B-acetonitrila, eluição de gradiente, taxa de fluxo: 18 mL/min). As frações correspondentes foram coletadas, e concentradas sob pressão reduzida para obter o produto do título (9-A: 2,4 mg, 9-B: 1,7 mg).

MS m/z (ESI): 1074,4 [M+1].

[366] Composto 9-A com configuração única (tendo tempo de retenção mais curto):

[367] Análise UPLC: tempo de retenção: 1,14 minutos, pureza: 85% (coluna: ACQUITY UPLC BEHC18 1,7 μm 2,1*50mm, fase móvel: A-water (5 mmol NH_4OAc), B-acetonitrila).

^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8,60 (t, 1H), 8,51-8,49 (d, 1H), 8,32-8,24 (m, 1H), 8,13-8,02 (m, 2H), 8,02-7,96 (m, 1H), 7,82-7,75 (m, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,26-7,15 (m, 4H), 6,99 (s, 1H), 6,55-6,48 (m, 1H), 5,65-5,54 (m, 1H), 5,41 (s, 2H), 5,35-5,15 (m, 3H), 4,74-4,62 (m, 1H), 4,54-4,40 (m, 2H), 3,76-3,64 (m，4H), 3,62-3,48 (m, 2H), 3,20-3,07 (m, 2H), 3,04-2,94 (m, 1H), 2,80-2,62 (m, 1H), 2,45-2,30 (m, 3H), 2,25-2,15 (m, 2H), 2,15-2,04 (m, 2H), 1,93-1,78 (m, 2H), 1,52-1,39 (m, 3H), 1,34-1,12 (m, 5H), 0,87 (t, 3H), 0,64-0,38 (m, 4H).

[368] Composto 9-B com configuração única (tendo tempo de retenção mais longo):

[369] Análise UPLC: tempo de retenção: 1,16 minutos, pureza: 89%

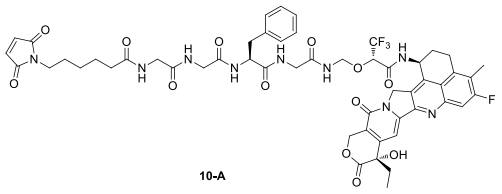
(coluna: ACQUITY UPLC BEHC18 1,7 µm 2,1*50mm, fase móvel: A-water (5 mmol NH_4OAc), B-acetonitrila).

^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8,68-8,60 (m, 1H), 8,58-8,50 (m, 1H), 8,32-8,24 (m, 1H), 8,13-8,02 (m, 2H), 8,02-7,94 (m, 1H), 7,82-7,75 (m, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,26-7,13 (m, 3H), 6,99 (s, 1H), 6,55-6,48 (m, 1H), 5,60-5,50 (m, 1H), 5,41 (s, 2H), 5,35-5,15 (m, 2H), 4,78-4,68 (m, 1H), 4,60-4,40 (m, 2H), 3,76-3,58 (m, 4H), 3,58-3,48 (m, 1H), 3,20-3,10 (m, 2H), 3,08-2,97 (m, 2H), 2,80-2,72 (m, 2H), 2,45-2,30 (m, 3H), 2,25-2,13 (m, 2H), 2,13-2,04 (m, 2H), 2,03-1,94 (m, 2H), 1,91-1,78 (m, 2H), 1,52-1,39 (m, 3H), 1,34-1,12 (m, 4H), 0,91-0,79 (m, 3H), 0,53-0,34 (m, 4H).

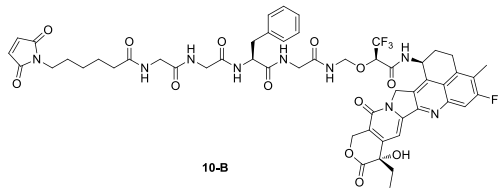
Exemplo 10

N-((2*S*,10*S*)-10-Benzil-2-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)carbamoil)-1,1,1-trifluoro-6,9,12,15-tetraoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetra-azahexadecan-16-il)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamida **10-A**

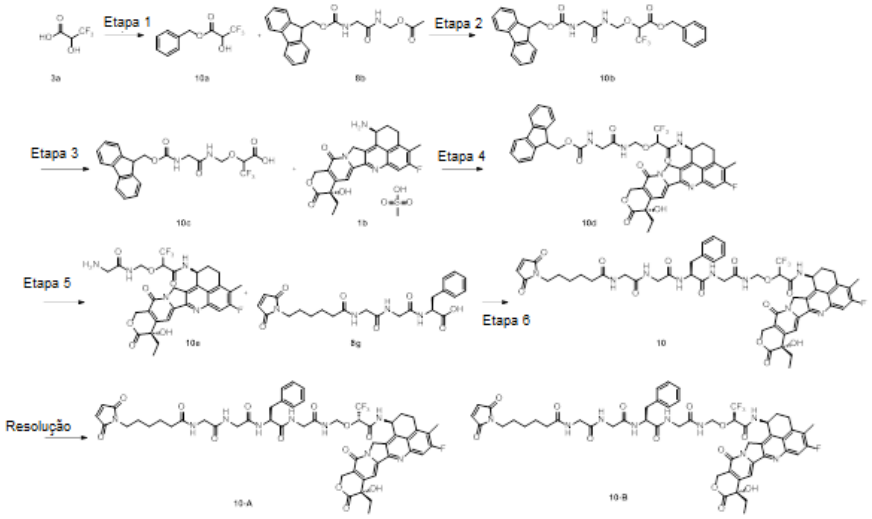
N-((2*R*,10*S*)-10-Benzil-2-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)carbamoil)-1,1,1-trifluoro-6,9,12,15-tetraoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetra-azahexadecan-16-il)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamida **10-B**



10-A



10-B



Etapa 1

Benzila 3,3,3-trifluoro-2-hidroxipropanoate **10a**

[370] **3a** (1,80 g, 12,5 mmol) foi dissolvido em 100 mL de acetonitrila, e em seguida adicionado com carbonato de potássio (5,17 g, 37,5 mmol), brometo de benzila (4,48 mL, 37,5 mmol) e iodeto de tetrabutilamônio (231 mg, 0,63 mmol) sucessivamente. A solução de reação foi aquecida a 60°C e agitada por 5 horas. A solução de reação foi resfriada à temperatura ambiente e filtrada. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida, e os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de coluna em sílica gel com desenvolvimento do sistema de solvente C para obter o produto do título **10a** (980 mg, rendimento: 33,5%).

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7,43-7,36 (m, 5H), 5,34 (s, 2H), 4,53 (s, 1H), 3,44 (s, 1H).

Etapa 2

Benzila 1-(9*H*-fluoren-9-il)-3,6-dioxo-10-(trifluorometil)-2,9-dioxa-4,7-diazaundecan-11-oato **10b**

[371] **8b** (63 mg, 0,17 mmol) e **10a** (80 mg, 0,34 mmol) foram adicionados ao frasco de reação, seguido pela adição de 3 mL de tetrahidrofurano. A solução de reação foi purgada com argônio três vezes e resfriada a 0-5°C em um banho de água gelada. Terc-butóxido de potássio (38 mg, 0,34 mmol) foi adicionado e o banho de água gelada foi

removido. A solução de reação foi aquecida à temperatura ambiente e agitada por 20 minutos. 10 mL de água gelada foram adicionados à solução de reação, que foi em seguida extraída com acetato de etila (20 mL×2) e clorofórmio (10 mL×5). As fases orgânicas foram combinadas e concentradas, e os resíduos resultantes foram dissolvidos em 2 mL de dioxano. 0,4 mL de água, bicarbonato de sódio (19 mg, 0,23 mmol) e cloroformiato de 9-fluoreno metila (49 mg, 0,19 mmol) foram adicionados, e a solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 1 hora. 20 mL de água foram adicionados, e a solução de reação foi extraída com acetato de etila (10 mL×3). A fase orgânica foi lavada com solução de cloreto de sódio saturada (20 mL), seca sobre sulfato de sódio anidro e filtrada. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida. Os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de coluna em sílica gel com desenvolvimento do sistema de solvente C para obter o produto do título **10b** (51 mg, rendimento: 55,3%).

MS m/z (ESI): 559,9 [M+18].

Etapa 3

Ácido 1-(9*H*-Fluoren-9-il)-3,6-dioxo-10-(trifluorometil)-2,9-dioxa-4,7-diazaundecan-11-oico **10c**

[372] **10b** (15 mg, 0,28 mmol) foi dissolvido em 3 mL de um solvente misturado de tetrahidrofurano e acetato de etila (V:V=2:1), seguido pela adição de paládio sobre carbono (15 mg, teor: 10%). A solução de reação foi purgada com hidrogênio três vezes e agitada à temperatura ambiente por 1 hora. A solução de reação foi filtrada através de celite, e o bolo do filtro foi lavado com tetrahidrofurano. O filtrado foi concentrado para obter o produto do título bruto **10c** (13 mg).

MS m/z (ESI): 452,9 [M+1].

Etapa 4

(9*H*-Fluoren-9-il)metil (2-((((3-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-

10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-1,1,1-trifluoro-3-oxopropan-2-il)óxi)metil)amino)-2-oxoetil)carbamato **10d**

[373] **1b** (10 mg, 18,8 μmol) foi adicionado ao frasco de reação, seguido pela adição de 1 mL de *N*,*N*-dimetilformamida. A solução foi purgada com argônio três vezes, e resfriada a 0-5°C em um banho de água gelada. Uma gota de trietilamina, **10c** (13 mg, 28,7 μmol) in 0,5 mL de *N*,*N*-dimetilformamida, e cloreto de 4-(4,6-dimetóxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio (11 mg, 39,7 μmol) foram adicionados, e a solução de reação foi agitada em um banho gelado por 30 minutos. 10 mL de água foram adicionados, e a solução de reação foi extraída com acetato de etila (10 mL×3). A fase orgânica foi combinada, lavada com solução de cloreto de sódio saturada (10 mL×2), seca sobre sulfato de sódio anidro e filtrada. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida, e os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de camada fina com desenvolvimento do sistema de solvente B para obter o produto do título **10d** (16 mg, rendimento: 97,8%).

MS m/z (ESI): 870,0[M+1].

Etapa 5

2-((2-Aminoacetamido)metóxi)-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)-3,3,3-trifluoropropanamida **10e**

[374] **10d** (16 mg, 18,4 μmol) foi dissolvido em 0,6 mL de diclorometano, seguido pela adição de 0,3 mL de dietilamina. A solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 2 horas. A solução de reação foi concentrada sob pressão reduzida. 2 mL de tolueno foram adicionados e a solução foi concentrada sob pressão reduzida, o que foi repetido duas vezes. 3 mL de n-hexano foram adicionados ao resíduo para polpar, e o sobrenadante foi vertido após permanecer por um instante

para reter o sólido, o que foi repetido três vezes. Os resíduos sólidos foram concentrados sob pressão reduzida por uma bomba de óleo até secura para obter o produto do título bruto **10e** (12 mg), que foi usado diretamente na próxima etapa sem purificação.

MS m/z (ESI): 647,9 [M+1].

Etapa 6

N-((2*S*,10*S*)-10-Benzil-2-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)carbamoil)-1,1,1-trifluoro-6,9,12,15-tetraoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetra-azahexadecan-16-il)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamida **10-A**

N-((2*R*,10*S*)-10-Benzil-2-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)carbamoil)-1,1,1-trifluoro-6,9,12,15-tetraoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetra-azahexadecan-16-il)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamida **10-B**

[375] O composto bruto **10e** (12 mg, 18,5 μmol) foi dissolvido em 1,0 mL de *N*,*N*-dimetilformamida. A solução foi purgada com argônio três vezes, e resfriada a 0-5°C em um banho de água gelada. **8g** (14 mg, 29,6 μmol) em 0,3 mL de *N*,*N*-dimetilformamida, e cloreto de 4-(4,6-dimetóxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio (15 mg, 54,2 μmol) foram adicionados, e a solução de reação foi agitada em um banho gelado por 30 minutos. O banho gelado foi removido, e a solução de reação foi aquecida à temperatura ambiente e agitada por 1 hora para obter composto **10**. A solução de reação foi purificada por cromatografia líquida de alto desempenho (condições de separação: coluna: XBridge Prep C18 OBD 5 μm 19*250 mm; fase móvel: A-water (10 mmol NH_4OAc), B-acetonitrila, eluição de gradiente, taxa de fluxo: 18 mL/min). As frações correspondentes foram coletadas, e concentradas sob pressão reduzida para obter os produtos do título (2,7 mg, 2,6 mg).

MS m/z (ESI): 1102,0 [M+1].

[376] Composto com configuração única (tendo tempo de retenção mais curto):

[377] Análise UPLC: tempo de retenção: 1,18 minutos, pureza: 91% (coluna: ACQUITY UPLC BEHC18 1,7 μm 2,1*50mm, fase móvel: A-water (5 mmol NH_4OAc), B-acetonitrila).

^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8,97 (d, 1H), 8,85-8,76 (m, 1H), 8,37-8,27 (m, 1H), 8,12-8,02 (m, 1H), 8,02-7,95 (m, 1H), 7,80 (d, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,26-7,10 (m, 4H), 6,99 (s, 1H), 6,66 (br, 1H), 6,52 (s, 1H), 5,65-5,54 (m, 1H), 5,41 (s, 1H), 5,37-5,25 (m, 3H), 5,23-5,13 (m, 1H), 4,81-4,68 (m, 2H), 4,51-4,41 (m, 1H), 3,78-3,45 (m, 6H), 3,21-3,13 (m, 1H), 3,02-2,93 (m, 1H), 2,77-2,63 (m, 2H), 2,45-2,29 (m, 3H), 2,24-2,05 (m, 3H), 2,04-1,93 (m, 5H), 1,90-1,75 (m, 2H), 1,52-1,38 (m, 4H), 0,90-0,78 (m, 5H).

[378] Composto com configuração única (tendo tempo de retenção mais longo):

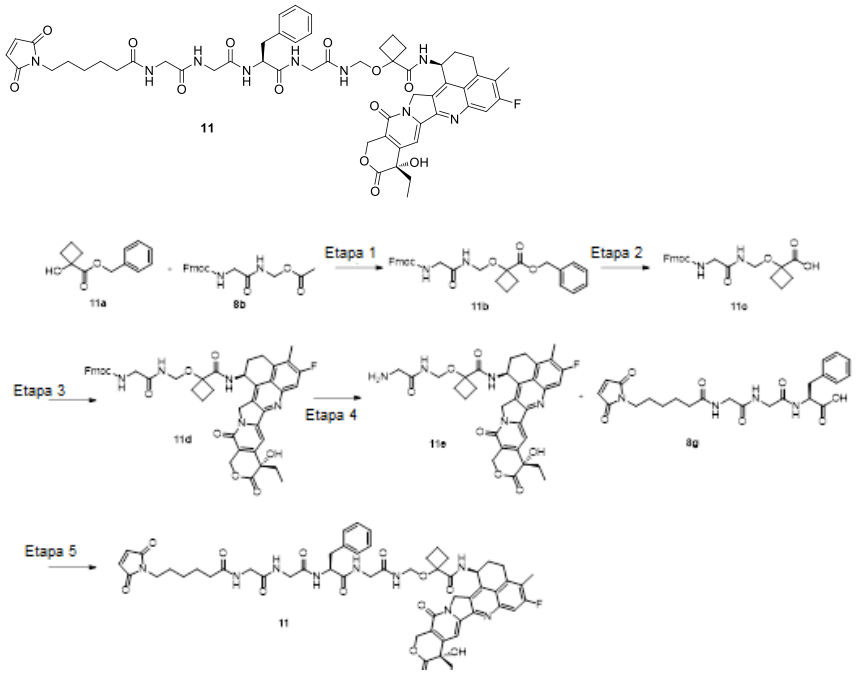
[379] Análise UPLC: tempo de retenção: 1,23 minutos, pureza: 90% (coluna: ACQUITY UPLC BEHC18 1,7 μm 2,1*50mm, fase móvel: A-water (5 mmol NH_4OAc), B-acetonitrila).

^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6): δ 9,05 (d, 1H), 8,97-8,88 (m, 1H), 8,35-8,27 (m, 1H), 8,11-8,03 (m, 1H), 8,02-7,95 (m, 1H), 7,80 (d, 1H), 7,34 (s, 1H), 7,29-7,13 (m, 4H), 6,99 (s, 1H), 6,66 (br, 1H), 6,54 (s, 1H), 5,64-5,55 (m, 1H), 5,43 (s, 1H), 5,36-5,20 (m, 3H), 4,92-4,85 (m, 1H), 4,82-4,72 (m, 2H), 4,52-4,42 (m, 1H), 3,77-3,48 (m, 6H), 3,21-3,14 (m, 1H), 3,03-2,95 (m, 1H), 2,79-2,65 (m, 2H), 2,47-2,28 (m, 3H), 2,25-2,05 (m, 3H), 2,05-1,94 (m, 5H), 1,91-1,76 (m, 2H), 1,52-1,37 (m, 4H), 0,92-0,77 (m, 5H).

Exemplo 11

1-(((*S*)-7-Benzil-20-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-3,6,9,12,15-pentaoxo-2,5,8,11,14-penta-azaicosil)óxi)-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-

hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)ciclobutano-1-carboxamida **11**



Etapa 1

1-((2-((((9*H*-Fluoren-9-il)metóxi)carbonil)amino)acetamido)metóxi)ciclobutano-1-carboxilato de benzila **11b**

[380] 1-Hidroxiciclobutano-carboxilato de benzila **11a** (167 mg, 0,81 mmol, preparado de acordo com o método conhecido descrito em "*Journal de Medicinal Chemistry*, 2013, vol. 56, # 13, p. 5541 - 5552") e **8b** (150 mg, 0,41 mmol) foram adicionados ao frasco de reação, seguido pela adição de 5 mL de tetrahidrofurano. A solução de reação foi purgada com argônio três vezes e resfriada a 0-5°C em um banho de água gelada, seguido pela adição de terc-butóxido de potássio (92 mg, 0,82 mmol). O banho de água gelada foi removido, e a solução de reação foi aquecida à temperatura ambiente e agitada por 10 minutos. 20 mL de água gelada foram adicionados à solução de reação, que foi em seguida extraída com acetato de etila (5 mL×2) e clorofórmio (5 mL×5). As fases orgânicas foram combinadas e concentradas, e os resíduos resultantes foram dissolvidos em 3 mL de dioxano. 0,6 mL de água, bicarbonato de

sódio (41 mg, 0,48 mmol) e cloroformiato de 9-fluoreno metila (105 mg, 0,41 mmol) foram adicionados, e a solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 1 hora. 20 mL de água foram adicionados, e a solução de reação foi extraída com acetato de etila (8 mL×3). A fase orgânica foi lavada com solução de cloreto de sódio saturada (20 mL), seca sobre sulfato de sódio anidro e filtrada. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida. Os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de coluna em sílica gel com desenvolvimento do sistema de solvente C para obter o produto do título **11b** (37 mg, rendimento: 17,6%).

MS m/z (ESI): 514,6 [M+1].

Etapa 2

Ácido 1-((2-((((9*H*-fluoren-9-il)metóxi)carbonil)amino)acetamido)metóxi)ciclobutano-1-carboxílico **11c**

[381] **11b** (37 mg, 71,9 μmol) foi dissolvido em 3 mL de um solvente misturado de tetrahidrofurano e acetato de etila (V:V=2:1), seguido pela adição de paládio sobre carbono (15 mg, teor: 10%). A solução de reação foi purgada com hidrogênio três vezes e agitada à temperatura ambiente por 2 horas. A solução de reação foi filtrada através de celite, e o bolo do filtro foi lavado com tetrahidrofurano. O filtrado foi concentrado para obter o produto do título **11c** (35 mg, rendimento: 82%), que foi usado diretamente na próxima etapa.

Etapa 3

(9*H*-Fluoren-9-il)metil (2-(((1-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)carbamoil)ciclobutóxi)metil)amino)-2-oxoetil)carbamato **11d**

[382] **1b** (10 mg, 0,018 mmol) foi adicionado ao frasco de reação, seguido pela adição de 1 mL de *N*,*N*-dimetilformamida. A solução foi purgada com argônio três vezes, e resfriada a 0-5°C em um banho de

água gelada. Uma gota de trietilamina, **11c** (13 mg, 0,031 mmol) em 0,5 mL de *N*,*N*-dimetilformamida, e cloreto de 4-(4,6-dimetóxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio (25 mg, 0,091 mmol) foram adicionados, e a solução de reação foi agitada em um banho gelado por 40 minutos. 8 mL de água foram adicionados, e a solução de reação foi extraída com acetato de etila (5 mL×3). A fase orgânica foi lavada com solução de cloreto de sódio saturada (8 mL), seca sobre sulfato de sódio anidro e filtrada. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida, e os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de camada fina com desenvolvimento do sistema de solvente A para obter o produto do título **11d** (19 mg, rendimento: 73,9%).

MS m/z (ESI): 842,3 [M+1].

Etapa 4

1-((2-Aminoacetamido)metóxi)-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)ciclobutano-1-carboxamida **11e**

[383] **11d** (19 mg, 22,6 μmol) foi dissolvido em 2 mL de diclorometano, seguido pela adição de 1 mL de dietilamina. A solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 1,5 hora. A solução de reação foi concentrada sob pressão reduzida. 1 mL de tolueno foram adicionados e a solução foi concentrada sob pressão reduzida, o que foi repetido duas vezes. 4 mL de *n*-hexano foi adicionado para polpar, e a camada de cima de hexano foi vertida, o que foi repetido três vezes. A solução foi concentrada sob pressão reduzida para obter o produto do título bruto **11e** (15 mg), que foi usado diretamente na próxima etapa sem purificação.

Etapa 5

1-(((*S*)-7-Benzil-20-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-3,6,9,12,15-pentaoxo-2,5,8,11,14-penta-azaicosil)óxi)-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-

hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)ciclobutano-1-carboxamida **11**

[384] O composto bruto **11e** (2 mg, 3,22 μmol) foi dissolvido em 0,5 mL de *N*,*N*-dimetilformamida. A solução foi purgada com argônio três vezes, e resfriada a 0-5°C em um banho de água gelada. **8g** (1,5 mg, 3,17 μmol) in 0,3 mL de *N*,*N*-dimetilformamida, e cloreto de 4-(4,6-dimetóxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio (2,7 mg, 9,67 μmol) foram adicionados, e a solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 30 minutos. A solução de reação foi concentrada para secagem através de evaporação rotatória por uma bomba de óleo para remover DMF. Os resíduos foram dissolvidos em DCM, e purificados por cromatografia de camada fina duas vezes (desenvolvimento de polaridade de solvente: DCM/MeOH=10/1) para obter o produto do título **11** (1 mg, rendimento: 28,8%).

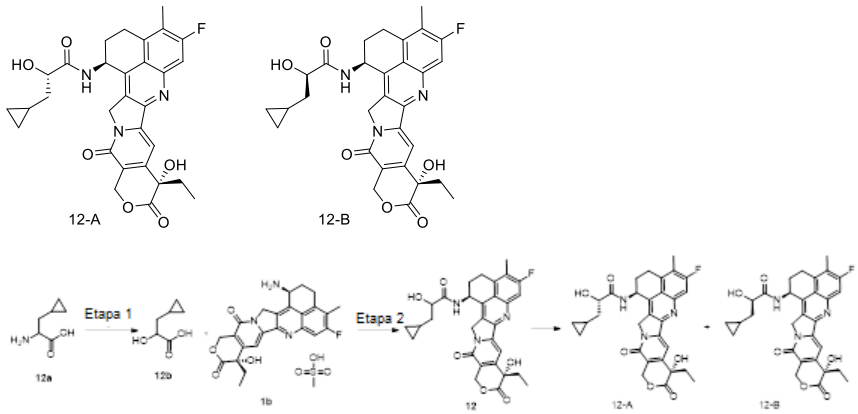
MS m/z (ESI): 1073,6 [M+1].

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8,70-8,60 (m, 1H), 8,28-8,19 (m, 1H), 8,13-7,91 (m, 3H), 7,79-7,71 (d, 1H), 7,29 (s, 1H), 7,25-7,09 (m, 4H), 6,98 (s, 1H), 6,71-6,62 (m, 1H), 6,55-6,47 (m, 1H), 5,64-5,54 (m, 2H), 5,40 (s, 1H), 5,35-5,27 (t, 2H), 5,17-5,10 (m, 2H), 4,60-4,51 (m, 1H), 4,51-4,35 (m, 2H), 3,93-3,78 (m, 3H), 3,71-3,59 (m, 3H), 3,01-2,88 (m, 3H), 2,70-2,64 (m, 2H), 2,44-2,30 (m, 3H), 2,28-2,14 (m, 3H), 2,11-1,92 (m, 6H), 1,90-1,76 (m, 3H), 1,51-1,39 (m, 4H), 0,92-0,75 (m, 6H).

Exemplo 12

(*S*)-3-Ciclopropil-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)-2-hidroxipropanamida **12-A**

(*R*)-3-Ciclopropil-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)-2-hidroxipropanamida **12-B**



Etapa 1

Ácido 3-ciclopropil-2-hidroxipropanoico **12b**

[385] **12a** (0,5 g, 3,87 mmol, fornecedor: Adamas) foi dissolvido em 35 mL de um solvente misturado de água e ácido acético (V:V=4:1), e a solução foi resfriada a 0-5°C em um banho de água gelada. Solução aquosa a 2M de nitrito de sódio (0,53 g, 7,74 mmol) foi adicionada em gotas, e a solução de reação foi aquecida à temperatura ambiente e agitada por 3 horas. Cloreto de sódio sólido foi adicionado à solução de reação para saturar a fase aquosa. A solução foi extraída com acetato de etila (8 mL×8), seca sobre sulfato de sódio anidro, e filtrada. O filtrado foi concentrado para obter o produto do título **12b** (0,45 g, rendimento: 89,3%).

Etapa 2

(*S*)-3-Ciclopropil-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)-2-hidroxipropanamida **12-A**

(*R*)-3-Ciclopropil-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)-2-hidroxipropanamida **12-B**

[386] 1,5 mL de etanol e 1,5 mL de *N*,*N*-dimetilformamida foram adicionados a **1b** (45 mg, 0,085 mmol). A solução foi purgada com argônio três vezes. 0,1 mL de *N*-metilmorfolina foi adicionado em gotas, e a solução de reação foi agitada até clarear. **12b** (90 mg, 0,691 mmol),

1-hidroxibenzotriazol (34 mg, 0,251 mmol) e cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (49 mg, 0,256 mmol) foram adicionados sucessivamente à solução de reação. Após finalização da adição, a solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 3 horas. A solução de reação foi concentrada sob pressão reduzida, e o composto bruto resultante **12** foi purificado por cromatografia líquida de alto desempenho (condições de separação: coluna: Sharpsil-T C18 5 μm 21,2*250 mm; fase móvel: A-water (10 mmol NH_4OAc), B-acetonitrila, eluição de gradiente, taxa de fluxo: 18 mL/min) para obter o produto do título (7 mg, 15 mg).

MS m/z (ESI): 547,9 [M+1].

[387] Composto com configuração única (tendo tempo de retenção mais curto)

[388] Análise UPLC: tempo de retenção: 1,345 minutos, pureza: 72% (coluna: ZORBAX Ecliphase Plus C18 1,8 μm 2,1*50mm, fase móvel: A-water (5 mmol NH_4OAc), B-acetonitrila).

^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8,42 (d, 1H), 7,78 (d, 1H), 7,30 (s, 1H), 6,51 (s, 1H), 5,60-5,50 (m, 2H), 5,42 (s, 1H), 5,19 (q, 2H), 4,02-4,00 (m, 1H), 3,21-3,11 (m, 2H), 2,39 (s, 3H), 2,21-2,07 (m, 2H), 2,05-1,95 (m, 1H), 1,92-1,68 (m, 4H), 1,53-1,41 (m, 1H),0,87 (t, 3H), 0,48-0,34 (m, 2H), 0,14-0,01 (m, 2H).

[389] Composto com configuração única (tendo tempo de retenção mais longo)

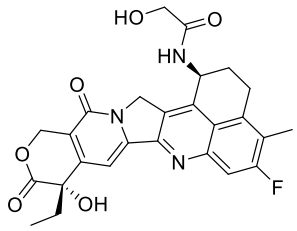
[390] Análise UPLC: tempo de retenção: 1,399 minutos, pureza: 88% (coluna: ZORBAX Ecliphase Plus C18 1,8 μm 2,1*50mm, fase móvel: A-water (5 mmol NH_4OAc), B-acetonitrila).

^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8,36 (d, 1H), 7,77 (d, 1H), 7,31 (s, 1H), 6,51 (s, 1H), 5,58-5,51 (m, 1H), 5,48 (d, 1H), 5,42 (s, 1H),5,20 (q, 2H), 4,09-4,02 (m, 1H), 3,22-3,11 (m, 2H), 2,39 (s, 3H), 2,27-2,06 (m, 2H), 2,05-1,95 (m, 1H), 1,93-1,81 (m, 2H), 1,65-1,43 (m,

2H), 1,32-1,21 (m, 1H), 0,87 (t, 3H), 0,48-0,33 (m, 2H), 0,14-0,01 (m, 2H).

Exemplo 13 (exemplo de referência)

N-((1*S*,9*S*)-9-Etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)-2-hidroxiacetamida



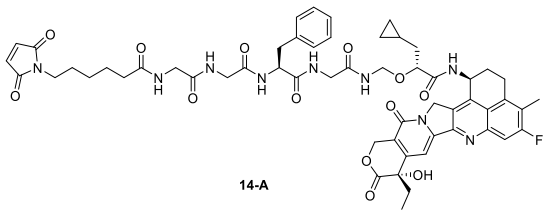
13

[391] O composto do título **13** foi preparado de acordo com o método descrito no Exemplo 76 na página 147 da descrição do pedido de patente EP2907824A1.

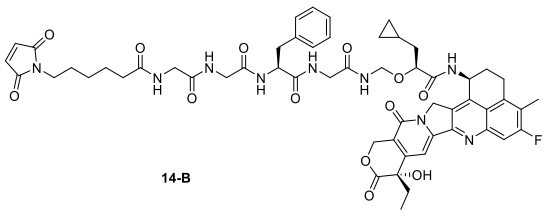
Exemplo 14

N-((2*R*,10*S*)-10-Benzil-2-(ciclopropilmetil)-1-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-1,6,9,12,15-pentaoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetra-azahexadecan-16-il)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamida **14-A**

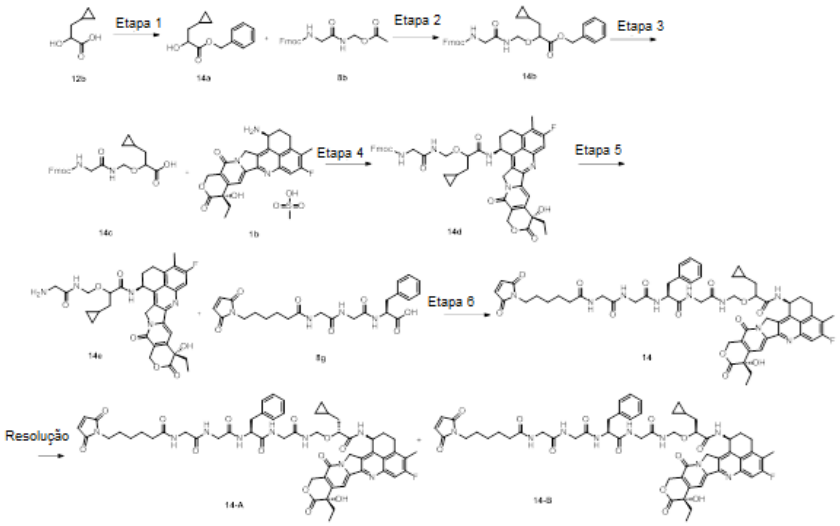
N-((2*S*,10*S*)-10-Benzil-2-(ciclopropilmetil)-1-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-1,6,9,12,15-pentaoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetra-azahexadecan-16-il)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamida **14-B**



14-A



14-B



Etapa 1

3-Ciclopropil-2-hidroxipropanoato de benzila **14a**

[392] **12b** (200 mg, 1,54 mmol) foi dissolvido em 20 mL de acetonitrila, e em seguida adicionado com carbonato de potássio (1,06 g, 7,68 mmol), brometo de benzila (0,16 mL, 1,34 mmol) e iodeto de tetrabutilamônio (28 mg, 0,07 mmol) sucessivamente. A solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 48 horas, e filtrada através de celite. O bolo do filtro foi lavado com acetato de etila (10 ml), e os filtrados foram combinados e concentrados sob pressão reduzida. Os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de coluna em sílica gel com desenvolvimento do sistema de solvente C para obter o produto do título **14a** (140 mg, rendimento: 41,3%).

Etapa 2

10-(Ciclopropilmetil)-1-(9*H*-fluoren-9-il)-3,6-dioxo-2,9-dioxa-4,7-diazaundecan-11-oato de benzila **14b**

[393] **14a** (94 mg, 0,427 mmol) e **8b** (130 mg, 0,353 mmol) foram adicionados ao frasco de reação, seguido pela adição de 10 mL de tetrahidrofurano. A solução de reação foi purgada com argônio três vezes e resfriada a 0-5°C em um banho de água gelada, seguido pela adição de terc-butóxido de potássio (79 mg, 0,704 mmol). O banho de água gelada foi removido, e a solução de reação foi aquecida à temperatura

ambiente e agitada por 10 minutos. 20 mL de água gelada foram adicionados à solução de reação, que foi em seguida extraída com acetato de etila (10 mL×4). A fase orgânica foi lavada com solução de cloreto de sódio saturada (20 mL), seca sobre sulfato de sódio anidro, e filtrada. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida. Os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de coluna em sílica gel com desenvolvimento do sistema de solvente C para obter o produto do título **14b** (50 mg, rendimento: 26,8%).

MS m/z (ESI): 529,2 [M+1].

Etapa 3

Ácido 10-(ciclopropilmetil)-1-(9*H*-fluoren-9-il)-3,6-dioxo-2,9-dioxa-4,7-diazaundecan-11-oico **14c**

[394] **14b** (27 mg, 0,051 mmol) foi dissolvido em 3 mL de acetato de etila, seguido pela adição de paládio sobre carbono (7 mg, teor: 10%, seca). A solução de reação foi purgada com hidrogênio três vezes e agitada à temperatura ambiente por 1 hora. A solução de reação foi filtrada através de celite, e o bolo do filtro foi lavado com acetato de etila. O filtrado foi concentrado para obter o produto do título bruto **14c** (23 mg), que foi usado diretamente na próxima etapa sem purificação.

MS m/z (ESI): 439,1 [M+1].

Etapa 4

(9*H*-Fluoren-9-il)metil (2-((((3-ciclopropil-1-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-1-oxopropan-2-il)óxi)metil)amino)-2-oxoetil)carbamato **14d**

[395] **1b** (22 mg, 42,38 μmol) foi adicionado ao frasco de reação, seguido pela adição de 3 mL de *N*,*N*-dimetilformamida. A solução foi purgada com argônio três vezes, e resfriada a 0-5°C em um banho de água gelada. Trietilamina (4,3 mg, 42,49 μmol) foi adicionada em gotas, e em seguida adicionada com composto bruto **14c** (23 mg, 51,1 μmol)

e cloreto de 4-(4,6-dimetóxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio (17,6 mg, 63,6 μmol). A solução de reação foi agitada em um banho gelado por 40 minutos. 15 mL de água foram adicionados, e a solução de reação foi extraída com acetato de etila (8 mL×3). As fases orgânicas foram combinadas. A fase orgânica foi lavada com solução de cloreto de sódio saturada (15 mL), seca sobre sulfato de sódio anidro e filtrada. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida. Os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de camada fina com desenvolvimento do sistema de solvente B para obter o produto do título **14d** (29 mg, rendimento: 79,9%).

MS m/z (ESI): 856,1[M+1].

Etapa 5

2-((2-Aminoacetamido)metóxi)-3-ciclopropil-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)propanamida **14e**

[396] **14d** (29 mg, 33,9 μmol) foi dissolvido em 0,8 mL de diclorometano, seguido pela adição de 0,4 mL de dietilamina. A solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 1,5 hora. A solução de reação foi concentrada sob pressão reduzida. 1 mL de tolueno foram adicionados e a solução foi concentrada sob pressão reduzida, o que foi repetido duas vezes. 3 mL de n-hexano foram adicionados aos resíduos para polpar, e o sobrenadante foi vertido após permanecer por um instante, o que foi repetido três vezes. Os resíduos foram concentrados sob pressão reduzida por uma bomba de óleo até secura para obter o produto do título bruto **14e** (22 mg), que foi usado diretamente na próxima etapa sem purificação.

MS m/z (ESI): 634,1[M+1].

Etapa 6

N-((2*R*,10*S*)-10-Benzil-2-(ciclopropilmetil)-1-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-

benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-1,6,9,12,15-pentaoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetra-azahexadecan-16-il)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamida **14-A**

N-((2*S*,10*S*)-10-Benzil-2-(ciclopropilmetil)-1-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-1,6,9,12,15-pentaoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetra-azahexadecan-16-il)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamida **14-B**

[397] O composto bruto **14e** (22 mg, 33,9 μmol) foi dissolvido em 2,5 mL de *N*,*N*-dimetilformamida. A solução foi purgada com argônio três vezes, e resfriada a 0-5°C em um banho de água gelada. **8g** (24 mg, 50,8 μmol) e cloreto de 4-(4,6-dimetóxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio (14 mg, 50,6 μmol) foram adicionados sucessivamente. O banho de água gelada foi removido, e a solução de reação foi aquecida à temperatura ambiente e agitada por 1 hora para obter composto **14**. A solução de reação foi purificada por cromatografia líquida de alto desempenho (condições de separação: coluna: XBridge Prep C18 OBD 5 μm 19*250 mm; fase móvel: A-water (10 mmol NH_4OAc), B-acetonitrila, eluição de gradiente, taxa de fluxo: 18 mL/min) para obter os produtos do título (2 mg, 2 mg).

MS m/z (ESI): 1088,4 [M+1].

[398] Composto com configuração única (tendo tempo de retenção mais curto):

[399] Análise UPLC: tempo de retenção: 1,18 minutos, pureza: 88% (coluna: ACQUITY UPLC BEHC18 1,7 μm 2,1*50mm, fase móvel: A-water (5 mmol NH_4OAc), B-acetonitrila).

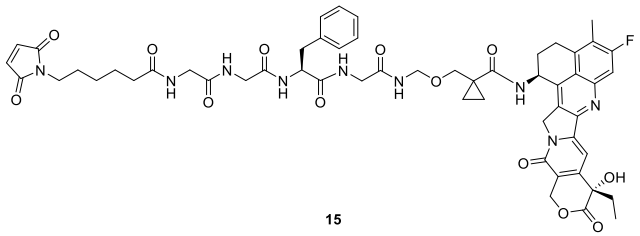
[400] Composto com configuração única (tendo tempo de retenção mais longo):

[401] Análise UPLC: tempo de retenção: 1,23 minutos, pureza: 96%

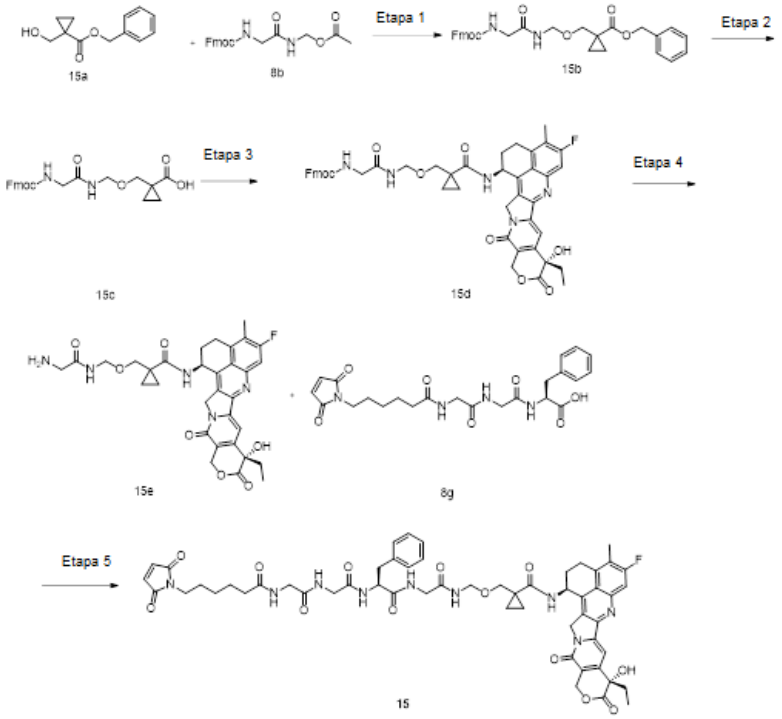
(coluna: ACQUITY UPLC BEHC18 1,7 µm 2,1*50mm, fase móvel: A-water (5 mmol NH_4OAc), B-acetonitrila).

Exemplo 15

1-((*S*)-9-Benzil-22-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-5,8,11,14,17-pentaoxo-2-oxa-4,7,10,13,16-penta-azadocosil)-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3,4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)ciclopropano-1-carboxamida **15**



15



Etapa 1

1-(10-(9*H*-Fluoren-9-il)-5,8-dioxo-2,9-dioxa-4,7-diazadecil)ciclopropano-1-carboxilato de benzila **15b**

[402] **8b** (500 mg, 1,35 mmol) foi adicionado ao frasco de reação,

seguido pela adição de 6 mL de tetrahidrofurano. 1-Hidroximetilciclopropano-1-carboxilato de benzila **15a** (233 mg, 1,13 mmol; preparado de acordo com o método descrito no Exemplo 22-2 na página 262 da descrição do pedido de patente “EP2862856A1”) foi adicionado ao frasco de reação. A solução de reação foi purgada com argônio três vezes e resfriada a 0-5°C em um banho de água gelada, seguido pela adição de hidreto de sódio (54 mg, 1,35 mmol). O banho de água gelada foi removido, e a solução de reação foi aquecida à temperatura ambiente e agitada por 40 minutos. A solução de reação foi resfriada a0°C, à qual 20 mL de água gelada foram adicionados. A solução foi extraída com acetato de etila (5 mL×2) e clorofórmio (5 mL×5). As fases orgânicas foram combinadas, lavadas com solução de cloreto de sódio saturada (20 mL), secas sobre sulfato de sódio anidro e filtradas. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida, e os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de coluna em sílica gel com desenvolvimento do sistema de solvente B para obter o produto do título **15b** (15 mg, rendimento: 2,5%).

MS m/z (ESI): 515,2 [M+1].

Etapa 2

Ácido 1-(10-(9*H*-Fluoren-9-il)-5,8-dioxo-2,9-dioxa-4,7-diazadecil)ciclopropano-1-carboxílico **15c**

[403] **15b** (15 mg, 0,029 mmol) foi dissolvido em 2 mL de acetato de etila, seguido pela adição de paládio sobre carbono (3 mg, teor: 10%, seco). A solução de reação foi purgada com hidrogênio três vezes e agitada à temperatura ambiente por 4,5 horas. A solução de reação foi filtrada através de celite, e o bolo do filtro foi lavado com acetato de etila. O filtrado foi concentrado para obter o produto do título **15c** (11 mg, rendimento: 89%).

MS m/z (ESI): 425,2 [M+1].

Etapa 3

(9*H*-Fluoren-9-il)metil (2-((((1-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)carbamoil)ciclopropil)metóxi)metil)amino)-2-oxoetil)carbamato **15d**

[404] **1b** (10 mg, 0,021 mmol) foi adicionado ao frasco de reação, seguido pela adição de 1 mL de *N*,*N*-dimetilformamida. A solução foi purgada com argônio três vezes, e resfriada a 0-5°C em um banho de água gelada. Uma gota de trietilamina, **15c** (11 mg, 0,026 mmol) e cloreto de 4-(4,6-dimetóxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio (10,7 mg, 0,039 mmol) foram adicionados. Após finalização da adição, a solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 60 minutos. 10 mL de água foram adicionados, e a solução de reação foi extraída com acetato de etila (5 mL×3). A fase orgânica foi lavada com solução de cloreto de sódio saturada (10 mL), seca sobre sulfato de sódio anidro e filtrada. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida, e os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de camada fina com desenvolvimento do sistema de solvente B para obter o produto do título **15d** (19 mg, rendimento: 87,0%).

MS m/z (ESI): 842,2 [M+1].

Etapa 4

1-(((2-Aminoacetamido)metóxi)metil)-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)ciclopropano-1-carboxamida **15e**

[405] **15d** (19 mg, 22,56 μmol) foi dissolvido em 2 mL de diclorometano, seguido pela adição de 1 mL de dietilamina. A solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 1,5 horas. A solução de reação foi concentrada sob pressão reduzida a 0°C. 1 mL de tolueno foram adicionados e a solução foi concentrada sob pressão reduzida, o que foi repetido duas vezes. 3 mL de n-hexano foram adicionados para

polpar, e a camada de cima de hexano foi vertida, o que foi repetido três vezes. A solução foi concentrada sob pressão reduzida para obter o produto do título bruto **15e** (13,9 mg), que foi usado diretamente na próxima etapa sem purificação.

MS m/z (ESI): 620,1 [M+1].

Etapa 5

1-((*S*)-9-Benzil-22-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-5,8,11,14,17-pentaoxo-2-oxa-4,7,10,13,16-penta-azadocosil)-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3,4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)ciclopropano-1-carboxamida **15**

[406] O composto bruto **15e** (13,9 mg, 22,4 μmol) foi dissolvido em 1 mL de *N*,*N*-dimetilformamida. A solução foi purgada com argônio três vezes, e resfriada a 0-5°C em um banho de água gelada. **8g** (15,8 mg, 33,4 μmol) e cloreto de 4-(4,6-dimetóxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio (9,3 mg, 33,6 μmol) foram adicionados. A solução de reação foi aquecida à temperatura ambiente e agitada por 60 minutos. A solução de reação foi purificada por cromatografia líquida de alto desempenho (condições de separação: coluna: XBridge Prep C18 OBD 5 μm 19*250 mm; fase móvel: A-water (10 mmol NH_4OAc), B-acetonitrila, eluição de gradiente, taxa de fluxo: 18 mL/min). As frações correspondentes foram coletadas, e concentradas sob pressão reduzida para obter o produto do título **15** (2,5 mg, rendimento: 10,3%).

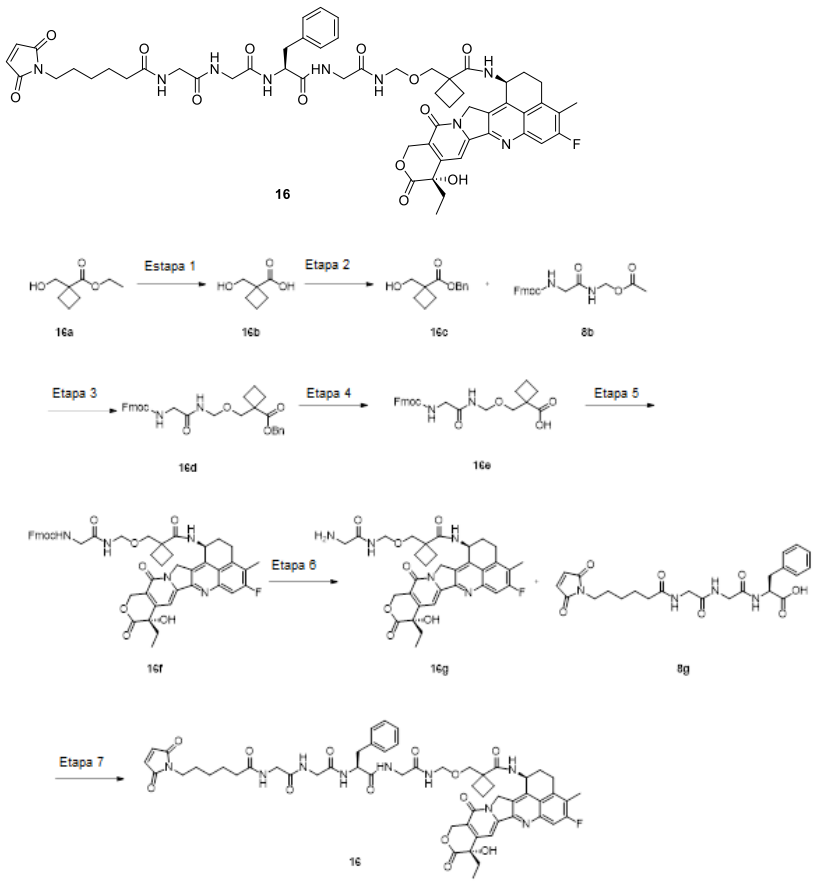
MS m/z (ESI): 1074,2 [M+1].

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8,51-8,37 (m, 1H), 8,22 (t, 1H), 8,14-8,02 (m, 2H), 8,011-7,94 (m, 1H), 7,82-7,73 (m, 1H), 7,29 (s, 1H), 7,26-7,10 (m, 3H), 6,98 (s, 1H), 6,53-6,47 (m, 1H), 5,62-5,50 (m, 1H), 5,45-5,36 (m, 1H), 5,35-5,23 (m, 2H), 5,13-5,02 (m, 2H), 4,61-4,50 (m, 2H), 4,42-4,28 (m, 2H), 3,76-3,61 (m, 3H), 3,60-3,45 (m, 3H), 3,27-3,23 (m, 1H), 3,20-2,81 (m,7H), 2,75-2,61 (m, 3H), 241-2,28 (m, 3H),

2,23-2,13 (m, 2H), 2,11-2,01 (m, 1H), 2,03-1,94 (m, 1H), 1,90 (s, 1H), 1,87-1,74 (m, 2H), 1,53-1,36 (m, 3H), 1,29-1,08 (m, 4H), 0,90-0,68 (m, 4H).

Exemplo 16

1-((*S*)-9-Benzil-22-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-5,8,11,14,17-pentaoxo-2-oxa-4,7,10,13,16-penta-azadocosil)-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)ciclobutano-1-carboxamida **16**



Etapa 1

Ácido 1-(hidroximetil)ciclobutano-1-carboxílico **16b**

[407] 1-(Hidroximetil)ciclobutanocarboxilato de etila **16a** (250 mg, 1,58 mmol, fornecedor: Alfa) foi dissolvido em metanol (2 mL) e água (1 mL), seguido pela adição de hidróxido de sódio (126 mg, 3,15 mmol). A solução de reação foi aquecida to 40°C e agitada por 3 horas. A solução

de reação foi resfriada à temperatura ambiente, e concentrada sob pressão reduzida para remover o solvente orgânico. A solução foi extraída com éter (10 mL), e a camada aquosa foi coletada. A fase aquosa foi ajustada para pH 3-4 com ácido clorídrico aquoso a 6N, e concentrada sob pressão reduzida para obter um sólido. 3 mL de tolueno foram adicionados e a solução foi concentrada sob pressão reduzida até secura, o que foi repetido três vezes. Os resíduos foram secos por uma bomba de óleo para obter o produto do título bruto **16b** (206 mg), que foi usado diretamente na próxima etapa sem purificação.

MS m/z (ESI，NEG):129,2 [M-1].

Etapa 2

1-(Hidroximetil)ciclobutano-1-carboxilato de benzila **16c**

[408] O composto bruto **16b** (206 mg, 1,58 mmol) foi dissolvido em acetonitrila (15 mL), seguido pela adição de carbonato de potássio anidro (1,09 g, 7,90 mmol), iodeto de tetrabutilamônio (29 mg, 78,51 μmol) e brometo de benzila (216 mg, 1,26 mmol). A solução de reação foi agitada à temperatura ambiente durante a noite. A solução de reação foi filtrada, e o filtrado foi concentrado sob pressão reduzida. Os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de coluna em sílica gel com desenvolvimento do sistema de solvente C para obter o produto do título **16c** (112 mg, rendimento: 32,1%).

MS m/z (ESI): 221,1 [M+1].

Etapa 3

Benzila 1-(10-(9*H*-fluoren-9-il)-5,8-dioxo-2,9-dioxa-4,7-diazadecil)ciclobutano-1-carboxilato **16d**

[409] **16c** (77 mg, 0,35 mmol) e **8b** (100 mg, 0,27 mmol) foram adicionados ao frasco de reação, seguido pela adição de 3 mL de tetrahidrofurano. A solução de reação foi purgada com argônio três vezes e resfriada a 0-5°C em um banho de água gelada, seguido pela adição de terc-butóxido de potássio (61 mg, 0,54 mmol). A solução de reação foi

agitada no banho de água gelada por 10 minutos. 20 mL de água gelada foram adicionados à solução de reação, que foi em seguida extraída com acetato de etila (5 mL) e clorofórmio (5 mL×5). As fases orgânicas foram combinadas e concentradas. Os resíduos resultantes foram dissolvidos em 3 mL de 1,4-dioxano. 0,5 mL de água, bicarbonato de sódio (27 mg, 0,32 mmol) e cloroformiato de 9-fluoreno metila (70 mg, 0,27 mmol) foram adicionados, e a solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 1 hora. 20 mL de água foram adicionados, e a solução de reação foi extraída com acetato de etila (10 mL×3). A fase orgânica foi lavada com solução de cloreto de sódio saturada (20 mL), seca sobre sulfato de sódio anidro e filtrada. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida. Os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de coluna em sílica gel com desenvolvimento do sistema de solvente C para obter o produto do título **16d** (24 mg, rendimento: 16,7%).

MS m/z (ESI): 551,3 [M+23].

Etapa 4

1-(10-(9*H*-Fluoren-9-il)-5,8-dioxo-2,9-dioxa-4,7-diazadecil)ciclobutano-1-carboxílico **16e**

[410] **16d** (12 mg, 22,7 μmol) foi dissolvido em 1,5 mL de um solvente misturado de tetrahidrofurano e acetato de etila (V:V=2:1), seguido pela adição de paládio sobre carbono (5 mg, teor: 10%). A solução de reação foi purgada com hidrogênio três vezes e agitada à temperatura ambiente por 2 horas. A solução de reação foi filtrada através de celite, e o bolo do filtro foi lavado com acetato de etila. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida para obter o produto do título bruto **16e** (10 mg), que foi usado diretamente na próxima etapa sem purificação.

Etapa 5

(9*H*-Fluoren-9-il)metil (2-((((1-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-

10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)carbamoil)ciclobutil)metóxi)metil)amino)-2-oxoetil)carbamato **16f**

[411] **1b** (7,5 mg, 0,014 mmol) foi adicionado ao frasco de reação, seguido pela adição de 1 mL de *N*,*N*-dimetilformamida. A solução foi purgada com argônio três vezes, e resfriada a 0-5°C em um banho de água gelada. Uma gota de trietilamina, o composto bruto **16e** (10 mg) in 0,5 mL de *N*,*N*-dimetilformamida, e cloreto de 4-(4,6-dimetóxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio (6 mg, 0,026 mmol) foram adicionados, e a solução de reação foi agitada em um banho gelado por 30 minutos. 10 mL de água foram adicionados, e a solução de reação foi extraída com acetato de etila (10 mL×3). A fase orgânica foi lavada com solução de cloreto de sódio saturada (10 mL), seca sobre sulfato de sódio anidro e filtrada. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida, e os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de camada fina com desenvolvimento do sistema de solvente B para obter o produto do título **16f** (10,6 mg, rendimento: 87,8%).

MS m/z (ESI): 856,2 [M+1].

Etapa 6

1-(((2-Aminoacetamido)metóxi)metil)-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)ciclobutano-1-carboxamida **16g**

[412] **16f** (10,6 mg, 12,4 μmol) foi dissolvido em 0,6 mL de diclorometano, seguido pela adição de 0,3 mL de dietilamina. A solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 2 horas. A solução de reação foi concentrada sob pressão reduzida. 2 mL de tolueno foram adicionados e a solução foi concentrada sob pressão reduzida, o que foi repetido duas vezes. 3 mL de n-hexano foram adicionados para polpar, e a camada de cima de hexano foi vertida, o que foi repetido três vezes.

A solução foi concentrada sob pressão reduzida para obter o produto do título bruto **16g** (8 mg), que foi usado diretamente na próxima etapa sem purificação.

MS m/z (ESI): 634,1 [M+1].

Etapa 7

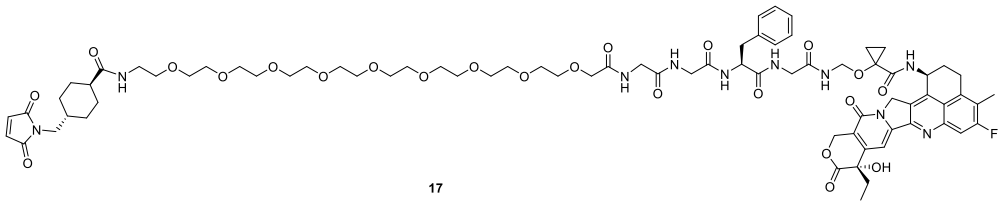
1-((*S*)-9-Benzil-22-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-5,8,11,14,17-pentaoxo-2-oxa-4,7,10,13,16-penta-azadocosil)-*N*-((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)ciclobutano-1-carboxamida **16**

[413] O composto bruto **16g** (8 mg) foi dissolvido em 1 mL de *N*,*N*-dimetilformamida. **8g** (8,8 mg, 18,6 μmol) e cloreto de 4-(4,6-dimetóxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio (5,2 mg, 18,8 μmol) foram adicionados. A solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 30 minutos. A solução de reação foi purificada por cromatografia líquida de alto desempenho (condições de separação: coluna: XBridge Prep C18 OBD 5 μm 19*250 mm; fase móvel: A-water (10 mmol NH_4OAc), B-acetonitrila, eluição de gradiente, taxa de fluxo: 18 mL/min) para obter o produto do título **16** (1,0 mg, rendimento: 7,2%).

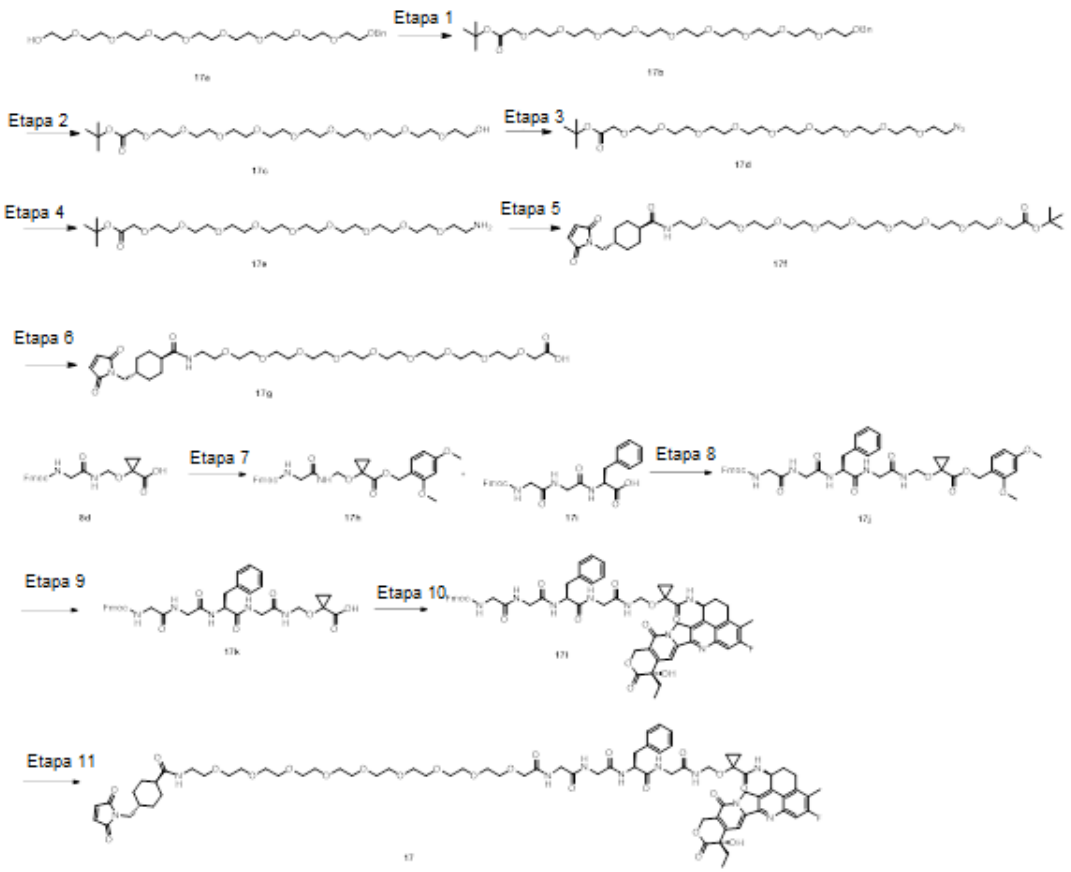
MS m/z (ESI): 1088,0 [M+1].

Exemplo 17

(1*r*,4*r*)-*N*-((*S*)-7-Benzil-1-(1-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)carbamoil)ciclopropóxi)-3,6,9,12,15-pentaoxo-17,20,23,26,29,32,35,38,41-nonaoxa-2,5,8,11,14-penta-azatritetracontan-43-il)-4-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)metil)ciclohexano-1-carboxamida **17**



17



Etapa 1

1-fenil-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29-decaoxahentriacontan-31-oato de *terc*-butila **17b**

[414] 1-Fenil-2,5,8,11,14,17,20,23,26-nonaoxaoctacosan-28-ol **17a** (0,34 g, 0,67 mmol, fornecedor: Bide Pharmatech Ltd.) foi dissolvido em 10 mL de diclorometano, e em seguida adicionado com silver óxido (0,24 g, 1,01 mmol), bromoacetato de *terc*-butila (0,16 g, 0,81 mmol) e iodeto de potássio (0,07 g, 0,40 mmol) sucessivamente. A solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 3 horas. A solução de reação foi filtrada, e o filtrado foi concentrado sob pressão reduzida. Os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de coluna em sílica gel com desenvolvimento do sistema de solvente B para obter o produto do título **17b** (0,42 g, rendimento: 100%).

MS m/z (ESI): 636,3 [M+18].

Etapa 2

29-hidróxi-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxanonacosan-1-oato de *terc*-butila **17c**

[415] **17b** (417 mg, 0,67 mmol) foi dissolvido em 15 mL de tetrahidrofurano, seguido pela adição de paládio sobre carbono (110 mg, teor: 10%, seco). A solução de reação foi purgada com hidrogênio três vezes, aquecida para 60°C e agitada por 3 horas. A solução de reação foi filtrada através de celite, e o bolo do filtro foi lavado com tetrahidrofurano. O filtrado foi concentrado para obter o produto do título bruto **17c** (357 mg), que foi usado diretamente na próxima etapa sem purificação.

MS m/z (ESI): 546,2 [M+18].

Etapa 3

29-Azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxanonacosan-1-oato **17d de** *terc*-butila

[416] **17c** (357 mg, 0,675 mmol) foi dissolvido em 10 mL de tolueno, seguido pela adição de difenil azide fosfato (279 mg, 1,014 mmol) e 1,8-diazabiciclоundec-7-eno (206 mg, 1,353 mmol). A solução de reação foi purgada com argônio três vezes, e agitada à temperatura ambiente por 2 horas, seguida por agitação a 105°C por 19 horas. A solução de reação foi resfriada à temperatura ambiente e concentrada. 20 mL de água foram adicionados, e a solução foi extraída com acetato de etila (10 mL×4). A fase orgânica foi lavada com solução de cloreto de sódio saturada (20 mL), seca sobre sulfato de sódio anidro e filtrada. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida. Os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de coluna em sílica gel com desenvolvimento do sistema de solvente B para obter o produto do título bruto **17d** (412 mg).

MS m/z (ESI): 571,3 [M+18].

Etapa 4

29-amino-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxanonacosan-1-oato de *terc*-butila **17e**

[417] **17d** (230 mg, 0,415 mmol) foi dissolvido em 8 mL de tetrahidrofurano, seguido pela adição de paládio sobre carbono (58 mg, teor: 10%, seco). A solução de reação foi purgada com hidrogênio três vezes, e agitada à temperatura ambiente por 2 horas. A solução de reação foi filtrada através de celite, e o bolo do filtro foi lavado com tetrahidrofurano. O filtrado foi concentrado para obter o produto do título bruto **17e** (220 mg), que foi usado diretamente na próxima etapa sem purificação.

MS m/z (ESI): 528,2 [M+1].

Etapa 5

1-((1*r*,4*r*)-4-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)metil)ciclohexil)-1-oxo-5,8,11,14,17,20,23,26,29-nonaoxa-2-azahentriacontan-31-oato de *terc*-butila **17f**

[418] Ácido (1*r*,4*r*)-4-((2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)metil) ciclohexano-1-carboxílico (98,5 mg, 0,415 mmol) foi dissolvido em 10 mL de diclorometano, seguido pela adição de hexafluorofosfato de 2-(7-oxabenzotriazol)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetrametilureia (190 mg, 0,500 mmol) e *N*,*N*-diisopropiletilamina (162 mg, 1,253 mmol). A solução de reação foi purgada com argônio três vezes, e em seguida adicionado com o composto bruto **17e** (220 mg, 0,417 mmol). A solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 1 hora. 15 mL de água foram adicionados, e a solução de reação foi extraída com diclorometano (8 mL×3). As fases orgânicas foram combinadas. A fase orgânica foi lavada com solução de cloreto de sódio saturada (15 mL), seca sobre sulfato de sódio anidro e filtrada. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida. Os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de coluna em sílica gel com desenvolvimento do sistema de solvente B para obter o produto do título **17f** (122 mg, rendimento: 39,2%).

MS m/z (ESI): 747,2[M+1].

Etapa 6

Ácido 1-((1*r*,4*r*)-4-((2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)metil)ciclohexil)-

1-oxo-5,8,11,14,17,20,23,26,29-nonaoxa-2-azahentriacontan-31-oico **17g**

[419] **17f** (122 mg, 0,163 mmol) foi dissolvido em 0,8 mL de diclorometano, seguido pela adição de 0,4 mL de ácido trifluoroacético. A solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 1 hora. 15 mL de diclorometano foram adicionados para diluir a solução de reação, e em seguida concentrados sob pressão reduzida. 10 mL de *n*-hexano foram adicionados e a solução foi concentrada sob pressão reduzida, o que foi repetido duas vezes. 10 mL de tolueno foram adicionados e a solução foi concentrada sob pressão reduzida. 10 mL de um solvente misturado de *n*-hexano: éter = 5:1 foi adicionado para polpar, o que foi repetido três vezes até o pH cehgar a 7. A solução foi concentrada por uma bomba de óleo até secura para obter o produto do título **17g** (98 mg, rendimento: 86,8%).

MS m/z (ESI): 691,2[M+1].

Etapa 7

2,4-Dimetoxibenzil 1-((2-((((9*H*-fluoren-9-il)metóxi)carbonil)amino)acetamido)metóxi)ciclopropano-1-carboxilato **17h**

[420] **8d** (164 mg, 0,40 mmol) foi dissolvido em diclorometano (5 mL), e em seguida adicionado com álcool 2,4-dimetoxibenzílico (81 mg, 0,48 mmol), cloridrato de 1-etil-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (115 mg, 0,60 mmol) e 4-dimetilaminopiridina (5 mg, 0,041 mmol). Após finalização da adição, a solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 1 hora. 20 mL de água foram adicionados, e a solução foi particionada após agitação. A fase aquosa foi extraída com diclorometano (8 mL×3), e as fases orgânicas foram combinadas. A fase orgânica foi lavada com solução de cloreto de sódio saturada (20 mL), seca sobre sulfato de sódio anidro e filtrada. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida. Os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de coluna em sílica gel com desenvolvimento do sistema de solvente C

para obter o produto do título **17h** (124 mg, rendimento: 55,4%).

MS m/z (ESI): 583,1[M+23].

Etapa 8

2,4-Dimetoxibenzil (*S*)-1-((11-benzil-1-(9*H*-fluoren-9-il)-3,6,9,12,15-pentaoxo-2-oxa-4,7,10,13,16-penta-azaheptadecan-17-il)óxi)ciclopropano-1-carboxilato **17j**

[421] **17h** (39 mg, 69,6 μmol) foi dissolvido em 0,6 mL de diclorometano, seguido pela adição de 0,3 mL de dietilamina. A solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 1 hora. A solução de reação foi concentrada sob pressão reduzida. 2 mL de tolueno foram adicionados e a solução foi concentrada sob pressão reduzida, o que foi repetido duas vezes. 3 mL de n-hexano foram adicionados para polpar, e a camada de cima de hexano foi vertida, o que foi repetido três vezes. A solução foi concentrada sob pressão reduzida. O produto bruto resultante foi dissolvido em 2 mL de *N*,*N*-dimetilformamida, seguido pela adição de (((9*H*-fluoren-9-il)metóxi)carbonil) glicilglicil-*L*-fenilalanina **17i** (35 mg, 69,8 μmol, preparado de acordo com o método descrito no Exemplo 7-12 na página 13 da descrição do pedido de patente “CN108853514A”) e cloreto de 4-(4,6-dimetóxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio (23 mg, 83,1 μmol). A solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 1 hora. 10 mL de água foram adicionados, e a solução foi extraída com acetato de etila (10 mL×3). As fases orgânicas foram combinadas. A fase orgânica foi lavada com solução de cloreto de sódio saturada (10 mL×2), seca sobre sulfato de sódio anidro e filtrada. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida. Os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de camada fina com desenvolvimento do sistema de solvente B para obter o produto do título **17j** (48 mg, rendimento: 83,9%).

MS m/z (ESI): 822,0[M+1].

Etapa 9

Ácido (*S*)-1-((11-Benzil-1-(9*H*-fluoren-9-il)-3,6,9,12,15-pentaoxo-2-oxa-4,7,10,13,16-penta-azaheptadecan-17-il)óxi)ciclopropano-1-carboxílico **17k**

[422] **17j** (48 mg, 58,4 μmol) foi dissolvido em 1,4 mL de ácido dicloroacético a 3% (v/v) em diclorometano, e a solução foi resfriada a 0-5°C em um banho de água gelada. Trietilsilano (21 mg, 180,6 μmol) foi adicionado, e a solução de reação foi agitada em um banho gelado por 3 horas. A solução de reação foi concentrada sob pressão reduzida no banho gelado para remover metade do solvente orgânico. 5 mL de éter foram adicionados, e a solução foi naturalmente aquecida até à temperatura ambiente e polpada. Um sólido branco foi precipitado e filtrado. O bolo do filtro foi coletado e seco por uma bomba de óleo para obter o produto do título **17k** (33 mg, rendimento: 84,1%).

Etapa 10

(9*H*-Fluoren-9-il)metil ((*S*)-7-benzil-1-(1-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)carbamoil)ciclopropóxi)-3,6,9,12-tetraoxo-2,5,8,11-tetra-azatridecan-13-il)carbamato **17l**

[423] **1b** (20 mg, 42,4 μmol) foi adicionado ao frasco de reação, seguido pela adição de 1 mL de metanol a 10% (v/v) em diclorometano. A solução foi purgada com argônio três vezes, e resfriada a 0-5°C em um banho de água gelada. Uma gota de trietilamina foi adicionada, e a solução de reação foi agitada até **1b** ser dissolvido. **17k** (33 mg, 49,1 μmol) foi dissolvido em 1 mL de metanol a 10% (v/v) em diclorometano. A solução resultante foi adicionada em gotas à solução de reação acima, seguido pela adição de cloreto de 4-(4,6-dimetóxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio (17,6 mg, 63,6 μmol). A solução de reação foi aquecida à temperatura ambiente e agitada por 1 hora. 10 mL de diclorometano e 5 mL de água foram adicionados, e a solução foi agitada por 5 minutos

e deixada para particionamento. A fase orgânica foi coletada. A fase aquosa foi extraída com diclorometano (10 mL×3), e as fases orgânicas foram combinadas. A fase orgânica foi lavada com solução de cloreto de sódio saturada (10 mL×2), seca sobre sulfato de sódio anidro e filtrada. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida. Os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de camada fina com desenvolvimento do sistema de solvente B para obter o produto do título **17l** (37 mg, rendimento: 80,2%).

MS m/z (ESI): 1090,1[M+1].

Etapa 11

(1*r*,4*r*)-*N*-((*S*)-7-Benzil-1-(1-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)carbamoil)ciclopropóxi)-3,6,9,12,15-pentaoxo-17,20,23,26,29,32,35,38,41-nonaoxa-2,5,8,11,14-penta-azatritetracontan-43-il)-4-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)metil)ciclohexano-1-carboxamida **17**

[424] **17l** (15,5 mg, 14,23 μmol) foi dissolvido em 0,6 mL de diclorometano, seguido pela adição de 0,3 mL de dietilamina. A solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 1,5 horas. A solução de reação foi concentrada sob pressão reduzida. 2 mL de tolueno foram adicionados e a solução foi concentrada sob pressão reduzida, o que foi repetido duas vezes. 3 mL de n-hexano foram adicionados para polpar, e a camada de cima de hexano foi vertida, o que foi repetido três vezes. A solução foi concentrada sob pressão reduzida e seca por uma bomba de óleo. O produto bruto resultante foi dissolvido em 1 mL de *N*,*N*-dimetilformamida. **17g** (11 mg, 15,92 μmol) e cloreto de 4-(4,6-dimetóxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio (6,0 mg, 21,68 μmol) foram adicionados. A solução de reação foi purgada com argônio três vezes, e agitada à temperatura ambiente por 30 minutos. A solução de reação foi purificada por cromatografia líquida de alto desempenho (condições de separação:

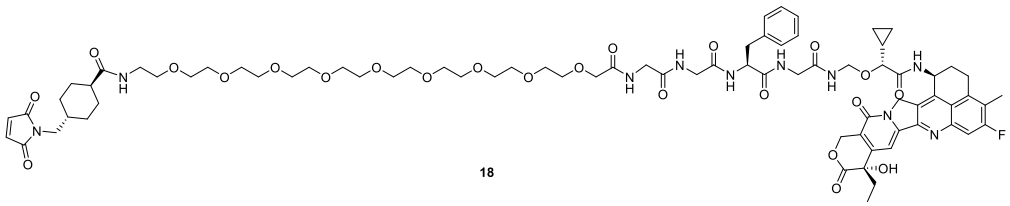
coluna: XBridge Prep C18 OBD 5 μm 19*250 mm; fase móvel: A-water (10 mmol NH_4OAc), B-acetonitrila, eluição de gradiente, taxa de fluxo: 18 mL/min). As frações correspondentes foram coletadas, e concentradas sob pressão reduzida para obter o produto do título **17** (16 mg, rendimento: 27,4%).

MS m/z (ESI): 1556,4 [M+18].

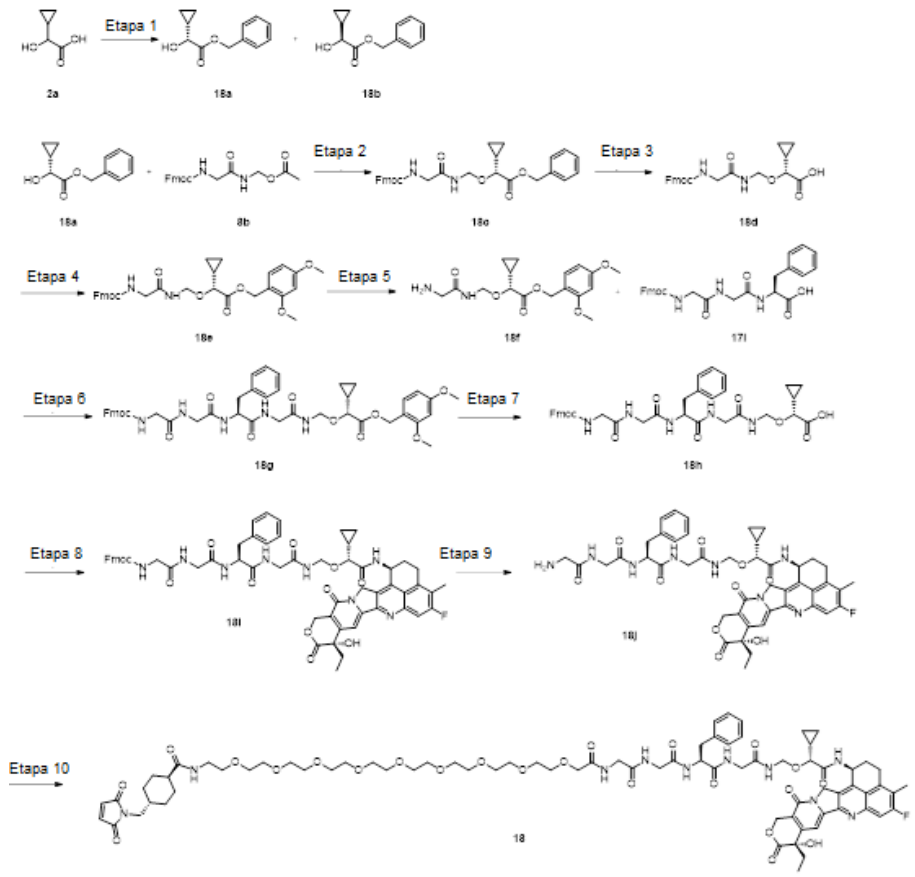
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8,98 (d, 1H), 8,76 (s, 1H), 8,20 (br, 1H), 8,12-7,95 (m, 3H), 7,93-7,76 (m, 2H), 7,75-7,66 (m, 2H), 7,24 (s, 1H), 7,20-7,05 (m, 6H), 6,97 (s, 1H), 6,64 (br, 1H), 6,55 (d, 1H), 6,47 (s, 1H), 5,61-5,52 (m, 2H), 5,37 (s, 1H), 5,33-5,23 (m, 2H), 5,18 (s, 1H), 5,13 (s, 1H), 5,05 (s, 1H), 5,00 (s, 1H), 4,65-4,55 (m, 2H), 4,53-4,45 (m, 1H), 4,38-4,28 (m, 2H), 3,84 (s, 2H), 3,67 (d, 3H), 3,60-3,40 (m, 33H), 3,18 (d, 1H), 3,15-3,08 (m, 3H), 2,28 (s, 3H), 2,00-1,92 (m, 3H), 1,85 (s, 2H), 1,82-1,73 (m, 2H), 1,68-1,52 (m, 4H), 1,29-1,15 (m, 3H), 0,86-0,76 (m, 5H).

Exemplo 18

(1*r*,4*r*)-*N*-((2*R*,10*S*)-10-Benzil-2-ciclopropil-1-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-1,6,9,12,15,18-hexaoxo-3,20,23,26,29,32,35,38,41,44-decaoxa-5,8,11,14,17-penta-azahexatetracontan-46-il)-4-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)metil)ciclohexano-1-carboxamida **18**



18



Etapa 1

(*R*)-2-Ciclopropil-2-hidroxiacetato de benzila **18a**

(*S*)-2-Ciclopropil-2-hidroxiacetato de benzila **18b**

[425] **2a** (7,4 g, 63,7 mmol) foi dissolvido em 200 mL de acetonitrila, e em seguida adicionado com carbonato de potássio (35 g, 253,6 mmol), brometo de benzila (9,3 g, 54,4 mmol) e iodeto de tetrabutilamônio (500 mg, 1,36 mmol) sucessivamente. A solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 16 horas, e filtrada através de celite. O bolo do filtro foi lavado com acetato de etila (10 ml), e os filtrados foram combinados e concentrados sob pressão reduzida. 4,1 g de os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de coluna em sílica gel com desenvolvimento do sistema de solvente C. Resoluçõ quiral foi ainda realizada para obter os produtos do título **18a** (1,1 g) e **18b** (1,2 g).

Etapa 2

(*R*)-10-Ciclopropil-1-(9*H*-fluoren-9-il)-3,6-dioxo-2,9-dioxa-4,7-diazaundecan-11-oato de benzila **18c**

[426] **8b** (3,1 g, 8,41 mmol) foi dissolvido em tetrahidrofurano (55 mL), seguido pela adição de **18a** (2,0 g, 9,70 mmol). A solução de reação foi resfriada a 0-5°C em um banho de água gelada, seguido pela adição de terc-butóxido de potássio (1,89 g, 16,84 mmol). A solução de reação foi agitada no banho de água gelada por 10 minutos. Acetato de etila (30 mL) e água (20 mL) foram adicionados, e a solução foi deixada para particionamento. A fase aquosa foi extraída com clorofórmio (30 mL×5), e as fases orgânicas foram combinadas. A fase orgânica foi concentrada sob pressão reduzida, e os resíduos resultantes foram dissolvidos em 1,4-dioxano (32 mL) e água (8 mL). Carbonato de sódio (1,78 g, 16,79 mmol) e cloroformiato de 9-fluoreno metila (2,18 g, 8,42 mmol) foram adicionados, e a solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 2 horas. Água (30 mL) foi adicionada à solução de reação, a qual foi extraída com acetato de etila (50 mL×3). As fases orgânicas foram combinadas. A fase orgânica foi lavada com solução de cloreto de sódio saturada (30 mL×2), secas sobre sulfato de sódio anidro e filtradas. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida. Os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de coluna com desenvolvimento do sistema de solvente C para obter o produto do título **18c** (1,3 g, rendimento: 30,0%).

MS m/z (ESI): 515,2[M+1].

Etapa 3

Ácido (*R*)-10-ciclopropil-1-(9*H*-fluoren-9-il)-3,6-dioxo-2,9-dioxa-4,7-diazaundecan-11-oico **18d**

[427] **18c** (1,29 g, 2,51 mmol) foi dissolvido em acetato de etila (15 mL), seguido pela adição de paládio sobre carbono (260 mg, teor: 10%, seco). A solução de reação foi purgada com hidrogênio três vezes e agitada à temperatura ambiente por 5 horas. A solução de reação foi filtrada

através de celite, e o bolo do filtro foi lavado com acetato de etila (20 mL) e metanol (20 mL). O filtrado foi concentrado para obter o produto do título bruto **18d** (980 mg), que foi usado diretamente na próxima etapa sem purificação.

MS m/z (ESI): 425,1 [M+1].

Etapa 4

2,4-Dimetoxibenzil (*R*)-10-ciclopropil-1-(9*H*-fluoren-9-il)-3,6-dioxo-2,9-dioxa-4,7-diazaundecan-11-oato **18e**

[428] O composto bruto **18d** (980 mg, 2,31 mmol) foi dissolvido em diclorometano (15 mL), e em seguida adicionado com álcool 2,4-dimetoxibenzíco (777 mg, 4,62 mmol), cloridrato de 1-etil-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (664 mg, 3,46 mmol) e 4-dimetilaminopiridina (28 mg, 0,23 mmol). A solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 1 hora. A solução de reação foi concentrada sob pressão reduzida para remover o solvente orgânico. 20 mL de água foram adicionados, e a solução foi extraída com acetato de etila (50 mL×3). As fases orgânicas foram combinadas. A fase orgânica foi lavada com solução de cloreto de sódio saturada (30 mL×2), secas sobre sulfato de sódio anidro e filtradas. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida. Os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de coluna com desenvolvimento do sistema de solvente C para obter o produto do título **18e** (810 mg, rendimento: 61,1%).

MS m/z (ESI): 575,0[M+1].

Etapa 5

(R)-2-((2-aminoacetamido)metóxi)-2-ciclopropilacetato de 2,4-dimetoxibenzila **18f**

[429] **18e** (33 mg, 57,4 μmol) foi dissolvido em 0,6 mL de diclorometano, seguido pela adição de 0,3 mL de dietilamina. A solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 1 hora. A solução de reação

foi concentrada sob pressão reduzida. 2 mL de tolueno foram adicionados e a solução foi concentrada sob pressão reduzida, o que foi repetido duas vezes. 3 mL de n-hexano foram adicionados para polpar, e a camada de cima de hexano foi vertida, o que foi repetido três vezes. A solução foi concentrada sob pressão reduzida para obter o produto do título bruto **18f** (21 mg), que foi usado diretamente na próxima etapa sem purificação.

Etapa 6

(11*S*,19*R*)-11-benzil-19-ciclopropil-1-(9*H*-fluoren-9-il)-3,6,9,12,15-pentaoxo-2,18-dioxa-4,7,10,13,16-penta-azaicosan-20-oato de 2,4-dimetoxibenzila **18g**

[430] O composto bruto **18f** (21 mg, 57,4 μmol) foi dissolvido em 3 mL de *N*,*N*-dimetilformamida. **17i** (29 mg, 57,8 μmol) e cloreto de 4-(4,6-dimetóxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio (19 mg, 68,7 μmol) foram adicionados. A solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 1 hora. 10 mL de água foram adicionados, e a solução de reação foi extraída com acetato de etila (10 mL×3). As fases orgânicas foram combinadas. A fase orgânica foi lavada com solução de cloreto de sódio saturada (10 mL×2), seca sobre sulfato de sódio anidro e filtrada. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida. Os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de camada fina com desenvolvimento do sistema de solvente B para obter o produto do título **18g** (37 mg, rendimento: 77,1%).

MS m/z (ESI): 853,0[M+18].

Etapa 7

Ácido (11*S*,19*R*)-11-Benzil-19-ciclopropil-1-(9*H*-fluoren-9-il)-3,6,9,12,15-pentaoxo-2,18-dioxa-4,7,10,13,16-penta-azaicosan-20-oico **18h**

[431] **18g** (37 mg, 44,3 μmol) foi dissolvido em 1,4 mL de 3% (v/v) dicloroacético acid em diclorometano, e a solução foi resfriada a 0-5°C

em um banho de água gelada. Trietilsilano (15,4 mg, 132,4 μmol) foi adicionado, e a solução de reação foi agitada em um banho gelado por 3 horas. A solução de reação foi concentrada sob pressão reduzida no banho gelado para remover metade do solvente orgânico. 5 mL de éter foram adicionados, e a solução foi naturalmente aquecida até à temperatura ambiente e polpada. Um sólido branco foi precipitado e filtrado. O bolo do filtro foi coletado e seco por uma bomba de óleo para obter o produto do título **18h** (24 mg, rendimento: 79,1%).

MS m/z (ESI): 708,2[M+23].

Etapa 8

(9*H*-Fluoren-9-il)metil ((2*R*,10*S*)-10-benzil-2-ciclopropil-1-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il)amino)-1,6,9,12,15-pentaoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetra-azahexadecan-16-il)carbamato **18i**

[432] **1b** (30 mg, 63,6 μmol) foi adicionado ao frasco de reação, seguido pela adição de 1 mL de metanol a 10% (v/v) em diclorometano. A solução foi purgada com argônio três vezes, e resfriada a 0-5°C em um banho de água gelada. Uma gota de trietilamina foi adicionada, e a solução de reação foi agitada até **1b** ser dissolvido. **18h** (65 mg, 94,8 μmol) foi dissolvido em 1 mL de metanol a 10% (v/v) em diclorometano, e a solução resultante foi adicionada em gotas à solução de reação acima, seguido pela adição de cloreto de 4-(4,6-dimetóxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio (27 mg, 97,6 μmol). A solução de reação foi aquecida à temperatura ambiente e agitada por 1 hora. 10 mL de diclorometano e 5 mL de água foram adicionados, e a solução foi agitada por 5 minutos e deixada para particionamento. A fase orgânica foi coletada. A fase aquosa foi extraída com diclorometano (10 mL×3), e as fases orgânicas foram combinadas. A fase orgânica foi lavada com solução de cloreto de sódio saturada (10 mL×2), seca sobre sulfato de sódio anidro e

filtrada. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida. Os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de camada fina com desenvolvimento do sistema de solvente B para obter o produto do título **18i** (25 mg, rendimento: 35,6%).

MS m/z (ESI): 1104,4[M+1].

Etapa 9

(*S*)-2-(2-(2-Aminoacetamido)acetamido)-*N*-(2-((((*R*)-1-ciclopropil-2-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-2-oxoetóxi)metil)amino)-2-oxoetil)-3-fenilpropanamida **18j**

[433] **18i** (12 mg, 10,9 μmol) foi dissolvido em 0,6 mL de diclorometano, seguido pela adição de 0,3 mL de dietilamina. A solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 1,5 hora. A solução de reação foi concentrada sob pressão reduzida. 2 mL de tolueno foram adicionados e a solução foi concentrada sob pressão reduzida, o que foi repetido duas vezes. 3 mL de n-hexano foram adicionados para polpar, e a camada de cima de hexano foi vertida, o que foi repetido três vezes. A solução foi concentrada sob pressão reduzida para obter o produto do título bruto **18j** (10 mg), que foi usado diretamente na próxima etapa sem purificação.

MS m/z (ESI): 881,0 [M+1].

Etapa 10

(1*r*,4*r*)-*N*-((2*R*,10*S*)-10-Benzil-2-ciclopropil-1-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-1,6,9,12,15,18-hexaoxo-3,20,23,26,29,32,35,38,41,44-decaoxa-5,8,11,14,17-penta-azahexatetracontan-46-il)-4-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)metil)ciclohexano-1-carboxamida **18**

[434] O composto bruto **18j** (10 mg) foi dissolvido em 1 mL de *N*,*N*-dimetilformamida. **17g** (8,5 mg, 12,3 μmol) e cloreto de 4-(4,6-dimetóxi-

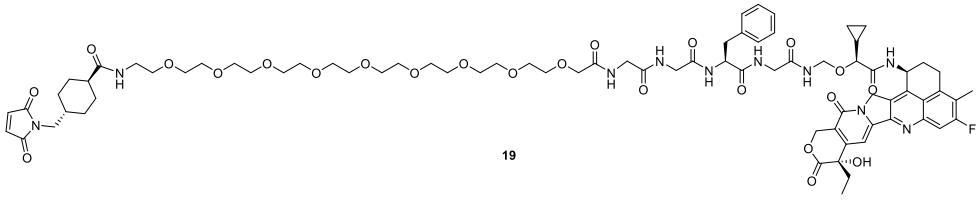
1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio (4,6 mg, 16,6 μmol) foram adicionados. A solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 30 minutos. A solução de reação foi filtrada, e purificada por cromatografia líquida de alto desempenho (condições de separação: coluna: XBridge Prep C18 OBD 5 μm 19*250 mm; fase móvel: A-water (10 mmol NH_4OAc), B-acetonitrila, eluição de gradiente, taxa de fluxo: 18 mL/min). As frações correspondentes foram coletadas, e concentradas sob pressão reduzida para obter o produto do título **18** (9,5 mg, rendimento: 56,2%).

MS m/z (ESI): 1570,2 [M+18].

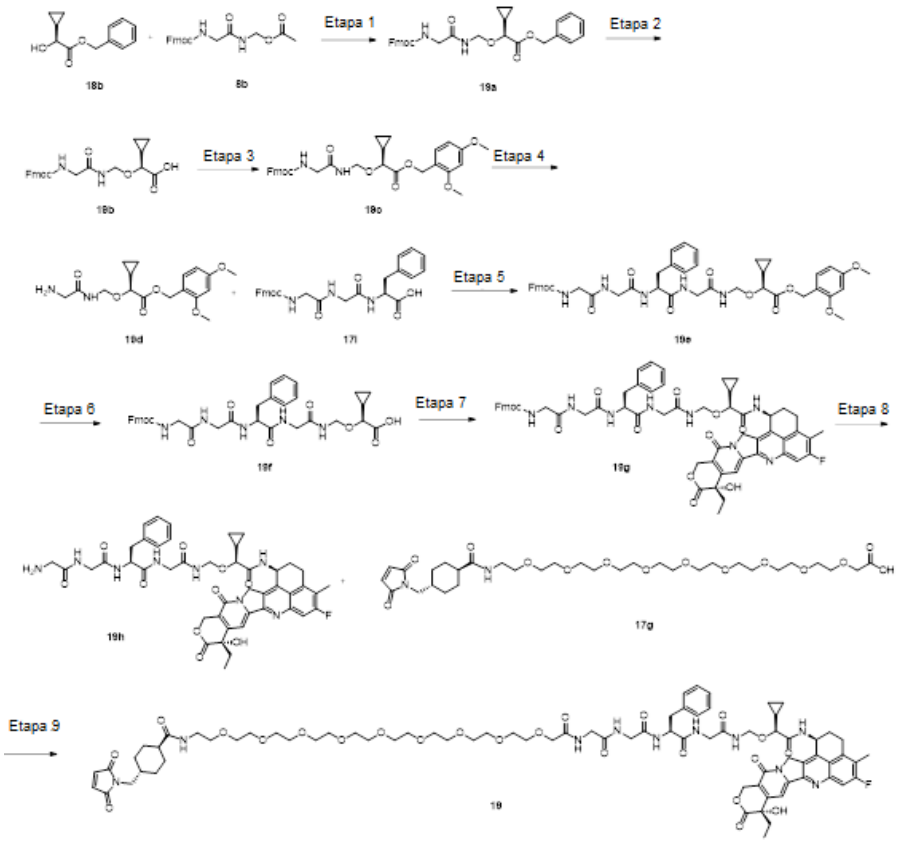
^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8,77 (d, 1H), 8,59-8,55 (m, 1H), 8,42 (d, 1H), 8,37-8,28 (m, 1H), 8,25-8,06 (m, 2H), 7,96-7,86 (m, 1H), 7,86-7,70 (m, 2H), 7,32-7,28 (m, 1H), 7,25-7,14 (m, 3H), 6,67 (m, 1H), 5,96 (s, 1H), 5,80-5,72 (m, 1H), 5,62-5,52 (m, 2H), 5,43-5,30 (m, 3H), 5,28-5,17 (m, 2H), 5,12-5,08 (m, 1H), 4,72-4,35 (m, 8H), 3,95-3,70 (m, 13H), 3,35-3,22 (m, 14H), 2,42-2,32 (m, 3H), 2,05-1,98 (m, 4H), 1,88-1,82 (m, 12H), 1,47-1,39 (m, 3H), 1,32-1,18 (m, 11H), 0,90-0,80 (m, 4H), 0,52-0,37 (m, 3H), 0,32-0,18 (m, 2H).

Exemplo 19

(1*r*,4*r*)-*N*-((2*S*,10*S*)-10-Benzil-2-ciclopropil-1-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-1,6,9,12,15,18-hexaoxo-3,20,23,26,29,32,35,38,41,44-decaoxa-5,8,11,14,17-penta-azahexatetracontan-46-il)-4-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)metil)ciclohexano-1-carboxamida **19**



19



Etapa 1

(*S*)-10-ciclopropil-1-(9*H*-fluoren-9-il)-3,6-dioxo-2,9-dioxa-4,7-diazaundecan-11-oato de benzila **19a**

[435] **18b** (252 mg, 1,22 mmol) foi adicionado ao frasco de reação, seguido pela adição de 4 mL de diclorometano. A solução de reação foi purgada com argônio três vezes e resfriada a 0-5°C em um banho de água gelada, seguido pela adição de *terc*-butóxido de lítio (98 mg, 1,22 mmol). A solução de reação foi agitada no banho de água gelada por 15 minutos e se tornou clara. **8b** (300 mg, 814,3 μmol) foi adicionado, e a solução de reação foi agitada no banho de água gelada por 2,5 horas. Água (10 mL) foi adicionada, e a solução foi particionada. A fase aquosa foi extraída com diclorometano (8 mL×2). As fases orgânicas foram combinadas, lavadas com água (10 mL×1) e salmoura saturada (10 mL×2), secas sobre sulfato de sódio anidro e filtradas. O filtrado foi concentrado para obter o produto bruto. Os resíduos resultantes foram purificados

por cromatografia de coluna em sílica gel com desenvolvimento do sistema de solvente C para obter o produto do título **19a** (282 mg, rendimento: 67,2%).

Etapa 2

Ácido (*S*)-10-ciclopropil-1-(9*H*-fluoren-9-il)-3,6-dioxo-2,9-dioxa-4,7-diazaundecan-11-oico **19b**

[436] **19a** (280 mg, 0,554 mmol) foi dissolvido em 8 mL de acetato de etila, seguido pela adição de paládio sobre carbono (84 mg, teor: 10%, seco). A solução de reação foi purgada com hidrogênio três vezes e agitada à temperatura ambiente por 3 horas. A solução de reação foi filtrada através de celite, e o bolo do filtro foi lavado com acetato de etila. O filtrado foi concentrado para obter o produto do título bruto **19b** (230 mg), que foi usado diretamente na próxima etapa sem purificação.

Etapa 3

(*S*)-10-ciclopropil-1-(9*H*-fluoren-9-il)-3,6-dioxo-2,9-dioxa-4,7-diazaundecan-11-oato de 2,4-dimetoxibenzila **19c**

[437] O composto bruto **19b** (230 mg, 541,8 μmol) foi dissolvido em 7 mL de diclorometano, e em seguida adicionado com álcool 2,4-dimetoxibenzílico (136,7 mg, 812,7 μmol), cloridrato de 1-etil-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (155 mg, 808,5 μmol) e 4-dimetilaminopiridina (6,6 mg, 53,5 μmol) sucessivamente. A solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 16 horas. A solução de reação foi diluída com 10 mL de diclorometano, lavada com água (10 mL×1) e salmoura saturada (10 mL×2), seca sobre sulfato de sódio anidro e filtrada. O filtrado foi concentrado para obter o produto bruto. Os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de camada fina com desenvolvimento do sistema de solvente B para obter o produto do título **19c** (159 mg, rendimento: 51,0%).

Etapa 4

(*S*)-2-((2-aminoacetamido)metóxi)-2-ciclopropilacetato de 2,4-dimetoxibenzila **19d**

[438] **19c** (60 mg, 104,4 μmol) foi dissolvido em 1 mL de diclorometano, seguido pela adição de 0,5 mL de dietilamina. A solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 1 hora. A solução de reação foi concentrada sob pressão reduzida. 2 mL de tolueno foram adicionados e a solução foi concentrada sob pressão reduzida, o que foi repetido duas vezes. 3 mL de n-hexano foram adicionados para polpar, e a camada de cima de hexano foi vertida, o que foi repetido três vezes. A solução foi concentrada sob pressão reduzida para obter o produto do título bruto **19d** (21 mg), que foi usado diretamente na próxima etapa sem purificação.

Etapa 5

(11*S*,19*S*)-11-benzil-19-ciclopropil-1-(9*H*-fluoren-9-il)-3,6,9,12,15-pentaoxo-2,18-dioxa-4,7,10,13,16-penta-azaicosan-20-oato de 2,4-dimetoxibenzila **19e**

[439] O composto bruto **19d** (36 mg, 102,2 μmol) foi dissolvido em 4 mL de *N*,*N*-dimetilformamida. **17i** (52 mg, 103,6 μmol) e cloreto de 4-(4,6-dimetóxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio (34,6 mg, 125,0 μmol) foram adicionados. A solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 1 hora. 10 mL de água foram adicionados, e a solução de reação foi extraída com acetato de etila (10 mL×3). As fases orgânicas foram combinadas. A fase orgânica foi lavada com solução de cloreto de sódio saturada (10 mL×2), seca sobre sulfato de sódio anidro e filtrada. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida. Os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de camada fina com desenvolvimento do sistema de solvente B para obter o produto do título **19e** (70 mg, rendimento: 80,2%).

Etapa 6

Ácido (11*S*,19*S*)-11-benzil-19-ciclopropil-1-(9*H*-fluoren-9-il)-3,6,9,12,15-

pentaoxo-2,18-dioxa-4,7,10,13,16-penta-azaicosan-20-oico **19f**

[440] **19e** (70 mg, 83,7 μmol) foi dissolvido em 2,5 mL de ácido dicloroacético a 3% (v/v) em diclorometano, e a solução foi resfriada a 0-5°C em um banho de água gelada. Trietilsilano (29 mg, 249,4 μmol) foi adicionado, e solução de reação foi agitada em um banho gelado por 3 horas. A solução de reação foi concentrada sob pressão reduzida no banho gelado para remover metade do solvente orgânico. 5 mL de éter foram adicionados, e a solução foi naturalmente aquecida até à temperatura ambiente e polpada. Um sólido branco foi precipitado e filtrado. O bolo do filtro foi coletado e seco por uma bomba de óleo para obter o produto do título **19f** (57 mg, rendimento: 99,2%).

Etapa 7

((2*S*,10*S*)-10-benzil-2-ciclopropil-1-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-1,6,9,12,15-pentaoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetra-azahexadecan-16-il)carbamato de (9*H*-Fluoren-9-il)metila **19g**

[441] **1b** (30 mg, 63,6 μmol) foi adicionado ao frasco de reação, seguido pela adição de 1 mL de metanol a 10% (v/v) em diclorometano. A solução foi purgada com argônio três vezes, e resfriada a 0-5°C em um banho de água gelada. Uma gota de trietilamina foi adicionado, e a solução de reação foi agitada até **1b** ser dissolvido. **19f** (57 mg, 83,1 μmol) foi dissolvido em 1 mL de metanol a 10% (v/v) em diclorometano, e a solução resultante foi adicionada em gotas à solução de reação acima, seguido pela adição de cloreto de 4-(4,6-dimetóxi- 1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio (26 mg, 93,9 μmol). A solução de reação foi aquecida à temperatura ambiente e agitada por 1 hora. 10 mL de diclorometano e 5 mL de água foram adicionados, e a solução foi agitada por 5 minutos e deixada para particionamento. A fase orgânica foi coletada. A

fase aquosa foi extraída com diclorometano (10 mL×3), e as fases orgânicas foram combinadas. A fase orgânica foi lavada com solução de cloreto de sódio saturada (10 mL×2), seca sobre sulfato de sódio anidro e filtrada. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida. Os resíduos resultantes foram purificados por cromatografia de camada fina com desenvolvimento do sistema de solvente B para obter o produto do título **19g** (56 mg, rendimento: 79,8%).

MS m/z (ESI): 1103,1[M+1]

Etapa 8

(*S*)-2-(2-(2-Aminoacetamido)acetamido)-*N*-(2-((((*S*)-1-ciclopropil-2-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-2-oxoetóxi)metil)amino)-2-oxoetil)-3-fenilpropanamida **19h**

[442] **19g** (4,6 mg, 4,16 μmol) foi dissolvido em 1,5 mL de diclorometano, seguido pela adição de 0,75 mL de dietilamina. A solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 1,6 hora. A solução de reação foi concentrada sob pressão reduzida. 2 mL de tolueno foram adicionados e a solução foi concentrada sob pressão reduzida, o que foi repetido duas vezes. 3 mL de n-hexano foram adicionados para polpar, e a camada de cima de hexano foi vertida, o que foi repetido três vezes. A solução foi concentrada sob pressão reduzida para obter o produto do título bruto **19h** (4,0 mg), que foi usado diretamente na próxima etapa sem purificação.

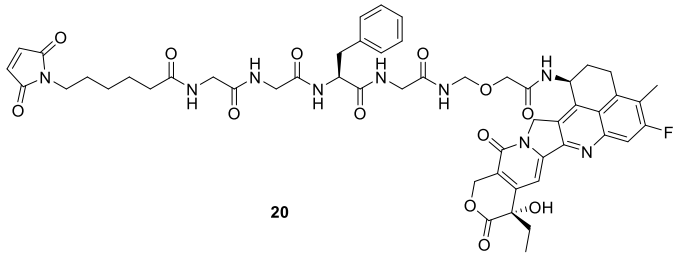
Etapa 9

(1*r*,4*r*)-*N*-((2*S*,10*S*)-10-Benzil-2-ciclopropil-1-(((1*S*,9*S*)-9-etil-5-fluoro-9-hidróxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1*H*,12*H*-benzo[*de*]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolin-1-il)amino)-1,6,9,12,15,18-hexaoxo-3,20,23,26,29,32,35,38,41,44-decaoxa-5,8,11,14,17-penta-azahexatetracontan-46-il)-4-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)metil)ciclohexano-1-carboxamida **19**

[443] O composto bruto **19h** (4,0 mg) foi dissolvido em 1 mL de *N*,*N*-dimetilformamida. **17g** (2,9 mg, 4,2 μmol) e cloreto de 4-(4,6-dimetóxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio (1,5 mg, 5,4 μmol) foram adicionados. A solução de reação foi agitada à temperatura ambiente por 40 minutos. A solução de reação foi filtrada, e purificada por cromatografia líquida de alto desempenho (condições de separação: coluna: XBridge Prep C18 OBD 5 μm 19*250 mm; fase móvel: A-water (10 mmol NH_4OAc), B-acetonitrila, eluição de gradiente, taxa de fluxo: 18 mL/min). As frações correspondentes foram coletadas, e concentradas sob pressão reduzida para obter o produto do título **19** (2,1 mg, rendimento: 32,4%).

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8,71-8,62 (m, 1H), 8,59-8,51 (m, 1H), 8,34-8,26 (m, 1H), 8,14-8,02 (m, 2H), 7,95-7,86 (m, 1H), 7,83-7,69 (m, 2H), 7,35-7,31 (m, 1H), 7,29-7,11 (m, 3H), 7,01 (s, 1H), 6,72-6,50 (m, 3H), 5,59-5,50 (m, 2H), 5,42 (s, 2H), 5,38-5,18 (m, 3H), 4,79-4,69 (m, 2H), 4,61-4,42 (m, 3H), 3,91 (s, 2H), 3,79-3,65 (m, 4H), 3,63-3,44 (m, 13H), 3,41-3,30 (m, 2H), 3,26-3,09 (m, 5H), 3,08-2,84 (m, 4H), 2,81-2,64 (m, 3H), 2,42-2,28 (m, 3H), 2,24-2,12 (m, 2H), 2,05-1,93 (m, 4H), 1,89-1,77 (m, 2H), 1,72-1,56 (m, 3H), 1,53-1,38 (m, 3H), 1,34-1,10 (m, 11H), 0,94-0,78 (m, 5H), 0,52-0,35 (m, 3H).

Exemplo 20 (exemplo de referência)



20

[444] O composto do título **20** foi preparado baseado no método descrito no Exemplo 58 na página 163 da descrição do pedido de patente CN104755494A.

[445] Os seguintes anticorpos foram preparados de acordo com métodos convencionais, por exemplo, construção de vetor, transfecção

de célula eucariótica tal como transfecção, purificação e expressão de célula HEK293 (Life Technologies Cat. No. 11625019).

[446] A seguir está a sequência de Trastuzumab:

Cadeia leve

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTA-
VAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS-
RFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL-
QSGNSQESVTEQDSK-
DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO,1

Cadeia pesada

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR-
QAPGKGLEWVA-
RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC
SRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP-
SSKSTSGGTAALGCLVK-
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG-
PSVFLFPPKPKDTLMIS-
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE-
PQVYTLPPSREEMTKN-
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO,2

[447] A seguir está a sequência de Pertuzumab:

[448] Cadeia leve

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQK-

PGKAPKLLIYSASYRYTGVPS-
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL-
QSGNSQESVTEQDSK-
DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO,3

Cadeia pesada

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVR-
QAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYN-
QRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFD
YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK-
DYFPEPVTVSWNSGAL-
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS-
RTPEVTCVVVDVSHED-
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN-
QVSLTCLVKGFYPSDI-
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO,4

[449] A seguir está a sequência de B7H3 anticorpo 1F9DS:

Cadeia leve

DTVVTQEPSFSVSPGG-
TVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIYNTNTRSSGVP-
DRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCAIHVDRDIWVFGGGTKLTV
LGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD-
GSPVKAGVETTK-
PSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPT
EC

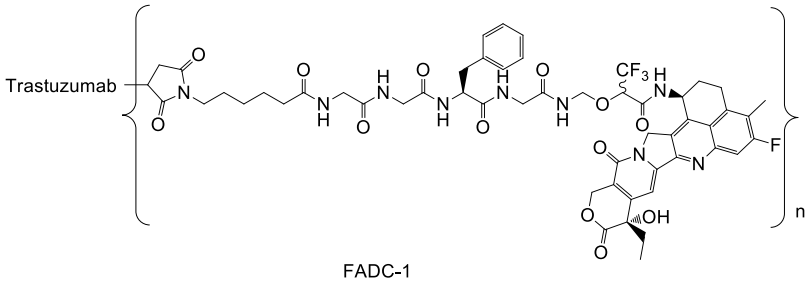
SEQ ID NO,5

Cadeia pesada

QVQLVQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHWVR-
QAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYV-
DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSARLYASFDY
WGQGALVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK-
DYFPEPVTVSWNSGAL-
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS-
RTPEVTCVVVDVSHED-
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN-
QVSLTCLVKGFYPSDI-
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO,6

Exemplo 21 ADC-1



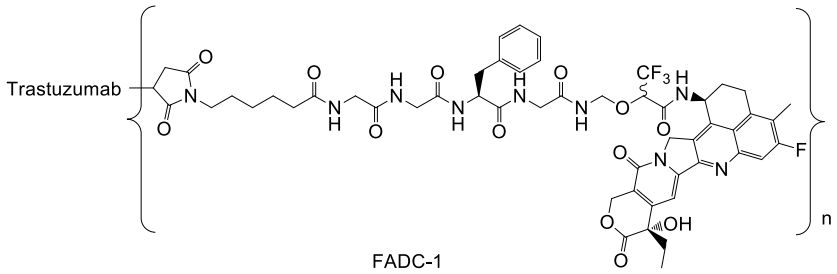
FADC-1

[450] Uma solução aquosa formulada de tris(2-carboxietil)fosfina (10 mM, 0,082 mL, 0,82 μmol) foi adicionado a uma solução aquosa tamponada com PBS de anticorpo Trastuzumab (solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5; 2,5 ml, 9,96 mg/ml, 0,168 μmol) a 37°C. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 37ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi resfriada a 25°C em um banho gelado, e diluída para 5,0 mg/ml. 2,0 ml da solução foram tomados para a próxima reação.

[451] Composto **10**, o composto tendo tempo de retenção mais curto (2,1 mg，2,02 μmol) foi dissolvido em 0,10 mL de DMSO, e em seguida adicionado a 2,0 ml da solução acima. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 25ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi dessalgada e purificada com uma coluna em gel Sephadex G25 (fase de eluição: solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5, contendo EDTA a 0,001 M) para obter a solução tamponada com PBS do produto exemplar **ADC-1** de Fórmula FADC-1 (5,0 mg/mL, 1,1 mL), que foi armazenado a 4°C.

[452] O valor médio calculado por UV-HPLC: n=5,09.

Exemplo 22 ADC-2



FADC-1

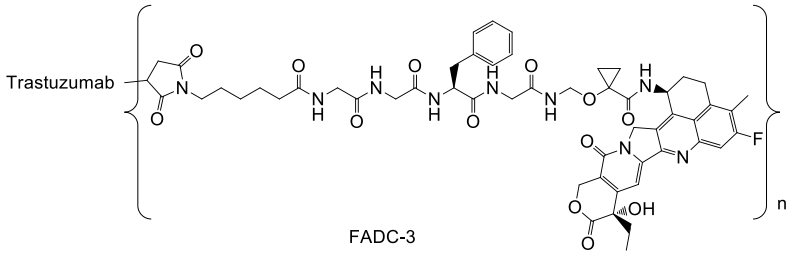
[453] Uma solução aquosa formulada de tris(2-carboxietil)fosfina (10 mM, 0,082 mL, 0,82 μmol) foi adicionada a uma solução aquosa tamponada com PBS de anticorpo Trastuzumab (solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5; 2,5 ml, 9,96 mg/ml, 0,168 μmol) a 37°C. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 37ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi resfriada a 25°C em um banho gelado, e diluída para 5,0 mg/ml. 2,0 ml da solução foram tomados para a próxima reação.

[454] Composto **10**, o composto tendo tempo de retenção mais longo (2,1 mg，2,02 μmol) foi dissolvido em 0,10 mL de DMSO, e em seguida adicionado a 2,0 ml da solução acima. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 25ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi dessalgada e

purificada com uma coluna em gel Sephadex G25 (fase de eluição: solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5, contendo EDTA a 0,001 M) para obter a solução tamponada com PBS do produto exemplar **ADC-2** de Fórmula FADC-1 (4,95 mg/mL, 1,1 mL), que foi armazenado a 4°C.

[455] O valor médio calculado por UV-HPLC: n=7,39.

Exemplo 23 ADC-3



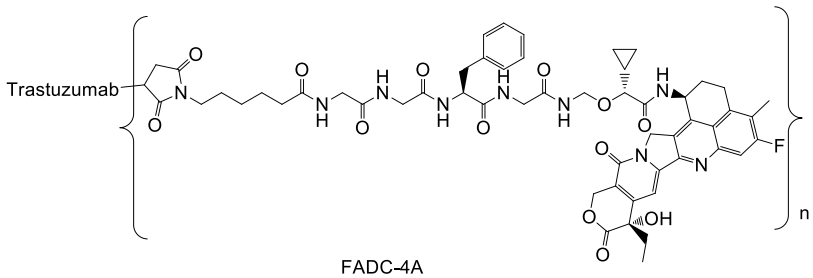
FADC-3

[456] Uma solução aquosa formulada de tris(2-carboxietil)fosfina (10 mM, 0,082 mL, 0,82 μmol) foi adicionada a uma solução aquosa tamponada com PBS de anticorpo Trastuzumab (solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5; 2,5 ml, 9,96 mg/ml, 0,168 μmol) a 37°C. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 37ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi resfriada a 25°C em um banho gelado, e diluída para 5,0 mg/ml. 2,0 ml da solução foram tomados para a próxima reação.

[457] Composto **8** (2,1 mg, 2,02 μmol) foi dissolvido em 0,10 mL de DMSO, e em seguida adicionado a 2,0 ml da solução acima. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 25ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi dessalgada e purificada com uma coluna em gel Sephadex G25 (fase de eluição: solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5, contendo EDTA a 0,001 M) para obter a solução tamponada com PBS do produto exemplar **ADC-3** de Fórmula FADC-3 (5,24 mg/mL, 1,1 mL), que foi armazenado a 4°C.

[458] O valor médio calculado por UV-HPLC: n=7,36.

Exemplo 24 ADC-4



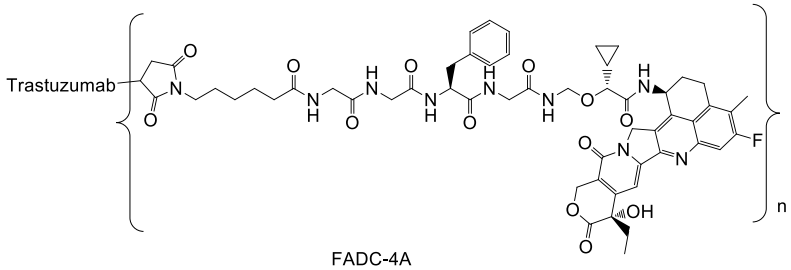
FADC-4A

[459] Uma solução aquosa formulada de tris(2-carboxietil)fosfina (10 mM, 0,173 mL, 1,73 μmol) foi adicionada a uma solução aquosa tamponada com PBS de anticorpo Trastuzumab (solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5; 3,74 ml, 13,38 mg/ml, 0,338 μmol) a 37°C. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 37ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi resfriada a 25°C em um banho gelado, e diluída para 6,7 mg/ml. 1,3 ml da solução foram tomados para a próxima reação.

[460] Composto **9**-tendo tempo de retenção mais curto, o composto 9-A (1,0 mg, 0,93 μmol) foi dissolvido em 0,10 mL de DMSO, e em seguida adicionado a 1,3 ml da solução acima. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 25ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi dessalgada e purificada com uma coluna em gel Sephadex G25 (fase de eluição: solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5, contendo EDTA a 0,001 M) para obter a solução tamponada com PBS do produto exemplar **ADC-4** de Fórmula FADC-4A (1,72 mg/mL, 2,36 mL), que foi armazenado a 4°C.

[461] O valor médio calculado por UV-HPLC: n=7,39.

Exemplo 25 ADC-5



FADC-4A

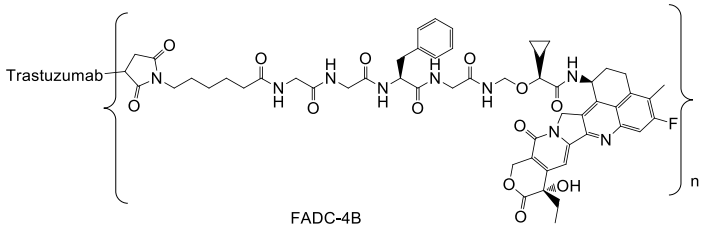
[462] Uma solução aquosa formulada de tris(2-carboxietil)fosfina

(10 mM, 0,067 mL, 0,67 μmol) foi adicionado a uma solução aquosa tamponada com PBS de anticorpo Trastuzumab (solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5; 3,0 ml, 6,70 mg/ml, 0,136 μmol) a 37°C. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 37ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi resfriada a 25°C em um banho gelado, e 0,614 ml da solução foram tomados para a próxima reação.

[463] Composto **9**-tendo tempo de retenção mais curto, o composto 9-A (0,5 mg, 0,42 μmol) foi dissolvido em 0,031 mL de DMSO, e em seguida adicionado a 0,614 ml da solução acima. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 25ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi dessalgada e purificada com uma coluna em gel Sephadex G25 (fase de eluição: solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5, contendo EDTA a 0,001 M) para obter a solução tamponada com PBS do produto exemplar **ADC-5** de Fórmula FADC-4A (3,08 mg/mL, 0,82 mL), que foi armazenado a 4°C.

[464] O valor médio calculado por UV-HPLC: n=3,16.

Exemplo 26 ADC-6



FADC-4B

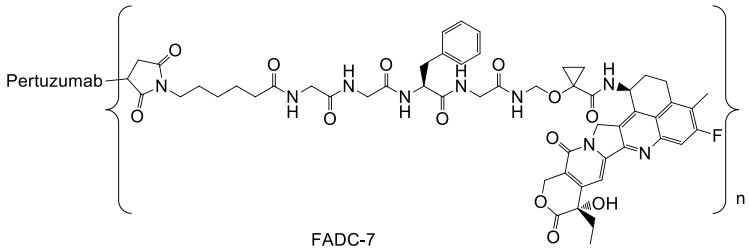
[465] Uma solução aquosa formulada de tris(2-carboxietil)fosfina (10 mM, 0,173 mL, 1,73 μmol) foi adicionada a uma solução aquosa tamponada com PBS de anticorpo Trastuzumab (solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5; 3,74 ml, 13,38 mg/ml, 0,338 μmol) a 37°C. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 37ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi resfriada a 25°C em um banho gelado, e diluída

para 6,7 mg/ml. 0,75 ml da solução foram tomados para a próxima reação.

[466] Composto **9**-tendo tempo de retenção mais longo, o composto 9-B (0,68 mg, 0,63 μmol) foi dissolvido em 0,10 mL de DMSO, e em seguida adicionado a 0,75 ml da solução acima. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 25ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi dessalgada e purificada com uma coluna em gel Sephadex G25 (fase de eluição: solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5, contendo EDTA a 0,001 M) para obter a solução tamponada com PBS do produto exemplar **ADC-6** de Fórmula FADC-4B (1,78 mg/mL, 1,78 mL), que foi armazenado a 4°C.

[467] O valor médio calculado por UV-HPLC: n=3,94.

Exemplo 27 ADC-7



FADC-7

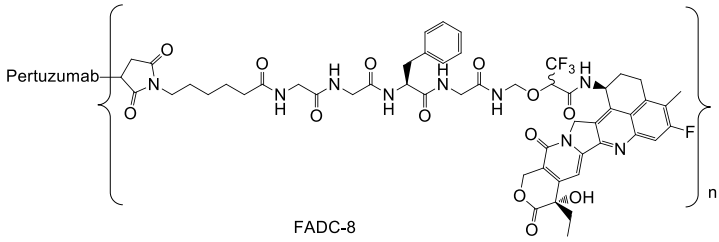
[468] Uma solução aquosa formulada de tris(2-carboxietil)fosfina (10 mM, 0,173 mL, 1,73 μmol) foi adicionada a uma solução aquosa tamponada com PBS de anticorpo Pertuzumab (solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5; 5,0 ml, 10 mg/ml, 0,338 μmol) a 37°C. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 37ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi resfriada a 25°C em um banho gelado, e diluída para 5,0 mg/ml. 1,0 ml da solução foram tomados para a próxima reação.

[469] Composto **8** (0,65 mg, 0,6 μmol) foi dissolvido em 0,1 mL de DMSO, e em seguida adicionado a 1,0 ml da solução acima. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a

25ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi dessalgada e purificada com uma coluna em gel Sephadex G25 (fase de eluição: solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5, contendo EDTA a 0,001 M) para obter a solução tamponada com PBS do produto exemplar **ADC-7** de Fórmula FADC-7 (1,42 mg/mL, 2,15 mL), que foi armazenado a 4°C.

[470] O valor médio calculado por UV-HPLC: n=6,91.

Exemplo 28 ADC-8



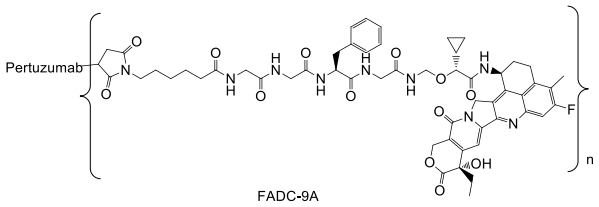
FADC-8

[471] Uma solução aquosa formulada de tris(2-carboxietil)fosfina (10 mM, 0,173 mL, 1,73 μmol) foi adicionado a uma solução aquosa tamponada com PBS de anticorpo Pertuzumab (solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5; 5,0 ml, 10 mg/ml, 0,338 μmol) a 37°C. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 37ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi resfriada a 25°C em um banho gelado, e diluída para 5,0 mg/ml. 1,6 ml da solução foram tomados para a próxima reação.

[472] Composto **10**, o composto tendo tempo de retenção mais curto (1,04 mg, 1,0 μmol) foi dissolvido em 0,1 mL de DMSO, e em seguida adicionado a 1,6 ml da solução acima. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 25ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi dessalgada e purificada com uma coluna em gel Sephadex G25 (fase de eluição: solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5, contendo EDTA a 0,001 M) para obter a solução tamponada com PBS do produto exemplar **ADC-8** de Fórmula FADC-8 (2,14 mg/mL, 2,31 mL), que foi armazenado a 4°C.

[473] O valor médio calculado por UV-HPLC: n=6,58.

Exemplo 29 ADC-9



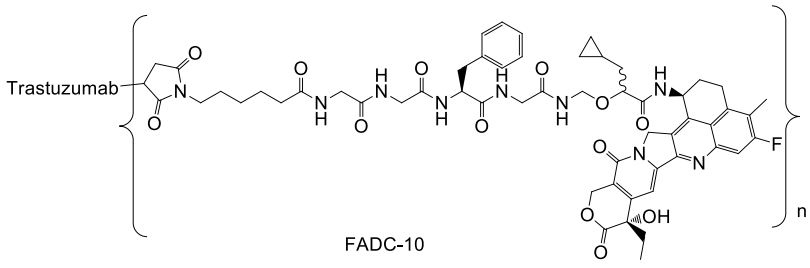
FADC-9A

[474] Uma solução aquosa formulada de tris(2-carboxietil)fosfina (10 mM, 0,173 mL, 1,73 μmol) foi adicionada a uma solução aquosa tamponada com PBS de anticorpo Pertuzumab (solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5; 5,0 ml, 10 mg/ml, 0,338 μmol) a 37°C. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 37ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi resfriada a 25°C em um banho gelado, e diluída para 5,0 mg/ml. 0,8 ml da solução foram tomados para a próxima reação.

[475] Composto **9**-tendo tempo de retenção mais curto, o composto 9-A (0,55 mg, 0,5 μmol) foi dissolvido em 0,1 mL de DMSO, e em seguida adicionado a the above 0,8 ml de solution. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 25ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi dessalgada e purificada com uma coluna em gel Sephadex G25 (fase de eluição: solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5, contendo EDTA a 0,001 M) para obter a solução tamponada com PBS do produto exemplar **ADC-9** de Fórmula FADC-9A (2,27 mg/mL, 1,11 mL), que foi armazenado a 4°C.

[476] O valor médio calculado por UV-HPLC: n=3,16.

Exemplo 30 ADC-10



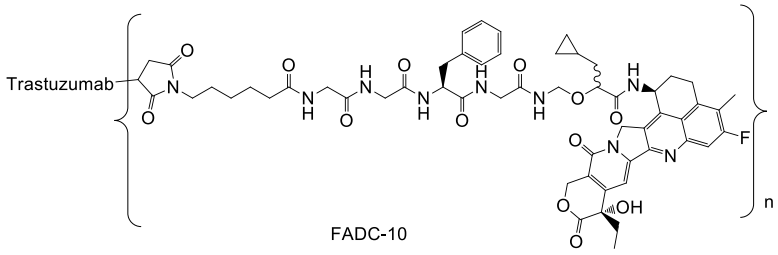
FADC-10

[477] Uma solução aquosa formulada de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (10 mM, 19,76 µL, 197,6 µmol) foi adicionada a uma solução aquosa tamponada com PBS de anticorpo Trastuzumab (solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5; 10,0 mg/ml, 0,574 mL, 38,78 nmol) a 37°C. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 37ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi resfriada a 25°C em um banho gelado.

[478] Composto **14**, o composto tendo tempo de retenção mais curto (0,64 mg, 588 nmol) foi dissolvido em 40 µl de DMSO, e em seguida adicionado à solução de reação acima. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 25ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi dessalgada e purificada com uma coluna em gel Sephadex G25 (fase de eluição: solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5, contendo EDTA a 0,001 M) para obter a solução tamponada com PBS do produto exemplar **ADC-10** de Fórmula FADC-10 (5,48 mg/mL, 1,03 mL), que foi armazenado a 4°C.

[479] O valor médio calculado por UV-Vis: n=6,25.

Exemplo 31 ADC-11



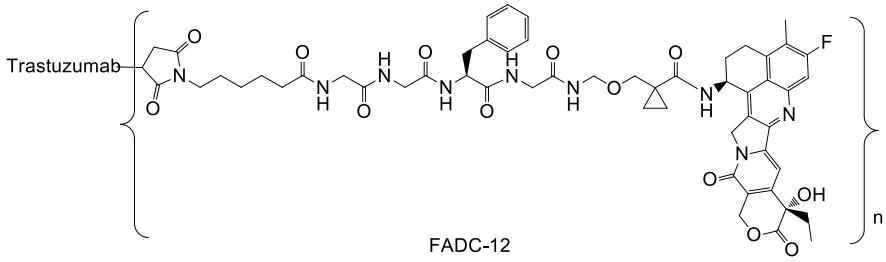
FADC-10

[480] Uma solução aquosa formulada de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (10 mM, 22,24 µL, 222,4 nmol) foi adicionada a uma solução aquosa tamponada com PBS de anticorpo Trastuzumab (solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5; 10,0 mg/ml, 0,646 mL, 43,64 nmol) a 37°C. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 37ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi resfriada a 25°C em um banho gelado.

[481] Composto **14**, o composto tendo tempo de retenção mais longo (0,72 mg, 662 nmol) foi dissolvido em 40 µl de DMSO, e em seguida adicionado à solução de reação acima. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 25ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi dessalgada e purificada com uma coluna em gel Sephadex G25 (fase de eluição: solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5, contendo EDTA a 0,001 M) para obter a solução tamponada com PBS do produto exemplar **ADC-11** de Fórmula FADC-10 (2,13 mg/mL, 1,87 mL), que foi armazenado a 4°C.

[482] O valor médio calculado por UV-Vis: n=7,03.

Exemplo 32 ADC-12



FADC-12

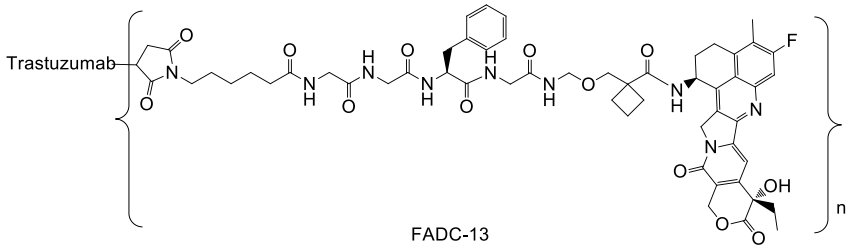
[483] Uma solução aquosa formulada de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (10 mM, 25,0 µL, 250,0 nmol) foi adicionada a uma solução aquosa tamponada com PBS de anticorpo Trastuzumab (solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5; 10,0 mg/ml, 0,726 mL, 49,05 nmol) a 37°C. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 37ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi resfriada a 25°C em um banho gelado.

[484] Composto **15** (0,81 mg, 754 nmol) foi dissolvido em 40 µl de DMSO, e em seguida adicionado à solução de reação acima. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 25ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi dessalgada e purificada com uma coluna em gel Sephadex G25 (fase de eluição: solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5, contendo EDTA a 0,001 M) para obter a solução tamponada com PBS

do produto exemplar **ADC-12** de Fórmula FADC-12 (3,34 mg/mL, 1,45 mL), que foi armazenado a 4°C.

[485] O valor médio calculado por UV-Vis: n=6,93.

Exemplo 33 ADC-13



FADC-13

[486] Uma solução aquosa formulada de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (10 mM, 9,88 µL, 98,8 nmol) foi adicionada a uma solução aquosa tamponada com PBS de anticorpo Trastuzumab (solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5; 10,0 mg/ml, 0,287 mL, 19,39 nmol) a 37°C. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 37ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi resfriada a 25°C em um banho gelado.

[487] Composto **16** (0,32 mg, 294 nmol) foi dissolvido em 20 µl de DMSO, e em seguida adicionado à solução de reação acima. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 25ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi dessalgada e purificada com uma coluna em gel Sephadex G25 (fase de eluição: solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5, contendo EDTA a 0,001 M) para obter a solução tamponada com PBS do produto exemplar **ADC-13** de Fórmula FADC-13 (2,37 mg/mL, 0,88 mL), que foi armazenado a 4°C.

[488] O valor médio calculado por UV-Vis: n=6,53.

Exemplo 34 ADC-14



FADC-14

[489] Uma solução aquosa formulada de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (10 mM, 20,38 µL, 203,8 nmol) foi adicionada a uma solução aquosa tamponada com PBS de anticorpo Trastuzumab (solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5; 10,0 mg/ml, 0,592 mL, 40,0 nmol) a 37°C. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 37ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi resfriada a 25°C em um banho gelado.

[490] Composto **17** (0,92 mg, 598 nmol) foi dissolvido em 40 µl de DMSO, e em seguida adicionado à solução de reação acima. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 25ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi dessalgada e purificada com uma coluna em gel Sephadex G25 (fase de eluição: solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5, contendo EDTA a 0,001 M) para obter a solução tamponada com PBS do produto exemplar **ADC-14** de Fórmula FADC-14 (0,30 mg/mL, 12,0 mL), que foi armazenado a 4°C.

[491] O valor médio calculado por UV-Vis: n=7,61.

Exemplo 35 ADC-15



FADC-15

[492] Uma solução aquosa formulada de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (10 mM, 20,38 µL, 203,8 nmol) foi adicionada a uma solução aquosa tamponada com PBS de anticorpo Trastuzumab (solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5; 10,0 mg/ml, 0,592 mL, 40,0 nmol) a 37°C. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 37ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi resfriada a 25°C em um banho gelado.

[493] Composto **18** (0,93 mg, 599 nmol) foi dissolvido em 40 µl de DMSO, e em seguida adicionado à solução de reação acima. A solução

de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 25ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi dessalgada e purificada com uma coluna em gel Sephadex G25 (fase de eluição: solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5, contendo EDTA a 0,001 M) para obter a solução tamponada com PBS do produto exemplar **ADC-15** de Fórmula FADC-15 (0,32 mg/mL, 11,8 mL), que foi armazenado a 4°C.

[494] O valor médio calculado por UV-Vis: n=7,89.

Exemplo 36 ADC-16



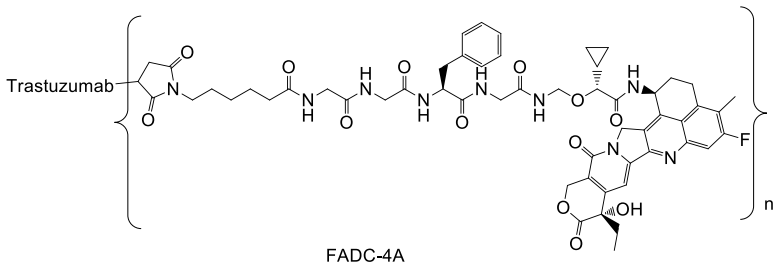
FADC-16

[495] Uma solução aquosa formulada de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (10 mM, 18,25 µL, 182,5 nmol) foi adicionada a uma solução aquosa tamponada com PBS de anticorpo Trastuzumab (solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5; 10,0 mg/ml, 0,53 mL, 35,8 nmol) a 37°C. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 37ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi resfriada a 25°C em um banho gelado.

[496] Composto **19** (0,83 mg, 534 nmol) foi dissolvido em 35 µl de DMSO, e em seguida adicionado à solução de reação acima. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 25ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi dessalgada e purificada com uma coluna em gel Sephadex G25 (fase de eluição: solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5, contendo EDTA a 0,001 M) para obter a solução tamponada com PBS do produto exemplar **ADC-16** de Fórmula FADC-16 (0,32 mg/mL, 12,0 mL), que foi armazenado a 4°C.

[497] O valor médio calculado por UV-Vis: n=7,43.

Exemplo 37 ADC-17



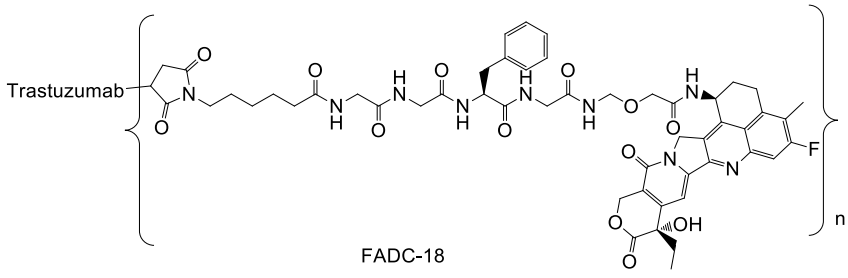
FADC-4A

[498] Uma solução aquosa formulada de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (10 mM, 43,2 μL, 432 nmol) foi adicionada a uma solução aquosa tamponada com PBS de anticorpo Trastuzumab (solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5; 10,0 mg/ml, 2,0 mL, 135,12 nmol) a 37°C. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 37ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi resfriada a 25°C em um banho gelado.

[499] Composto **9**-tendo tempo de retenção mais curto, o composto **9-A** (2,22 mg, 2067 nmol) foi dissolvido em 175 μl de DMSO, e em seguida adicionado à solução de reação acima. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 25ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi dessalgada e purificada com uma coluna em gel Sephadex G25 (fase de eluição: solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5, contendo EDTA a 0,001 M) para obter a solução tamponada com PBS do produto exemplar **ADC-17** de Fórmula FADC-4A (1,32 mg/mL, 12,0 mL), que foi armazenado a 4°C.

[500] O valor médio calculado por UV-Vis: n=5,42.

Exemplo 38 ADC-18 (exemplo de referência)



FADC-18

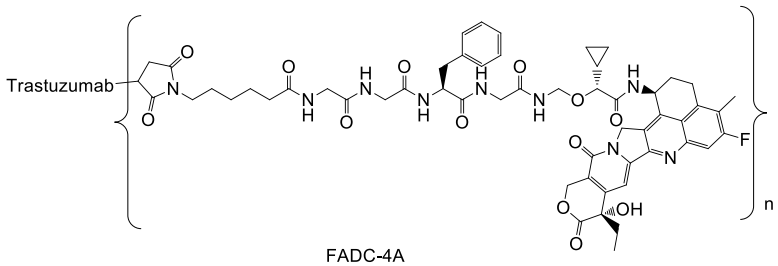
[501] Uma solução aquosa formulada de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (10 mM, 51,7 μL, 517 nmol) foi adicionado a uma solução

aquosa tamponada com PBS de anticorpo Trastuzumab (solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5; 10,0 mg/ml, 1,5 mL, 101,3 nmol) a 37°C. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 37ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi resfriada a 25°C em um banho gelado.

[502] Composto **20** (2,0 mg, 1934 nmol) foi dissolvido em 100 µl de DMSO, e em seguida adicionado à solução de reação acima. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 25ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi dessalgada e purificada com uma coluna em gel Sephadex G25 (fase de eluição: solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5, contendo EDTA a 0,001 M) para obter a solução tamponada com PBS do produto exemplar **ADC-18** de Fórmula FADC-18 (0,79 mg/mL, 13,0 mL), que foi armazenado a 4°C.

[503] O valor médio calculado por UV-Vis: n=7,23.

Exemplo 39 ADC-19



FADC-4A

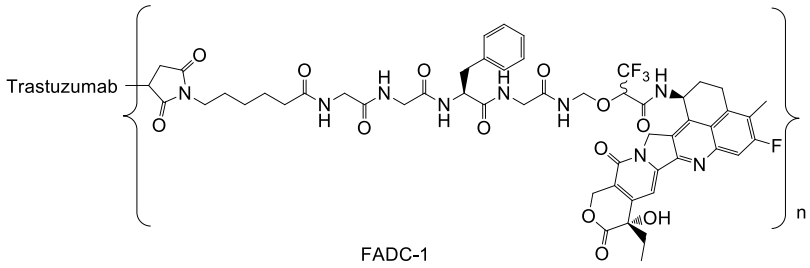
[504] Uma solução aquosa formulada de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (10 mM, 46,9 µL, 469 nmol) foi adicionada a uma solução aquosa tamponada com PBS de anticorpo Trastuzumab (solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5; 10,0 mg/ml, 1,36 mL, 91,9 nmol) a 37°C. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 37ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi resfriada a 25°C em um banho gelado.

[505] Composto **9**-tendo tempo de retenção mais curto, o composto **9-A** (2,0 mg, 1862 nmol) foi dissolvido em 100 µl de DMSO, e em seguida adicionado à solução de reação acima. A solução de reação foi

colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 25ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi dessalgada e purificada com uma coluna em gel Sephadex G25 (fase de eluição: solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5, contendo EDTA a 0,001 M) para obter a solução tamponada com PBS do produto exemplar **ADC-19** de Fórmula FADC-4A (0,73 mg/mL, 13,0 mL), que foi armazenado a 4°C.

[506] O valor médio calculado por UV-Vis: n=6,26.

Exemplo 40 ADC-20



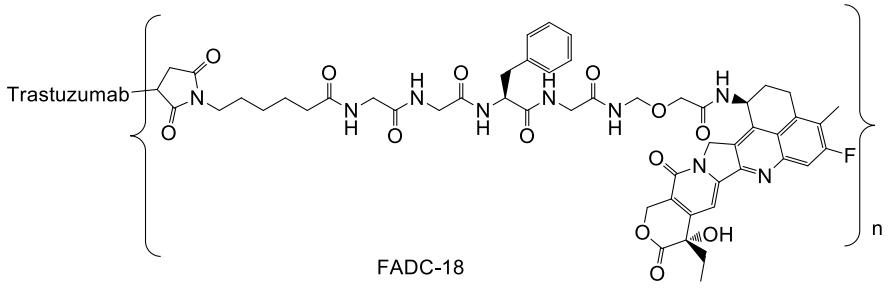
FADC-1

[507] Uma solução aquosa formulada de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (10 mM, 51,7 µL, 517 nmol) foi adicionada a uma solução aquosa tamponada com PBS de anticorpo Trastuzumab (solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5; 10,0 mg/ml, 1,5 mL, 101,3 nmol) a 37°C. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 37ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi resfriada a 25°C em um banho gelado.

[508] Composto **10**, o composto tendo tempo de retenção mais longo (2,0 mg, 1815 nmol) foi dissolvido em 100 µl de DMSO, e em seguida adicionado à solução de reação acima. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 25ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi dessalgada e purificada com uma coluna em gel Sephadex G25 (fase de eluição: solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5, contendo EDTA a 0,001 M) para obter a solução tamponada com PBS do produto exemplar **ADC-20** de Fórmula FADC-1 (0,73 mg/mL, 13,0 mL), que foi armazenado a 4°C.

[509] O valor médio calculado por UV-Vis: n=7,43.

Exemplo 41 ADC-21 (exemplo de referência)



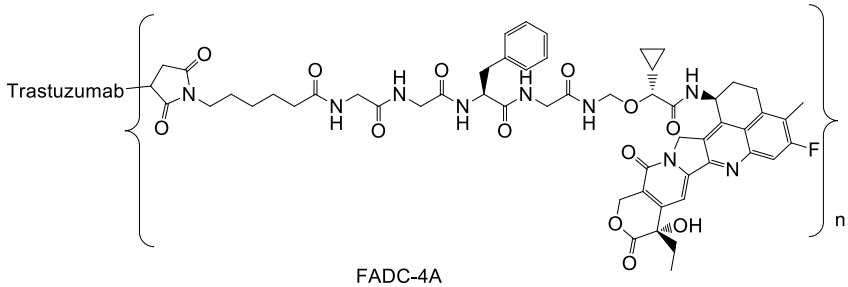
FADC-18

[510] Uma solução aquosa formulada de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (10 mM, 63,9 µL, 639 nmol) foi adicionada a uma solução aquosa tamponada com PBS de anticorpo Trastuzumab (solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5; 10,0 mg/ml, 1,86 mL, 125,4 nmol) a 37°C. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 37ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi resfriada a 25°C em um banho gelado.

[511] Composto **20** (2,07 mg, 2001 nmol) foi dissolvido em 150 µl de DMSO, e em seguida adicionado à solução de reação acima. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 25ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi dessalgada e purificada com uma coluna em gel Sephadex G25 (fase de eluição: solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5, contendo EDTA a 0,001 M) para obter a solução tamponada com PBS do produto exemplar **ADC-21** de Fórmula FADC-18 (2,91 mg/mL, 4,44 mL), que foi armazenado a 4°C.

[512] O valor médio calculado por UV-Vis: n=7,23.

Exemplo 42 ADC-22



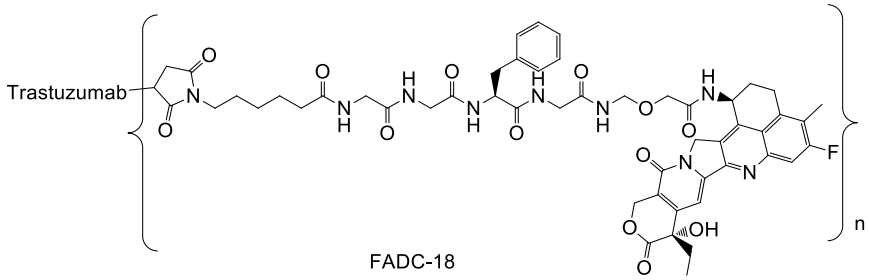
FADC-4A

[513] Uma solução aquosa formulada de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (10 mM, 64,9 µL, 649 nmol) foi adicionada a uma solução aquosa tamponada com PBS de anticorpo Trastuzumab (solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5; 10,0 mg/ml, 1,88 mL, 127,2 nmol) a 37°C. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 37ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi resfriada a 25°C em um banho gelado.

[514] Composto **9**-tendo tempo de retenção mais curto, o composto **9-A** (2,1 mg, 1955 nmol) foi dissolvido em 150 µl de DMSO, e em seguida adicionado à solução de reação acima. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 25ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi dessalgada e purificada com uma coluna em gel Sephadex G25 (fase de eluição: solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5, contendo EDTA a 0,001 M) para obter a solução tamponada com PBS do produto exemplar **ADC-22** de Fórmula FADC-4A (3,56 mg/mL, 3,98 mL), que foi armazenado a 4°C.

[515] O valor médio calculado por UV-Vis: n=6,79.

Exemplo 43 ADC-23 (exemplo de referência)



FADC-18

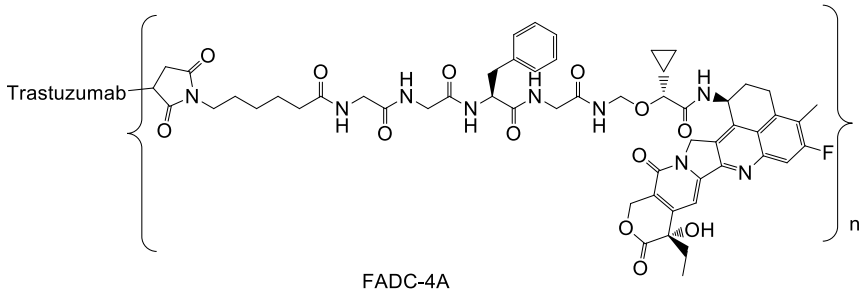
[516] Uma solução aquosa formulada de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (10 mM, 11,89 mL, 118,9 µmol) foi adicionada a uma solução aquosa tamponada com PBS de anticorpo Trastuzumab (solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5; 10,0 mg/ml, 345 mL, 23,31 µmol) a 37°C. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 37ºC por 3,5 horas antes de parar a

reação. A solução de reação foi resfriada a 25°C em um banho gelado.

[517] Composto **20** (362 mg, 350 μmol) foi dissolvido em 7,12 ml de MeCN e 3,56 mL de DMSO, e em seguida adicionado à solução de reação acima. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 25ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi dessalgada e purificada por um pacote ultrafiltração com solução aquosa tamponada com PBS contendo MeCN a 2% (v/v) e DMSO a 1% (v/v) (solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5) e solução aquosa tamponada com ácido succínico (solução aquosa tamponada com ácido succínico a 0,01 M com pH=5,3). Sacarose foi adicionado a 60 mg/mL, e Tween 20 foi adicionado a 0,2 mg/mL. A solução foi engarrafada e liofilizada para obter a amostra de pó liofilizado do produto exemplar **ADC-23** de Fórmula FADC-18, que foi armazenado a 4°C.

[518] O valor médio calculado por UV-Vis: n=7,05.

Exemplo 44 ADC-24



FADC-4A

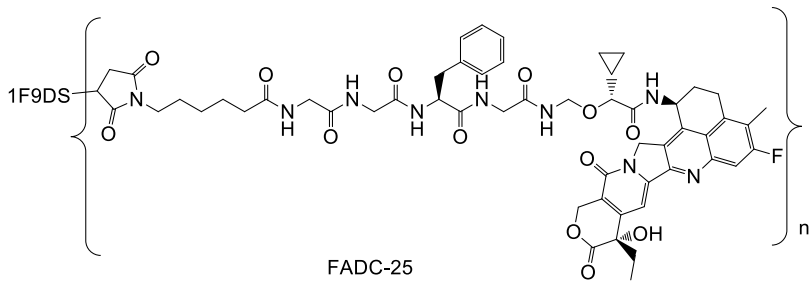
[519] Uma solução aquosa formulada de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (10 mM, 11,44 mL, 114,4 μmol) foi adicionada a uma solução aquosa tamponada com PBS de anticorpo Trastuzumab (solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5; 10,0 mg/ml, 332 mL, 22,43 μmol) a 37°C. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 37ºC por 3,5 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi resfriada a 25°C em um banho gelado.

[520] Composto **9**-tendo tempo de retenção mais curto, o composto **9-A** (241 mg, 224 μmol) foi dissolvido em 13,76 ml de MeCN e

6,88 mL de DMSO, e em seguida adicionado à solução de reação acima. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 25ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi dessalgada e purificada por um pacote ultrafiltração com solução aquosa tamponada com PBS contendo MeCN a 4% (v/v) e DMSO a 2% (v/v) (solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5) e solução aquosa tamponada com ácido succínico (solução aquosa tamponada com ácido succínico a 0,01 M com pH=5,3). Sacarose foi adicionado a 60 mg/mL, e Tween 20 foi adicionado a 0,2 mg/mL. A solução foi engarrafada e liofilizada para obter a amostra de pó liofilizado do produto exemplar **ADC-24** de Fórmula FADC-4A, que foi armazenado a 4°C.

[521] O valor médio calculado por UV-Vis: n=7,07.

Exemplo 45 ADC-25



FADC-25

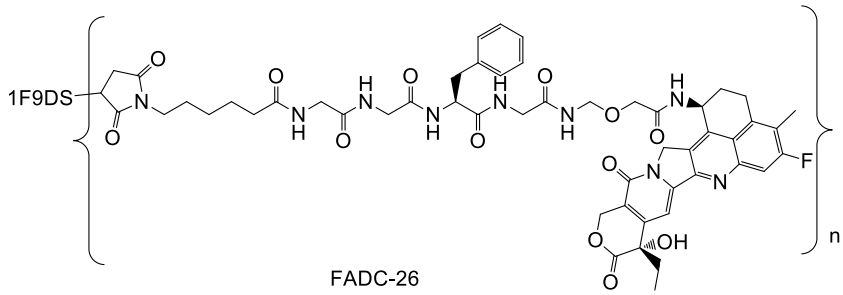
[522] Uma solução aquosa formulada de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (10 mM, 73,7 µL, 740 nmol) foi adicionada a uma solução aquosa tamponada com PBS de anticorpo B7H3 anticorpo 1F9DS (solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5; 10,0 mg/ml, 2,14 mL, 144,60 nmol) a 37°C. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 37ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi resfriada a 25°C em um banho gelado.

[523] Composto **9**-tendo tempo de retenção mais curto, o composto **9-A** (3,0 mg, 2793 nmol) foi dissolvido em 150 µl de DMSO, e em seguida adicionado à solução de reação acima. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 25ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi dessalgada e

purificada com uma coluna em gel Sephadex G25 (fase de eluição: solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5, contendo EDTA a 0,001 M) para obter a solução tamponada com PBS do produto exemplar **ADC-25** de Fórmula FADC-25 (1,28 mg/mL, 13,0 mL), que foi armazenado a 4°C.

[524] O valor médio calculado por UV-Vis: n=6,87.

Exemplo 46 ADC-26 (exemplo de referência)



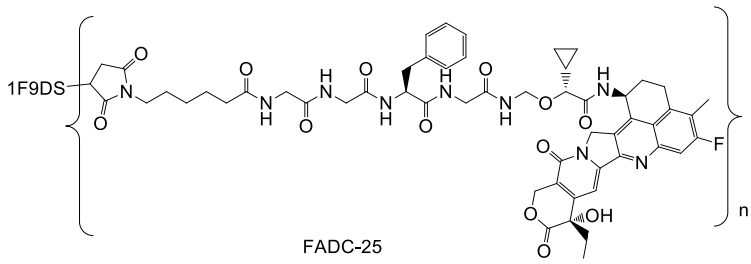
FADC-26

[525] Uma solução aquosa formulada de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (10 mM, 30,1 µL, 300 nmol) foi adicionada a uma solução aquosa tamponada com PBS de anticorpo B7H3 anticorpo 1F9DS (solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5; 10,0 mg/ml, 0,89 mL, 60,14 nmol) a 37°C. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 37ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi resfriada a 25°C em um banho gelado.

[526] Composto **20** (1,0 mg, 967 nmol) foi dissolvido em 100 µl de DMSO, e em seguida adicionado à solução de reação acima. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 25ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi dessalgada e purificada com uma coluna em gel Sephadex G25 (fase de eluição: solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5, contendo EDTA a 0,001 M) para obter a solução tamponada com PBS do produto exemplar **ADC-26** de Fórmula FADC-26 (1,61 mg/mL, 4,0 mL), que foi armazenado a 4°C.

[527] O valor médio calculado por UV-Vis: n=6,15.

Exemplo 47 ADC-27



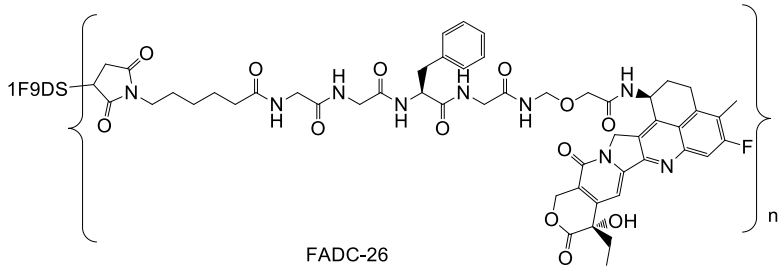
FADC-25

[528] Uma solução aquosa formulada de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (10 mM, 30,1 µL, 300 nmol) foi adicionada a uma solução aquosa tamponada com PBS de anticorpo B7H3 anticorpo 1F9DS (solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5; 10,0 mg/ml, 0,89 mL, 60,14 nmol) a 37°C. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 37ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi resfriada a 25°C em um banho gelado.

[529] Composto **9**-tendo tempo de retenção mais curto, o composto **9-A** (1,02 mg, 950 nmol) foi dissolvido em 100 µl de DMSO, e em seguida adicionado à solução de reação acima. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 25ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi dessalgada e purificada com uma coluna em gel Sephadex G25 (fase de eluição: solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5, contendo EDTA a 0,001 M) para obter a solução tamponada com PBS do produto exemplar **ADC-27** de Fórmula FADC-25 (1,94 mg/mL, 3,5 mL), que foi armazenado a 4°C.

[530] O valor médio calculado por UV-Vis: n=6,11.

Exemplo 48 ADC-28 (exemplo de referência)



FADC-26

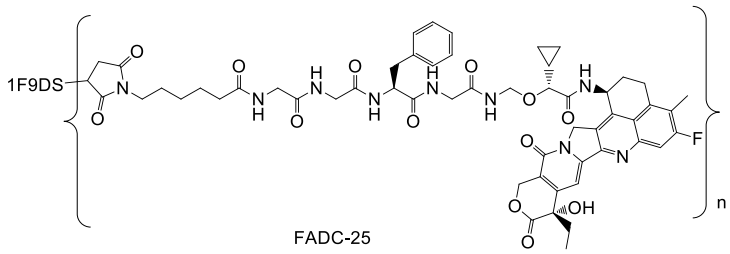
[531] Uma solução aquosa formulada de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (10 mM, 81,3 µL, 810 nmol) foi adicionada a uma solução

aquosa tamponada com PBS de anticorpo B7H3 anticorpo 1F9DS (solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5; 10,0 mg/ml, 2,36 mL, 159,47 nmol) a 37°C. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 37ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi resfriada a 25°C em um banho gelado.

[532] Composto **20** (3,0 mg, 2901 nmol) foi dissolvido em 150 µl de DMSO, e em seguida adicionado à solução de reação acima. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 25ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi dessalgada e purificada com uma coluna em gel Sephadex G25 (fase de eluição: solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5, contendo EDTA a 0,001 M) para obter a solução tamponada com PBS do produto exemplar **ADC-28** de Fórmula FADC-26 (1,29 mg/mL, 13,0 mL), que foi armazenado a 4°C.

[533] O valor médio calculado por UV-Vis: n=7,46.

Exemplo 49 ADC-29



FADC-25

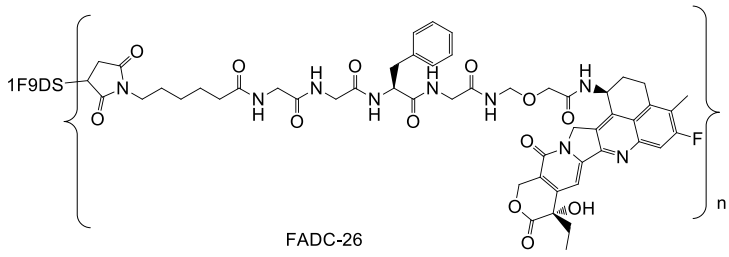
[534] Uma solução aquosa formulada de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (10 mM, 28,6 µL, 290 nmol) foi adicionado a uma solução aquosa tamponada com PBS de anticorpo B7H3 anticorpo 1F9DS (solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5; 10,0 mg/ml, 0,80 mL, 50,06 nmol) a 37°C. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 37ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi resfriada a 25°C em um banho gelado.

[535] Composto **9**-tendo tempo de retenção mais curto, o composto **9-A** (1,29 mg, 1201 nmol) foi dissolvido em 100 µl de DMSO, e em seguida adicionado à solução de reação acima. A solução de reação

foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 25ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi dessalgada e purificada com uma coluna em gel Sephadex G25 (fase de eluição: solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5, contendo EDTA a 0,001 M) para obter a solução tamponada com PBS do produto exemplar **ADC-29** de Fórmula FADC-25 (2,63 mg/mL, 2,4 mL), que foi armazenado a 4°C.

[536] O valor médio calculado por UV-Vis: n=7,24.

Exemplo 50 ADC-30 (exemplo de referência)



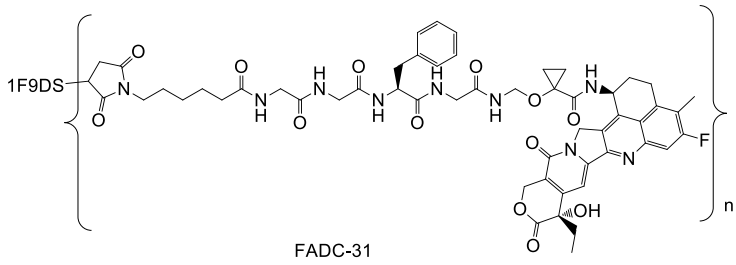
FADC-26

[537] Uma solução aquosa formulada de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (10 mM, 29,1 μL, 290 nmol) foi adicionada a uma solução aquosa tamponada com PBS de anticorpo B7H3 anticorpo 1F9DS (solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5; 10,0 mg/ml, 0,86 mL, 58,4 nmol) a 37°C. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 37ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi resfriada a 25°C em um banho gelado.

[538] Composto **20** (1,0 mg, 967 nmol) foi dissolvido em 100 μl de DMSO, e em seguida adicionado à solução de reação acima. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 25ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi dessalgada e purificada com uma coluna em gel Sephadex G25 (fase de eluição: solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5, contendo EDTA a 0,001 M) para obter a solução tamponada com PBS do produto exemplar **ADC-30** de Fórmula FADC-26 (1,61 mg/mL, 4,0 mL), que foi armazenado a 4°C.

[539] O valor médio calculado por UV-Vis: n=6,15.

Exemplo 51 ADC-31



FADC-31

[540] Uma solução aquosa formulada de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (10 mM, 30,1 µL, 300 nmol) foi adicionada a uma solução aquosa tamponada com PBS de anticorpo B7H3 anticorpo 1F9DS (solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5; 10,0 mg/ml, 0,89 mL, 60,14 nmol) a 37°C. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 37ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi resfriada a 25°C em um banho gelado.

[541] Composto **8** (1,0 mg, 943 nmol) foi dissolvido em 100 µl de DMSO, e em seguida adicionado à solução de reação acima. A solução de reação foi colocada em um agitador de banho de água, e agitada a 25ºC por 3 horas antes de parar a reação. A solução de reação foi dessalgada e purificada com uma coluna em gel Sephadex G25 (fase de eluição: solução aquosa tamponada com PBS a 0,05 M com pH=6,5, contendo EDTA a 0,001 M) para obter a solução tamponada com PBS do produto exemplar **ADC-31** de Fórmula FADC-31 (1,47 mg/mL, 4,5 mL), que foi armazenado a 4°C.

[542] O valor médio calculado por UV-Vis: n=6,33.

Análise de Carga do fármaco da Solução Estoque de ADC

Objetivo experimental e princípio

[543] A solução estoque de ADC é um tipo de fármaco conjugada com anticorpo. Seu mecanismo para o tratamento de doenças é entregar moléculas de toxina nas células por meio do direcionamento de anticorpos, matando assim as células. A carga do fármaco desempenha um papel decisivo na eficácia do fármaco. A carga do fármaco da solução estoque de ADC foi determinada pelo método ultravioleta.

Método experimental

[544] Uma cubeta contendo tampão de succinato de sódio foi colocada na célula de absorção de referência e na célula de absorção de medição da amostra, respectivamente. Após a dedução do branco do solvente, uma cubeta contendo a solução de teste foi colocada na célula de absorção de medição da amostra e a absorbância a 280 nm e 370 nm foi medida.

[545] Cálculo dos resultados: A carga do fármaco da solução estoque de ADC foi determinada por espectrofotometria ultravioleta (instrumento: espectrofotômetro ultravioleta Thermo nanodrop2000). Seu princípio é que a absorbância total da solução estoque de ADC em um determinado comprimento de onda é igual à soma da absorbância do fármaco citotóxica e a absorbância do anticorpo monoclonal naquele comprimento de onda, ou seja:

(1) $A_{280nm} = \varepsilon_{mab\text{-}280b}C_{mab} + \varepsilon_{fármaco\text{-}280}bC_{fármaco}$

$\varepsilon_{fármaco\text{-}280}$: o valor médio do coeficiente de abrsorção molar do fármaco a 280 nm é 5100;

$C_{fármaco}$: concentração do fármaco;

$\varepsilon_{mab\text{-}280}$: o valor médio do coeficiente de abrsorção molar da solução estoque de trastuzumab ou da solução estoque de pertuzumab a 280 nm é 214600;

C_{mab}: concentração da solução estoque de trastuzumab ou solução estoque de pertuzumab;

b: o comprimento do caminho óptico é de 1 cm.

[546] Da mesma forma, a equação de absorbância total da amostra a 370 nm pode ser obtida:

(2) $A_{370nm} = \varepsilon_{mab\text{-}370}bC_{mab} + \varepsilon_{Fármaco\text{-}370}bC_{Fármaco}$

$\varepsilon_{Fármaco\text{-}370}$: o valor médio do coeficiente de abrsorção molar do fármaco em 370 nm é 19000;

$C_{Fármaco}$: concentração do fármaco;

$\varepsilon_{mab-370}$: o valor médio do coeficiente de abrsorção molar da solução estoque de trastuzumab ou da solução estoque de pertuzumab a 370 nm é 0;

C_{mab}: concentração da solução estoque de trastuzumab;

b: o comprimento do caminho óptico é de 1 cm.

[547] A carga do fármaco pode ser calculada pelas duas equações (1) e (2) em combinação com o coeficiente de extinção e os dados de concentração do anticorpo monoclonal e o fármaco nos dois comprimentos de onda de detecção.

Carga do fármaco = $C_{Fármaco}/C_{mab}$.

Ensaio Biológico

Exemplo de Teste 1: Teste *in vitro* da inibição do composto de fórmula (D) na proliferação de células tumorais

I. Objetivo do teste

[548] O objetivo deste teste é testar o efeito de inibição *in vitro* do composto de fármaco de fórmula (D) da presente invenção na proliferação de células U87MG (banco de células da Academia Chinesa de Ciências, Catálogo # TCHu138) e células tumorais SK-BR-3 (células de câncer de mama humano, ATCC, artigo número HTB-30). As células foram tratadas com diferentes concentrações do composto *in vitro*. Após 6 dias de cultivo, a proliferação celular foi determinada pelo reagente CTG (Ensaio de Viabilidade Celular de Luminescência CellTiter-Glo®, Promega, número do artigo: G7573), e a atividade *in vitro* do composto foi avaliada de acordo com o valor IC_{50}.

II. Método de teste

[549] O método de teste para o teste de inibição da proliferação *in vitro* dos presentes compostos em células tumorais é descrito abaixo tomando o método de teste de inibição da proliferação *in vitro* em células U87MG como exemplo. Este método é também aplicável, mas não limi-

tado a, testes de inibição da proliferação *in vitro* em outras células tumorais.

[550] 1. Cultivo celular: células U87MG e células SK-BR-3 foram cultivadas em meio EMEM contendo 10% de FBS (GE, artigo número SH30024,01) e meio McCoy's 5A contendo 10% de FBS (Gibco, artigo número 16600-108), respectivamente.

[551] 2. Preparação de células: células U87MG e células SK-BR-3 em fase de crescimento logarítmico foram lavadas com PBS (tampão fosfato, Shanghai Basal Media Technologies Co., Ltd.) uma vez e, em seguida, adicionadas com 2-3 ml de tripsina (0,25 % Tripsina-EDTA (1 ×), Gibico, Life Technologies) para digerir por 2-3 min. 10-15 ml de meio de cultura de células foram adicionados após as células terem sido completamente digeridas. As células digeridas foram eluídas e centrifugadas a 1000 rpm durante 5 min. O sobrenadante foi descartado e 10-20 ml de meio de cultura de células foram adicionados para ressuspender as células para obter uma suspensão de uma única célula.

[552] 3. Plaqueamento de células: as suspensões de células únicas U87MG e SK-BR-3 foram bem misturadas e as densidades celulares foram ajustadas para $2,75 \times 10^3$ células/ml e $8,25 \times 10^3$ células/ml com o meio de cultura de células, respectivamente. A suspensão de células com densidade ajustada foi bem misturada e adicionada a uma placa de cultura de células de 96 poços a 180 µl/poço. 200 µl de meio de cultura foram adicionados aos poços periféricos da placa de 96 poços. A placa foi incubada em uma incubadora por 24 horas (37 ºC, 5% de CO_2).

[553] 4. Formulação do composto: o composto foi dissolvido com DMSO (dimetilsulfóxido, Shanghai Titan Technology Co., Ltd.) para obter uma solução estoque com uma concentração inicial de 10 mM.

[554] A concentração inicial do composto de molécula pequena foi de 500 nM, e o método de formulação é o seguinte.

[555] 30 µl de diferentes amostras de teste foram respectivamente adicionados à primeira coluna da placa de formulação de fundo em forma de U de 96 poços com uma concentração de amostra de 100 µM. 20 µl de DMSO foram adicionados a cada poço da segunda coluna até a 11ª coluna. 10 µl da amostra da primeira coluna foram adicionados aos 20 µl de DMSO na segunda coluna e bem misturados, dos quais 10 µl foram retirados e adicionados à terceira coluna, e assim por diante até a 10ª coluna. 5 µl de fármaco de cada poço da placa de formulação foram adicionados a 95 µl de meio de cultura EMEM e bem misturados para uso posterior.

[556] A concentração inicial de ADC foi de 10 nM ou 500 nM, e o método de formulação é o seguinte.

[557] 100 µl de diferentes amostras de teste foram respectivamente adicionados à primeira coluna da placa de 96 poços com uma concentração de amostra de 100 nM ou 5 µM. 100 µl de PBS foram adicionados a cada poço da segunda coluna à 11ª coluna. 50 µl da amostra da primeira coluna foram adicionados aos 100 µl de PBS na segunda coluna e bem misturados, dos quais 50 µl foram retirados e adicionados à terceira coluna, e assim por diante até a 10ª coluna com uma diluição.

[558] 5. Carga da amostra: 20 µl das amostras de teste formuladas de diferentes concentrações foram adicionados à placa de cultura, cada amostra foi testada em duplicata. A placa foi incubada em uma incubadora por 6 dias (37 ºC, 5% de CO_2).

[559] 6. Operação de coloração: a placa de cultura de células de 96 poços foi retirada e 90 µl de solução de CTG foram adicionados a cada poço e incubados em temperatura ambiente por 10 minutos.

[560] 7. Leitura da placa: a placa de cultura de células de 96 poços foi retirada e colocada em um leitor de microplacas (BMG labtech, FE-RAstar FS) para medir a quimiluminiscência.

III. Análise de dados

[561] Dados foram analisados com Microsoft Excel e Graphpad Prism 5. Os resultados são apresentados na seguinte tabela.

Tabela 1 Valor de IC_{50} de inibição *in vitro* dos fragmentos de moléculas pequenas da presente invenção na proliferação de células SK-BR-3 e células U87

No. do Composto	IC_{50} (nM)	
	SK-BR-3	U87
1	0,12	0,23
2-Tempo de retenção mais curto 2-B	0,33	0,86
2- Tempo de retenção mais longo 2-A	8,11	2,31
3- Tempo de retenção mais curto	0,36	0,83
3- Tempo de retenção mais longo	1,67	2,98
4	1,9	/
5	/	4,81
6	/	1,83
7	/	1,95

[562] Conclusão: O fragmento de molécula pequena da presente invenção tem atividade inibitória óbvia na proliferação de células SK-BR-3 e células U87, e o centro quiral tem certa afecção na atividade inibidora do composto.

Exemplo de teste 2: Teste *in vitro* da inibição do presente conjugado fármaco-anticorpo direcionado a HER2 na proliferação de células tumorais

[563] O objetivo deste teste é testar o efeito de inibição *in vitro* do presente conjugado fármaco-anticorpo direcionado a HER2 na proliferação de células SK-BR-3 (células de câncer de mama humano, ATCC, artigo número HTB-30) e células MDA-MB-468 (células de câncer de mama humano, ATCC, artigo número HTB-132). As células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos *in vitro*. Após 6 dias de cultivo, a proliferação celular foi determinada pelo reagente CTG, e a atividade *in vitro* dos compostos foi avaliada de acordo com o valor

IC_{50}.

[564] De acordo com o método de teste do Exemplo de Teste 1, as células de teste eram células SK-BR-3 e células MDA-MB-468, e o meio de cultura de células era meio 5A de McCoy contendo 10% de FBS (Gibco, artigo número 16600-108), meio EMEM contendo 10% de FBS (GE, artigo número SH30024,01) e meio L-15 contendo 10% de FBS (ThermoFisher, artigo número 11415-114). As densidades de células viáveis das três linhagens de células foram ajustadas para 8,33 x 10^3 células/ml, 8,33 x 10^3 células/ml e 1,39 x 10^4 células/ml com o meio de cultura de células, respectivamente. A suspensão de células com densidade ajustada foi bem misturada e adicionada a uma placa de cultura de células de 96 poços a 180 µl/poço. Compostos relacionados foram testados e os resultados são mostrados na tabela abaixo.

Tabela 2 Valor de IC^{50} de inibição in vitro do presente conjugado fármaco-anticorpo direcionado a HER2 na proliferação de células tumorais

No. do Composto	IC_{50} (nM)	
	SK-BR-3	MDA-MB-468
ADC-3	0,43	>50
ADC-4	0,30	>50
ADC-6	0,48	>50
ADC-7	0,14	>50
ADC-9	0,95	>50
ADC-10	1,36	>50
ADC-11	0,73	>50
ADC-12	0,82	>50
ADC-13	0,47	>50
ADC-14	0,53	>50
ADC-15	0,38	>50
ADC-16	0,49	>50
ADC-17	0,37	>50

[565] Conclusão: o conjugado anticorpo-fármaco direcionado a HER2 da presente invenção tem atividade inibitória óbvia na proliferação de células SK-BR-3 positivas para HER2. Enquanto isso, tem baixa atividade inibitória na proliferação de células MDA-MB-468 negativas

para HER2. Portanto, tem boa seletividade.

Exemplo de teste 3: Teste de estabilidade de plasma Her2-ADC

[566] Amostra ADC-19, amostra ADC-18, amostra ADC-20, plasma humano, plasma de macaco (Shanghai Medicilon Inc.) e solução de BSA (Sigma) PBS a 1% (Sangon Biotech (Shanghai) Co., Ltd.) foram filtrados respectivamente através de um filtro de 0,22 μm para esterilização. ADC-19, ADC-18 e ADC-20 foram adicionados ao plasma estéril acima ou solução de BSA PBS a 1% a uma concentração final de 200 μg/ml, respectivamente, que foi então incubado em uma incubadora de células a 37 ºC, e o dia inicial da incubação foi registrado como Dia 0. As amostras foram coletadas no Dia 7, Dia 14 e Dia 21 para detecção de toxina livre cção.

[567] 25 μl de amostra foram adicionados a uma placa de 96 poços. 50 μL de solução de trabalho de padrão interno (100 ng/mL de camptotecina em acetonitrila) e 150 μl de acetonitrila foram adicionados. A solução foi agitada com vórtex por 5 minutos e centrifugada por 10 minutos (4000 rpm). 5 μl da solução foram retirados para análise LC/MS/MS (Applied Biosystems, Inc., EUA).

[568] Os resultados mostram que ADC-19 é bastante estável em plasma humano, plasma de macaco e solução de BSA PBS a 1%. A taxa de liberação de toxina livre não excedeu 2,1% e tornou-se estável no Dia 14. Os resultados são mostrados na Figura 1A.

[569] ADC-18 tem baixa estabilidade em plasma humano e plasma de macaco, e a maior taxa de liberação de toxina livre foi de 14,5% e 8,10%, respectivamente. É estável em solução de PBS BSA a 1%. Os resultados são mostrados na Figura 1B.

[570] ADC-20 tem baixa estabilidade em plasma humano, plasma de macaco e solução de BSA PBS a 1%, e a maior taxa de liberação de toxina livre foi de 21,7%, 29,7% e 21,7%, respectivamente. Ele estava

sempre em um estado de degradação em solução BSA PBS a 1%. Os resultados são mostrados na Figura 1C.

Exemplo de Teste 4: Avaliação da eficácia em camundongos com tumor JIMT-1

I. Objetivo do teste

[571] Camundongos nus Nunu foram usados como o animal de teste para avaliar a eficácia do anticorpo Her2-ADC T-DM1, ADC-21 e ADC-24 em camundongos nus de tumor de mama humano resistentes a trastuzumab (Herceptina) da cepa de tumor transplantado JIMT-1 após injeção intraperitoneal.

II. Fármacos e materiais de teste

1. Teste de fármacos

T-DM1 (preparado com referência ao pedido de patente US20050169933)

ADC-21: 3 mg/kg

ADC-21: 10 mg/kg

ADC-24: 3 mg/kg

ADC-24: 10 mg/kg

Branco: PBS

2. Método de formulação: as drgas foram todas diluídas e formuladas com PBS.

3. Animais de teste

[572] Camundongos nus Nunu, adquiridos de Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.

III. Método de teste

[573] Células JIMT-1 (Nanjing Cobioer Biosciences Co., Ltd.) (5 x 10^6 células/camundongo, tendo 50% de matrigel) foram inoculadas por via subcutânea na costela direita do camundongo. Após o tumor crescer por 8 dias e atingir 203,09 ± 11,94 mm^3, os animais foram agrupados aleatoriamente em 6 grupos com 8 animais por grupo (d1).

[574] Os fármacos foram administradas por injeção intraperitoneal por um total de 2 vezes. O volume do tumor e o peso corporal foram medidos duas vezes por semana e os dados foram registrados.

[575] O software estatístico Excel 2003 foi usado para estatísticas de dados: o valor médio foi calculado como média; O valor SD foi calculado como STDEV; O valor SEM foi calculado como STDEV/SQRT; O valor P entre os diferentes grupos foi calculado como TTEST.

Volume do Tumor (V) foi calculado como: V=1/2×LComprimento×Lcurto^2

Volume relativo (RTV) = V_T/V_0

[576] Taxa de inibição do tumor (%) = $(C_{RTV}-T_{RTV})/C_{RTV}$ (%),

em que V_0 e V_T representam o volume do tumor no início e no final do teste, respectivamente. C_{RTV} e T_{RTV} representam o volume relativo do tumor do grupo de controle em branco (Veículo, PBS) e o grupo de teste no final do teste, respectivamente.

4. Resultado dos testes

[577] Os resultados do teste são mostrados na Figura 2. Os fármacos foram administradas por injeção intraperitoneal por 2 vezes, e o teste terminou no Dia 34 de observação. T-DM1 (10 mg/kg) não mostra nenhum efeito de inibição no tumor; ADC-21 (3 mg/kg) mostra uma taxa de inibição do tumor de 46,22% ($P < 0,01$); ADC-21 (10 mg/kg) mostra uma taxa de inibição do tumor de 56,77% ($P < 0,001$); ADC-24 (3 mg/kg) mostra uma taxa de inibição do tumor de 62,77% ($P < 0,001$); e ADC-24 (10 mg/kg) mostra uma taxa de inibição do tumor de 76,32% ($P < 0,001$). Com a mesma dose, o efeito de inibição tumoral do ADC-24 é significativamente melhor do que o do ADC-21.

Exemplo de teste 5: Avaliação da eficácia em camundongos portadores de tumor SK-BR-3

I. Objetivo do teste

[578] Camundongos nus Nunu foram usados como o animal de

teste para avaliar a eficácia do anticorpo Her2-ADC ADC-21 e ADC-22 em camundongos nus de tumor transplantado da cepa de células de câncer de mama humano SK-BR-3 após injeção intraperitoneal.

II. Fármacos e materiais de teste

1. Teste de fármacos

ADC-21: 1 mg/kg

ADC-21: 6 mg/kg

ADC-22: 1 mg/kg

ADC-22: 6 mg/kg

Branco: PBS

2. Método de formulação: os fármacos foram todas diluídas e formuladas com PBS.

3. Animais de teste

[579] Camundongos nus Nunu, adquiridos de Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.

III. Método de teste

[580] Células SK-BR-3 (ATCC) (5×10^6 células/camundongo, tendo 50% de matrigel) foram inoculadas por via subcutânea na costela direita de camundongo. Após o tumor crescer por 20 dias e atingir 153,34 ± 11,73 mm^3, os animais foram agrupados aleatoriamente em 5 grupos com 8 animais por grupo (d0).

[581] Os fármacos foram administradas por injeção intraperitoneal uma vez. O volume do tumor e o peso corporal foram medidos duas vezes por semana e os dados foram registrados.

[582] O software estatístico Excel 2003 foi usado para estatísticas de dados: o valor médio foi calculado como média; O valor SD foi calculado como STDEV; O valor SEM foi calculado como STDEV/SQRT; O valor P entre os diferentes grupos foi calculado como TTEST.

[583] O volume do tumor (V) foi calculado como: $V=1/2\times LComprimento\times Lcurto^2$

Volume relativo (RTV) = V_T/V_0

Taxa de inibição do tumor (%) = $(C_{RTV}-T_{RTV})/C_{RTV}$ (%),

em que V_0 e V_T representam o volume do tumor no início e no final do teste, respectivamente. C_{RTV} e T_{RTV} representam o volume de tumor relatico do grupo de controle em branco e do grupo de teste no final do experimento, respectivamente.

4. Resultado dos testes

[584] Os resultados do teste são mostrados na Figura 3. Os fármacos foram administradas por injeção intraperitoneal uma vez e o teste terminou no Dia 28 de observação. ADC-21 (1 mg/kg) mostra uma taxa de inibição do tumor de 15,01%; e ADC-21 (6 mg/kg) mostra uma taxa de inibição do tumor de 77,4%, que difere significativamente do controle em branco ($P < 0,001$). ADC-22 (1 mg/kg) mostra uma taxa de inibição do tumor de 19,82%; e ADC-22 (6 mg/kg) mostra uma taxa de inibição do tumor de 98,38% ($P < 0,001$). Com a mesma dose de 6 mg/kg, o efeito de inibição tumoral do ADC-22 é significativamente melhor do que o do ADC-21.

Exemplo de Teste 6: Teste de estabilidade do plasma

[585] A amostra de ADC-25 foi bem misturada com plasma humano, plasma de macaco e solução de BSA PBS a 1%, respectivamente, a uma concentração final de 100 μg/ml e filtrada para esterilização. A mistura foi incubada em banho-maria a 37 ºC e o dia inicial da incubação foi registrada como Dia 0. As amostras foram coletadas no Dia 7, Dia 14 e Dia 21 para detecção de toxina livre.

[586] As amostras coletadas em diferentes pontos de tempo foram resfriadas à temperatura ambiente e bem misturadas por vórtice. 25 μl de amostra foram adicionados a uma placa de 96 poços. 50 μL de solução de trabalho de padrão interno (100 ng/mL de camptotecina em acetonitrila) e 150 μl de acetonitrila foram adicionados. A solução foi agitada com vórtex por 5 minutos e centrifugada por 10 minutos (4000 rpm). 5

µl da solução foram retirados para análise LC/MS/MS.

[587] Os resultados são mostrados na Figura 4. ADC-25 é bastante estável em plasma humano, plasma de macaco e solução de BSA PBS a 1%. A taxa de liberação de toxina livre não excedeu 2% e tornou-se estável no Dia 14.

Exemplo de teste 7: Avaliação da eficácia de ADC em tumor de xenoenxerto de astroblastoma U87MG de cérebro humano em camundongos nus

I. Objetivo do teste

[588] Camundongos nus BALB/cA foram usados como o animal de teste para avaliar a eficácia do composto ADC da presente invenção no tumor de xenoenxerto de astroblastoma U87MG de cérebro humano em camundongos nus.

II. Fármacos e materiais de teste

1. Teste de fármacos

ADC-27 (3 mg/kg)

ADC-26 (3 mg/kg)

Branco: solução tampão PBS (pH 7,4)

2. Método de formulação: solução tampão PBS (pH 7,4).

3. Animais de teste

Camundongos nus BALB/cA, adquiridos de Shanghai JieSiJie Laboratory Animal Co., Ltd.

III. Método de teste

[589] Camundongos nus BALB/cA (fêmeas, 6 a 7 semanas de idade) foram usados no teste. Células de astroblastoma de cérebro humano U87MG (astroblastoma de cérebro humano, banco de células da Academia Chinesa de Ciências, Catálogo # TCHu138) foram inoculadas por via subcutânea. No dia 10 após a inoculação, os animais foram agrupados aleatoriamente em 8 animais por grupo (D0), e os fármacos foram

administradas por injeção intraperitoneal uma vez por semana por 3 vezes. O volume do tumor e o peso corporal foram medidos 2 a 3 vezes por semana, e os dados foram registrados. A fórmula de cálculo do volume do tumor (V) é a seguinte:

$V = 1/2 \times a \times b^2$

em que a e b representam comprimento e largura, respectivamente.

Volume relativo (RTV) = V_T/V_0

Taxa de inibição do tumor (%) = $(C_{RTV} - T_{RTV})/C_{RTV}$ (%)

em que V_0 e V_T representam o volume do tumor no início e no final do teste, respectivamente. C_{RTV} e T_{RTV} representam o volume do tumor relativo do grupo de controle (branco) e do grupo de teste no final do teste, respectivamente.

4. Resultado dos testes

[590] A administração por injeção intraperitoneal (i.p.) foi realizada uma vez por semana por 3 vezes. No Dia 22 da observação, a taxa de inibição do tumor de ADC-27 (3 mg/kg) atingiu 63,3% ($P < 0,0001$); e a taxa de inibição tumoral de ADC-26 (3 mg/kg) atingiu 49,1%. ADC-27 mostra eficácia antitumoral mais forte do que ADC-26.

[591] Durante a administração, os animais em cada grupo apresentam pesos corporais normais, sugerindo que a ADC não tem efeitos colaterais óbvios. Os resultados do teste são mostrados na Tabela 3 e Figura 5. Os anticorpos testados podem inibir efetivamente o crescimento do tumor de xenoenxerto U87MG em camundongos nus portadores de tumor e mostram uma maneira dependente da dose.

Tabela 3 Eficácia do anticorpo administrado no tumor de xenoenxerto de astroblastoma U87MG de cérebro humano em camundongos nus (D22)

Grupo	Volume Médio do Tumor (mm^3)				Volume Relativo do Tumor		Taxa de Inibição do Tumor (%)
	Dia 0	SEM	Dia 22	SEM	Dia 22	SEM	Dia 22
Controle em branco	167,06	17,74	2906,96	327,6	17,76	1,63	-

ADC-27 3mpk	167,07	16,06	1172,48	80,27	7,55	0,95	63,3***
ADC-26 3mpk	167,73	17,63	1561,03	303,37	8,83	1,17	49,1***

Exemplo de teste 8: Avaliação da eficácia de ADC em tumor de xenoenxerto de células metastáticas Detroit 562 de carcinoma da faringe humano em células metastáticas de camundongos nus

I. Objetivo do teste

[592] Camundongos nus BALB/cA foram usados como o animal de teste para avaliar a eficácia do composto ADC da presente invenção no tumor xenoenxerto de células metastáticas Detroit 562 de carcinoma da faringe humana em células metastáticas de camundongos nus.

II. Fármacos e materiais de teste

1. Teste de fármacos

ADC-29 (3mg/kg)

ADC-28 (3mg/kg)

Controle negativo ADC (3mg/kg): conjugado ligante-toxina formado por acoplamento de alvo não B7H3 com o composto 20.

2. Método de formulação: os medicamentos foram todos diluídos e formulados com PBS.

3. Animais de teste

[593] BALB/cA-nude ratos nus, adquiridos de Changzhou Cavens Laboratory Animal Co., Ltd.

III. Método de teste

[594] Camundongos nus BALB/cA (fêmeas, 6 a 7 semanas de idade) foram usados no teste. Células metastáticas do fluido pleural de carcinoma da faringe humana Células Detroit 562 (ATCC, Catálogo # ATCC® CCL-138 ™) foram inoculadas por via subcutânea. No dia 10 após a inoculação, os animais foram agrupados aleatoriamente em 8 animais por grupo (D0), e os fármacos foram administradas por injeção intraperitoneal uma vez por semana por 3 vezes. O volume do tumor e o peso corporal foram medidos 2 a 3 vezes por semana, e os dados

foram registrados. A fórmula de cálculo do volume do tumor (V) é a seguinte:

$V = 1/2 \times a \times b^2$

em que a e b representam comprimento e largura, respectivamente.

Volume relativo (RTV) = V_T/V_0

Taxa de inibição do tumor (%) = $(C_{RTV} - T_{RTV})/C_{RTV}$ (%)

em que V_0 e V_T representam o volume do tumor no início e no final do teste, respectivamente. C_{RTV} e T_{RTV} representam o volume relativo do tumor do grupo de controle (controle negativo) e do grupo de teste no final do teste, respectivamente.

4. Resultado dos testes

[595] A administração por injeção intraperitoneal foi realizada uma vez por semana por 3 vezes. No Dia 28 da observação, a taxa de inibição do tumor de ADC-29 (3 mg/kg, 3 mpk) atingiu 72,27% ($P < 0,001$); e a taxa de inibição tumoral de ADC-28 (3 mg/kg, 3mpk) atingiu 56,2% ($P < 0,001$). ADC-29 mostra eficácia antitumoral mais forte do que ADC-28.

[596] Durante a administração, os animais em cada grupo apresentaram pesos corporais normais, sugerindo que a ADC não tem efeitos colaterais óbvios. Os resultados do teste são mostrados na Tabela 4 e Figura 6. Os anticorpos testados podem inibir efetivamente o crescimento do tumor de xenoenxerto Detroit 562 em camundongos nus portadores de tumor e mostram uma maneira dependente da dose.

Tabela 4. Eficácia do anticorpo administrado no tumor de xenoenxerto Detroit 562 em camundongos nus com tumor (D28)

Grupo	Volume Médio do Tumor (mm^3)		Volume Médio do Tumor (mm^3)		Volume Relativo do Tumor		Taxa de Inibição do Tumor (%) no Dia 28
	Dia 0	SEM	Dia 28	SEM	Dia 28	SEM	
Controle Negativo	182,70	6,79	1317,99	223,20	7,47	1,46	-
ADC-29 3mpk	182,59	6,50	381,48	105,76	2,07	0,58	72,27***
ADC-28 3mpk	182,57	6,92	578,07	160,13	3,43	1,09	56,2***

Exemplo de teste 9: Avaliação da eficácia em camundongos com tumor U87-MG

I. Objetivo do teste

[597] Camundongos nus BALB/c foram usados como o animal de teste para avaliar a eficácia do conjugado B7H3-anticorpo-fármaco administrado por injeção intraperitoneal em modelo de tumor de xenoenxerto de células de glioma humano U87MG.

II. Fármacos e materiais de teste

1. Teste de fármacos

ADC-30 1 mg/kg

ADC-30 3 mg/kg

ADC-31 1 mg/kg

ADC-31 3 mg/kg

Branco: PBS

2. Método de formulação: os medicamentos foram todos diluídos e formulados com PBS.

3. Animais de teste

Camundongos nus BALB/cA, adquiridos de Shanghai Slac Laboratory Animal Co. Ltd.

III. Método de teste

[598] Células U87MG (astroblastoma de cérebro humano, banco de células da Academia Chinesa de Ciências, Catálogo # TCHu138) (2,5 × 106 células/camundongo) foram inoculadas por via subcutânea na costela direita do camundongo. Após o tumor crescer por 14 dias e atingir 167,49 mm3, os animais foram agrupados aleatoriamente em 5 grupos com 8 animais por grupo (d1).

[599] Os fármacos foram administradas por injeção intraperitoneal uma vez por semana em um total de 3 vezes. O volume do tumor e o peso corporal foram medidos duas vezes por semana e os dados foram registrados.

[600] O software estatístico Excel 2003 foi usado para estatísticas de dados: o valor médio foi calculado como média; O valor SD foi calculado como STDEV; O valor SEM foi calculado como STDEV/SQRT; O valor P entre os diferentes grupos foi calculado como TTEST.

[601] O volume do tumor (V) foi calculado como: V=1/2×LComprimento×Lcurto^2

Volume relativo (RTV) = V_T/V_0

Taxa de inibição do tumor (%) = $(C_{RTV} - T_{RTV})/C_{RTV}$ (%)

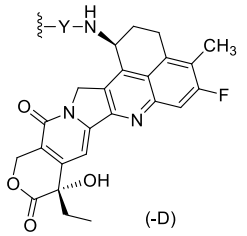
em que V_0 e V_T representam o volume do tumor no início e no final do teste, respectivamente. C_{RTV} e T_{RTV} representam o volume relativo do tumor do grupo de controle em branco (Veículo) e o grupo de teste no final do teste, respectivamente.

4. Resultado dos testes

[602] Os resultados do teste são mostrados na Figura 7. A administração por injeção intraperitoneal foi realizada uma vez por semana por um total de 3 vezes. No Dia 18 da observação, a taxa de inibição tumoral de ADC-30 (1 mg/kg) atingiu 0,31%; a taxa de inibição tumoral de ADC-30 (3 mg/kg) atingiu 45,23% ($P < 0,0001$); a taxa de inibição tumoral de ADC-31 (1 mg/kg) atingiu 39,22% ($P < 0,01$); e a taxa de inibição tumoral de ADC-31 (3 mg/kg) atingiu 80,24% ($P < 0,0001$). Com a mesma dose, o efeito de inibição do tumor do ADC-31 é significativamente melhor do que o do ADC-30.

REIVINIDICAÇÕES

1. Conjugado fármaco-ligante ou um sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo, caracterizado pelo fato de que o conjugado fármaco-ligante compreende uma estrutura de Fórmula (-D):



(-D)

em que:

Y é selecionado a partir do grupo consistindo em -O-$(CR^aR^b)_m$-CR^1R^2-C(O)-, -O-CR^1R^2-$(CR^aR^b)_m$-, -O-CR^1R^2-, -NH-$(CR^aR^b)_m$-CR^1R^2-C(O)- e -S-$(CR^aR^b)_m$-CR^1R^2-C(O)-;

R^a e R^b são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, átomo de deutério, halogênio, alquila, haloalquila, alquila deuterada, alcóxi, hidróxi, amino, ciano, nitro, hidroxialquila, cicloalquila e heterociclila;

ou, R^a e R^b juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma cicloalquila ou heterociclila;

R^1 é selecionado a partir do grupo consistindo em halogênio, alquila deuterada, cicloalquila, cicloalquilalquila, alcoxialquila, heterociclila, arila e heteroarila;

R^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, halogênio, haloalquila, alquila deuterada, cicloalquila, cicloalquilalquila, alcoxialquila, heterociclila, arila e heteroarila;

ou, R^1 e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma cicloalquila ou heterociclila;

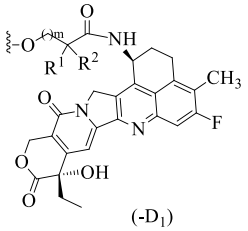
ou, R^a e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma cicloalquila ou heterociclila;

em que, a linha ondulada na Fórmula -D representa um

átomo de hidrogênio, ou uma ligação covalente a uma unidade ligadora ou um anticorpo que se liga ao antígeno expresso pela célula alvo;

m é um inteiro de 0 a 4.

2. Conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo de acordo com a reivinidicação 1, caracterizado pelo fato de que o conjugado fármaco-ligante compreende uma estrutura de Fórmula (-D_1):



(-D_1)

em que:

R^1 é uma cicloalquilalquila ou cicloalquila, e preferivelmente C_{3-6} cicloalquilalquila ou C_{3-6} cicloalquila;

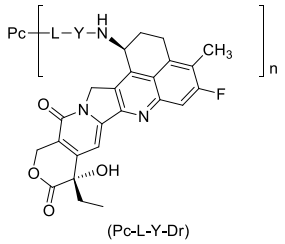
R^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, haloalquila e C_{3-6} cicloalquila, e preferivelmente átomo de hidrogênio;

ou, R^1 e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma C_{3-6} cicloalquila;

a linha ondulada representa um átomo de hidrogênio, ou uma ligação covalente a uma unidade ligadora ou um anticorpo que se liga ao antígeno expresso pela célula alvo;

m é 0 ou 1.

3. Conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo de acordo com a reivinidicação 1, caracterizado pelo fato de que é um conjugado fármaco-ligante de Fórmula (Pc-L-Y-Dr) ou um sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo:



(Pc-L-Y-Dr)

em que:

Y é selecionado a partir do grupo consistindo em -O-$(CR^aR^b)_m$-CR^1R^2-C(O)-, -O-CR^1R^2-$(CR^aR^b)_m$-, -O-CR^1R^2-, -NH-$(CR^aR^b)_m$-CR^1R^2-C(O)- e -S-$(CR^aR^b)_m$-CR^1R^2-C(O)-;

R^a e R^b são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, átomo de deutério, halogênio, alquila, haloalquila, alquila deuterada, alcóxi, hidróxi, amino, ciano, nitro, hidroxialquila, cicloalquila e heterociclila;

ou, R^a e R^b juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma cicloalquila ou heterociclila;

R^1 é selecionado a partir do grupo consistindo em halogênio, haloalquila, alquila deuterada, cicloalquila, cicloalquilalquila, alcoxialquila, heterociclila, arila e heteroarila;

R^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, halogênio, haloalquila, alquila deuterada, cicloalquila, cicloalquilalquila, alcoxialquila, heterociclila, arila e heteroarila;

ou, R^1 e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma cicloalquila ou heterociclila;

ou, R^a e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma cicloalquila ou heterociclila;

m é um inteiro de 0 a 4;

n é 1 a 10, que pode ser um inteiro ou um decimal;

Pc é um ligante; e L é uma unidade ligadora.

4. Conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo de acordo com a reivinidicação 3,

caracterizado pelo fato de que:

Y é -O-(CR^aR^b)m-CR^1R^2-C(O)-;

R^a e R^b são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, átomo de deutério, halogênio e alquila;

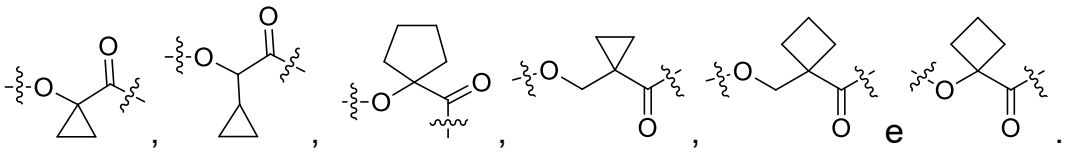
R^1 é uma C_{3-6} cicloalquilalquila ou C_{3-6} cicloalquila;

R^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, haloalquila e C_{3-6} cicloalquila, e preferivelmente átomo de hidrogênio;

ou, R^1 e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma C_{3-6} cicloalquila;

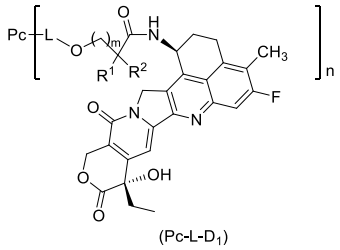
m é 0 ou 1.

5. Conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que Y é selecionado a partir do grupo consistindo em:


, e .

6. Conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o terminal O de Y é conectado à unidade ligadora L.

7. Conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo de acordo com a reivinidicação 1, caracterizado pelo fato de que é um conjugado fármaco-ligante de Fórmula (Pc-L-D1) ou um sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo:



(Pc-L-D_1)

em que:

R^1 é uma C_{3-6} cicloalquilalquila ou C_{3-6} cicloalquila;

R^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, haloalquila e C_{3-6} cicloalquila, e preferivelmente átomo de hidrogênio;

ou, R^1 e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma C_{3-6} cicloalquila;

m é 0 ou 1;

n é 1 a 10, que pode ser um inteiro ou um decimal;

Pc é um ligante; e L é uma unidade ligadora.

8. Conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 7, caracterizado pelo fato de que n é 2 a 8, que pode ser um inteiro ou um decimal; e preferivelmente n é 3 a 8, que pode ser um inteiro ou um decimal.

9. Conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 8, caracterizado pelo fato de que a unidade ligadora -L- é $-L^1-L^2-L^3-L^4-$,

L^1 é selecionado a partir do grupo consistindo em -(succinimida-3-il-*N*)-W-C(O)-, $-CH_2$-C(O)-NR^3-W-C(O)- e -C(O)-W-C(O)-, em que W é selecionado a partir do grupo consistindo em C_{1-8} alquila, C_{1-8} alquil-cicloalquila e heteroalquila linear compreendendo 1 a 8 átomo(s), a heteroalquila compreende 1 a 3 heteroátomo(s) selecionados a partir do grupo consistindo em N, O e S, em que a C_{1-8} alquila, cicloalquila e

heteroalquila linear são cada uma independente, opcional e ainda substituídas por um ou mais substituinte(s) selecionados a partir do grupo consistindo em halogênio, hidróxi, ciano, amino, alquila, cloroalquila, alquila deuterada, alcóxi e cicloalquila;

L^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em -$NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2CH_2C(O)$-, -$NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2C(O)$-, -$S(CH_2)p^1C(O)$- e uma ligação química, em que p^1 é um inteiro de 1 a 20; e L^2 é preferivelmente uma ligação química;

L^3 é um resíduo de peptídeo composto de 2 a 7 aminoácidos, em que os aminoácidos são opcional e ainda substituídos por um ou mais substituinte(s) selecionados a partir do grupo consistindo em halogênio, hidróxi, ciano, amino, alquila, cloroalquila, alquila deuterada, alcóxi e cicloalquila;

L^4 é selecionado a partir do grupo consistindo em -$NR^5(CR^6R^7)_t$-, -$C(O)NR^5$, -$C(O)NR^5(CH_2)_t$- e uma ligação química, em que t é um inteiro de 1 a 6; e L^4 é preferivelmente -$NR^5(CR^6R^7)t$-;

R^3, R^4 e R^5 são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, alquila, haloalquila, alquila deuterada e hidroxialquila;

R^6 e R^7 são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, halogênio, alquila, haloalquila, alquila deuterada e hidroxialquila.

10. Conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo de acordo com a reivinidicação 9, caracterizado pelo fato de que L^1 é selecionado a partir do grupo consistindo em -(succinimida-3-il-*N*)-$(CH_2)s^1$-C(O)-, -(succinimida-3-il-*N*)-CH_2-ciclohexil-C(O)-, -(succinimida-3-il-*N*)-$(CH_2CH_2O)s^2$-CH_2CH_2-C(O)-, -CH_2-C(O)-NR^3-$(CH_2)s^3$-C(O)- e -C(O)-$(CH_2)s^4$C(O)-, em que s^1 é um inteiro de 2 a 8, s^2 é um inteiro de 1 a 3, s^3 é um inteiro de 1 a 8, e s^4 é um

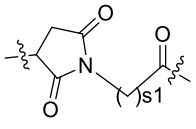
inteiro de 1 a 8.

11. Conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo de acordo com a reivinidicação 9 ou 10, caracterizado pelo fato de que L^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em $-NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2C(O)-$ e uma ligação química, em que p^1 é um inteiro de 6 a 12.

12. Conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 11, caracterizado pelo fato de que L^4 é selecionado a partir de $-NR^5(CR^6R^7)_t-$, R^5 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio e alquila, R^6 e R^7 são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio e alquila, t é 1 ou 2, e preferivelmente 2.

13. Conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 12, caracterizado pelo fato de que L^3 é um resíduo de peptídeo composto de 2 a 7 aminoácidos selecionados a partir do grupo consistindo em fenilalanina, glicina, valina, lisina, citrulina, serina, ácido glutâmico e ácido aspártico, preferivelmente o resíduo de tetrapeptídeo, e mais preferivelmente o resíduo de tetrapeptídeo de glicina-glicina-fenilalanina-glicina.

14. Conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 13, caracterizado pelo fato de que a unidade ligadora -L- é $-L^1-L^2-L^3-L^4-$,

L^1 is  , e s^1 é um inteiro de 2 a 8;

L^2 é uma ligação química;

L^3 é um resíduo de tetrapeptídeo;

L^4 é $-NR^5(CR^6R^7)_t-$, R^5 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio e alquila, R^6 e R^7 são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio e alquila, e t é 1 ou 2.

15. Conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 13, caracterizado pelo fato de que a unidade ligadora -L- é $-L^1-L^2-L^3-L^4-$,

L^1 é -(succinimida-3-il-*N*)-CH_2-ciclohexil-C(O)-;

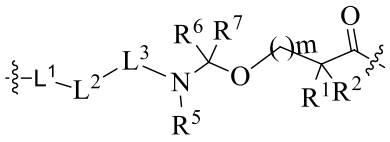
L^2 é $-NR^4(CH_2CH_2O)_9CH_2C(O)-$;

L^3 é um resíduo de tetrapeptídeo;

L^4 é $-NR^5(CR^6R^7)t-$, R^5 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio e alquila, R^6 e R^7 são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio e alquila, e t é 1 ou 2.

16. Conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 15, caracterizado pelo fato de que o L^1 terminal de uma unidade ligadora -L- é conectado ao ligante, e the L^4 terminal de uma unidade ligadora -L- é conectado a Y.

17. Conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 16, caracterizado pelo fato de que -L-Y- é:



em que L^1 é selecionado a partir do grupo consistindo em -(succinimida-3-il-*N*)-$(CH_2)s^1$-C(O)- e -(succinimida-3-il-*N*)-CH_2-ciclohexil-C(O)-;

L^2 é $-NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2C(O)-$ ou uma ligação química, e p^1 é um inteiro de 6 a 12;

L^3 é um resíduo de tetrapeptídeo de GGFG;

R^1 é uma C_{3-6} cicloalquilalquila ou C_{3-6} cicloalquila;

R^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, haloalquila e C_{3-6} cicloalquila;

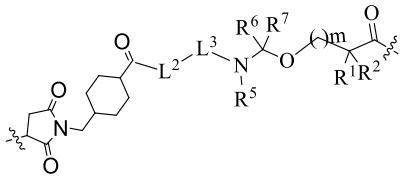
ou, R^1 e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma C_{3-6} cicloalquila;

R^5, R^6 e R^7 são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio e alquila;

s^1 é um inteiro de 2 a 8;

m é um inteiro de 0 a 4.

18. Conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo de acordo com a reivinidicação 17, caracterizado pelo fato de que -L-Y- é:



L^2 é $-NR^4(CH_2CH_2O)_9CH_2C(O)-$;

L^3 é um resíduo de tetrapeptídeo de GGFG;

R^1 é uma C_{3-6} cicloalquilalquila ou C_{3-6} cicloalquila;

R^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, haloalquila e C_{3-6} cicloalquila;

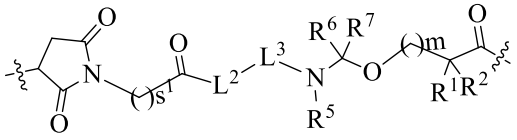
ou, R^1 e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma C_{3-6} cicloalquila;

R^5, R^6 e R^7 são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio e alquila;

m é um inteiro de 0 a 4.

19. Conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente

aceitável ou solvato do mesmo de acordo com a reivinidicação 17, caracterizado pelo fato de que -L-Y- é



L^2 é uma ligação química;

L^3 é um resíduo de tetrapeptídeo de GGFG;

R^1 é uma C_{3-6} cicloalquilalquila ou C_{3-6} cicloalquila;

R^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, haloalquila e C_{3-6} cicloalquila;

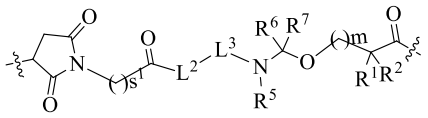
ou, R^1 e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma C_{3-6} cicloalquila;

R^5 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio e alquila, e R^6 e R^7 são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio e alquila;

s^1 é um inteiro de 2 a 8, e preferivelmente 5;

m é um inteiro de 0 a 4.

20. Conjugado fármaco-ligante ou um sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo, caracterizado pelo fato de que um conjugado fármaco-ligante compreende uma estrutura de Fórmula (-L-Y-):



(-L-Y-)

em que:

L^2 é uma ligação química;

L^3 é um resíduo de tetrapeptídeo de GGFG;

R^1 é uma C_{3-6} cicloalquilalquila ou C_{3-6} cicloalquila;

R^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, haloalquila e C_{3-6} cicloalquila;

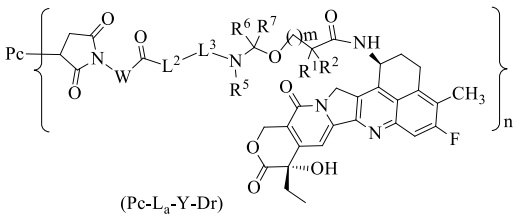
ou, R^1 e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma C_{3-6} cicloalquila;

R^5 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio e alquila, e R^6 e R^7 são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio e alquila;

s^1 é um inteiro de 2 a 8;

m é um inteiro de 0 a 4.

21. Conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que é um conjugado fármaco-ligante de Fórmula (Pc-L_a-Y-Dr) ou um sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo:



(Pc-L_a-Y-Dr)

em que:

W é selecionado a partir do grupo consistindo em C_{1-8} alquila, C_{1-8} alquil-cicloalquila e heteroalquila linear compreendendo 1 a 8 átomo(s), a heteroalquila compreende 1 a 3 heteroátomo(s) selecionados a partir do grupo consistindo em N, O e S, em que a C_{1-8} alquila, cicloalquila e heteroalquila linear são cada uma independente, opcional e ainda substituídas por um ou mais substituinte(s) selecionados a partir do grupo consistindo em halogênio, hidróxi, ciano, amino, alquila, cloroalquila, alquila deuterada, alcóxi e cicloalquila;

L^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em -$NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2CH_2C(O)$-, -$NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2C(O)$-, -$S(CH_2)p^1C(O)$- e uma ligação química, em que p^1 é um inteiro de 1 a 20;

L^3 é um resíduo de peptídeo composto de 2 a 7 aminoácidos,

em que os aminoácidos são opcional e ainda substituídos por um ou mais substituinte(s) selecionados a partir do grupo consistindo em halogênio, hidróxi, ciano, amino, alquila, cloroalquila, alquila deuterada, alcóxi e cicloalquila;

R^1 é selecionado a partir do grupo consistindo em halogênio, cicloalquilalquila, alquila deuterada, cicloalquila, heterociclila, arila e heteroarila;

R^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, halogênio, haloalquila, alquila deuterada, cicloalquila, heterociclila, arila e heteroarila;

ou, R^1 e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma cicloalquila ou heterociclila;

R^4 e R^5 são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, alquila, haloalquila, alquila deuterada e hidroxialquila;

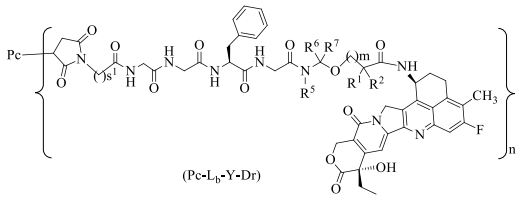
R^6 e R^7 são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, halogênio, alquila, haloalquila, alquila deuterada e hidroxialquila;

m é um inteiro de 0 a 4;

n é 1 a 10, que pode ser um inteiro ou um decimal;

Pc é um ligante.

22. Conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo de acordo com a reivinidicação 21, caracterizado pelo fato de que é um conjugado fármaco-ligante de Fórmula (Pc-L_b-Y-Dr) ou um sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo:

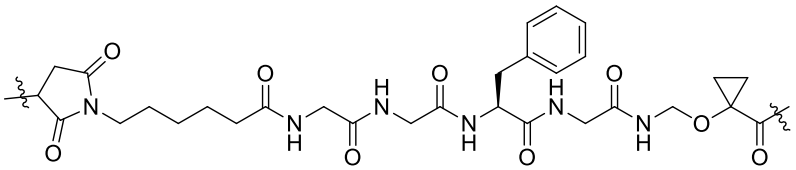


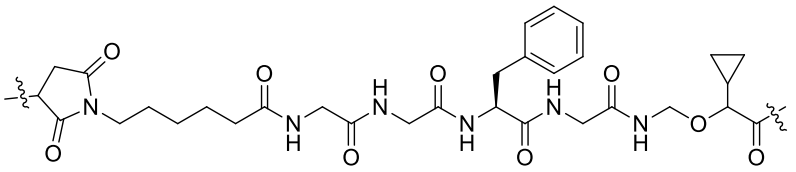
em que:

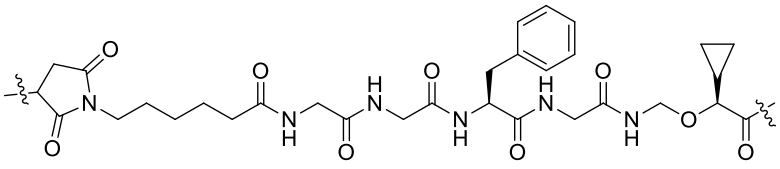
s^1 é um inteiro de 2 a 8, e preferivelmente 5;

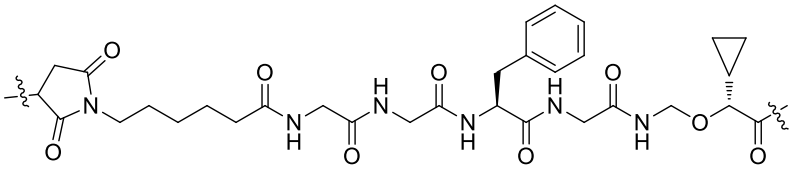
Pc, R^1, R^2, R^5~R^7, m e n são como definidos na reivindicação 21.

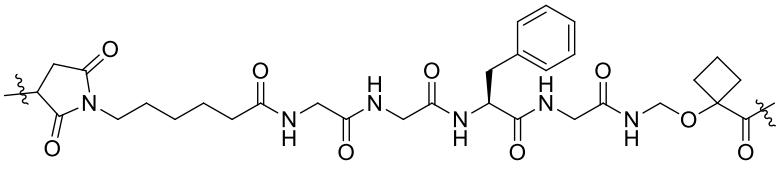
23. Conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 20, caracterizado pelo fato de que -L-Y- é selecionado a partir do grupo consistindo em:

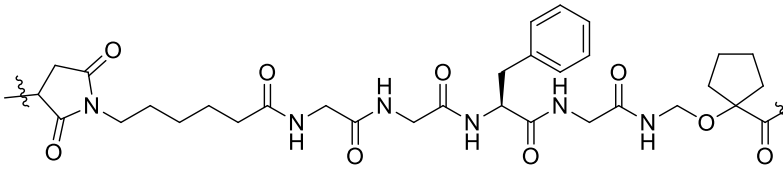


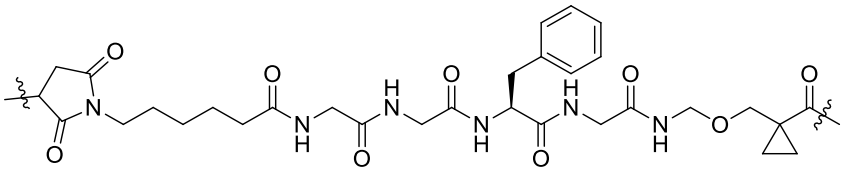


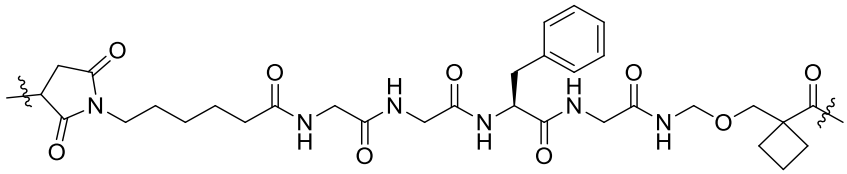


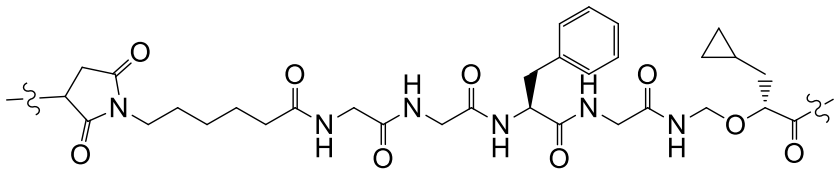


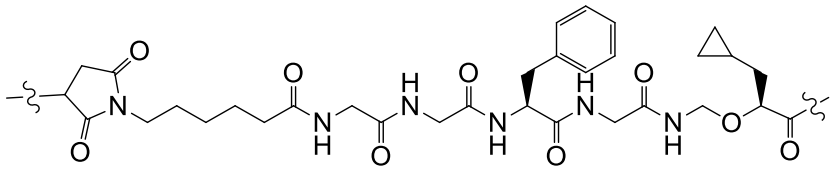


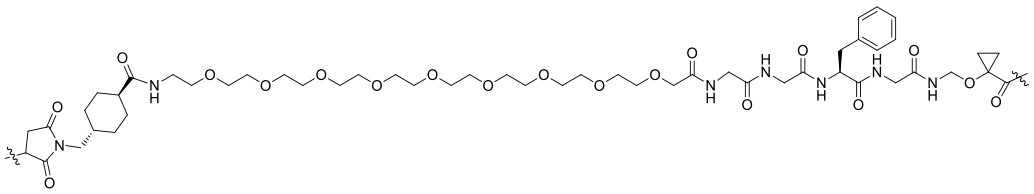


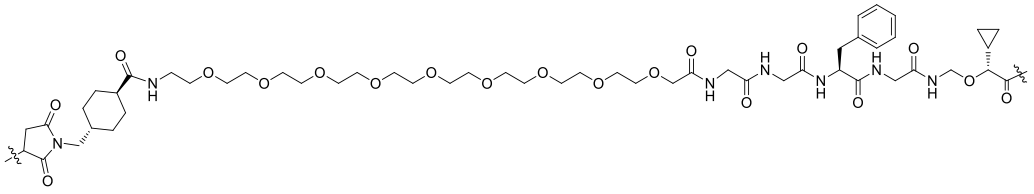




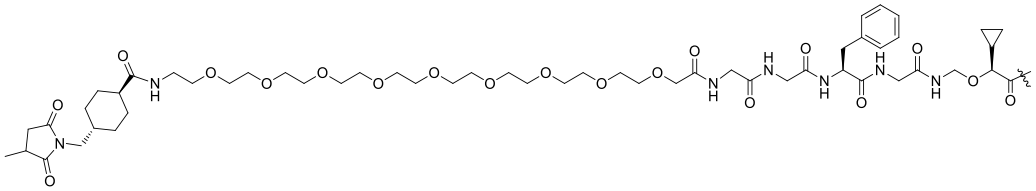




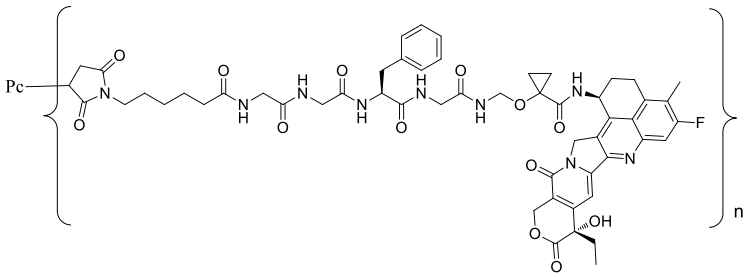


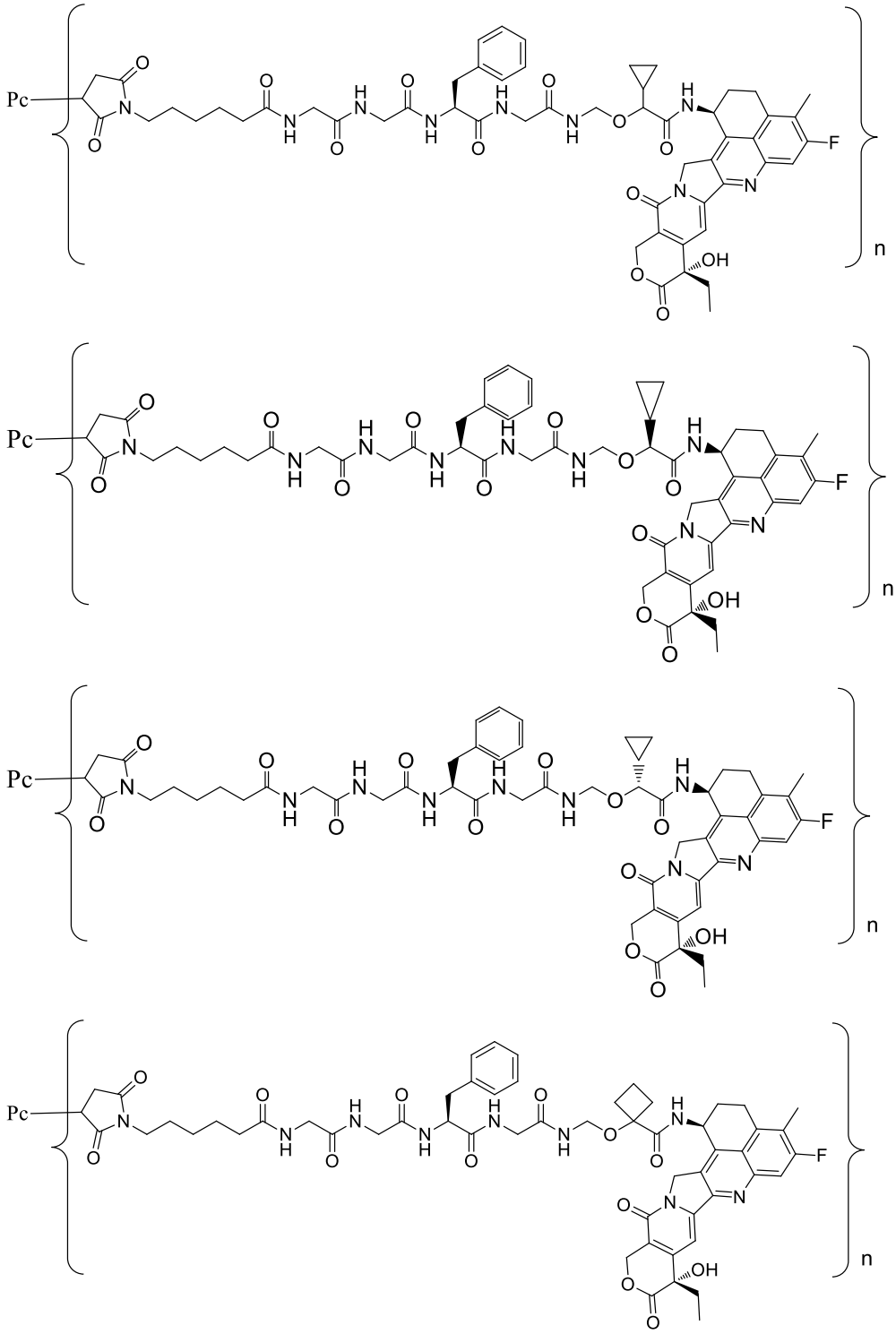


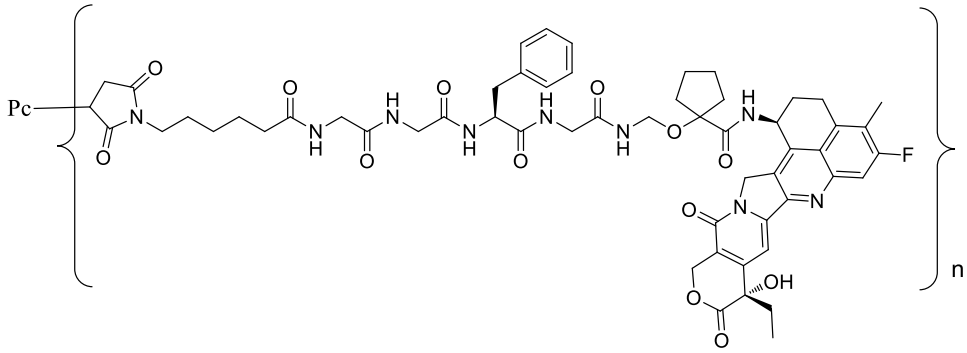
e

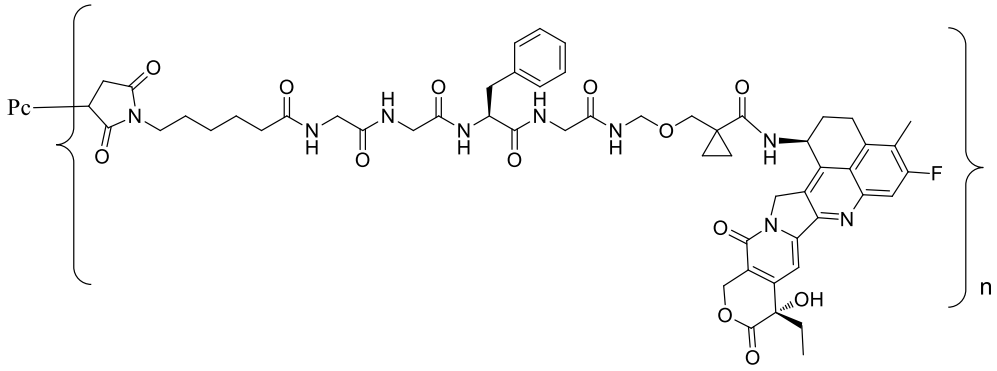


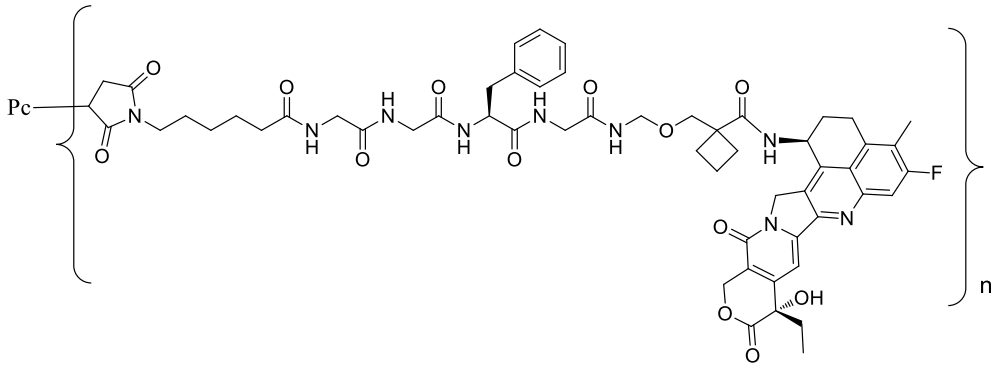
24. Conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, caracterizado pelo fato de que é selecionado a partir do grupo consistindo em:

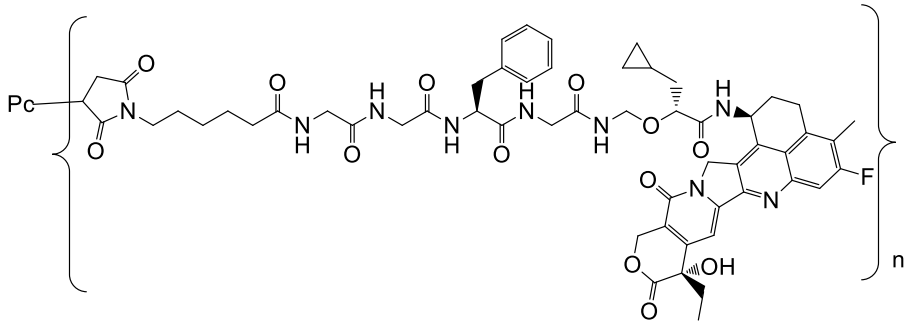


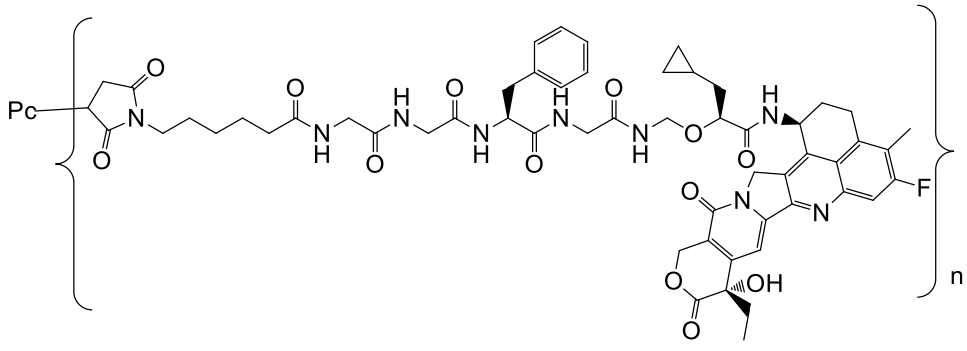


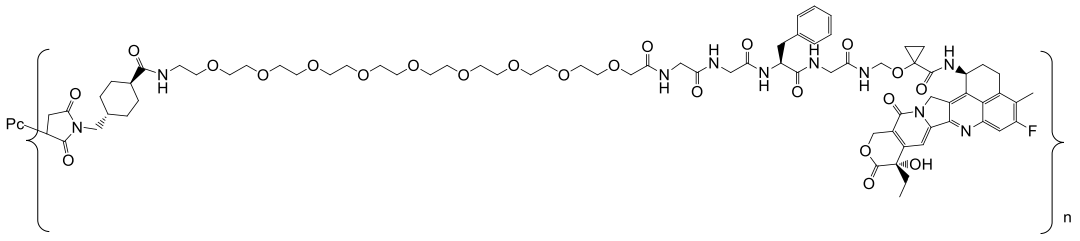

Pc
n

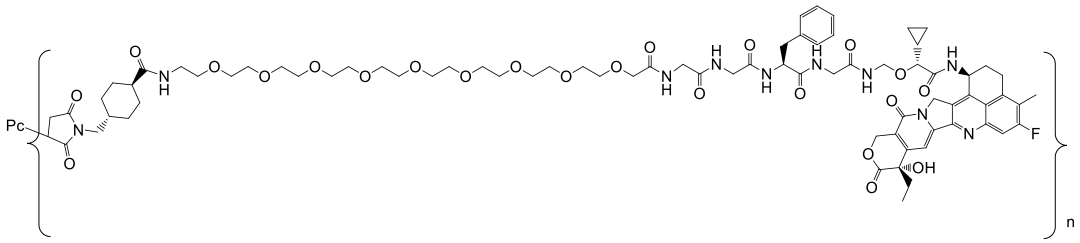

Pc
n


Pc
n

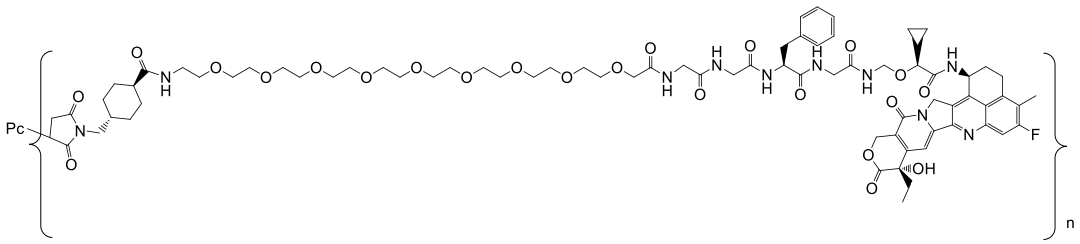

Pc
n


Pc
n





e



em que:

n é 1 a 10, que pode ser um inteiro ou um decimal;

Pc é um ligante.

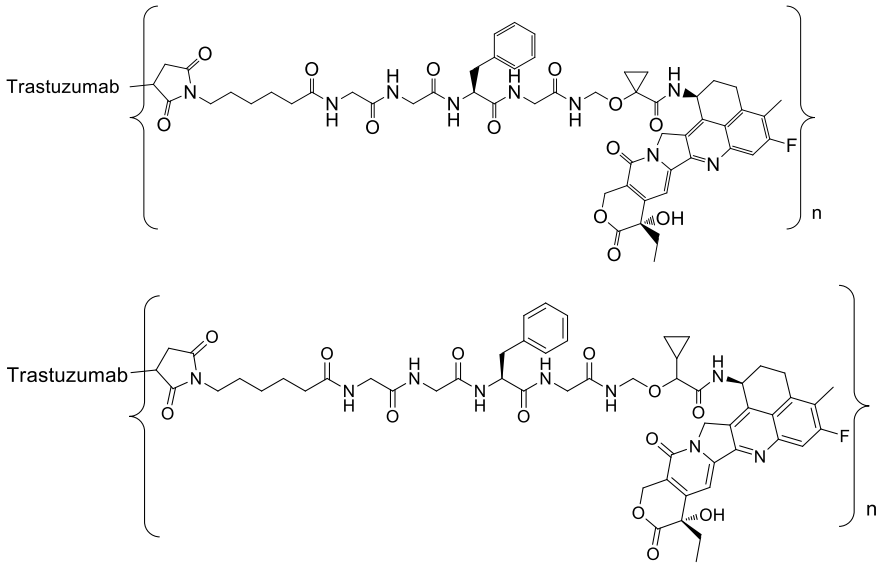
25. Conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 24, caracterizado pelo fato de que Pc é um anticorpo ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo, e o anticorpo é selecionado a partir do grupo consistindo em anticorpo quimérico, anticorpo humanizado e anticorpo completamente humanizado.

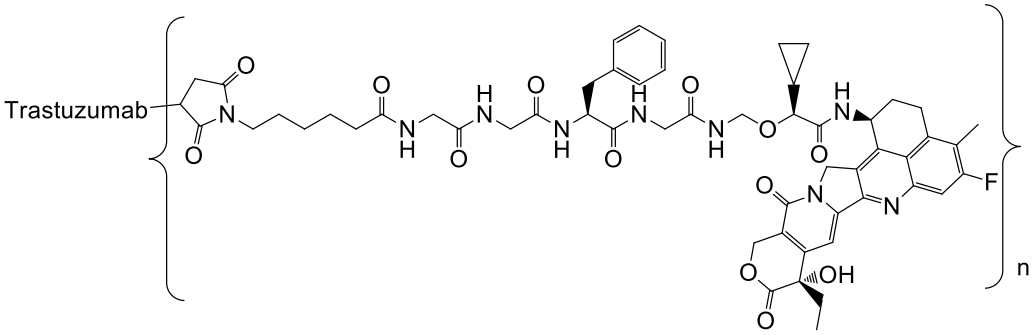
26. Conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo de acordo com a reivinidicação 25, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo é selecionado a partir do grupo consistindo em anticorpo anti-HER2 (ErbB2), anticorpo anti-EGFR, anticorpo anti-B7-H3, anticorpo anti-c-Met, anticorpo anti-HER3 (ErbB3), anticorpo anti-HER4 (ErbB4), anticorpo anti-CD20, anticorpo anti-CD22, anticorpo anti-CD30,

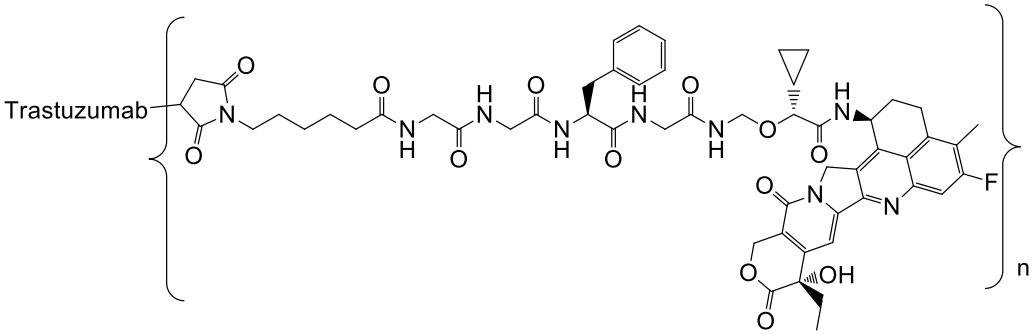
anticorpo anti-CD33, anticorpo anti-CD44, anticorpo anti-CD56, anticorpo anti-CD70, anticorpo anti-CD73, anticorpo anti-CD105, anticorpo anti-CEA, anticorpo anti-A33, anticorpo anti-Cripto, anticorpo anti-EphA2, anticorpo anti-G250, anticorpo anti-MUCl, anticorpo anti-Lewis Y, anticorpo anti-VEGFR, anticorpo anti-GPNMB, anticorpo antiintegrina, anticorpo anti-PSMA, anticorpo anti-Tenascin-C, anticorpo anti-SLC44A4, anticorpo anti-Mesotelina e fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos.

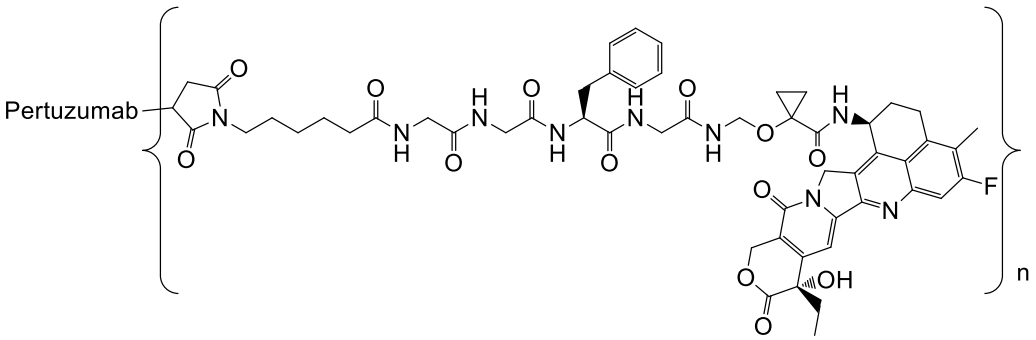
27. Conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo de acordo com a reivinidicação 25, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo é selecionado a partir do grupo consistindo em Trastuzumab, Pertuzumab, Nimotuzumab, Enoblituzumab, Emibetuzumab, Inotuzumab, Pinatuzumab, Brentuximab, Gemtuzumab, Bivatuzumab, Lorvotuzumab, cBR96 e Glematumamab, ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos.

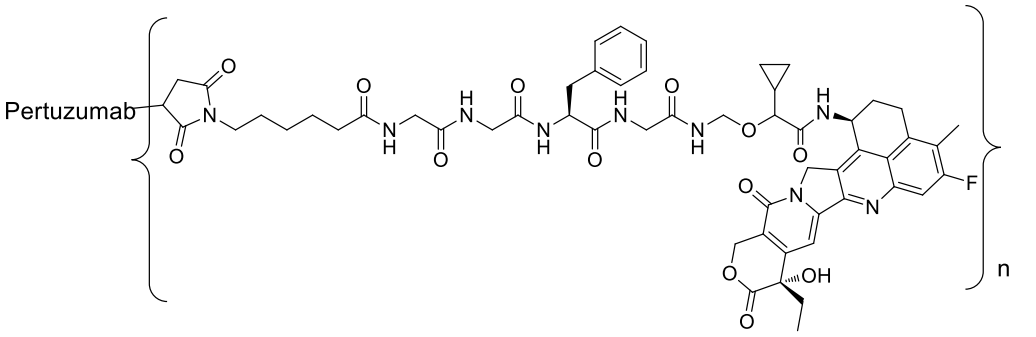
28. Conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 27, caracterizado pelo fato de que é selecionado a partir do grupo consistindo em:

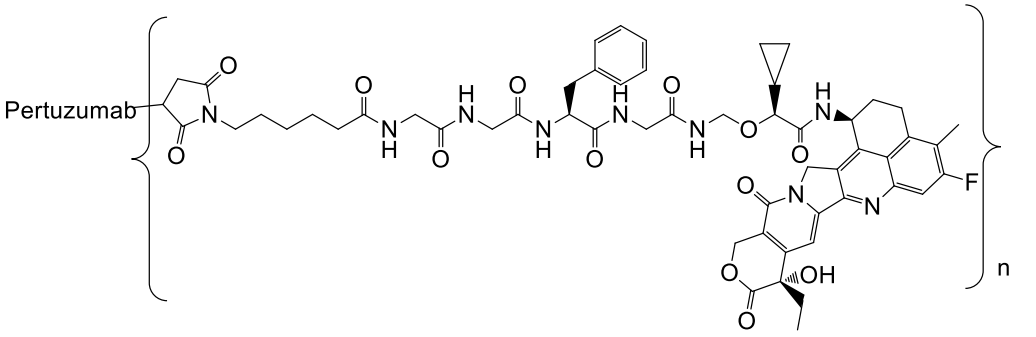


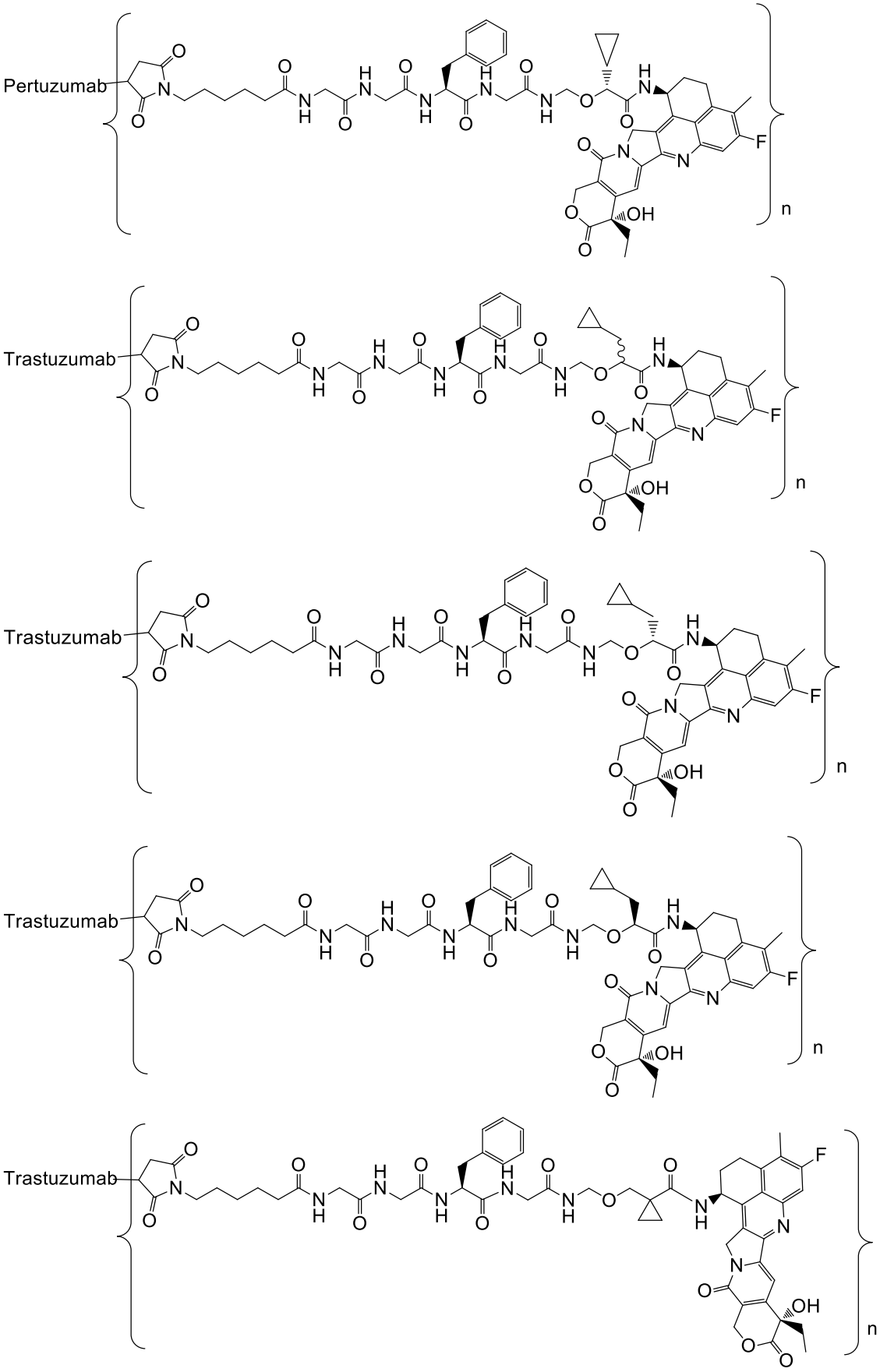

Trastuzumab
n

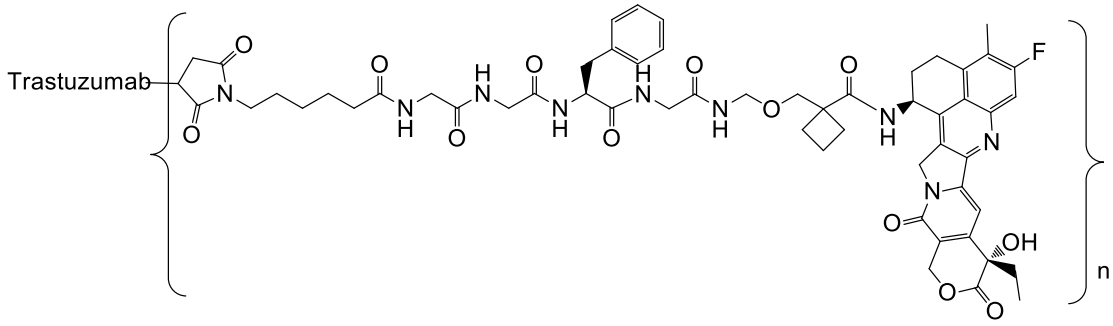

Trastuzumab
n

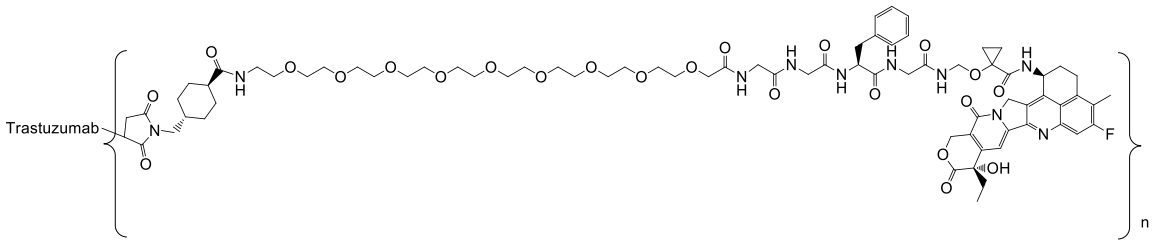

Pertuzumab
n

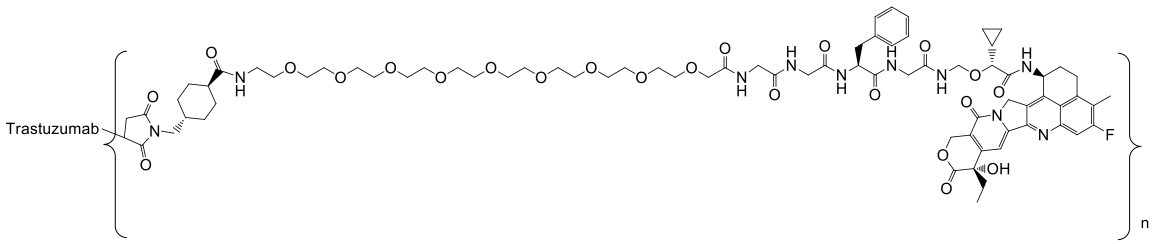

Pertuzumab
n


Pertuzumab
n

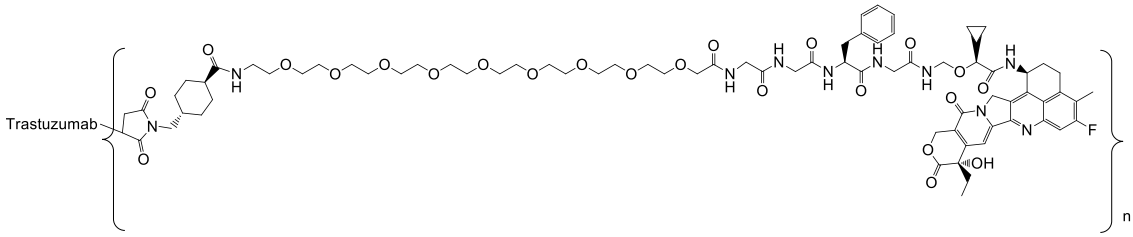

Pertuzumab
Trastuzumab
Trastuzumab
Trastuzumab
Trastuzumab
n
n
n
n
n





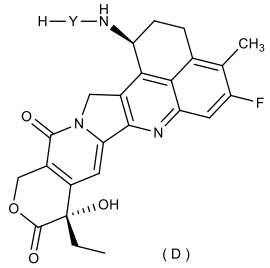


e



em que n é como definido na reivindicação 3.

29. Composto de Fórmula (D):



ou um tautômero, mesômero, racemato, enantiômero, diastereômero do mesmo, ou mistura dos mesmos, ou um sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos, caracterizado pelo fato de que:

Y é selecionado a partir do grupo consistindo em -O-

$(CR^aR^b)_m$-CR^1R^2-C(O)-, -O-CR^1R^2- $(CR^aR^b)_m$ -, -O-CR^1R^2-, -NH-$(CR^aR^b)_m$-CR^1R^2-C(O)- e -S-$(CR^aR^b)_m$-CR^1R^2-C(O)-;

R^a e R^b são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, átomo de deutério, halogênio, alquila, haloalquila, alquila deuterada, alcóxi, hidróxi, amino, ciano, nitro, hidroxialquila, cicloalquila e heterociclila;

ou, R^a e R^b juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma cicloalquila ou heterociclila;

R^1 é selecionado a partir do grupo consistindo em halogênio, alquila deuterada, cicloalquila, cicloalquilalquila, alcoxialquila, heterociclila, arila e heteroarila;

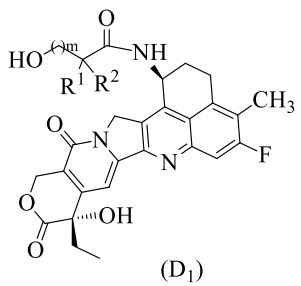
R^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, halogênio, haloalquila, alquila deuterada, cicloalquila, cicloalquilalquila, alcoxialquila, heterociclila, arila e heteroarila;

ou, R^1 e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma cicloalquila ou heterociclila;

ou, R^a e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma cicloalquila ou heterociclila;

m é um inteiro de 0 a 4.

30. Composto de Fórmula (D) de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que é um composto de Fórmula (D_1):



(D_1)

ou um tautômero, mesômero, racemato, enantiômero, diastereômero do mesmo, ou mistura dos mesmos, ou um sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos,

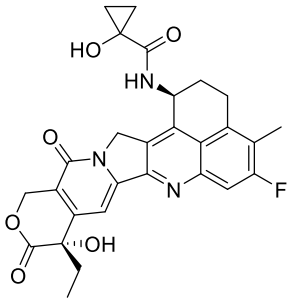
em que: R^1 é uma C_{3-6} cicloalquilalquila ou C_{3-6} cicloalquila;

R^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, haloalquila e C_{3-6} cicloalquila;

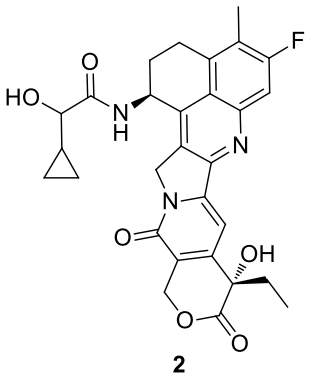
ou, R^1 e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma C_{3-6} cicloalquila;

m é 0 ou 1.

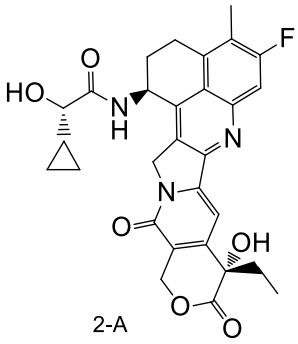
31. Composto de Fórmula (D) de acordo com a reivindicação 29 ou 30, caracterizado pelo fato de que é selecionado a partir do grupo consistindo em:



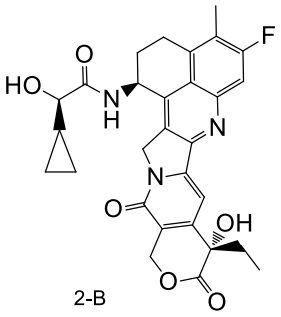
1 ,



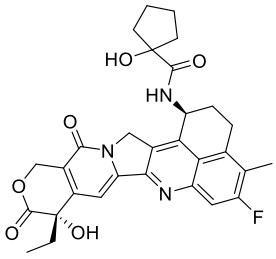
2 ,



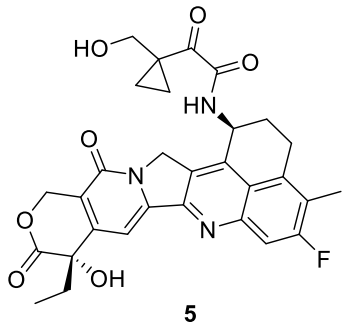
2-A ,



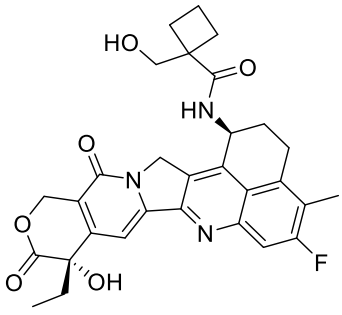
2-B ,



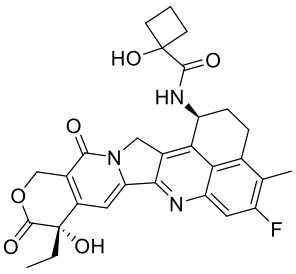
4 ,



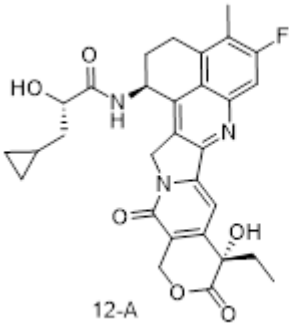
5 ,



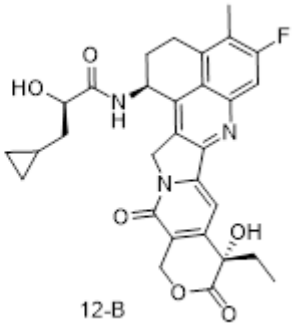
6 ,



7 ,

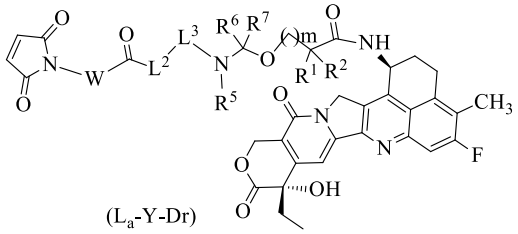


12-A e



12-B .

32. Composto de Fórmula (L_a-Y-Dr):



(L_a-Y-Dr)

ou um tautômero, mesômero, racemato, enantiômero, diastereômero do mesmo, ou mistura dos mesmos, ou um sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos,

caracterizado pelo fato de que:

W é selecionado a partir do grupo consistindo em C_{1-8} alquila, C_{1-8} alquil-cicloalquila e heteroalquila linear compreendendo 1 a 8 átomo(s), a heteroalquila compreende 1 a 3 heteroátomo(s) selecionados a partir do grupo consistindo em N, O e S, em que a C_{1-8} alquila, cicloalquila e heteroalquila linear são cada uma independente, opcional e ainda substituídas por um ou mais substituinte(s) selecionados a partir do grupo consistindo em halogênio, hidróxi, ciano, amino, alquila, cloroalquila, alquila deuterada, alcóxi e cicloalquila;

L^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em -$NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2CH_2C(O)$-, -$NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2C(O)$-, -$S(CH_2)p^1C(O)$- e uma ligação química, em que p^1 é um inteiro de 1 a 20;

L^3 é um resíduo de peptídeo composto de 2 a 7 aminoácidos, em que os aminoácidos são opcional e ainda substituídos por um ou

mais substituinte(s) selecionados a partir do grupo consistindo em halogênio, hidróxi, ciano, amino, alquila, cloroalquila, alquila deuterada, alcóxi e cicloalquila;

R^1 é selecionado a partir do grupo consistindo em halogênio, alquila deuterada, cicloalquila, cicloalquilalquila, alcoxialquila, heterociclila, arila e heteroarila;

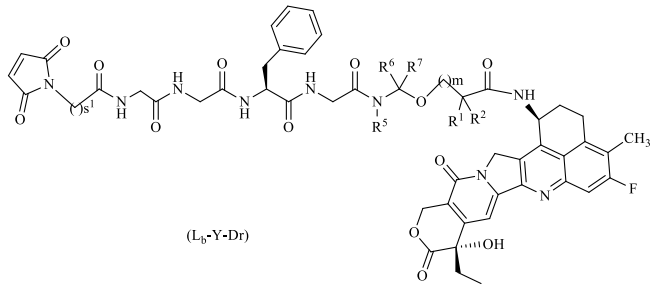
R^2 é selecionado a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, halogênio, haloalquila, alquila deuterada, cicloalquila, cicloalquilalquila, alcoxialquila, heterociclila, arila e heteroarila; ou, R^1 e R^2 juntos com o átomo de carbono ao qual eles estão ligados formam uma cicloalquila ou heterociclila;

R^4 e R^5 são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, alquila, haloalquila, alquila deuterada e hidroxialquila;

R^6 e R^7 são idênticos ou diferentes e são, cada um, independentemente selecionados a partir do grupo consistindo em átomo de hidrogênio, halogênio, alquila, haloalquila, alquila deuterada e hidroxialquila;

m é um inteiro de 0 a 4.

33. Composto de Fórmula (L_a-Y-Dr) de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que é um composto de Fórmula (L_b-Y-Dr):

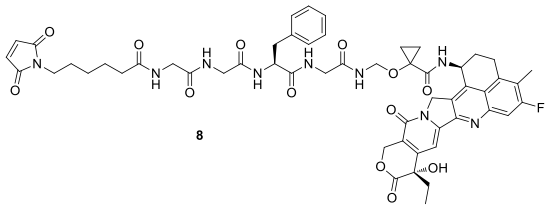


(L_b-Y-Dr)

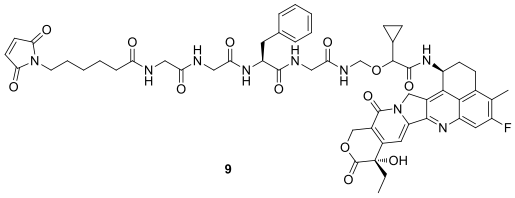
ou um tautômero, mesômero, racemato, enantiômero, diastereômero do mesmo, ou mistura dos mesmos, ou um sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos,

em que R^1, R^2, R^5~R^7, s^1 e m são como definidos na reivindicação 32.

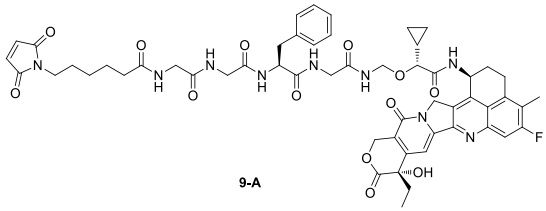
34. Composto de Fórmula (L_a-Y-Dr) de acordo com a reivindicação 32 ou 33, caracterizado pelo fato de que é selecionado a partir do grupo consistindo em:



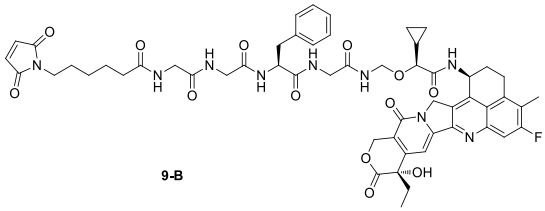
8



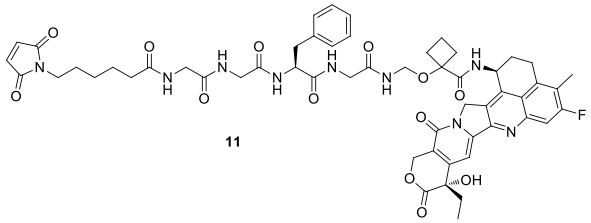
9



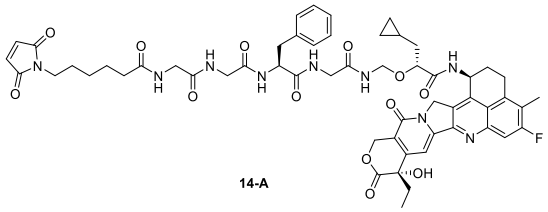
9-A



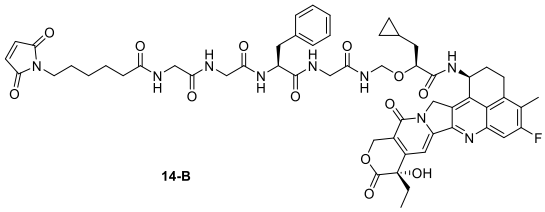
9-B



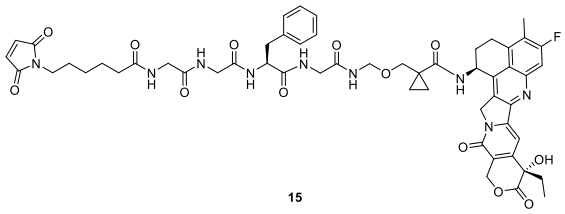
11



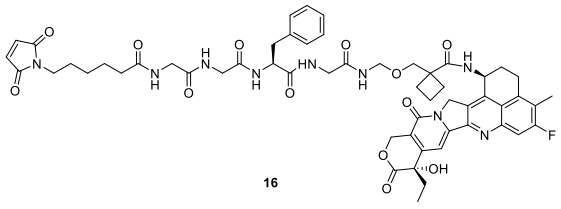
14-A



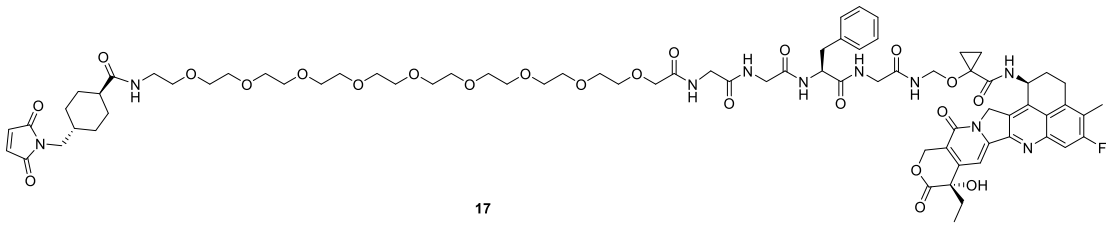
14-B



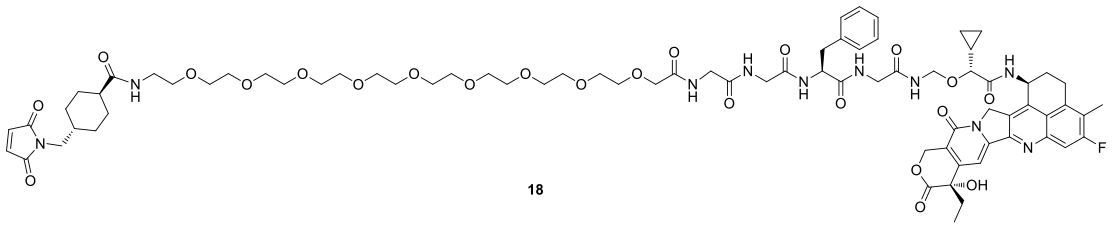
15



16

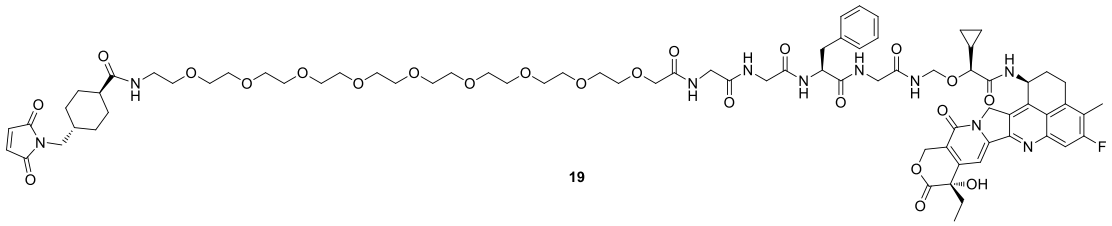


17



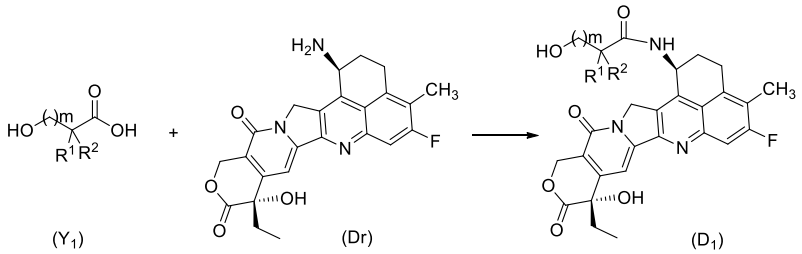
18

e



19

35. Método para preparar o composto de Fórmula (D_1) ou o tautômero, mesômero, racemato, enantiômero, diastereômero do mesmo, ou mistura dos mesmos, ou o sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende a seguinte etapa de:



(Y_1) (Dr) (D_1)

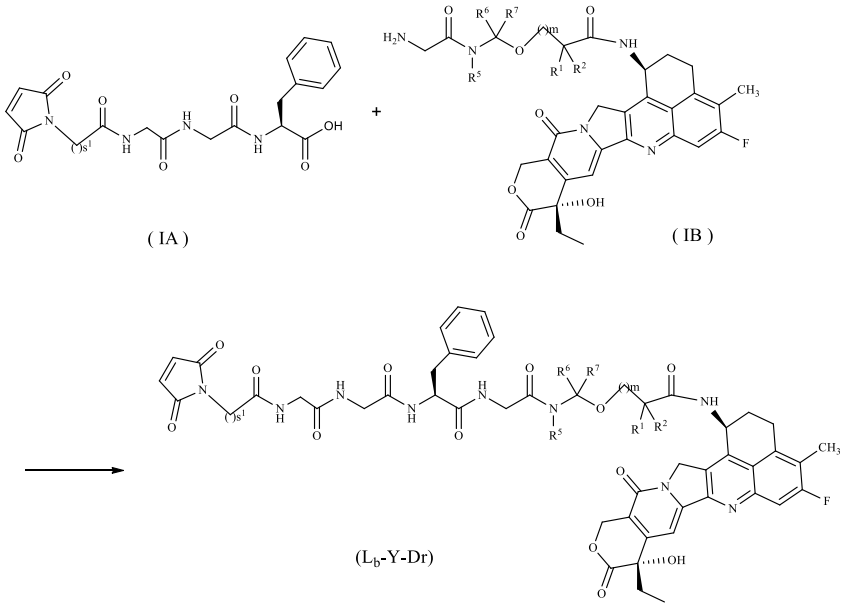
condensar o composto de Fórmula (Y_1) e o composto de Fórmula (Dr) para obter o composto de Fórmula (D_1),

em que:

R^1, R^2 e m são como definidos na reivindicação 30.

36. Método para preparar o composto de Fórmula (L_b-Y-Dr) ou o tautômero, mesômero, racemato, enantiômero, diastereômero do mesmo, ou mistura dos mesmos, ou o sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende a seguinte etapa

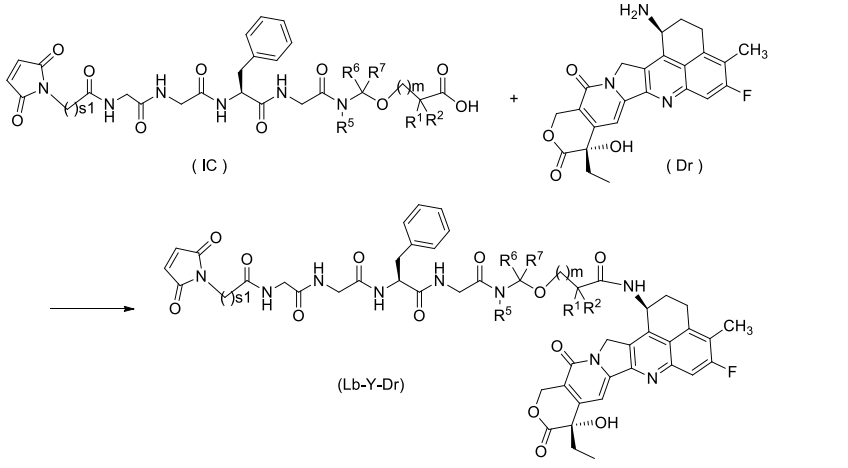
de:



condensar o composto de Fórmula (IA) e o composto de Fórmula (IB) para obter o composto de Fórmula (L_b-Y-Dr),

em que: R^1, R^2, R^5~R^7, s^1 e m são como definidos na reivindicação 32.

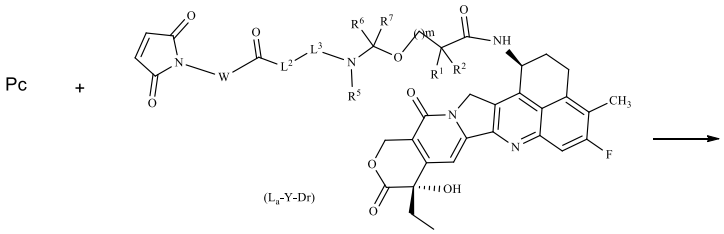
37. Método para preparar o composto de Fórmula (L_b-Y-Dr) ou o tautômero, mesômero, racemato, enantiômero, diastereômero do mesmo, ou mistura dos mesmos, ou o sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende a seguinte etapa de:

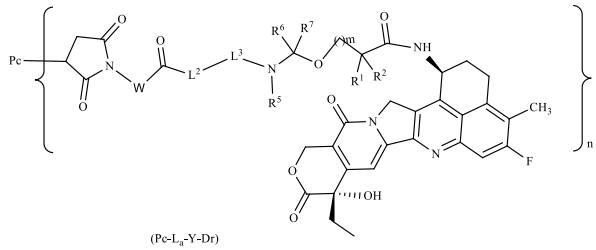


condensar o composto de Fórmula (IA) e o composto de Fórmula (IB) para obter o composto de Fórmula (L_b-Y-Dr),

em que: R^1, R^2, R^5~R^7, s^1 e m são como definidos na reivindicação 32.

38. Método para preparar o conjugado fármaco-ligante de Fórmula (Pc-L_a-Y-Dr) ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende a seguinte etapa de:





Pc é acoplado ao composto de Fórmula (L_a-Y-Dr) após redução para obter o composto de Fórmula (Pc-L_a-Y-Dr);

em que:

Pc é um ligante;

W, L^2, L^3, R^1, R^2, R^5~R^7, m e n são como definidos na reivindicação 21.

39. Conjugado fármaco-ligante ou um sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende um ligante e um fármaco ligado ao ligante, em que um fármaco é selecionado a partir do composto como definido em qualquer uma das reivindicações 29 a 34, e o fármaco está preferivelmente ligado ao ligante via um ligador.

40. Conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo de acordo com a reivinidicação 39, caracterizado pelo fato de que um ligante é um anticorpo monoclonal.

41. Método para preparar o conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo de acordo com a reivindicação 39 ou 40, caracterizado pelo fato de que compreende uma etapa de ligar o composto como definido em qualquer uma das reivindicações 29 a 34 ao ligante, e preferivelmente via um ligador.

42. Método de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo fato de que o ligante é um anticorpo monoclonal.

43. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz do conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 28 ou o composto de de Fórmula (D) ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo como definido em qualquer uma das reivindicações 29 a 31, e veículo(s), diluente(s) ou excipiente(s) farmaceuticamente aceitáveis.

44. Uso do conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 28, o composto de de Fórmula (D) ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo como definido em qualquer uma das reivindicações 29 a 31, ou a composição farmacêutica como definida na reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de medicamentos para tratar ou prevenir um tumor.

45. Uso de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo fato de que o tumor é um câncer relacionado à expressão de HER2, HER3, B7H3 ou EGFR.

46. Uso do conjugado fármaco-ligante ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 28, o composto de de Fórmula (D) ou o sal farmaceuticamente aceitável ou solvato do mesmo como definido em qualquer uma das reivindicações 29 a 31, ou a composição farmacêutica de

acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de medicamentos para tratar e/ou prevenir um câncer, em que o câncer é preferivelmente selecionado a partir do grupo consistindo em câncer de mama, câncer de ovário, câncer cervical, câncer uterino, câncer de próstata, câncer de rim, câncer de uretra, câncer de bexiga, câncer de fígado, câncer de estômago, câncer de endométrio, câncer de glândula salivar, câncer de esôfago, melanoma, glioma, neuroblastoma, sarcoma, câncer de pulmão, câncer de cólon, câncer retal, câncer colorretal, leucemia, câncer ósseo, câncer de pele, câncer de tireoide, câncer de pâncreas e linfoma.

Fig 1A

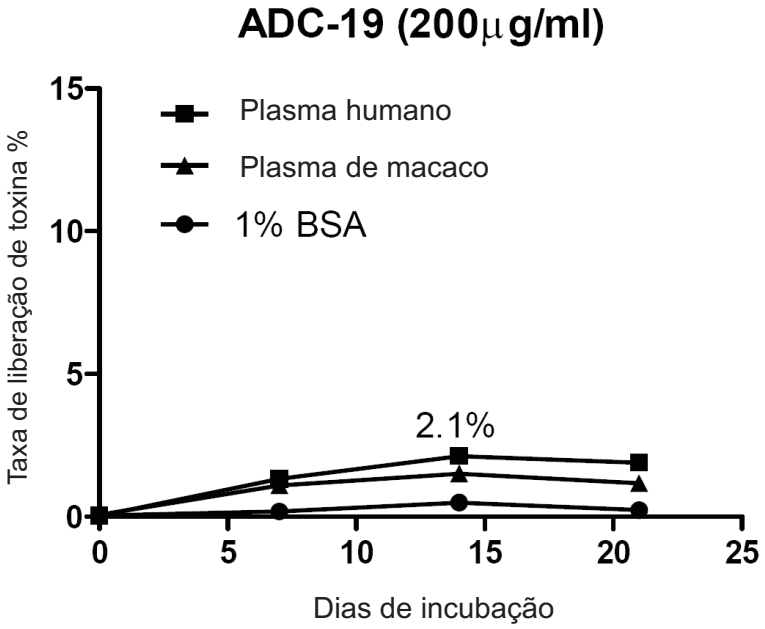

ADC-19 (200μg/ml)
Plasma humano
Plasma de macaco
1% BSA
2.1%
Taxa de liberação de toxina %
Dias de incubação
0
5
10
15
20
25

Fig 1B

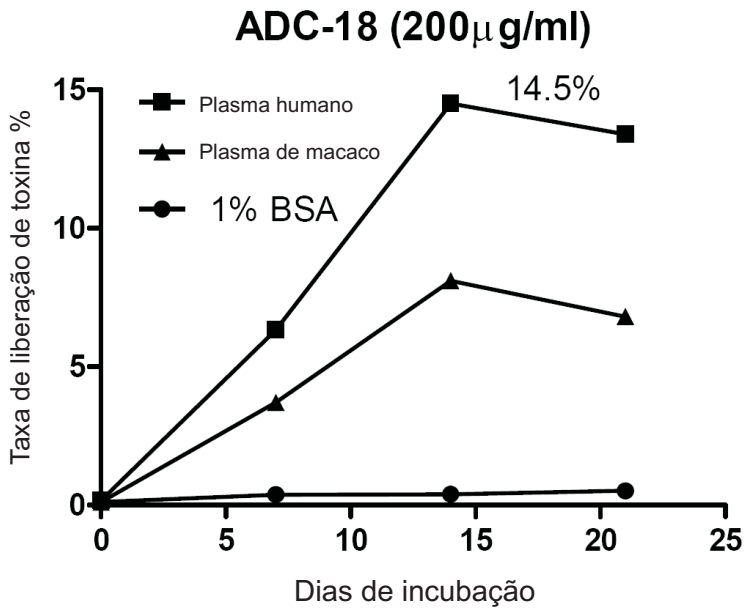

ADC-18 (200μg/ml)
Plasma humano
Plasma de macaco
1% BSA
14.5%
Taxa de liberação de toxina %
Dias de incubação
0
5
10
15
20
25

Fig 1C

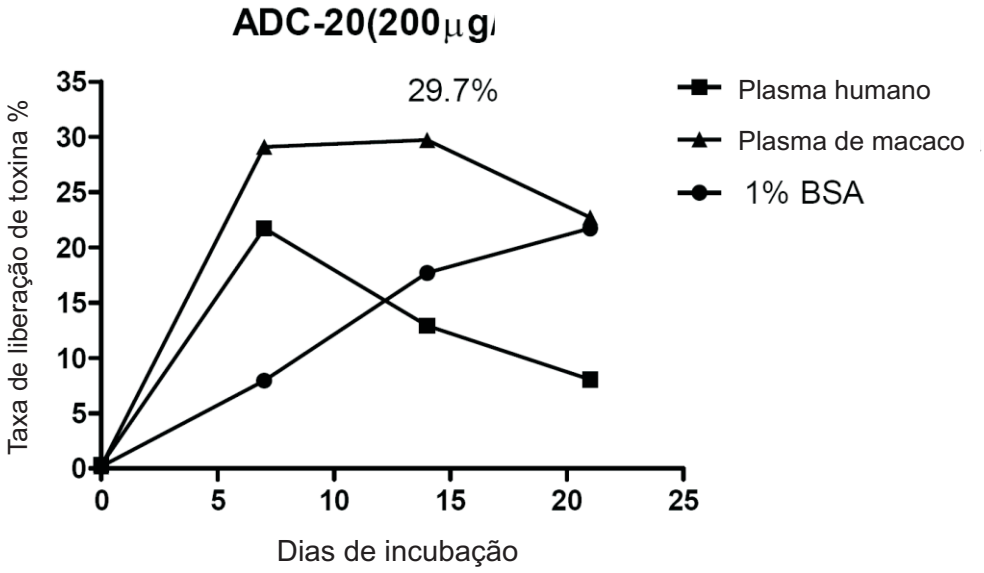

ADC-20(200μg/
29.7%
Taxa de liberação de toxina %
Dias de incubação
Plasma humano
Plasma de macaco
1% BSA

Fig 2

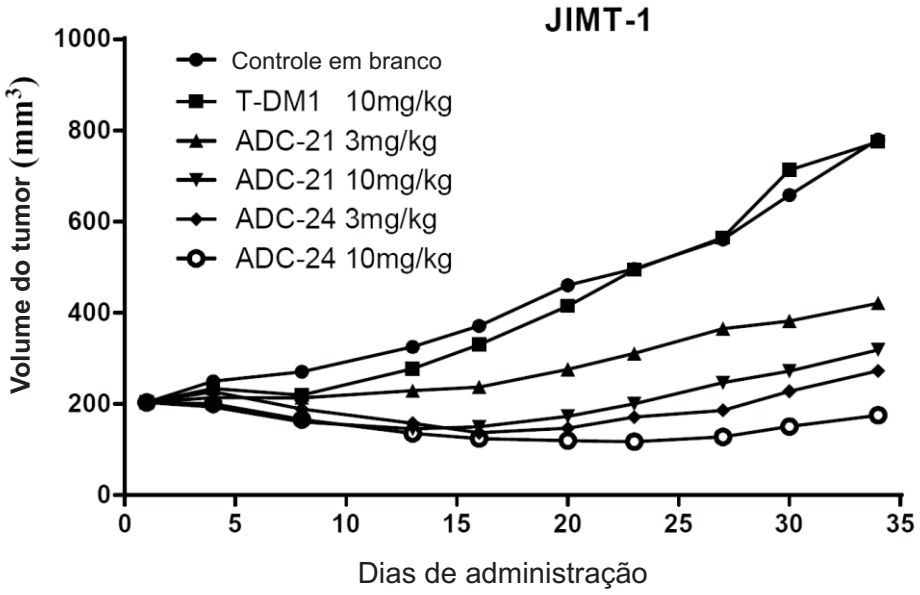

JIMT-1
Volume do tumor (mm3)
Dias de administração
Controle em branco
T-DM1 10mg/kg
ADC-21 3mg/kg
ADC-21 10mg/kg
ADC-24 3mg/kg
ADC-24 10mg/kg

Fig 3

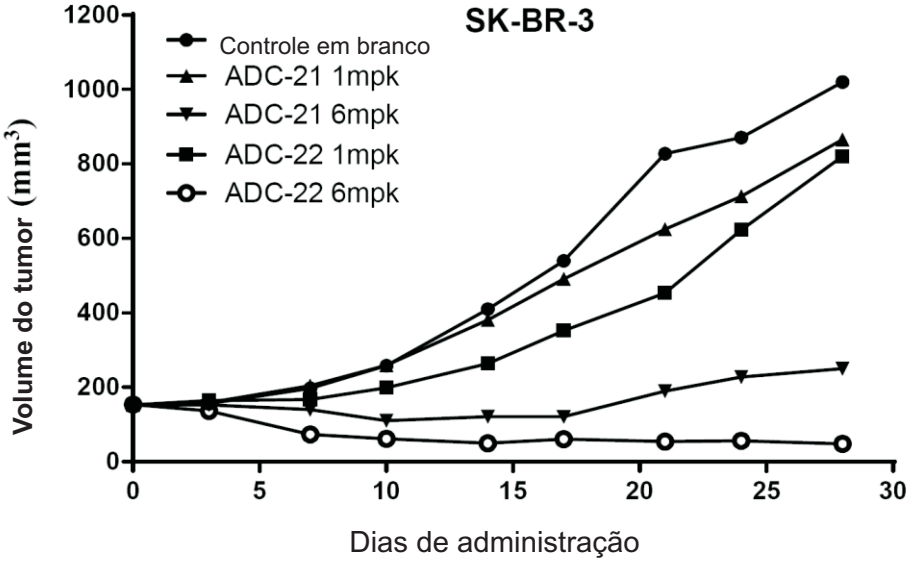

SK-BR-3
Controle em branco
ADC-21 1mpk
ADC-21 6mpk
ADC-22 1mpk
ADC-22 6mpk
Volume do tumor (mm3)
1200
1000
800
600
400
200
0
0
5
10
15
20
25
30
Dias de administração

Fig 4

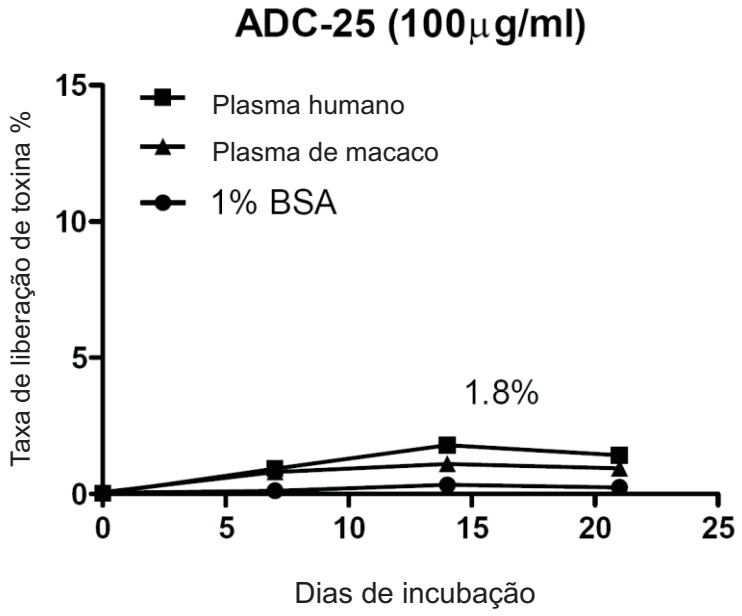

ADC-25 (100μg/ml)
Plasma humano
Plasma de macaco
1% BSA
Taxa de liberação de toxina %
15
10
5
0
1.8%
0
5
10
15
20
25
Dias de incubação

Fig 5

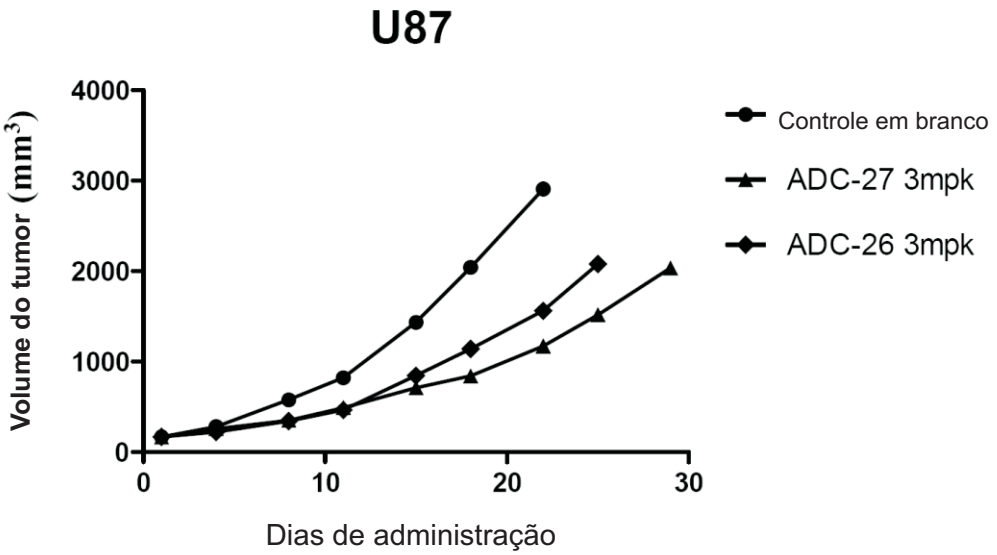

U87
Volume do tumor (mm3)
4000
3000
2000
1000
0
0
10
20
30
Dias de administração
Controle em branco
ADC-27 3mpk
ADC-26 3mpk

Fig 6

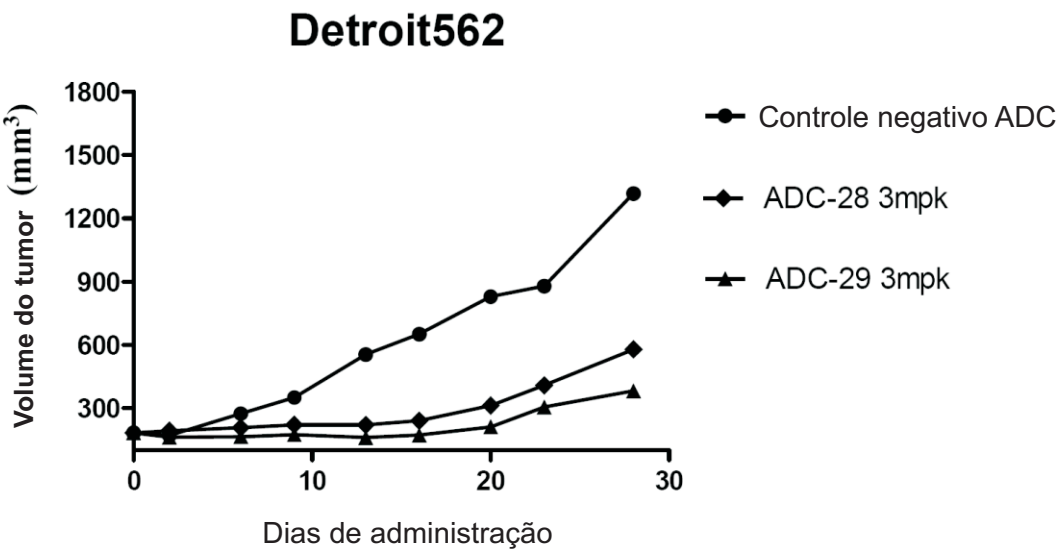
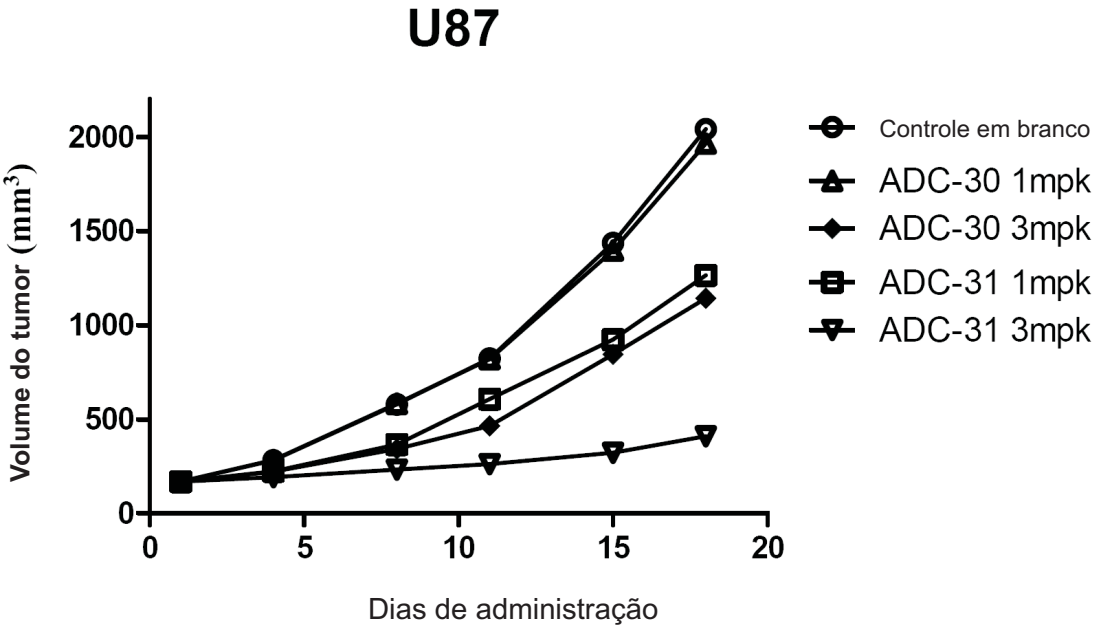

Detroit562
Volume do tumor (mm3)
1800
1500
1200
900
600
300
0
10
20
30
Dias de administração
Controle negativo ADC
ADC-28 3mpk
ADC-29 3mpk

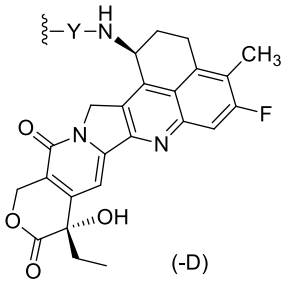
Fig 7


U87
Volume do tumor (mm3)
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
Dias de administração
Controle em branco
ADC-30 1mpk
ADC-30 3mpk
ADC-31 1mpk
ADC-31 3mpk

RESUMO

Patente de Invenção: **“CONJUGADO FÁRMACO-LIGANTE DE ANÁLOGO EXATECANO, MÉTODO PARA PREPARAR O MESMO E APLICAÇÃO DO MESMO”.**

A presente invenção refere-se a um conjugado fármaco-ligante de um análogo de exatecano, um método para preparar o mesmo e uma aplicação do mesmo. Especificamente, a presente invenção fornece um conjugado fármaco-ligante possuindo uma estrutura mostrada na fórmula (-D), um método para preparação desse fim, uma composição farmacêutica contendo o mesmo e seu uso na preparação de fármacos para o tratamento de câncer por meio de regulação do receptor. A definição de cada substituinte na fórmula (-D) é a mesma que na descrição.



(-D)

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: listagem de sequência p252407.TXT
- Data de Geração do Código: 11/03/2021
- Hora de Geração do Código: 16:32:44
- Código de Controle:
  - Campo 1: 84969B8EB20F5A0A
  - Campo 2: D893C1F0E116B5D6