



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) PI0618136-8 A2



* B R P I 0 6 1 8 1 3 6 A 2 *

(22) Data de Depósito: 31/10/2006
(43) Data da Publicação: 16/08/2011
(RPI 2119)

(51) Int.CI.:
A61K 31/42 2006.01
C07D 291/00 2006.01

(54) Título: ANÁLOGOS DE DIAZONAMIDA A, CONJUNGADO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO E MÉTODO PARA SINTETIZAR OS MESMOS

(30) Prioridade Unionista: 31/10/2005 US 11/264,502,
16/06/2006 US 60/814,651, 16/06/2006 US 60/814,651, 31/10/2005
US 11/264,502

(73) Titular(es): BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM

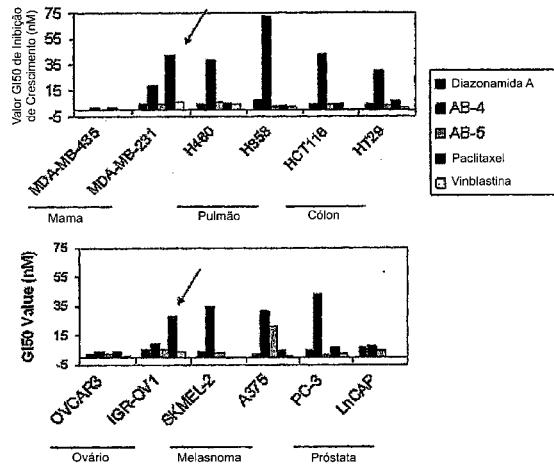
(72) Inventor(es): Anthony Burgett, Noelle Williams, Patrick Harran

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006042565 de 31/10/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/053650de 10/05/2007

(57) Resumo: ANÁLOGOS DE DIAZONAMIDA A, CONJUNGADO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO E MÉTODO PARA SINTETIZAR OS MESMOS. A presente invenção refere-se a um análogo de diazonamida A específico e seus sais e conjugados, que são eficazes no tratamento de doenças proliferativas.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "ANÁLOGOS DE DIAZONAMIDA A, CONJUGADO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO E MÉTODO PARA SINTETIZAR OS MESMOS".

Campo Técnico

5 A presente invenção refere-se a um análogo de diazonamida A que tem atividade antitumor superior. A rotina sintética para este composto é também descrita.

Técnica Antecedente

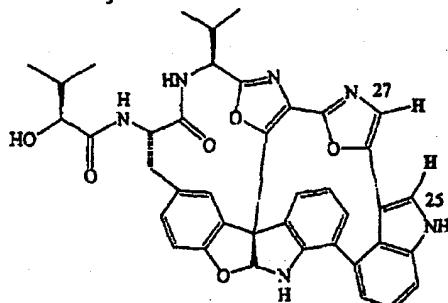
10 A diazonamida A é um agente de rompimento de fuso mitótico primeiro isolado do organismo marinho *Diazona angulata*. Numerosas tentativas foram feitas para sintetizar este composto e seus análogos. Publicação PCT WO 03/106438 descreve uma rotina sintética putativa; entretanto, a estrutura de diazonamida A fornecida naquela publicação é incorreta. A Patente U.S. Nº 7.022.720 ('720) corretamente descreve uma estrutura de diazonamida A e descreve a síntese de alguns de seus análogos por meio do uso combinado de endociclagem Heck catalítica, redisposição pinnacol de contração de anel estéreo-controlada, e arilação de indol por meio da transferência de elétron fotoinduzida interna. Estruturas gerais de alguns análogos são fornecidas. Um pedido filho reivindicando prioridade desta patente

15 foi depositado em 31 de outubro de 2005 e é publicado como 2006/0089397 e inclui a estrutura do análogo, Composto J₅ reivindicado aqui. A patente '720 não descreve especificamente o composto da presente invenção, que tem atividade antimitótica surpreendentemente potente.

20

Descrição da Invenção

25 A presente invenção é direcionada a um composto da fórmula



(Composto J) e os sais farmaceuticamente aceitáveis deste. A invenção é também direcionada às composições farmacêuticas contendo este composto

e/ou seus sais, às formas modificadas deste composto acopladas à agentes de estabilização ou alvejamento, e a métodos de tratar doenças proliferativas, em particular cânceres resistentes a Taxol®, usando estes compostos e formulações.

- 5 Em outro aspecto, a invenção é direcionada a métodos para sintetizar o Composto J e seus sais.

Breve Descrição dos Desenhos

Figura 1 mostra a capacidade do Composto J inibir o crescimento de várias linhagens de célula de câncer em comparação à diazonamida A, 10 uma forma hidroxilada de Composto J., paclitaxel, e vinblastina.

Figura 2 mostra um plot de fração de sobrevivência contra a concentração de fármaco com respeito às linhagens de célula de câncer ovariano de PTX10 para o Composto J e paclitaxel.

Figura 3 é um gráfico mostrando os farmacocinéticos de Composto J.

Figuras 4 A e 4B motram o efeito do Composto J quando comparado ao paclitaxel sobre xenoenxertos de células HCT116 e PC-3.

Figuras 5A e 5B mostram que o Composto J não tem nenhum efeito sobre a proliferação de neutrófilo ou contagens celulares in vivo.

20 Modos de Realizar a Invenção

O Composto J foi mostrado, como descrito nos exemplos abaixo, ter potente atividade antimitótica com respeito a certos cânceres, em particular cânceres que são resistentes ao Taxol®. O Composto J pode ser fornecido em sua forma de base livre, ou pode ser fornecido como um sal farmaceuticamente aceitável, ou como uma mistura da forma representada e o correspondente sal. Os sais adequados incluem aqueles de ácidos inorgânicos tais como cloridratos, bromidratos, sulfatos, hidrossulfatos, e os similares, ou sais de adição de ácido orgânico tais como os acetatos, formiatos, maleatos, e similares.

30 Além disso, o Composto J pode ser acoplado à porções tais como agentes de alvejamento. Entre tais agentes de alvejamento estão os anticorpos ou fragmentos imunologicamente ativos destes, incluindo formas de

anticorpo de cadeia única direcionadas contra抗ígenos de tumor ou contra receptores ou integrinas associadas com tumores, peptidomiméticos direcionados contra estas porções, e similares. Além disso, o Composto J pode ser acoplado a um excipiente tal como polietileno glicol para alterar farmacocinéticos.

As formulações úteis na invenção incluem formulações padrão tais como aquelas mencionadas em Remington's Pharmaceutical Sciences, última edição, Mack Publishing Co., Easton, PA, incorporada aqui por referência. Tais formulações incluem aquelas designadas para liberação oral, liberação lenta, administração tópica, administração parenteral, ou qualquer outra rotina adequada como determinado por um médico atendente ou veterinário. Desse modo a administração pode ser sistêmica ou local. Veículos adequados ou excipientes incluem lipossomas, micelas, nanopartículas, matrizes poliméricas, tampões, e a faixa total de formulações conhecidas dos médicos.

O Composto J é particularmente útil no tratamento de doenças proliferativas, em particular, tumores e malignidades associadas com mama, ovário, pulmão, colón, próstata, melanoma, colón, pâncreas, glioma, carcinoma, e similares.

As formulações que incluem o Composto J e/ou seus sais e/ou seus conjugados podem também ser usados em combinação com outros fármacos, tais como agentes antitumor adicionais ou outros compostos paleativos tais como compostos que ajudam em nutrição ou saúde geral.

Composto J é convenientemente sintetizado para tratar o precursor de amino livre com S-2,5-dioxopirrolidin-1-il-2-hidróxi-3-metilbutanoato. Isto converte a amina livre no 3-metil-2-hidroxibutilato.

Aqueles versados na técnica apreciarão que esta reação de acoplamento possa também ser realizada com outros ésteres ativados do 2-hidróxi-3-metilbutanoato, tal como a título de exemplo apenas éster de N-hidroxibenzotriazol, éster de perfluorofenila, ésteres de N-hidroxiftalimida, ésteres ativados gerados pela reação do ácido carboxílico com uma carbodiimida, e outros ésteres ativados convencionalmente usados para acilação de

uma amina para formar ligações de amida; desse modo, a invenção fornece um método de preparar o Composto J acoplando um derivado de 2-hidróxi-3-metilbutanoato ativado, que pode opcionalmente ser protegido na 2-hidroxila, com a amina descrita acima. A amina pode também opcionalmente ser em forma protegida, isto é, ela pode ter grupos de proteção em qualquer dos dois ou ambos o nitrogênio de indol e o nitrogênio de indolina. Os grupos de proteção para uso na hidroxila incluem grupos acila, grupos silila, acetais de pirano, e similares. Os grupos de proteção adequados para uso nos átomos de nitrogênio de anel do composto de amina, que não pretendese que reajam com o éster ativado de hidroxibutanoato, podem incluir grupos acila tais como carbamatos ou trifluoroacetato, bem como grupos silila. Grupos de proteção adequados e métodos para incorporar e removê-los são bem conhecidos na técnica, e são descritos, por exemplo, em T.H. Greene, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, 2^a edição.

Os seguintes exemplos são oferecidos para ilustrar, porém não limitar, a invenção. Os Exemplos 1-16 descrevem a síntese de Composto J. Os Exemplos 17-20 descrevem sua atividade biológica.

Exemplo 1

7-Bromoindol

2-Bromonitrobenzeno (1,10 kg, 5,45 mols) foi dissolvido em tetraidrofurano (10 L) em temperatura ambiente. Esta solução resfriada com agitação em um banho mantido a -78°C. Quando a temperatura interna atingiu -40°C, brometo de vinilmagnésio (16,3 L, 16,3 mols) foi adicionado em uma tal taxa a fim de manter a temperatura interna a -40°C durante a adição. Sob completa adição, a reação foi removida do banho e deixada aquecer lentamente para -30°C durante o curso de 45 minutos. Isto requereu resfriamento ocasional. A solução reacional a -30°C foi resfriada bruscamente pela adição rápida de uma solução ligeiramente fria (~10°C) de NH₄Cl aquoso saturado (10 L). Ligeira espumação ocorreu. (Resfriamento brusco inverso na solução de cloreto de amônio é também satisfatório.) Isto resultou em uma mistura bifásica com alguns sais de magnésio não dissolvidos na forma de um gel. A mistura foi agitada durante 30 minutos e separada. A camada

aquosa foi novamente extraída com tetraidrofurano (10 L). As camadas orgânicas combinadas foram evaporadas em pressão reduzida com uma temperatura de banho de 35°C e o óleo escuro resultante foi absorvido em cloreto de metileno (5 L) e secado com Na₂SO₄. A mistura foi filtrada e concentrada.

- 5 O material resultante foi cromatografado, eluindo com 2% acetato de etila - hexanos para fornecer 7-bromoindol (557 g, 52% de produção) como um sólido não totalmente branco. ¹H RMN (CDCl₃): consistente com a estrutura proposta.

Exemplo 2

- 10 Ácido 2-acetamido-3 -(7-bromo-1H-indol-3-il)propanóico.

A um frasco de base redonda de 3 gargalos, de 5 litros, equipado com barra agitadora, atmosfera de nitrogênio, termostato e condensador, foi adicionado o composto do título de Exemplo 1 (252,1 g , 1,29 mol) seguido por ácido acético (1,5 L) e anidrido acético (760 mL, 8,04 mols). L-serina (266,9 g, 2,53 mols) foi carregada após agitação durante 20 minutos. Esta mistura foi agitada durante 4 horas antes dela ser aquecida para 40°C. Após a maior parte dos sólidos ter se dissolvido, a reação foi aquecida para 90°C, seguida por uma excursão para 110°C. A reação foi então resfriada para 80°C, agitada nesta temperatura, e o progresso da reação foi monitorado por HPLC. Após 5 horas a reação foi completada como julgado pela ausência de 7-bromoindol no cromatograma. O aquecimento foi removido, e a reação foi deixada continuar agitando durante a noite em temperatura ambiente.

Metanol (450 mL) foi adicionado e a reação foi concentrada em vário a -50°C para um alcatrão preto, espesso. Metanol (3 L) foi adicionado ao resíduo e após vigorosa agitação a maior parte do resíduo entrou em solução, deixando para trás um fino precipitado. A esta mistura foi adicionado H₂SO₄ (52,5 mL), e a reação foi agitada ao refluxo durante a noite. A reação foi resfriada para a temperatura ambiente e diluída com tetraidrofurano (3 L). A solução foi carregada em um funil separador de 12 L contendo NaHCO₃ aquoso saturado (4 L). Esta mistura foi extraída com metil t-butil éter (3 x 4 L). As camadas orgânicas foram combinadas e lavadas com salmoura e se-

cadas em Na_2SO_4 , em seguida concentradas em vácuo para fornecer uma mistura de sólido marrom e óleo marrom. Cloreto de metileno (500 mL) foi adicionado ao produto bruto, e um pouco de sólidos branco permaneceu não dissolvido. Estes cristais foram filtrados para fornecer ~10 g de produto. Cristais semente foram adicionados ao filtrado, e após 30 minutos, um sólido marrom precipitou-se. A nova mistura foi filtrada, e mais cristais semente foram adicionados para produzir uma terceira colheita de precipitado, e esta terceira mistura foi também filtrada. Adição de cristais semente ao filtrado não produziu nenhum produto adicional. O filtrado foi concentrado em vácuo para fornecer uma espuma marrom, que foi redissolvida em cloreto de metileno (600 mL). Metil t-butil éter (MTBE) (1,250 mL) foi lentamente adicionado à solução, que precipitou um sólido marrom. Uma mistura foi filtrada, e o filtrado foi adicionado à outras amostras impuras, em seguida purificado por cromatografia de coluna, eluindo com cloreto de metileno - hexanos. Nenhuma das frações contendo o produto foi muito pura (faixa: 50% - 75%), então todas foram recristalizadas com MTBE para fornecer pós amarelo pálido. Estas amostras foram combinadas com as amostras de recristalização para fornecer o composto do título (139 g, 33% de produção, 75% de pureza). ^1H RMN (CDCl_3): consistente com a estrutura proposta.

20 Exemplo 3

Cloridrato de 2-amino-3-(7-bromo-1H-indol-3-il)propanoato de metila

H_2SO_4 (340 mL) foi adicionado lentamente em uma mistura agitada do composto do título de Exemplo 2 (342 g, 1,05 mol) em metanol (3,4 L). A mistura marrom escuro resultante foi aquecida ao refluxo durante 16 horas, tempo no qual análise de HPLC indicou conclusão da reação. A reação foi resfriada para a temperatura ambiente e resfriada bruscamente lentamente em uma mistura agitada de água (4,8 L), bicarbonato de sódio (342 g) e cloreto de metileno (4,8 L). A agitação foi continuada durante 1,5 hora. As camadas foram separadas e a camada aquosa foi novamente extraída duas vezes com cloreto de metileno (3,0 L). Os extratos combinados foram secados com sulfato de sódio e concentrados em um alcatrão preto. O material foi dissolvido em cloreto de metileno (3,0 L). 1N de HCl em dietil éter (1,1 L)

foi adicionado lentamente com resfriamento externo. A suspensão foi resfriada para temperatura de banho de gelo e filtrada. Os sólidos foram lavados duas vezes com cloreto de metileno (500 mL) e três vezes com hexanos (500 mL). Os sólidos foram secados para massa constante em um forno a 5 vácuo a 32°C para fornecer o composto do título (267,4 g, 76% de produção). ^1H RMN (CDCl_3): consistente com a estrutura proposta.

Exemplo 4

2-((S)-2-benziloxicarbonilamino)-3-metilbutanamido)-3-(7-bromo-1H-indol-3-ii)oxazol-4-propanoato de metila.

10 O composto do título de Exemplo 3 (256,6 g, 770 mmols), TBTU (296,4 g, 1,2 eq) e Cbz-L-valina (212,7 g, 1,1 eq) foram dissolvidos em dimetilformamida (DMF, anidro, 2.700 mL) e resfriados para 0°C durante 30 minutos. Diisopropiletilamina (DIEA, 268 mL) foi adicionado lentamente e a solução foi deixada aquecer para a temperatura ambiente. A agitação foi continuada durante 4 horas tempo no qual HPLC indicou conclusão da reação. A reação foi diluída com acetato de etila (11 L) e água (7,5 L). A mistura foi agitada durante 1 hora e deixada separar. A camada orgânica foi lavada uma vez com água (7,5 L), duas vezes com salmoura (7,5 L) e duas vezes com NaHCO_3 saturado (7,5 L). O material foi secado com sulfato de sódio e concentrado para sólido preto marrom. O material foi apreendido em cloreto de metileno (7,5 L) e combinado com 22,2 g de outro lote de material de qualidade similar e sílica gel (400 g). O solvente foi removido para sustentar o composto bruto sobre sílica. Este material foi dividido na metade e cada metade foi cromatografada em uma coluna de gravidade de sílica de 0,15 m 15 x 1,21 m (6 polegadas x 4 pés). Cada qual foi eluída com cloreto de metileno (20 L) seguido por acetona a 5% em cloreto de metileno (20 L) seguido por acetona 8% em cloreto de metileno (30 L) para fornecer o composto do título (383 g, 89% de produção). ^1H RMN (CDCl_3): consistente com a estrutura proposta.

20

25

Exemplo 5

2-((S)-1-('benziloxicarbonilamino)-2-metilpropil)-5-(7-bromo-1H-indol-3-ii)oxazol-4-carboxilato de metila.

Diclorodicianoquinona (340,8 g, 1.500 mmols) foi adicionado a uma solução agitada do composto do título de Exemplo 4 (361,4 g, 681 mmols) dissolvido em tetraidrofuranô (15 L) e aquecido até o refluxo durante 6 horas, tempo no qual HPLC indicou completa reação. A reação foi concentrada para ¼ de seu volume e diluída com acetato de etila (12 L). A solução preta resultante foi lavada três vezes com NaHCO₃ aquoso saturado (5,5 L). A camada orgânica foi secada sobre sulfato de sódio e concentrada para fornecer o composto do título como um sólido preto (392 g, 100% de produção). ¹H RMN (CDCl₃): consistente com a estrutura proposta.

10 **Exemplo 6**

Bromidrato de 2-((S)-1-amino-2-metilpropil)-5-(7-bromo-1H-indol-3-il)oxazol-4-carboxilato de metila.

A HBr a 33% em ácido acético (1,33 L) foi adicionado o composto do título de Exemplo 5 (403,4 g, 766 mmols) e a mistura vigorosamente agitada durante 1 hora e 20 minutos. A mistura foi lentamente e cuidadosamente adicionada a MTBE (12 L) com resfriamento externo e forte agitação. A mistura foi agitada durante 1 hora a 0°C e filtrada sob N₂. Os sólidos higroscópicos foram lavados com MTBE (1 L) e secados para massa constante em um forno a vácuo para produzir o composto do título (277,5 g, 76,5%) como um sólido marrom fino. ¹H RMN (CDCl₃): consistente com a estrutura proposta.

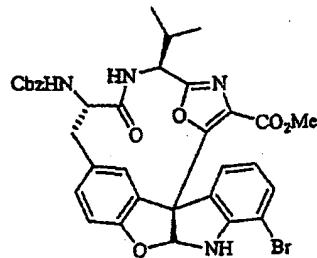
Exemplo 7

2-((S)-1-((S)-2-(benziloxicarbonilamino)-3-(4-hidroxifenil)propanamido)-2-metilpropil)-5-(7-bromo-1H-indol-3-il)oxazol-4-carboxilato de metila.

25 A diisopropiletilamina (225 mL, 1.290 mmols) agitada a 0°C foi adicionado uma solução do composto do título de Exemplo 6 (277,5 g, 586,5 mmols), Cbz-L-tirosina (194,2 g 615,9 mmols) e TBTU (207,2 g, 1,1 eq) em dimetilformamida (anidro, 2,77 L). A reação foi deixada aquecer para a temperatura ambiente e agitada durante 16 horas, tempo no qual HPLC indicou conclusão da reação. A solução reacional foi lentamente vertida em NaHCO₃ aquoso saturado (12,0 L) e agitada durante 30 minutos. O precipitado foi filtrado e a massa filtrante foi cuidadosamente lavada com água. O material

marrom resultante foi secado para massa constante em um forno a vácuo a 40°C para produzir o composto do título (435 g). O composto do título foi também purificado por recristalização. O composto do título foi dissolvido em isopropanol (9,0 L) a 70°C. O material insolúvel foi removido por filtração e o filtrado foi aquecido, ao mesmo tempo que lentamente adicionando hexanos (9,0 L). A suspensão foi deixada resfriar para a temperatura ambiente tempo, no qual um banho de gelo foi aplicado. Uma vez resfriada, a mistura foi agitada em temperatura de banho de gelo durante 30 minutos e filtrada. O sólido foi lavado com hexanos e secado para massa constante a 40°C em um forno a vácuo fornecendo o composto do título puro (264 g, 61% de produção). ^1H RMN (CDCl_3): consistente com a estrutura proposta.

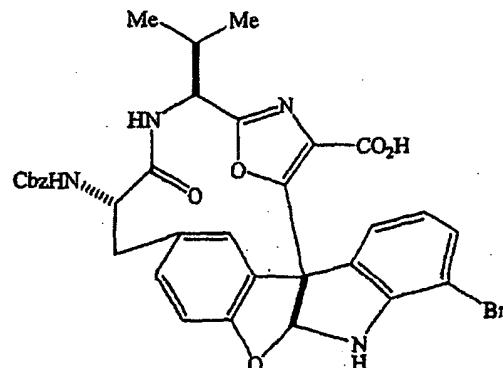
Exemplo 8



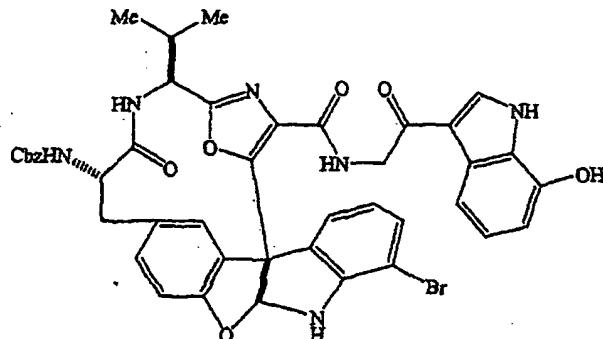
O composto do título de Exemplo 7 (45,0 g, 65 mmols) foi dissolvido em tetraidrofurano (325 mL) e foi adicionado rapidamente a uma solução a -20°C de $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ (20 g, 62 mmols) e LiOAc (12,7 g, 196 mmols) em 2,2,2-trifluoroetanol (13,0 L). A solução foi agitada a -20°C durante 25 minutos, tempo no qual NaHCO_3 sólido (117,5 g) foi lavado. O banho frio foi removido e a agitação foi continuada durante mais 30 minutos. A mistura foi filtrada a 10°C e o filtrado foi concentrado. O resíduo, 94,6 g, foi apreendido em CHCl_3 -tetraidrofurano (3:1, 300 mL) e sonicado durante 10 minutos. O diastereômero indesejado precipitado foi removido por filtração e o filtrado foi concentrado para fornecer o composto do título bruto. As operações acima foram realizadas um total de 3 vezes para fornecer um total combinado de 223,6 g de composto do título bruto. O composto do título bruto foi inicialmente purificado por filtração em tampão de sílica eluindo com acetato de etila a 100%. Isto resultou em 179,9 g de material que foi também purificado por cromatografia de coluna múltipla. Uma primeira coluna foi elu-

ída usado 6:1 cloreto de metileno - tetraidrofurano. Isto resultou em 71,1 g de material, que foram apreendidos em 6:1 cloreto de metileno - tetraidrofurano (200 mL) e refrigerados durante a noite. O diastereômero indesejado precipitado foi removido por filtração e o filtrado foi concentrado para fornecer 66,6 g de composto. Este material foi cromatografado durante mais duas vezes eluindo com 15:1 cloreto de metileno - tetraidrofurano para fornecer o composto do título em duas frações: (16,8 g e 9,3 g). ^1H RMN (DMSOd-6): consistente com a estrutura proposta. Espectro de massa (ESI) m/z: 687 ($\text{M}+\text{I}$).

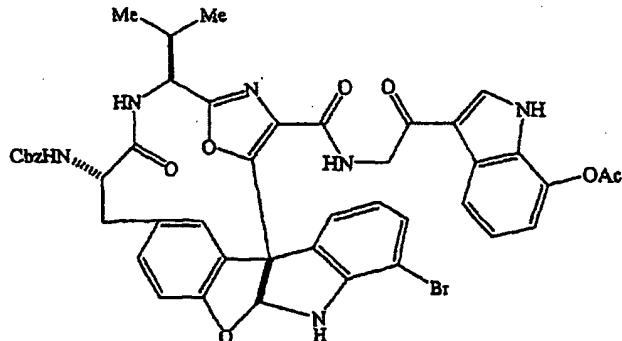
10 **Exemplo 9**



A um frasco contendo o composto sintetizado no Exemplo 8 (102 mg, 0,148 mmol) foi adicionado metanol (3,6 mL). A solução foi resfriada em banho de água gelada durante 15 minutos. Uma solução de matéria-prima de LiOH em água (35,4 mg/0,6 mL, 1,48 mmol) foi adicionada gota a gota a 0°C. A mistura foi aquecida para a temperatura ambiente (todo o precipitado dissolveu-se) e agitada durante 4 horas. Menos do que 1% do material de partida permaneceu após checagem por LCMS. Cerca de 10 g de gelo foram adicionados a uma mistura reacional e a temperatura foi diminuída para 0°C. HCl aquoso (1N, 1,6 mL) foi adicionado gota a gota a 0°C para ajustar o pH de uma mistura reacional para entre 2 e 3. Acetato de etila (2 x 20 mL) foi usado para extrair o ácido desejado. As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com água (10 mL), salmoura (10 mL) e secadas sobre Na_2SO_4 . A solução foi concentrada para fornecer 100 mg do composto do título que foi usado na etapa seguinte sem outra purificação. ^1H RMN (DMSOd-6): consistente com a estrutura proposta.

Exemplo 10

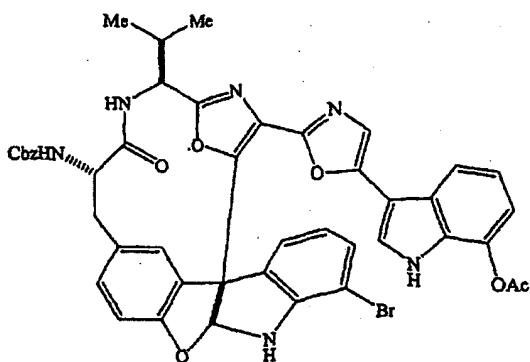
A um frasco seco contendo o composto sintetizado no Exemplo 9 (100 mg) foi adicionado cloridrato de 2-amino-1-(7-hidróxi-1H-indol-3-il) etanona (50,3 mg, 0,222 mmol) e DMF anidroso (0,5 mL). Trietilamina (31 μ L, 0,222 mmol) foi adicionado em temperatura ambiente sob N₂. Uma solução amarela pré-preparada de DHOBt (8,45 mg, 0,0518 mmol), EDC HCl (42,6 mg, 0,222 mmol) e trietilamina (31 μ L, 0,222 mmol) em DMF anidroso (2,0 mL) foi adicionada a uma solução em temperatura ambiente. A mistura foi agitada a 41 a 42°C sob N₂ durante 6 horas. A mistura reacional foi diluída com acetato de etila (30 mL) seguido por lavagem com água (10 mL), NaHSO₄ a 10% aquoso (10 mL), água (2 x 10 mL), NaHCO₃ aquoso saturado (10 mL), água (2 x 10 mL), e salmoura (10 mL). Uma solução foi secada sobre Na₂SO₄, filtrada e evaporada para fornecer o composto do título (130 mg). ¹H RMN (DMSOd-6): consistente com a estrutura proposta.

15 Exemplo 11

A um frasco seco contendo o composto sintetizado no Exemplo 10 foi adicionado tetraidrofurano anidroso (0,9 mL) e CH₂Cl₂ (2,7 mL). A solução resultante foi resfriada em banho de água gelada durante 15 minutos. Anidrido acético (42 μ L, 0,444 mmol) e piridina (18 μ L, 0,222 mmol) foram adi-

cionados a 0°C. Em seguida a mistura foi aquecida para a temperatura ambiente e agitada durante 3,5 horas sob N₂. A reação foi monitorada por meio de LCMS. A solução reacional foi diluída com acetato de etila (30 mL) seguido por lavagem com água (10 mL) e salmoura (10 mL) e secagem sobre Na₂SO₄. Após concentração, 136 mg de produto bruto foram obtidos. Cromatografia instantânea, eluindo com acetato de etila /CH₂Cl₂, 30/70 ~ 35/65) forneceu o composto do título (80 mg, 61% de produção total durante as últimas três etapas). ¹H RMN (DMSO-d₆): consistente com a estrutura proposta.

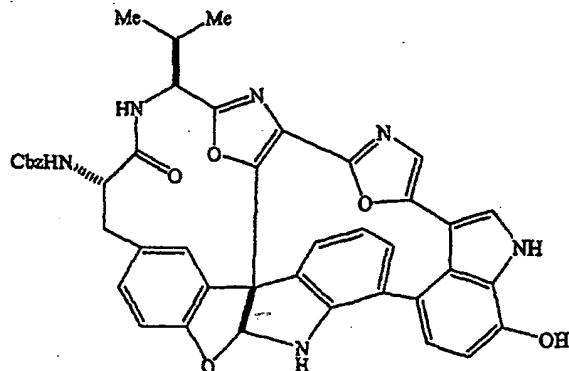
10 Exemplo 12



Trifenilfosfina (474 mg, 1,81 mmol) e hexacloroetano (428 mg, 1,81 mmol) foram adicionados a um frasco seco equipado com barra agitadora. CH₂Cl₂ anidroso (18,5 mL) foi adicionado e a solução resultante foi resfriada bem em banho de água gelada sob N₂. Trietilamina (351 ul, 2,52 mmols) 15 foi adicionada lentamente à solução, seguido por agitação durante 10 minutos a 0°C. A solução do composto sintetizado no Exemplo 11 (160 mg, 0,180 mmol) em CH₂Cl₂ anidroso (9,5 mL) foi adicionado gota a gota e a temperatura foi mantida a 0°C a 2°C. Após adição, a mistura reacional foi agitada a 0°C durante 10 minutos (o tempo total deve ser menor do que 15 minutos). 20 Água (34 µL) foi adicionada para saciar a reação. Todo o solvente foi evaporado a 15°C sob pressão reduzida. Acetato de etila (5 mL) foi adicionado ao óxido de trifenilfosfina precipitado. Após filtragem, o filtrado foi concentrado novamente e o procedimento acima foi repetido duas vezes para remover óxido de trifenilfosfina adicional. O filtrado foi concentrado seguido por purificação por meio de cromatografia instantânea eluindo com acetato de etila - 25

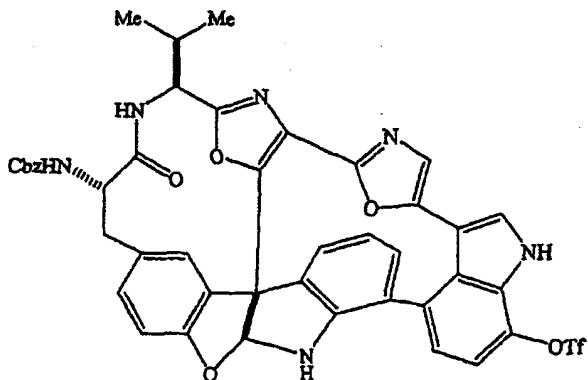
tolueno (60:40) para produzir o composto do título (110 mg, 70% de produção.) ^1H RMN (DMS Od-6): consistente com a estrutura proposta.

Exemplo 13



A solução do composto sintetizado no Exemplo 12 em acetonitrila (10,0 mg/4 mL) foi adicionada a um tubo de teste de quartzo seguido por pulverização com N_2 durante 30 minutos. Uma solução desgaseificada de matéria-prima de LiOH em H_2O (0,596 mg/0,60 mL) foi adicionado gota a gota. A solução reacional tornou-se amarelo escuro e foi desgaseificada com N_2 durante 30 minutos. O tubo de teste de quartzo foi colocado em fotorreator iluminado com bulbos de luz de 300 nm. A solução reacional foi irradiada durante 45 minutos e pulverizada com N_2 . Esta reação foi repetida 12 vezes. As misturas reacionais combinadas foram diluídas com acetato de etila (200 mL) seguido por lavagem com NH_4Cl saurado (50 mL), H_2O (50 mL), salmoura (50 mL) e secagem sobre Na_2SO_4 para fornecer o composto do título.

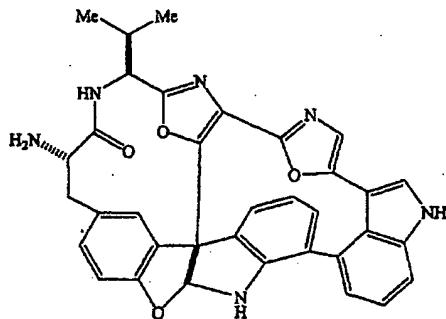
Exemplo 14



A um frasco seco contendo o composto sintetizado no Exemplo 13 (0,150 mmol) foi adicionado K_2CO_3 seco (61 mg) e DMF anidroso (4 mL). Uma solução de trifluorometanossulfonato de 4-nitrofenila em DMF anidroso

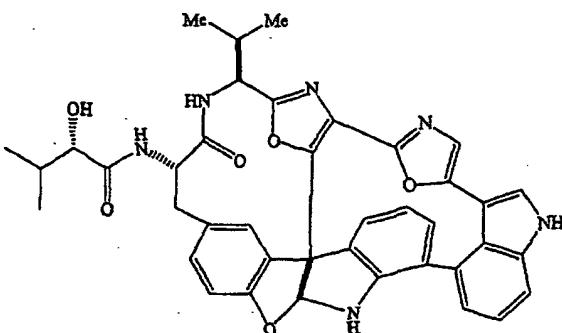
(61 mg/1,3 mL) foi adicionado à mistura reacional em temperatura ambiente. A solução amarelo-marrom resultante foi agitada em temperatura ambiente sob N₂ durante 1 hora. Em seguida a mistura foi diluída com acetato de etila (100 mL) seguido por lavagem com NH₄Cl aquoso saturado (2 x 20 mL), H₂O 5 (5 x 20 mL), salmoura (2 x 20 mL) e secada sobre Na₂SO₄. Após concentração, o produto foi purificado por meio de cromatografia instantânea, eluindo com acetato de etila -CH₂Cl₂ (30:70) para fornecer o composto do título (50 mg, 38% de produção total durante as últimas duas etapas). ¹H RMN (DM-SOd-6): consistente com a estrutura proposta.

10 Exemplo 15



A um frasco contendo o composto sintetizado no Exemplo 14 (50 mg, 0,057 mmol) foi adicionado MeOH (5 mL) e trietilamina (29 µL, 0,205 mmol) seguido por purga com N₂. Em seguida Pd(OH)₂/C (95 mg) foi adicionado sob N₂. Um balão carregado com gás de hidrogênio foi adicionado i- 15 mediatamente e o frasco foi purgado com hidrogênio 4 vezes. A reação foi deixada prosseguir durante 3 horas. A mistura foi filtrada através de uma almofada de Celite e o resíduo foi lavado por MeOH (2 x 10 mL). O filtrado foi concentrado e diluído com acetato de etila (50 mL). A solução foi lavada com H₂O (3 x 10 mL) e salmoura (10 mL), e secada sobre Na₂SO₄. Após 20 concentração, o composto do título foi obtido (33 mg); ele foi usado na etapa seguinte sem outra purificação.

Exemplo 16



Para sintetizar o Composto J de fórmula (1) mostrado acima, a um frasco seco contendo o composto sintetizado no Exemplo 15 (2 mg, 0,0469 mmol) foi adicionado tetraidrofurano anidroso (1,1 mL). Uma solução de (S)-2,5-dioxopirrolidin-1-il-2-hidróxi-3-metilbutanoato (11,1 mg, 0,0516 mmol) em tetraidrofurano anidroso (0,3 mL) foi adicionada a uma mistura reacional em temperatura ambiente. A mistura reacional foi agitada em temperatura ambiente sob N₂ durante 2 horas. A mistura reacional foi diluída com CH₂Cl₂ (50 mL) seguido por lavagem com NaHCO₃ saturado (2x 5 mL), H₂O (5 mL) e salmoura (5 mL), e secagem sobre Na₂SO₄. Após concentração, o produto final foi purificado por meio de cromatografia instantânea, eluindo com MeOH-CH₂Cl₂ (3:9) para fornecer o composto do título (19 mg, 58% de produção). Espectro de massa (ESI) m/z: 697,2 (M+I). ¹H RMN (DMSOd-6): consistente com a estrutura proposta.

Exemplo 17

15 Inibição de Várias Linhagens Celulares pelo Composto J

Diversas linhagens de célula de tumor representando câncer de mama, pulmão, cólon, ovário e próstata bem como melanoma foram ensaiadas sob condições de desenvolvimento padrão na presença de quantidades variáveis de diazonamida A, uma forma hidroxilada de Composto J, Composto J, paclitaxel e vinblastina. Os resultados são representados como a concentração que diminui o crescimento por um fator de dois (GI₅₀) na figura 1. Na caixa mostrada na figura 1, AB-4 é a forma hidroxilada de Composto J e AB-5 é Composto J. Como mostrado, todos os fármacos testados tiveram concentrações GI₅₀ muito baixas na linhagem de célula de tumor de mama MDA-MB-435, porém diazonamida A, Composto J e vinblastina foram mais eficazes do que os fármacos restantes com respeito a MDA-MB-231. Em

- pulmão e cólon, a forma hidroxilada de Composto J foi menos eficaz do que os fármacos restantes. Todos os fármacos testados tiveram GI_{50}^5S (único dígito nM) muito baixas na linhagem de célula de ovário OVCAR3, porém o paclitaxel foi显著mente menos eficaz do que o restante para quatro fármacos contra as linhagens de célula de ovário IGR-OVI e SKMEL-2. Em melanoma, Composto J e sua forma hidroxilada foram menos eficazes do que os fármacos restantes, porém nas linhagens de célula da próstata PC-3 e LnCAP, todos os fármacos funcionaram bem. (A forma hidroxilada de Composto J foi menos ativa contra PC-3.)
- 10 Experimentos adicionais testando o efeito de Composto J e paclitaxel sobre a sobrevivência de linhagem de célula de tumor ovariano PTX10 são mostrados na figura 2. Plotados contra a concentração adicional, estes resultados mostram que o Composto J é mais eficaz do que o paclitaxel na redução da percentagem de sobrevivência de células. Na figura 2, 15 os círculos representam o Composto J e os diamantes representam paclitaxel.

Exemplo 18

Farmacocinéticos

O Composto J foi injetado intravenosamente em camundongos contendo crescimento de tumores de xenoenxerto de células de câncer de mama MDA-MB-435. A concentração intratumoral de Composto J foi avaliada como uma função de tempo. Os resultados são mostrados na figura 3. Como sumariado, a meia-vida terminal deste composto é de 297,6 minutos, a área sob a curva é de 3010224 min* ng/ml e o volume de distribuição é de 25 2,9 l/kg.

Exemplo 19

Atividade in vivo

Como mostrado nas figuras 4A e 4B, o Composto J é comparável ao paclitaxel na inibição de crescimento de xenoenxertos de HCT116 e 30 xenoenxertos de PC-3.

Detalhes da preparação de modelos de murino contendo xenoenxertos de células HCT 116 ou células PC-3 são descritos na seção se-

guindo estes exemplos. Após os tumores serem desenvolvidos, terapia utilizando o Composto J ou paclitaxel foi iniciada. Como mostrado na figura 4A, 20 mg/kg de Composto J administrado IV torna mais lento o crescimento de tumor de uma maneira similar ao paclitaxel na mesma concentração. Na figura 4 A, o *'s representam camundongos de controle, os quadrados representam 5 mg/kg de Composto J; os diamantes representam 20 mg/kg de Composto J; e a linha inclinada representa 20 mg/kg de paclitaxel. Como observado, paclitaxel e Composto J em concentrações similares fornecem curvas similares de inibição de crescimento. Além disso, quatro de 10 animais usados no estudo ficaram livres de tumores durante mais de cinco meses e não experimentaram nenhuma perda de peso.

De um modo similar usando células PC-3 como o xenoenxerto, novamente 20 mg/kg de Composto J ou paclitaxel significantemente inibiram o crescimento de tumor. Na figura 4B, os quadrados são o controle, os círculos escuros são os pontos de dados para o Composto J e os diamantes claros são os pontos de dados para o paclitaxel.

Exemplo 20

Efeito sobre a Proliferação de Neutrófilo e Contagens Celulares

Como mostrado na figura 5, embora o paclitaxel resulte em uma redução de contagens de neutrófilo em medula óssea e em sangue periférico em dosagens de 5 mg/kg e 20 mg/kg, o Composto J nestas concentrações não tem nenhum efeito sobre estas contagens celulares.

Além da avaliação do efeito sobre tumores, o efeito de paclitaxel e Composto J sobre os neutrófilos em medula óssea e sangue foram obtidos. Como mostrado na figura 5A, embora o paclitaxel em 20 mg/kg significantemente reduza as contagens e neutrófilo em medula óssea, uma dose comparável de Composto J não teve nenhum efeito. Os dados são fornecidos como o número de células GR1+ em um fêmur.

Na figura 5B, similarmente, a contagem de neutrófilo em sangue periférico é enormemente reduzida tanto por 5 mg/kg quanto 20 mg/kg de paclitaxel, porém não é significantemente afetada por quantidades similares de Composto J. Estes dados são tabulados como ANC (célula/ml).

Os dados obtidos para inibição de crescimento em xenoenxertos para o Composto J quando comparado ao paclitaxel são mostrados abaixo.

Tabela 1
SUMÁRIO DE DADOS DE EFICÁCIA DO COMPOSTO J

Tumor	Composto	Rotina de liberação	% MaxT/C ^a	Log ₁₀ Morte de Célula de Tumor ^b	Nº Livre de Tumor (dia)
HCT118 (cólon)	Composto J (20 mg/kg)	IV	0,2	1,8	2/5 (243+)
	Composto J (5 mg/kg)	IV	26,5	0,54	0/5
	Composto J (5 mg/kg)	IP	41,9	0,37	0/5
	Paclitaxel (20 mg/kg)	IV	0,2	3,2	1/5 (243+)
PC3 (próstata)	Composto J (20 MG/KG)	IV	0,3	3,4	2/5 (157 ^c)
	Paclitaxel (20 mg/kg)	IV	0	3,4	4/5 (157 ^c)
MDA-MB-435 (mama)	Composto J (20 mg/kg)	IP	6,8	0,6	0/6
	Vinblastina (0,7 mg/kg)	IP	14,1	0,6	0/6
MDA-MB-435 (mama)	Composto J (20 mg/kg)	IP	3,1	1,0	0/6
	Vinblastina (0,7 mg/kg)	IP	41,1	0,2	0/6
HCT118 (cólon)	Composto J (20 mg/kg)	IP	9,3	1,0	0/5
	Vinblastina (0,45 mg/kg)	IP	56	0,2	0/5

%Max T/C = peso de tumor tratado médio/
peso de tumor de controle médio

$$\text{Log}_{10} \text{Morte de Célula de Tumor} = [(T - C) \times 10,301] / Td$$

T= tempo em dias para o grupo tratado para atingir 300 mg

C= tempo em dias para o grupo de controle para atingir 300 mg

Td = tempo de duplicamento de tumor

Os detalhes do protocolo para os Exemplos 19 e 20 são como segue:

Materiais Requeridos:

- Células de tumor de próstata PC3 e células de tumor de có⁵lon HCT116 (adquiridas do repositório de tumor Division of Cancer Treatment e Diagnosis (DCTD) do NCI
 - Meios de RPMI Completo
 - RPMI (Cat Nº 11875-085, Invitrogen)
 - 10% de Soro Bovino Fetal inativado por calor (30°¹⁰ 56°C) (Cat Nº 100-106, Gemini Bio-Products).
 - 2 mM L-glutamina (Cat Nº 25030-081, Invitrogen)
 - 0,1mM de MEM Solução de Aminoácidos Não-Essenciais (Cat Nº 1140-050, Invitrogen)
 - 10 U/ml de Penicilina / 10 µg / ml de Estreptomicina (Cat Nº 15140-122, Invitrogen)
 - 1 mM de Piruvato de Sódio (Cat Nº 1360-070)
 - Tripsina-EDTA (Cat Nº 25300-054, Invitrogen)
 - Salina Tamponada por Fosfato livre de Ca²⁺/Mg²⁺, dextrose a 5% em água
- 20 • Prato de Cultura Celular de 150 mm X 25 mm (Cat Nº 430599, Corning, Inc.)
 - Pipetas de 10 e 25 ml, auxiliar de pipeta padrão, pontas de pipeta p200 e p1000 e pipetador padrão
 - Camundongos nus NCr-nu/nu atípicos em 6-12 semanas de idade, ou sexo (código de linhagem: 01B74, NCI Frederick Animal Producti²⁵on Program - fornecedores incluem Charles River Labs e Taconic Farms). Camundongos fêmea de aproximadamente 7 semanas de idade foram utilizados para experimentos existentes.
- 30 • Seringa de tuberculina de 1 c³ padrão, agulhas 30G1/2 e 25G5/8 (Becton Dickinson)
 - Tubos de 5 ml Falcon (Cat Nº 352054)
 - Tubos cônicos plásticos descartáveis de 50 e 15 ml (Falcon

ou vendedor similar)

- Solução Azul Tripano (0,4%) (Cat NºT8154, Sigma)
- Hemacitômetro de contraste de fase Hausser (Cat Nº 02-671-54, Fisher)

- 5 • Balde de gelo
- Balança para pesar camundongos (precisa até 0,2 g)
- Compassos de calibre Vernier
- Facilidade de vivário livre de patógenos (camundongos nus devem ser alojados em isolamento de camundongos convencionais se possível - salas separadas ou gaiolas micro-isoladoras equipadas com fluxo de ar individual; alojamento, leito, água de todos os animais devem ser autoclavados antes do uso; ração de camundongo irradiada padrão deve ser usada; os animais devem ser trocados de gaiolas dentro coifa de fluxo laminar; investigadores que manipulam os camundongos devem ser adequadamente 10 trajados com roupão, touca, butim, luvas, máscara)
- 15 • Composto AB-5 (Composto J)
- Álcool etílico, 200 provas (Aaper, MFD 041205)
- Cremaphor (Cat Nº C5135, Sigma)
- Paclitaxel (Cat NºANP0010, Polymed Therapeutics)

20 **Procedimento :**

- 25 1) Rapidamente descongelar células PC3 ou HCT16 (se necessário) em banho de água a 37°C. Transferir os conteúdos para 9 ml de meios de RPMI completos. Giro 5' a 1200 rpm (240Xg). Descartar os meios e ressuspender o pélete em 8 ml meios de RPMI completos. Semear em pratos de cultura celular de 100 mm X 25 mm em CO₂ a 5%, incubador umidificado a 37°C.

- 30 2) Permitir o crescimento durante 5-10 dias, dividir (aspirar os meios, lavar com 3-5 ml de PBS, adicionar 1 ml de tripsina-EDTA, incubar 3-5' a 37°C, adicionar meios em volume desejado e transferir para múltiplas placas) 1:8 a 1:10 a cada 3-4 dias quando necessário para permitir as células entrarem na fase de crescimento logarítmico.

- 3) Quando as células estiverem bem-desenvolvidas, começar a

expandir para pratos de 150 mm X 25 mm. Usa-se 20 ml de meios em um prato de 150 mm e usa-se 2 ml de tripsina para divisão. Quando quase confluente, deve existir 2×10^7 células/150 mm do prato.

5 4) Planejar à frente para a chegada do momento de camundongos nu/nu de modo que eles possam aclimatar-se à facilidade animal durante 1 semana antes da injeção de células de tumor. Durante este tempo, rótulo de orelha ou máscara de acordo com a prática padrão para Vivarium).

10 5) Coletar células PC3 ou HCTI 16 quando você prognosticar já ter células suficientes para o número total de camundongos em estudo (Número total de camundongos = 7 camundongos/grupo X total Nº grupos - grupos sugeridos: controle de veículo, Paclitaxel controle positivo, AB-5 + até 5 camundongos adicionais para prover variação em taxa de retirada de xeno-enxerto; isto é, 26 camundongos). Planejar injetar 10 milhões de células/camundongo e prover a perda de células/volume durante o processo de injeção. Isto é, se 30 camundongos devem ser injetados, planejar coletar células suficientes para pelo menos 35 injeções - 35×10 milhões de células = $3,5 \times 10^8$ células. No experimento de HCTI 16 existente, 7,5 células $\times 10^6$ foram injetadas por camundongo. Cinco camundongos por grupo foram utilizados para tratamento de AB-5 e quatro camundongos por grupo foram utilizados para o controle e tratamentos com paclitaxel. No experimento de PC3 existente, 10^7 células foram injetadas. Seis camundongos por grupo foram utilizados para o tratamento de controle e cinco camundongos por grupo foram utilizados para os tratamentos com AB-5 e paclitaxel. Tamanhos de grupo menores foram necessários devido à limitações em disponibilidade de 20 AB-5.

25 6) Coletar células como para dividir nas etapas 2 e 3 acima. É proveitoso coletar apenas 10 placas em um momento e colocar as células coletadas sobre gelo quando alguém necessitar processar um grande número de placas para um único experimento. Lavar as placas com veículos adicionais 1-2 vezes além dos veículos usados para diluir tripsina e coletar células inicialmente. As células de 10 placas com lavagens associadas confortavelmente ajustar-se-ão em um cônico de 50 ml. Todas as etapas devem ser

conduzidas usando células e técnicas assépticas e a centrífuga deve ser mantida fria em todo o procedimento.

- 7) Uma vez que todas as células foram coletadas, girar 5' 1200 rpm (240Xg). Ressuspender os péletes em 5-10 ml de RPMI simples (livre de soro e aditivo). Agrupar os péletes e em seguida contar a população de células agrupadas diluída em concentração adequada para contagem. Contar 50 µl + 50 µl de azul tripano em um hemacitômetro padrão. Girar as células como antes e repetir a lavagem livre de soro mais duas vezes para assegurar completa remoção do soro. Pode ser proveitoso dividir as células novamente em múltiplos tubos cônicos de 50 ml para contagem e lavagens, porém estar seguro de agrupar novamente em um único tubo para giro final.

- 8) Ressuspender o pélete celular, levando em consideração o volume do pélete sozinho, em $4 \times 10^7/\text{ml}$ em meios livres de soro. Pipetagem ou suave centrifugação é aceitável.

- 9) Empregar as células sobre gelo para vivário onde os camundongos devem estar já em gaiolas prontas para injeção.

- 10) Extrair 0,8-0,9 ml de células para dentro de seringa de tuberculina gelada. Acoplar agula de 25G e cuidadosamente rebentar as bolhas de modo que 0,7 ml de células permaneça na serinja pronta para injetar.
- 20 Deixar as células restantes sobre gelo.

- 11) Manualmente reprimir os camundongos com a mão esquerda, mantendo o rabo e a pele atrás da cabeça firmes de modo que o camundongo não possa mover-se, porém seja ainda capaz de respirar. Esfregar a pele a ser injetada com álcool e puxar uma área de pele solta. Biselar sobre a agulha, suavemente inserir a seringa e a agulha contendo as células exatamente sob a pele do camundongo e lentamente injeta 0,2 ml de células (1×10^7 células). Área de injeção deve formar um área aumentada sob a pele. Substituir os camundongos em gaiolas.

- 12) Iniciar as medições de tamanho de tumor com compassos de calibre Vernier (medir o comprimento e largura e calcular o volume como $(L \times W^2)/2$ três dias após a injeção. Também medir o peso do camundongo. Em geral, os pesos do camundongo devem ser medidos ao mesmo tempo

todos os dias (dentro de 1-2 horas) para evitar a flutuação diária esperada. Medir o volume do tumor pelo menos mais uma vez em intervalos de 2-3 dias para estar seguro de que o volume do tumor está crescendo. A terapia pode ser iniciada quando o volume do tumor estiver entre 150-250 mm³.

5 Este ponto deve ser atingido dentro de 5-10 dias de injeção de inicial. Não usar camundongos cujos tumores estão significantemente fora desta faixa. A terapia foi iniciada 5 dias após a injeção de tumor para o experimento de PCS existente e 8 dias após a injeção de tumor para o experimento de HCT116 existente.

10 13) Antes do primeiro dia de terapia, aliquotar os compostos paclitaxel e AB-5/Composto J em alíquotas de dose individual. Deve ser possível estimar o peso de camundongos no primeiro dia de terapia com base nos pesos medidos durante o período de crescimento de tumor inicial. Aliquotar suficiente composto por tubo para o número de camundongos em grupo de
15 tratamento + 1,5-2 doses extras. Tanto o paclitaxel quanto o Composto J são dados a 20 mg/kg. Minimizar a perda de composto e maximizar a precisão, pesou-se 20-30 mg de composto e dissolve-se em etanol. Alíquotas de quantidade de composto desejadas são então pipetadas em tubos individuais e secadas sob vácuo. As alíquotas são armazenadas dessecadas a -
20 20°C em Teflon ou tubos de vidro.

14) No primeiro dia de terapia, aleatorizar os camundongos do grupo, de modo que o volume de tumor médio por grupo é consistente. Se usar machos, pode ser necessário utilizar gaiolas múltiplas visto que é desaconselhável reagrupar camundongos nu/nu machos com camundongos
25 nu/nu novos por causa de briga.

15) Preparar uma solução de matéria-prima de 1:1 cremafor: etanol. Preparar o Composto J e paclitaxel para injeção primeiro dissolvendo em 20 µl/dose de cremafor: etanol com vigorosa centrifugação ou sonicação, como necessário. Diluir em dextrose a 5%, tal que a concentração final de
30 cremafor:etanol seja de 10% (isto é, adicionar 180 µl de dextrose a 5% por dose). Centrifugar para misturar. A solução será ligeiramente viscosa. Paclitaxel pode requerer concentração ligeiramente mais elevada de excipiente

para permanecer em solução (até 20% final). Nos experimentos de HCTI 16 e PC3 existentes, 20% de excipiente foi utilizado para a formulação de paclitaxel e 10% para a formulação AB-5.

16) Aquecer o rabo usando uma lâmpada quente de 150W. Escolheu-se aquecer apenas o rabo, porém técnicas padrão usadas por vivário são finas. Colocar o camundongo em um *Tailveiner*. Esfregar a veia com esfregão com álcool e lentamente injetar 0,2 ml durante 5 segundos.

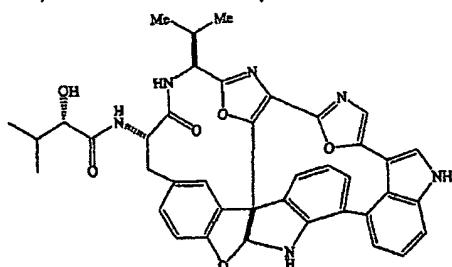
17) Seis doses devem ser administradas em um intervalo de dia sim dia não (q2dX6). Nos experimentos de HCTI 16 e PC3 existentes, as doses foram dadas Segunda/Quarta/Sexta durante duas semanas (q2-3dX6).

18) Camundongos devem ser pesados e a dose recalculada para cada dose.

19) Volume de tumor e peso deve ser medido a cada 3-4 dias (Segunda/Sexta) durante diversos meses após a injeção de tumor. Os camundongos de controle devem atingir 20 mm em maior diâmetro (ponto necessitando sacrifício em nossa facilidade) dentro de 30-40 dias. Tanto o paclitaxel quanto o Composto J devem causar significante regressão com curas em 40 - 80% dos camundongos.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto, caracterizado pelo fato de que apresenta a fórmula



ou os sais farmaceuticamente aceitáveis ou conjugados do mesmo.

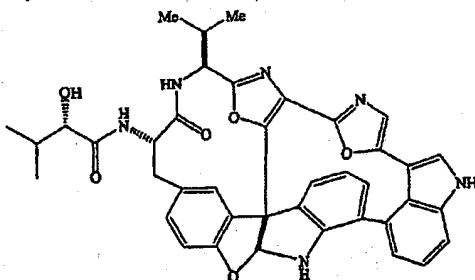
2. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é na forma de um sal farmaceuticamente aceitável.

3. Conjugado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o composto de fórmula 1 é acoplado a um agente de alvejamento.

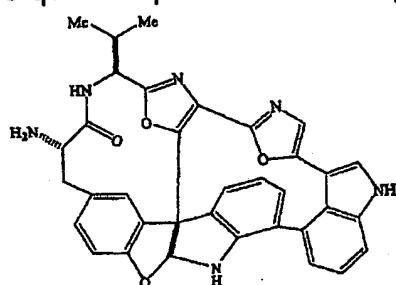
4. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que 10 compreende como ingrediente ativo o composto como definido na reivindicação 1, e também inclui um excipiente farmaceuticamente aceitável.

5. Uso do composto como definido na reivindicação 1, ou uma composição farmacêutica do mesmo, caracterizado pelo fato de ser no preparo de um medicamento para o tratamento de doenças proliferativas em um 15 indivíduo.

6. Método para sintetizar um composto de fórmula:

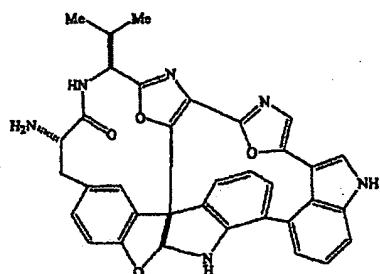


caracterizado pelo fato de que compreende um composto de fórmula:

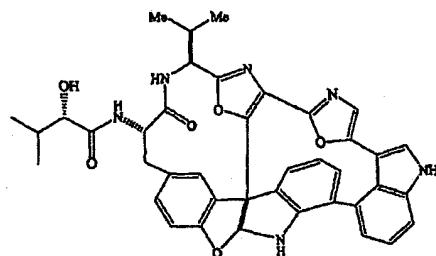


ou uma forma protegida do mesmo, tendo um grupo de proteção em lugar de um hidrogênio em pelo menos um nitrogênio de anel, com um éster ativado de ácido (S)-2-hidróxi-3-metilbutanóico ou uma forma protegida do mesmo, tendo um grupo de proteção no grupo 2-hidroxila; seguido por remoção de 5 quaisquer grupos de proteção que estavam presentes no grupo amina ou hidroxila.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o éster ativado de ácido (S)-2-hidróxi-3-metilbutanóico é o éster de N-hidroxissuccinimida de ácido (S)-2-hidróxi-3-metilbutanóico, que é tratada com um composto de fórmula:



para fornecer o produto de fórmula:



8. Composição para o tratamento de doenças proliferativas em um indivíduo, caracterizada pelo fato de que compreende uma quantidade eficaz do composto como definido na reivindicação 1 ou uma composição 15 farmacêutica do mesmo.

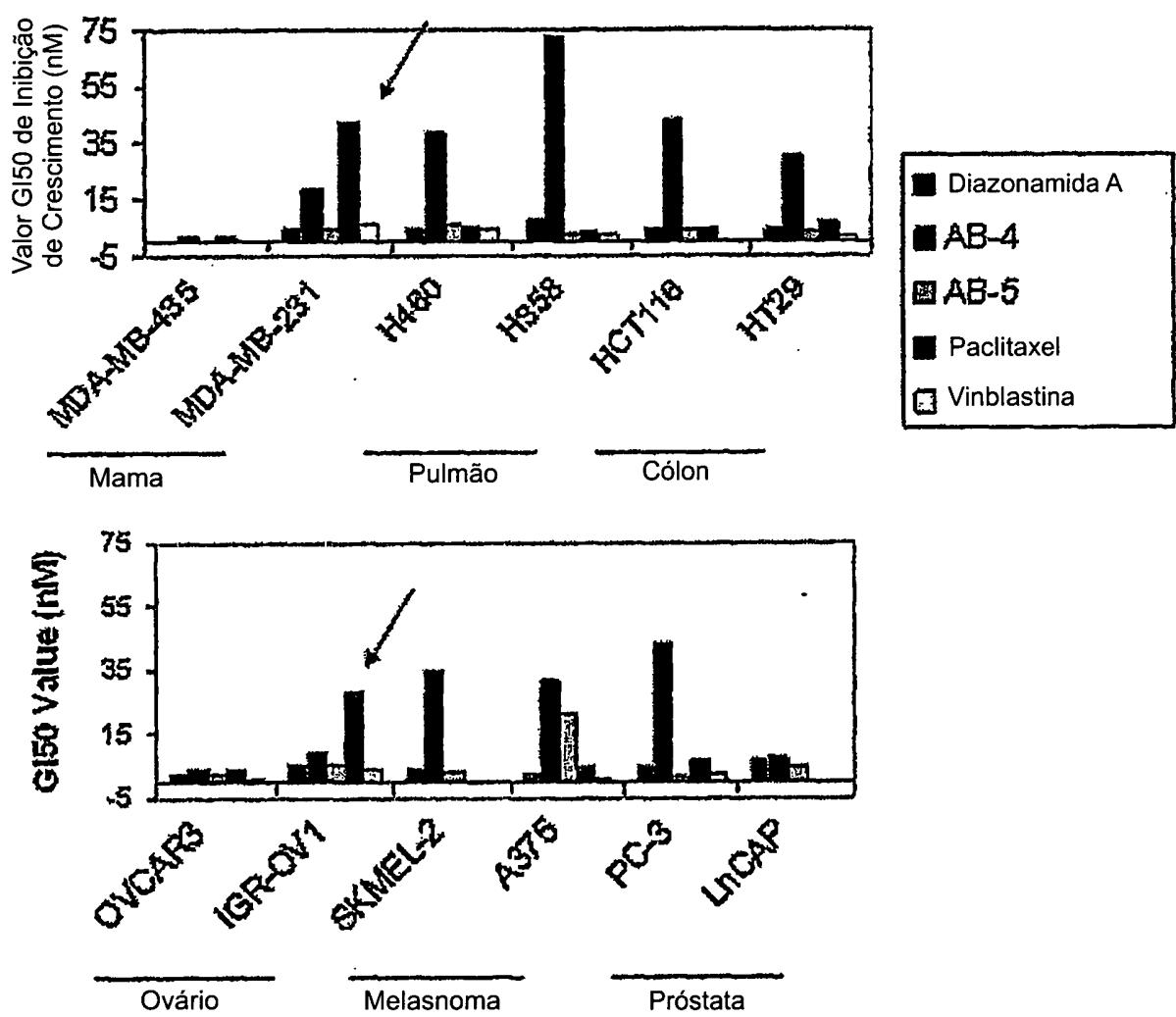


FIG 1

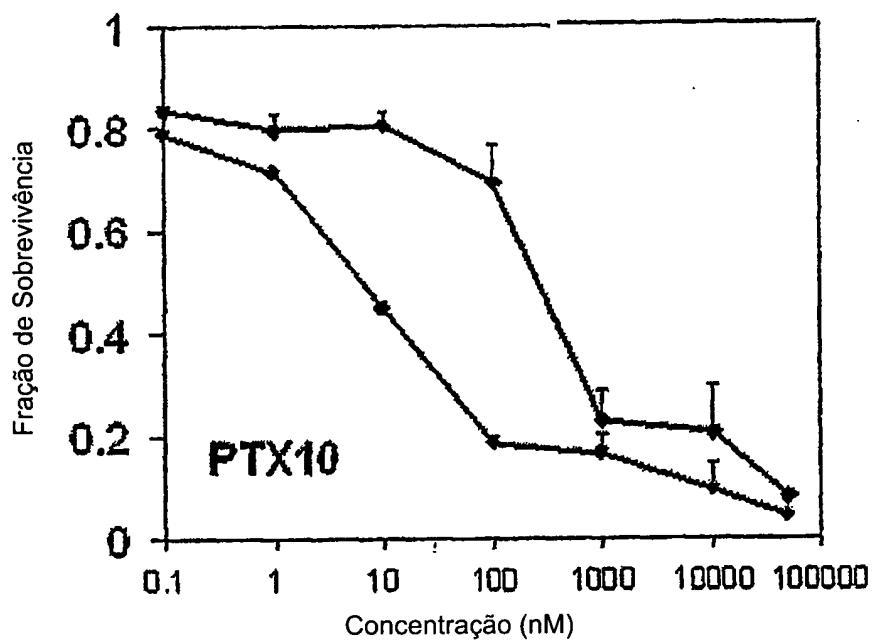
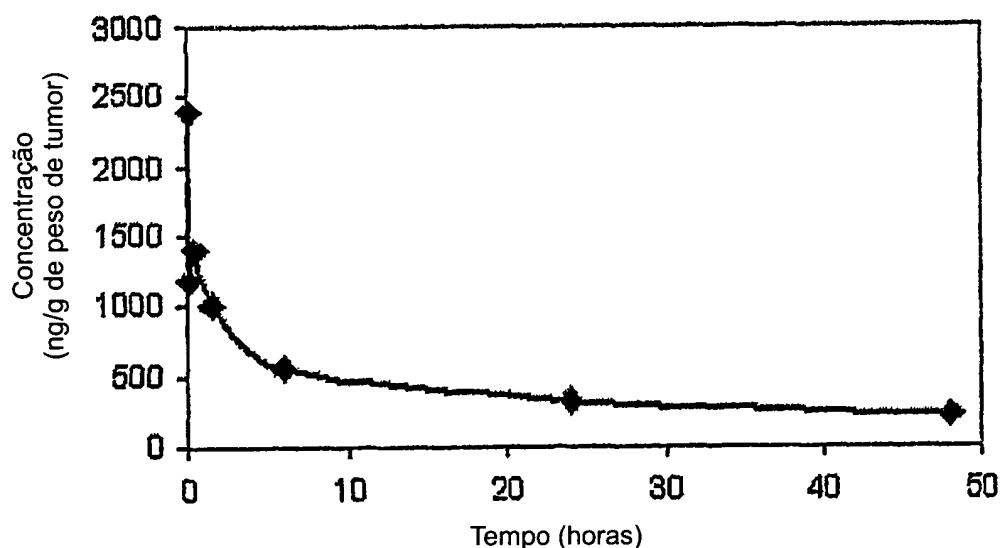


FIG 2



Parâmetros PK, Camundongo i.v.

Meia vida terminal (z)

297,6 minutos

Área sob a curva (AUCinf)

3010224 min*ng/ml

Volume de distribuição (Vd)

2,9 L/Kg

FIG 3

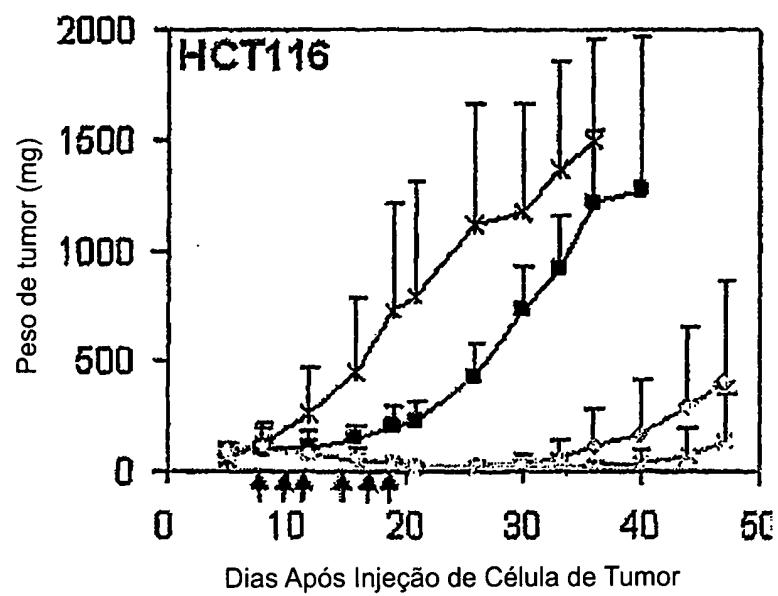


FIG 4A

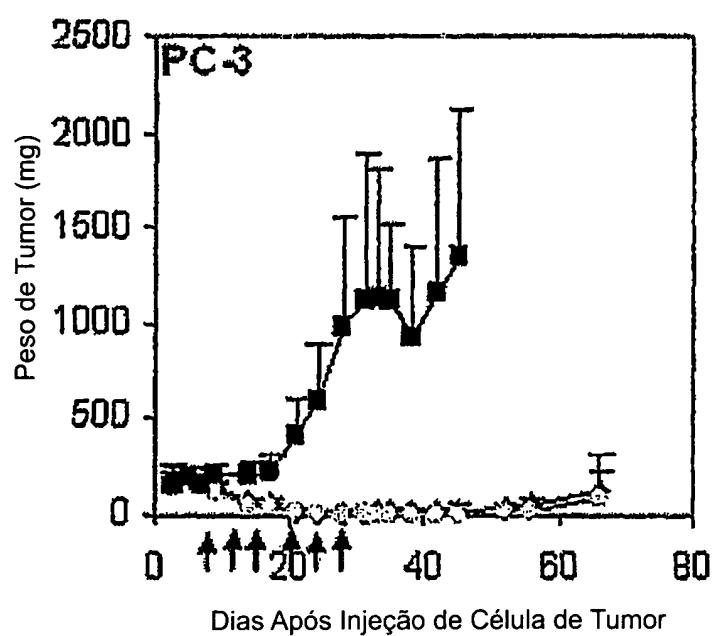


FIG 4B

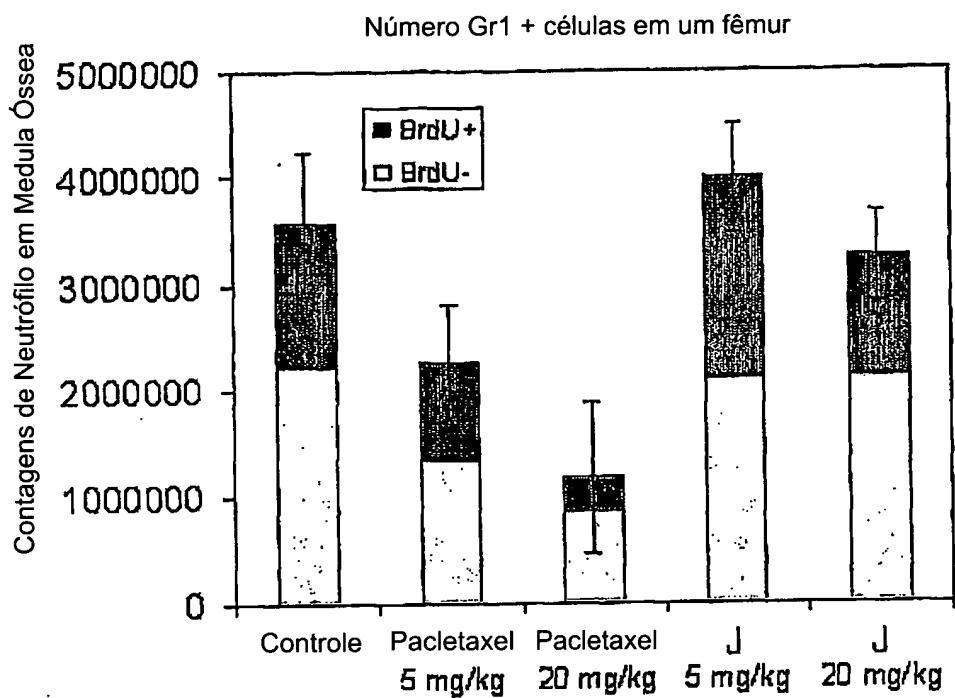


FIG 5A

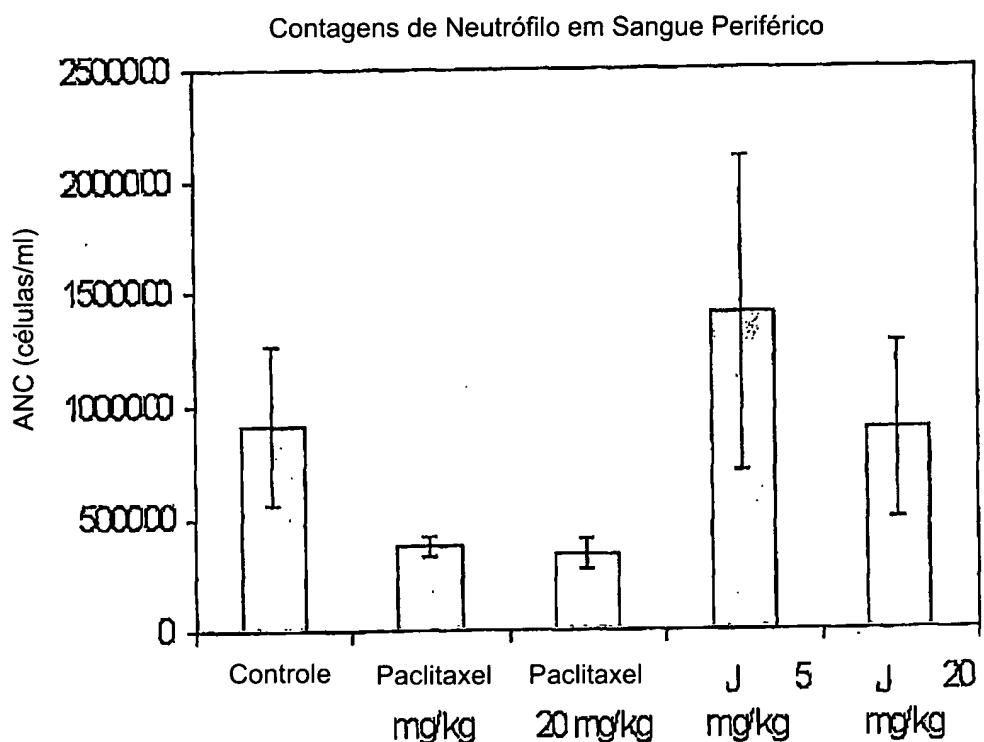


FIG 5B

P 0618136-8

RESUMO

Patente de Invenção: "**ANÁLOGOS DE DIAZONAMIDA A, CONJUGADO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO E MÉTODO PARA SINTETIZAR OS MESMOS**".

- 5 A presente invenção refere-se a um análogo de diazonamida A específico e seus sais e conjugados, que são eficazes no tratamento de doenças proliferativas.