

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

(21) **PI0709709-3 A2**

(22) Data de Depósito: 17/05/2007
(43) Data da Publicação: 26/07/2011
(RPI 2116)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 31/335 2006.01
A61P 35/04 2006.01

(54) Título: **COMPOSTO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO DE TRATAMENTO DE CÂNCER OU MALIGNIDADES DE CÉLULA B, USO DE UM COMPOSTO, E, PROCESSO PARA PREPARAR UM COMPOSTO**

(30) Prioridade Unionista: 19/05/2006 GB 0609981.6

(73) Titular(es): Biotica Technology Limited

(72) Inventor(es): Barrie Wilkinson, Ming Zhang, Steven Moss

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007054801 de 17/05/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/135078 de 29/11/2007

(57) Resumo: COMPOSTO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO DE TRATAMENTO DE CÂNCER OU MALIGNIDADES DE CÉLULA B, USO DE UM COMPOSTO, E, PROCESSO PARA PREPARAR UM COMPOSTO A presente invenção se refere a derivados de borrelidina que são úteis em medicina, e.g. no tratamento de câncer ou malignidades de célula B, ou outras doenças nas quais angiogênese contribui para a patologia incluindo distúrbios oftálmicos tal como retinopatia diabética assim como degeneração macular relacionada à idade (AMD), neovascularização corneana e retinopatia ou prematuridade. A presente invenção também fornece métodos para a produção destes compostos e seu uso em medicina, em particular no tratamento e 1 ou profilaxia de câncer ou malignidades de célula B e outras doenças nas quais angiogênese está implicada no processo patogénico.

“COMPOSTO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO DE TRATAMENTO DE CÂNCER OU MALIGNIDADES DE CÉLULA B, USO DE UM COMPOSTO, E, PROCESSO PARA PREPARAR UM COMPOSTO”

5 Fundamentos da invenção

10 Borrelidina 1 (Figura 1) é uma macrolida de 18 membros produzida por diversas linhagens bacterianas incluindo, mas não limitado a, *Streptomyces rochei* ATCC23956, *Streptomyces parvulus* Tü113 e *Streptomyces parvulus* Tü4055. A estrutura bruta de borrelidina foi primeiro elucidada em 1967 (Keller-Scheirlein, 1967), e foi subsequentemente refinada por análise RMN detalhada (Kuo et al., 1989). A configuração absoluta de borrelidina foi confirmada por cristalografia de raios X (Anderson et al., 1989). Sua co-identidade como o antibiótico treponemicina foi verificada (Maehr & Evans, 1987).

15 Diversos grupos registraram a síntese de fragmentos da estrutura de borrelidina, e quatro sínteses totais independentes de borrelidina foram registradas (Hanessian et al., 2003; Duffey et al., 2003; Nagamitsu et al., 2004; Vong et al., 2004). Em adição o agrupamento gênico responsável pela biossíntese de borrelidina por *Streptomyces parvulus* Tü4055 foi
20 identificado, clonado e seqüenciado (WO 2004/058976; Olano et al., 2004a). Baseado nesta aplicação de engenharia biossintética técnicas permitiram elucidação da via biossintética levando a borrelidina e à produção de novos análogos (WO 2004/058976; Olano et al., 2003; Olano et al., 2004b; Moss et al., 2006).

25 Borrelidina foi primeiro descoberta devido a sua atividade antibacteriana (Berger et al., 1949), embora esta atividade antibacteriana se estenda apenas a um número limitado de micrococos, e não é encontrada contra todas as bactérias de teste comuns. O modo de ação em microorganismos sensíveis envolve inibição seletiva de treonil tRNA sintetase

(Paetz & Nass, 1973; Ruan et al., 2005). Outras atividades contra espiroquetas do gênero *Treponema* (Singh et al., 1985; Patente US 4.759.928), contra vírus (Dickinson et al., 1965), usos para o controle de pestes animais e ervas daninhas (Patente Alemã 3607287) e uso como um fungicida agrícola (Patente Alemã 19835669; Patente US 6.193.964) foram registrados. Adicionalmente, recentemente, borrelidina foi relatada tendo atividade antimalárica contra linhagens de *Plasmodium falciparum* resistentes a droga (Otoguro et al., 2003). Entre todos estes relatos apenas dois relataram quaisquer derivados sinteticamente modificados. O primeiro destes descreve o éster benzílico e seu derivado bis-O-(4-nitrobenzoila) (Berger et al., 1949). O segundo destes descreve o éster metílico de borrelidina, o derivado de éster metílico bis O-acetila, e os derivados de éster metílico Δ_{14-15} -dihidro-, $\Delta_{14-15,12-13}$ -tetrahidro-, e $\Delta_{14-15,12-13}$ -tetrahidro-C12-amino (Anderton & Rickards, 1965). Nenhuma atividade biológica foi registrada para qualquer destes compostos.

Uma recente descrição de particular interesse é a descoberta de que borrelidina apresenta atividade anti-angiogênese (Wakabayashi et al., 1997). Angiogênese é o processo da formação de novos vasos sanguíneos. Angiogênese ocorre apenas localmente e transientemente em adultos, estando envolvida em, por exemplo, reparo seguindo trauma local e o ciclo reprodutivo feminino. Foi estabelecida como um componente chave em diversos processos patogênicos incluindo câncer, artrite reumatóide e retinopatia diabética (Perrin et al., 2005). Sua importância em possibilitar que tumores cresçam além de um diâmetro de 1-2 cm foi estabelecida por Folkman (Folkman, 1986), e é provocada pelo tumor respondendo a hipoxia. Em suas conseqüências posteriores angiogênese é principalmente um processo derivado de hospedeiro, assim inibição de angiogênese oferece potencial significativo no tratamento de cânceres, evitando os obstáculos de outras modalidades terapêuticas anticâncer tal como a diversidade de tipos de

câncer e resistência a drogas (Matter, 2001). É de interesse adicional que publicações recentes tenham descrito o envolvimento funcional de tirosinil e triptofanoil-tRNA sintetases na regulação de angiogênese (Wakasugi et al., 2002; Otani et al., 2002).

5 No modelo de cultura em matriz de aorta de rato de angiogênese, borrelidina exibe um potente efeito inibidor de angiogênese e também causa ruptura de tubos capilares formados de uma maneira dose dependente induzindo apoptose das células formados de capilares (Wakabayashi et al., 1997). Borrelidina inibiu formação de tudo capilar com
10 um valor de IC_{50} de 0,4 ng/mL (0,8 nM). No mesmo estudo, borrelidina mostrou possuir atividade antiproliferativa para células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) em um ensaio de crescimento celular; o valor de IC_{50} foi medido a 6 ng/mL, o qual é 15 vezes mais fraco do que a atividade anti-angiogênese medida no mesmo meio. Esta atividade antiproliferativa de
15 borrelidina mostrou ser geral para várias linhagens celulares, tal como pode ser visto em um ensaio de inibição de crescimento de célula de câncer. Em adição a estes dados, os autores relatam que borrelidina inibe síntese protéica nas células cultivadas de rato, um fator mais provavelmente ligado a sua capacidade de inibir treonil tRNA sintetase; entretanto o valor de IC_{50} para
20 atividade anti-angiogênese (0,4 ng/mL) foi 50 vezes menor do que aquele relatado para inibição de síntese protéica (20 ng/mL), indicando diferentes atividades do composto. Assim acredita-se que a atividade antiproliferativa pode ser ligada a inibição de treonil tRNA-sintetase e modificação estrutural da molécula para alterar especificamente as duas diferentes atividades fornece
25 um meio de melhorar índice terapêutico. A inibição de treonil tRNA sintetase pode ser medida por diversos métodos publicados, e.g. como publicado por Ruan et al (Ruan et al., 2005).

Borrelidina também apresenta inibição potente de angiogênese in vivo usando o modelo de saco aéreo dorsal de camundongo (Funahashi et

al., 1999), que examina angiogênese induzida por VEGF e é um excelente modelo para estudar angiogênese de tumor. Borrelidina foi administrada em uma dose de 1,8 mg/kg por injeção intraperitoneal e mostrou reduzir significativamente o incremento de volume vascular induzido por células WiDr, e em um maior grau do que TNP-470, que é um inibidor de angiogênese sintético em testes clínicos. Controles detalhados verificaram que estes dados são para inibição de angiogênese e não inibição de crescimento das células de tumor. Os autores também mostraram que borrelidina é eficaz para a inibição da formação de metástases pulmonares espontâneas de células de melanoma B16-BL6 na mesma dosagem inibindo os processos angiogênicos envolvidos na sua formação.

Patente JP 9-227.549 e Patente JP 8-173.167 confirmam que borrelidina é eficaz contra linhagens de célula WiDr de câncer de cólon humano, e também contra linhagens de célula PC-3 de câncer de próstata humano. Patente JP 9-227.549 descreve a produção de borrelidina por *Streptomyces rochei* Mer-N7167 (Ferm P-14670) e seu isolamento da cultura de fermentação resultante. Em adição a borrelidina 1, 12-desnitrila-12-carboxil borrelidina 2 (presumivelmente um intermediário biossintético ou metabólito de desvio portossitêmico), 10-desmetil borrelidina 3 (presumivelmente um análogo biossintético surgindo a partir da incorporação de uma unidade extensora de malonil-CoA alternativa em módulo 4 da borrelidina PKS), 11-epiborrelidina 4 e o análogo de borrelidina C14,C15-cis 5 foram descritos (veja Figura 1). Assim, Patente JP 9-227.549 especifica borrelidina e análogos de borrelidina caracterizados pelo fato de que um grupo nitrila ou carboxila é acoplado ao esqueleto de carbono em C12, e um átomo de hidrogênio ou grupo alquila inferior é acoplado ao esqueleto de carbono em C10.

Borrelidina foi investigada na década de 1960 por seu potencial farmacêutico (antiviral) mas estes esforços foram descontínuos

devido à toxicidade, em particular seu efeito como um sensibilizador químico (Lumb et al, 1965, Dickinson et al., 1965).

WO 01/09113 descreve a preparação de análogos de borrelidina que passaram por modificação sintética na unidade de ácido carboxílico do anel de ciclopentano. A atividade destes compostos foi avaliada usando ensaios de proliferação de célula endotelial e formação de capilar endotelial de uma maneira similar àquela descrita acima. Em geral, modificação da unidade de carboxila melhorou a seletividade para inibir formação de capilar: a principal razão desta melhora em seletividade é através de uma diminuição na atividade de inibição de proliferação celular ao passo que a atividade inibidora de formação de capilar foi alterada em um grau muito menor. Especificamente, a borrelidina-morfolinoetil éster mostrou um índice de seletividade de 60 vezes, a borrelidina-amida mostrou um índice de seletividade de 37 vezes, a borrelidina-(2-piridila)-etil éster mostrou um índice de seletividade de 7,5 vezes e a borrelidina-morfolinoetil amida mostrou um índice de seletividade de 6 vezes, para a atividade inibidora de formação de capilar versus proliferação celular com respeito à borrelidina. A atividade inibidora de formação de capilar destes e outros derivados de borrelidina foi verificada usando um ensaio de formação de micro-vaso. Em adição, os autores mostraram que borrelidina inibiu fracamente a propagação de nódulos metastáticos, depois de remoção do tumor primário, ao usar um modelo de adenocarcinoma pulmonar de Lewis. Entretanto, o derivado de borrelidina-(3-picolilamida) foi registrado inibindo muito consideravelmente o aumento de micrometástases em ratos depois de intraperitoneal e também com administração por via oral em doses subtóxicas. Similarmente, usando o modelo de cólon 38 baço fígado, a capacidade de formar metástase de células de adenocarcinoma de cólon de camundongo transplantadas em baço de camundongo foi consideravelmente diminuída depois de tratamento com uma dose subtóxica deste derivado de borrelidina. Estes dados confirmam a

capacidade previamente relatada de borrelidina e seus derivados de inibir a formação de metástases.

Borrelidina também foi identificada como um inibidor de quinase dependente de ciclina Cdc28/Cln2 de *Saccharomyces cerevisiae* com um valor de IC₅₀ de 12 µg/mL (24 µM) (Tsuchiya et al., 2001). Foi mostrado que borrelidina seqüestra tanto células haplóides como diplóides em fase G₁ tardia (em um momento indistinguível de ferormônio de acasalamento α), e em concentrações que não afetam biossíntese protéica bruta. Estes dados foram adotados para indicar que borrelidina tem potencial como um composto líder para desenvolver agentes antitumor.

Dois relatos adicionais foram publicados referentes à atividade biológica de borrelidina. O primeiro destes indica que os efeitos anti-angiogênicos de borrelidina são mediados através de vias distintas (Kawamura et al., 2003). Altas concentrações de treonina foram encontradas atenuando a capacidade de borrelidina de inibir tanto formação de tubo capilar no modelo de cultura de aorta de rato como proliferação de células HUVEC; entretanto, isto não afetou a capacidade de borrelidina de colapsar tubos capilares formados ou de induzir apoptose em HUVEC. Borrelidina também foi encontrada ativando caspase-3 e caspase-8, e inibidores de ambas destas borrelidinas suprimidas induziram apoptose em HUVEC. O segundo destes artigos usou o método de definição de perfil de mRNA celular global para fornecer percepção dos efeitos de borrelidina em *Saccharomyces cerevisiae* (Eastwood and Schaus, 2003). Esta análise mostrou a indução de enzimas biossintéticas de aminoácidos de uma maneira dependente de tempo mediante tratamento com borrelidina, e ficou acertado que indução desta via envolve o fator de transcrição GCN4.

Certos análogos de borrelidina foram descritos em WO 2004/058976 (Biotica Technology Ltd et al).

Em resumo, o efeito inibidor de angiogênese de borrelidina é

direcionado para os efeitos biológicos combinados de proliferação e formação capilar. Em adição, borrelidina, e derivados desta, mostraram inibir a propagação de metástases. Borrelidina também tem indicações para uso em modulação de ciclo celular. Assim, borrelidina e compostos relacionados são alvos particularmente atrativos para investigação como agentes terapêuticos para o tratamento de tecidos de tumor, ou como agentes únicos ou para uso como um adjunto para outras terapias. Em adição, eles podem ser usados para tratar outras doenças nas quais angiogênese está implicada no processo patológico, incluindo, mas não restrito a, a seguinte lista: artrite reumatóide, psoríase, arteriosclerose, e vários distúrbios oftálmicos tal como retinopatia diabética assim como degeneração macular relacionada à idade (AMD), neovascularização corneana e retinopatia da prematuridade.

A presente invenção fornece derivados de borrelidina que são úteis como agentes anticâncer e anti-malignidade de célula B, e como agentes para o tratamento de outras doenças nas quais angiogênese está implicada no processo patológico.

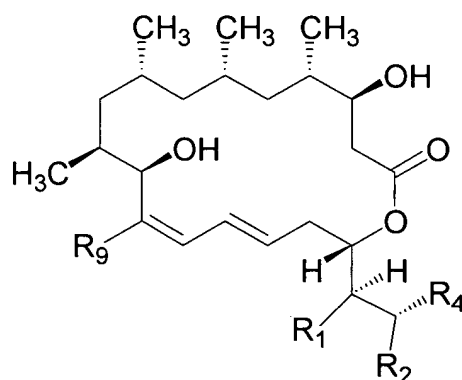
Portanto, permanece uma necessidade de identificar novos derivados de borrelidina com índice terapêutico melhorado, o que pode ter utilidade no tratamento de câncer e / ou malignidades de célula B, ou como agentes para o tratamento de outras doenças nas quais angiogênese está implicada no processo patológico. Preferivelmente tais derivados de borrelidina têm uma ou mais das seguintes propriedades: uma proporção melhorada de atividade anti-angiogênica para inibição de proliferação celular geral e/ou atividade de tRNA sintetase, solubilidade em água melhorada, permeabilidade celular melhorada, um perfil farmacológico melhorado e perfil de efeito colateral reduzido para administração. A presente invenção descreve derivados de análogos de borrelidina ou com unidades iniciadoras de cadeia aberta ou unidades iniciadoras de anel de 4 membros que geralmente têm propriedades biológicas melhoradas comparadas com borrelidina e

análogos relacionados; em particular eles mostram melhoras com respeito a uma proporção melhorada de atividade anti-angiogênica para inibição de proliferação celular geral.

Sumário da invenção

5 A presente invenção fornece derivados de borrelidina, métodos para a preparação destes compostos, intermediários destes e métodos para o uso destes compostos em medicina.

Em um aspecto mais específico a presente invenção fornece derivados de borrelidina de acordo com a fórmula (I) abaixo, ou um sal
10 farmacologicamente aceitável do mesmo:

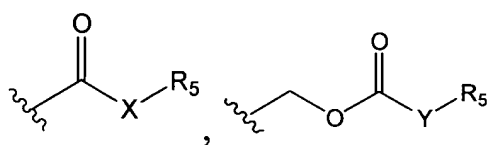


Fórmula (I)

onde:

R_1 e R_2 independentemente representam cada H, SR_3 ou um grupo alquila C1-C4 que pode ser opcionalmente substituído por um ou mais
15 grupos selecionados a partir de OH, F, Cl ou SR_3 ; onde R_3 representa H, CH_3 ou $COCH_3$; alternativamente R_1 e R_2 junto com os carbonos com os quais eles são acoplados representam um anel de cicloalquila de 4 membros opcionalmente substituído por um ou mais átomos de halogênios ou um ou mais grupos alquila C1 a C3

20 R_4 representa



ou $-NHNHC(O)R_8$ onde R_8 representa biotina, H ou um grupo

alquila C1-C4 opcionalmente substituído por um ou mais grupos selecionados a partir de OH, F, Cl;

X representa -NH- ou -O-;

Y representa -NH-, -O- ou -CH₂-;

5 R₅ representa H ou -(CH₂)_nR₆, onde:

n representa um número inteiro entre 1 e 3,

R₆ representa H, -OH, -OCH₃, -CO₂R₇, ou um grupo alquila C1 a C4 opcionalmente substituído por um ou mais grupos selecionados a partir de OH, F, Cl, -CO₂R₇, -COR₇, onde R₇ representa um grupo alquila C1-
10 C4

ou R₆ representa:

i) um anel aromático de 6 membros,

ii) um anel heteroaromático de 5 a 7 membros contendo entre um e três átomos de N, S ou O,

15 iii) um grupo de cicloalquila de 5 a 7 membros ou

iv) um anel de heteroalquil de 5 a 7 membros contendo entre um e três átomos de N, S ou O,

cada um de i) a iv) acima pode ser opcionalmente substituído por um ou mais grupos selecionados a partir de CH₃, OCH₃, F, Cl ou Br

20 R₉ representa CN, CO₂H, CH₃ ou CONH₂;

contanto, entretanto, que quando X representa -O- então R₅ não representa H.

A estrutura acima mostra um tautômero representativo e a invenção abrange todos os tautômeros dos compostos de fórmula (I), por
25 exemplo, compostos cetônicos onde compostos enólicos são ilustrados e vice versa.

Em um aspecto adicional, a presente invenção fornece derivados de borrelidina tal como compostos de fórmula (I) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmos, para uso como um produto

farmacêutico.

Definições

Os artigos “um” e “uma” são usados aqui para se referir a um ou a mais do que um (i.e. pelo menos um) dos objetos gramaticais do artigo.

5 Como forma de exemplo “um análogo” significa um análogo ou mais do que um análogo.

10 Como usado aqui o termo “análogo(s)” se refere a compostos químicos que são estruturalmente similares a outros mas que diferem levemente em composição (como na substituição de um átomo por outro na presença ou ausência de um grupo funcional particular).

15 Em particular, o termo “análogo de borrelidina” se refere a um composto de borrelidina produzido pelos métodos de WO 2004/058976 e como mostrado por fórmula (II). Estes compostos são também referidos como “compostos parentais” e estes termos são usados permutavelmente no presente pedido. No presente pedido o termo “análogos de borrelidina” inclui referência a própria borrelidina.

20 Como usado aqui, o termo “derivado de borrelidina” se refere a um derivado de borrelidina referido acima como representando a invenção em seu mais amplo aspecto, i.e. um composto de acordo com fórmula (I) acima, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmos. Estes compostos são também referidos como “compostos da invenção” ou “derivados de borrelidina” e estes termos são usados permutavelmente no presente pedido.

25 Como usado aqui, o termo “câncer” se refere a um novo crescimento maligno que surge a partir de epitélio, encontrado na pele ou, mais comumente, na mucosa de órgãos corporais, por exemplo, mama, próstata, pulmão, rim, pâncreas, estômago ou intestino. Um câncer tende a se infiltrar em tecido adjacente e se espalhar (metastasiar) para órgãos distantes, por exemplo, para osso, fígado, pulmão ou o cérebro. Como usado aqui o termo câncer inclui tanto tipos metastáticos de célula tumoral, tal como mas

não limitado a, melanoma, linfoma, leucemia, fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, como mastocitoma e tipos de carcinoma de tecido, tal como mas não limitado a, câncer colorretal, câncer de próstata, câncer de pulmão de célula pequena e câncer de pulmão de célula não pequena, câncer de mama, câncer pancreático, câncer de bexiga, câncer renal, câncer gástrico, glioblastoma, câncer de fígado primário e câncer ovariano.

Como usado aqui o termo “malignidades de célula B” inclui um grupo de distúrbios que incluem leucemia linfocítica crônica (CLL), mieloma múltiplo, e linfoma não Hodgkin (NHL). Estas são doenças neoplásicas do sangue e órgãos formadores de sangue. Elas causam disfunção de medula óssea e sistema imune, o que torna o hospedeiro altamente susceptível a infecção e hemorragia.

Os sais farmaceuticamente aceitáveis de compostos da invenção tal como os compostos de fórmula (I) incluem sais convencionais formados a partir de ácidos ou bases inorgânicos ou orgânicos farmaceuticamente aceitáveis assim como sais de adição de ácido de amônio quaternário. Exemplos mais específicos de sais ácidos adequados incluem clorídrico, bromídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico, perclórico, fumárico, acético, propiônico, succínico, glicólico, fórmico, láctico, maléico, tartárico, cítrico, palmóico, malônico, hidroximaléico, fenilacético, glutâmico, benzóico, salicílico, fumárico, toluenossulfônico, metanossulfônico, naftaleno-2-sulfônico, benzenossulfônico hidroxinaftóico, hidroiódico, málico, esteróico, tânico e os semelhantes. Outros ácidos tais como oxálico, embora não farmaceuticamente aceitáveis, podem ser úteis na preparação de sais úteis como intermediários para obter os compostos da invenção e seus sais farmaceuticamente aceitáveis. Exemplos mais específicos de sais básicos adequados incluem sais de sódio, lítio, potássio, magnésio, alumínio, cálcio, zinco, N,N'-dibenziletilenodiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenodiamina, N-metilglucamina e procaína. Referências daqui por diante a

um composto de acordo com a invenção incluem tanto compostos de fórmula (I) como seus sais farmacologicamente aceitáveis.

Grupos alquila, alcenila e alcinila podem ser de cadeia linear ou ramificada.

5 Exemplos de grupos alquila C1-C4 incluem metila, etila, n-propila, i-propila e n-butila.

Grupos cicloalquila de 5 a 7 membros se referem a um anel de cicloalquila incluindo 5-7 átomos de carbono que opcionalmente podem ser ramificados. Exemplos incluem ciclopentila e ciclohexila.

10 Anéis de heteroalquila de 5 a 7 membros contendo um ou mais heteroátomos selecionados a partir de N, O e S incluem anéis contendo um ou dois heteroátomos, especialmente um heteroátomo. Exemplos incluem furano, pirano, oxetano, oxirano, piperidina, pirrolidina, azetidina, aziridina, tiirano, tietano, tiofeno, tiopirano e morfolina.

15 Anéis aromáticos de 6 membros incluem fenil.

Anéis heteroaromáticos de 5 a 7 membros contendo 1 a 3 heteroátomos selecionados a partir de O, N e S incluem anéis de 6 membros tal como piridil e pirimidinil e anéis de 5 membros tal como furanila, pirrolila, imidazolila, tiofenila, oxazolila, oxadiazolila, tiazolil e tiadiazolil.

20 Descrição da invenção

A presente invenção fornece derivados de borrelidina, como descrito acima, métodos para a preparação destes compostos, intermediários destes e métodos para o uso destes compostos em medicina.

Adequadamente R₉ representa CN.

25 Adequadamente R₁ e R₂ junto com os carbonos com os quais eles são acoplados representam um anel de cicloalquila de 4 membros.

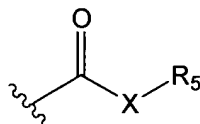
Adequadamente R₁ e R₂ junto com os carbonos com os quais eles são acoplados representam um anel de cicloalquila de 4 membros, substituído apenas por R₄.

Adequadamente X representa $-O-$. Alternativamente, adequadamente X representa $-NH-$.

Adequadamente Y representa $-NH-$ ou $-O-$. Em uma forma de realização Y representa $-NH-$. Em outra forma de realização Y representa

5 $-O-$.

Adequadamente R_4 representa



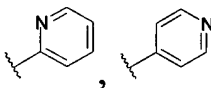
Adequadamente n representa 1. Alternativamente, adequadamente n representa 2.

Adequadamente R_6 representa um anel heteroarômático de 6

10 membros contendo entre um e três átomos de N, S ou O.

Mais adequadamente R_6 representa um anel heteroarômático de 6 membros contendo um átomo de N.

Mais adequadamente R_6 representa

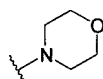


ou



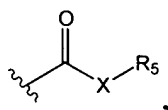
15 Alternativamente, adequadamente R_6 representa um anel de heteroalquil de 6 membros contendo entre um e três átomos de N, S ou O

Mais adequadamente R_6 representa

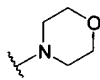


Adequadamente, R_1 e R_2 junto com os carbonos com os quais eles são acoplados representam um anel de cicloalquila de 4 membros,

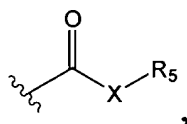
20 substituído apenas por R_4 que representa



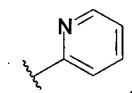
onde X representa $-O-$ e R_5 representa $-(CH_2)_nR_6$, onde n representa 2 e R_6 representa



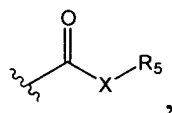
Alternativamente, adequadamente R_1 e R_2 junto com os carbonos com os quais eles são acoplados representam um anel de
5 cicloalquila de 4 membros substituído apenas por R_4 que representa



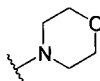
onde X representa $-O-$ e R_5 representa $-(CH_2)_nR_6$, onde n representa 2 e R_6 representa



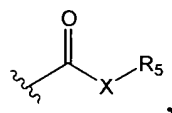
Alternativamente, adequadamente, R_1 e R_2 junto com os carbonos com os quais eles são acoplados representam um anel de
10 cicloalquila de 4 membros substituído apenas por R_4 que representa



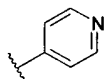
onde X representa $-NH-$ e R_5 representa $-(CH_2)_nR_6$, onde n representa 2 e R_6 representa



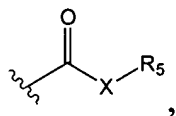
Alternativamente, adequadamente R_1 e R_2 junto com os carbonos com os quais eles são acoplados representam um anel de
15 cicloalquila de 4 membros substituído apenas por R_4 que representa



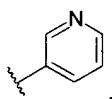
onde X representa $-NH-$ e R_5 representa $-(CH_2)_nR_6$, onde n representa 1 e R_6 representa



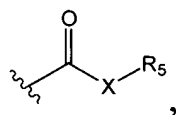
Alternativamente, adequadamente R_1 e R_2 junto com os carbonos com os quais eles são acoplados representam um anel de cicloalquila de 4 membros substituído apenas por R_4 que representa



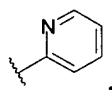
5 onde X representa $-\text{NH}-$ e R_5 representa $-(\text{CH}_2)_n\text{R}_6$, onde n representa 1 e R_6 representa



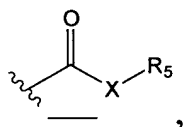
Alternativamente, adequadamente R_1 e R_2 junto com os carbonos com os quais eles são acoplados representam um anel de cicloalquila de 4 membros substituído apenas por R_4 que representa



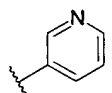
10 onde X representa $-\text{NH}-$ e R_5 representa $-(\text{CH}_2)_n\text{R}_6$, onde n representa 1 e R_6 representa



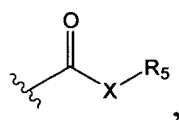
Alternativamente, adequadamente R_1 e R_2 junto com os carbonos com os quais eles são acoplados representam um anel de cicloalquila de 4 membros substituído apenas por R_4 que representa



15 onde X representa $-\text{NH}-$ e R_5 representa $-(\text{CH}_2)_n\text{R}_6$, onde n representa 2 e R_6 representa



Alternativamente, adequadamente R_1 e R_2 junto com os carbonos com os quais eles são acoplados representam um anel de cicloalquila de 4 membros substituído apenas por R_4 que representa

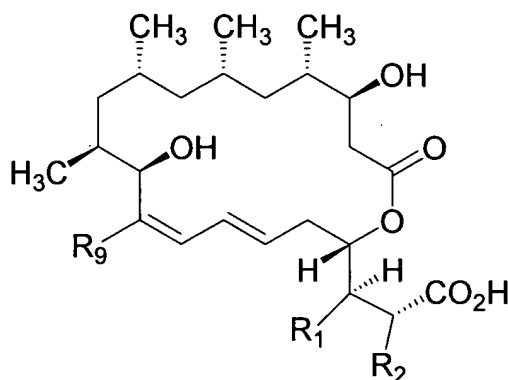


onde X representa –NH– e R₅ representa H.

Em geral, os compostos da invenção são preparados por derivação semi-sintética de um análogo de borrelidina. Análogos de borrelidina podem ser preparados usando métodos como descritos em WO 2004/058976, cujo documento é incorporado aqui por referência em sua totalidade.

Em geral, o processo para preparar um composto de fórmula (I) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo compreende:

(a) reagir um composto de fórmula (II):



(II)

ou um derivado protegido deste, usando qualquer um dos métodos descritos em (i) a (viii) abaixo, ou

(b) converter um composto de fórmula (I) ou um sal deste em composto de fórmula (I) ou outro sal farmaceuticamente aceitável do mesmo;

ou

(c) desproteger um composto protegido de fórmula (I).

Compostos de fórmula (II) podem ser adequadamente produzidos por quaisquer métodos conhecidos por uma pessoa versada na arte. Em particular, de acordo com os métodos descritos em WO 2004/058976.

A presente invenção fornece métodos para preparar os

compostos de fórmula (I), em particular usando métodos de esterificação, amidação e redução conhecidos por uma pessoa versada na arte. Em adição aos métodos específicos e referências fornecidas aqui uma pessoa versada na arte também pode consultar referências de livros-texto padrão para métodos sintéticos, incluindo, mas não limitado a Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry (Furniss et al., 1989) e March's Advanced Organic Chemistry (Smith and March, 2001).

Os compostos de fórmula geral (I) podem ser preparados adaptando os métodos gerais descritos aqui, por exemplo, usando, mas não limitado a, os seguintes processos:

(i) reação de um cloreto ácido formado a partir de um composto de fórmula (II) com um álcool ou amina adequada;

(ii) esterificação ou amidação direta de um composto de fórmula (II) na presença de carbodiimida, tal como N-(3-dimetilaminopropila)-N'-etilcarbodiimida (EDCI), e uma base;

(iii) transesterificação de um éster, formado a partir de um composto de fórmula (II), com um álcool adequado;

(iv) reação de um éster de metila de um composto de fórmula (II) com uma amina adequada;

(v) formação de um éster ativo a partir de um composto de fórmula (II), e.g. com 1-hidroxibenzotriazol, então reação com um álcool ou amina adequada;

(vi) formação de um anidrido misturado a partir de um composto de fórmula (II), e.g. com éster de ácido clorofórmico, então reação com uma amina adequada;

(vii) redução de um anidrido misturado a partir de um composto de fórmula (II) com um hidreto metálico a um álcool;

(viii) alquilação e acilação de um álcool primário preparado a partir de um composto de fórmula (II).

Em particular derivados de éster de um composto de fórmula (II) podem ser mais preferivelmente preparados reagindo um derivado ativado formado a partir de um composto de fórmula (II) com 1-hidroxibenzotriazol na presença de carbodiimida (tal como N-(3-dimetilaminopropila)-N'-etilcarbodiimida (EDCI)), com um álcool adequado.

Uma tal reação é tipicamente realizada em solventes inertes, tal como mas não limitados a tetrahidrofurano (THF). Em uma tal reação N-(3-dimetilaminopropila)-N'-etilcarbodiimida (EDCI) é usada como a carbodiimida e dimetilaminopiridina (DMAP) é usada como uma base. É adequado usar um excesso molar de 10 vezes do componente alcoólico. A reação é realizada em uma temperatura entre 0°C e 100°C, preferivelmente em ambiente (e.g. 25°C), com agitação por entre 1 e 10 h, mas tipicamente por 3 h.

Derivados de amida de um composto de fórmula (II) podem ser prontamente preparados, por exemplo com o derivado de anidrido misturado formou éster de ácido clorofórmico. A reação pode ser realizada em solventes orgânicos inertes e livres de água tal como, mas não limitados a, THF ou diclorometano (DCM). Trietilamina, piridina e 4-(dimetilamino)piridina podem ser usados como base. Tipicamente a amina a ser acoplada pode estar presente em até excesso molar de 10 vezes. A reação é realizada agitando em uma temperatura entre -20°C e 50°C. A reação é tipicamente deixada em agitação por entre 1 e 10 h. Em uma forma de realização preferida do processo o anidrido misturado é formado com cloroformiato de isobutila em THF anidro a -20°C, na presença de trietilamina, e acoplamento é realizado durante 3 h depois de adicionar excesso entre 5 e 10 vezes da amina.

Derivados de álcool primário de um composto de fórmula (II) podem ser preparados a partir de um anidrido misturado e redução com hidreto metálico complexo em THF a -20°C. A alquilação e acilação de tais

compostos pode ser realizada por qualquer método geral, tal como aqueles descritos em Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry (Furniss et al., 1989) e March's Advanced Organic Chemistry (Smith and March, 2001).

Em adição aos métodos específicos e referências fornecidas aqui uma pessoa de verso na arte também pode consultar referências de livro-texto padrão para métodos sintéticos, incluindo, mas não limitado a Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry (Furniss et al., 1989) e March's Advanced Organic Chemistry (Smith and March, 2001).

Em processos (a) e (c), exemplos de grupos protetores e dos meios para sua remoção podem ser encontrados em T W Greene "Protective Groups in Organic Synthesis" (J Wiley and Sons, 1991). Grupos protetores de hidroxila adequados incluem alquila (e.g. metila), acetal (e.g. acetonida) e acil (e.g. acetila ou benzoíla) que podem ser removidos por hidrólise, e arilalquil (e.g. benzila) que pode ser removido por hidrogenólise catalítica, ou éter de silila, que pode ser removido por hidrólise ácida ou clivagem auxiliada por íon fluoreto. Grupos protetores de amina adequados incluem sulfonil (e.g. tosila), acil (e.g. benziloxicarbonila ou t-butoxicarbonila) e arilalquil (e.g. benzila) que podem ser removidos por hidrólise ou hidrogenólise como apropriado.

Outros compostos da invenção podem ser preparados por métodos conhecidos por si ou por métodos análogos àqueles descritos acima.

Os compostos da invenção são úteis diretamente, e como modelos para semi-síntese ou bioconversão adicional, para produzir compostos úteis como agentes anticâncer. Métodos para a derivação semi-sintética de borrelidina foram descritos em WO 01/09113.

As estruturas acima de intermediários (e.g. compostos de fórmula (II)) podem ser sujeitas a tautomerização e onde um tautômero representativo é ilustrado será entendido que e todos os tautômeros, por exemplo, compostos cetônicos onde compostos enólicos são ilustrados e vice

versa são pretendidos para serem referidos como.

A invenção propicia adicionalmente o uso de um composto da invenção no tratamento de câncer ou malignidades de célula B. Ela também fornece um composto da invenção para uso no tratamento de câncer ou malignidades de célula B. Ela também fornece um método de tratamento de câncer ou malignidades de célula B que compreende administrar a um paciente uma quantidade eficaz de um composto da invenção. Ela também fornece o uso de um composto da invenção na preparação de um medicamento para o tratamento de câncer ou malignidades de célula B.

Borrelidina também é conhecida por ter utilidades no tratamento de outras condições, incluindo, mas não limitado a infecções bacterianas, infecções virais e malária e em outras doenças nas quais angiogênese está implicada no processo patogênico, incluindo, mas não restrito a, as seguintes: artrite reumatóide, psoríase, arteriosclerose, retinopatia diabética e vários distúrbios oftálmicos. Os usos e métodos envolvendo os compostos da invenção também se estendem a estas outras indicações.

Em uma forma de realização preferida, a presente invenção fornece compostos com utilidade no tratamento de câncer ou malignidades de célula B. Alguém versado na arte será capaz por experimentação de rotina de determinar a capacidade destes compostos de inibir crescimento de célula de tumor (veja, por exemplo, os métodos descritos em Roth et al., 1999 e Dengler et al., 1995 e os métodos descritos nos Exemplos aqui).

A presente invenção também fornece uma composição farmacêutica compreendendo um derivado de ansamicina, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmos, junto com um carreador farmaceuticamente aceitável.

Os compostos mencionados acima da invenção ou uma formulação destes podem ser administrados por qualquer método convencional, por exemplo, mas sem limitação eles podem ser administrados

parenteralmente (incluindo administração intravenosa), oralmente, topicamente (incluindo bucal, sublingual ou transdérmica), através de um dispositivo médico (e.g. uma endoprótese expansível), por inalação, ou através de injeção (subcutânea ou intramuscular). O tratamento pode consistir

5 de uma única dose ou uma pluralidade de doses durante um período de tempo.

Embora seja possível para um composto da invenção ser administrado sozinho, é preferível apresentá-lo como uma formulação farmacêutica, junto com um ou mais carreadores aceitáveis. Assim é fornecida uma composição farmacêutica compreendendo um composto da

10 invenção junto com um ou mais diluentes ou carreadores farmaceuticamente aceitáveis. O(s) diluente(s) ou carreador(es) devem ser “aceitáveis” no sentido de serem compatíveis com o composto da invenção e não deletérios aos destinatários deste. Exemplos de carreadores adequados são descritos em mais detalhe abaixo.

Os compostos da invenção podem ser administrados sozinhos ou em combinação com outros agentes terapêuticos. Co-administração de dois (ou mais) agentes pode possibilitar doses significativamente mais baixas de cada um a ser usado, com isso reduzindo os efeitos colaterais vistos. Também é fornecida uma composição farmacêutica compreendendo um composto da

15 invenção e um agente terapêutico adicional junto com um ou mais diluentes ou carreadores farmaceuticamente aceitáveis.

Em um aspecto adicional, a presente invenção sustenta o uso de um composto da invenção em terapia de combinação com um segundo agente para o tratamento de câncer ou malignidades de célula B.

Em uma forma de realização, um composto da invenção é co-administrado com outro agente terapêutico para o tratamento de câncer ou malignidades de célula B agentes preferidos incluem, mas não são limitados a, metotrexato, leucovorina, adriamicina, prenisona, bleomicina, ciclofosfamida, 5-fluorouracila, paclitaxel, docetaxel, vincristina, vinblastina,

25

vinorelbina, doxorubicina, tamoxifeno, toremifeno, megestrol acetato, anastrozol, goserelina, anticorpo monoclonal anti-HER2 (e.g. HerceptinTM), capecitabina, cloridrato de raloxifeno, inibidores de EGFR (e.g. Iressa®, TarcevaTM, ErbituxTM), inibidores de HSP90 (e.g. 17-(alilamino)-17-demetoxigeldanamicina (17-AAG) ou 17-(dimetilaminoetilamino)-17-demetoxigeldanamicina (17-DMAG)), inibidores de mTOR (e.g. rapamicina, CCI-779, RAD001) ou inibidores de VEGF (e.g. AvastinTM), inibidores de proteassomo (e.g. VelcadeTM) ou Glivec®. Adicionalmente, um composto da invenção pode ser administrado em combinação com outras terapias incluindo, mas não limitado a, radioterapia ou cirurgia.

As formulações podem ser convenientemente apresentadas em forma de dosagem unitária e podem ser preparadas por qualquer dos métodos bem conhecidos na arte de farmácia. Tais métodos incluem a etapa de colocar em associação o ingrediente ativo (composto da invenção) com o carreador que constitui um ou mais ingredientes acessórios. Em geral as formulações são preparadas colocando uniformemente e intimamente o ingrediente ativo em associação com carreadores líquidos ou carreadores sólidos finamente divididos ou ambos, e então, se necessário, modelando o produto.

Os compostos da invenção normalmente serão administrados oralmente ou por qualquer via parenteral, na forma de uma formulação farmacêutica compreendendo o ingrediente ativo, opcionalmente na forma de um ácido orgânico, ou inorgânico não tóxico, ou base, sal de adição, em uma forma de dosagem farmacêuticamente aceitável. Dependendo do distúrbio e paciente a ser tratado, assim como da via de administração, as composições podem ser administradas em doses variadas.

Por exemplo, os compostos da invenção podem ser administrados oralmente, bucalmente ou sublingualmente na forma de comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, soluções ou suspensões, que podem conter agentes aromatizantes ou corantes, para aplicações de liberação

imediate, atrasada ou controlada.

Tais comprimidos podem conter excipientes tal como celulose microcristalina, lactose, citrato de sódio, carbonato de cálcio, fosfato de cálcio dibásico e glicina, desintegrantes tal como amido (preferivelmente amido de milho, batata ou tapioca), glicolato de amido de sódio, croscarmelose de sódio e certos silicatos complexos, e ligantes de granulação tal como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), hidroxipropilcelulose (HPC), sacarose, gelatina e acácia. Adicionalmente, agentes lubrificantes tais como estearato de magnésio, ácido esteárico, beenato de glicerila e talco podem ser incluídos.

Composições sólidas de um tipo similar também podem ser empregadas como materiais de enchimento em cápsulas de gelatina. Excipientes preferidos neste sentido incluem lactose, amido, uma celulose, açúcar do leite ou polietilenoglicóis de alto peso molecular. Para suspensões aquosas e/ou elixires, os compostos da invenção podem ser combinados com vários agentes adoçantes ou aromatizantes, matéria corante ou corantes, com agentes emulsificantes e/ou suspensores e com diluentes tais como água, etanol, propilenoglicol e glicerina, e combinações destes.

Um comprimido pode ser feito por compressão ou moldando, opcionalmente com um ou mais ingredientes acessórios. Comprimidos que passaram por compressão podem ser preparados comprimindo em uma máquina adequada o ingrediente ativo em uma forma de fluxo livre tal como um pó ou grânulos, opcionalmente misturado com um ligante (e.g. povidona, gelatina, hidroxipropilmetil celulose), lubrificante, diluente inerte, conservante, desintegrante (e.g. glicolato de amido de sódio, povidona reticulada, carboximetil celulose de sódio reticulada), agente ativo em superfície ou dispersante. Comprimidos modulados podem ser feitos moldando em uma máquina adequada uma mistura do composto em pó umedecida com um diluente líquido inerte. Os comprimidos podem ser

opcionalmente revestidos ou marcados e podem ser formulados de forma a fornecer liberação lenta ou controlada do ingrediente ativo neste usando, por exemplo, hidroxipropilmetilcelulose em proporções variadas para fornecer perfil de liberação desejado.

5 Formulações em conformidade com a presente invenção adequadas para administração oral podem ser apresentadas como unidades distintas tal como cápsulas, hóstias ou comprimidos, cada uma contendo uma quantidade pré-determinada do ingrediente ativo; como um pó ou grânulos; como uma solução ou uma suspensão em um líquido aquoso ou um líquido
10 não aquoso; ou como uma emulsão líqüida de óleo em água ou uma emulsão líqüida de água em óleo. O ingrediente ativo também pode ser apresentado como um bolo, electuário ou pasta.

 Formulações adequadas para administração tópica na boca incluem pílulas compreendendo o ingrediente ativo em uma base aromatizada,
15 normalmente sacarose e acácia ou tragacanto; pastilhas compreendendo o ingrediente ativo em uma base inerte tal como gelatina e glicerina, ou sacarose e acácia; e antissépticos bucais compreendendo o ingrediente ativo em um carreador líquido adequado.

 Deve ser entendido que em adição aos ingredientes
20 particularmente mencionados acima as formulações desta invenção podem incluir outros agentes convencionais na arte levando em consideração o tipo de formulação em questão, por exemplo, aqueles adequados para administração oral podem incluir agentes aromatizantes.

 Composições farmacêuticas adaptadas para administração
25 tópica podem ser formuladas como pomadas, cremes, suspensões, loções, pós, soluções, pastas, géis, curativos impregnados, líquidos pulverizáveis, aerossóis ou óleos, dispositivos transdérmicos, pós polvilháveis, e os semelhantes. Estas composições podem ser preparadas através de métodos convencionais contendo o agente ativo. Assim, elas também podem

compreender carreadores e aditivos convencionais compatíveis, tal como conservantes, solventes para auxiliar penetração de droga, emoliente em cremes ou pomadas e etanol ou álcool oleílico para loções. Tais carreadores podem ser apresentados como a partir de cerca de 1% até cerca de 98% da composição. Mais normalmente eles irão formar até cerca de 80% da composição. Apenas como uma ilustração, um creme ou pomada é preparado misturando quantidades suficientes de material hidrofílico e água, contendo de cerca de 5-10% em peso do composto, em quantidades suficientes para produzir um creme ou pomada tendo a consistência desejada.

Composições farmacêuticas adaptadas para administração transdérmica podem ser apresentadas como esparadrapos discretos pretendidos para permanecer em íntimo contato com a epiderme do destinatário por um período prolongado de tempo. Por exemplo, o agente ativo pode ser liberado do esparadrapo por iontoforese.

Para aplicações a tecidos externos, por exemplo a boca e pele, as composições são preferivelmente aplicadas como uma pomada ou creme tópico. Quando formulado em uma pomada, o agente ativo pode ser empregado ou com uma base de pomada parafínica ou miscível em água.

Alternativamente, o agente ativo pode ser formulado em um creme com uma base de creme de óleo em água ou uma base de água em óleo.

Para administração parenteral, formas fluidas de dosagem unitária são preparadas utilizando o ingrediente ativo e um veículo estéril, por exemplo, mas sem limitação água, álcoois, polióis, glicerina e óleos vegetais, sendo preferido água. O ingrediente ativo, dependendo do veículo e concentração usada, pode ser ou suspenso ou dissolvido no veículo. Ao preparar soluções o ingrediente ativo pode ser dissolvido em água para injeção e esterilizado por filtro antes de encher em um frasco adequado ou ampola e vedação.

Vantajosamente, agentes tais como anestésicos locais,

conservantes e agentes tamponantes podem ser dissolvidos no veículo. Para acentuar a estabilidade, a composição pode ser congelada depois de enchimento no frasco e a água removida sob vácuo. O pó liofilizado seco é então vedado no frasco e um frasco acompanhante de água para injeção pode ser fornecido para reconstituir o líquido antes de uso.

Suspensões parenterais são preparadas substancialmente da mesma maneira que soluções, exceto que o ingrediente ativo é suspenso no veículo ao invés de ser dissolvido e esterilização não pode ser realizada por filtração. O ingrediente ativo pode ser esterilizado por exposição a óxido de etileno antes de suspender no veículo estéril. Vantajosamente, um tensoativo ou agente umectante é incluído na composição para facilitar distribuição uniforme do ingrediente ativo.

Os compostos da invenção também podem ser administrados usando dispositivos médicos conhecidos na arte. Por exemplo, em uma forma de realização, uma composição farmacêutica da invenção pode ser administrada com um dispositivo de injeção hipodérmica sem agulha, tal como os dispositivos descritos em Patente US 5.399.163; Patente US 5.383.851; Patente US 5.312.335; Patente US 5.064.413; Patente US 4.941.880; Patente US 4.790.824; ou Patente US 4.596.556. Exemplos de implantes e módulos bem conhecidos úteis na presente invenção incluem: Patente US 4.487.603, que descreve uma bomba de micro-infusão implantável para dispensar medicação em uma taxa controlada; Patente US 4.486.194, que descreve um dispositivo terapêutico para administrar medicamentos através da pele; Patente US 4.447.233, que descreve uma bomba de infusão de medicamento para liberar medicação em uma taxa de infusão precisa; Patente US 4.447.224, que descreve um aparato de infusão implantável de fluxo variável para liberação contínua de droga; Patente US 4.439.196, que descreve um sistema osmótico de liberação de droga tendo compartimentos de múltiplas câmaras; e Patente US 4.475.196, que descreve um sistema

osmótico de liberação de droga. Muitos outros tais implantes, sistemas de liberação, e módulos são conhecidos por aqueles versados na arte.

A dosagem a ser administrada de um composto da invenção irá variar de acordo com o composto particular, a doença envolvida, o sujeito, e a natureza e severidade da doença e a condição física do sujeito, e a via de administração selecionada. A dosagem apropriada pode ser prontamente determinada por uma pessoa versada na arte.

As composições podem conter de 0,1% em peso, preferivelmente de 5-60%, mais preferivelmente de 10-30% em peso, de um composto da invenção, dependendo do método de administração.

Será reconhecido por alguém de verso na arte que a quantidade ótima e espaçamento de dosagens individuais de um composto da invenção serão determinados pela natureza e grau da condição sendo tratada, pela forma, via e sítio de administração, e pela idade e condição do sujeito particular sendo tratado, e que um médico irá, no final das contas, determinar dosagens apropriadas a serem usadas. Esta dosagem pode ser repetida tantas vezes quanto apropriado. Se efeitos colaterais se desenvolvem a quantidade e/ou frequência da dosagem pode ser alterada ou reduzida, em conformidade com prática clínica normal.

Breve descrição das figuras

Figura 1: ilustra a estrutura de borrelidina e alguns metabólitos relacionados isolados de organismos produtores de borrelidina

Figura 2: mostra os espectros ^1H RMN para 17-des(ciclopentano-2-ácido carboxílico)-17-(ciclobutano-2-ácido carboxílico)borrelidina (4-(2-hidroxietila))morfolina éster (7)

Figura 3: mostra os espectros ^1H RMN para 17-des(ciclopentano-2-ácido carboxílico)-17-(ciclobutano-2-ácido carboxílico)borrelidina (2-(2-hidroxietila)piridina éster (8)

Figura 4: mostra os espectros ^1H RMN para 17-

des(ciclopentano-2-ácido carboxílico)-17-(ciclobutano-2-ácido carboxílico)borrelidina (4-(2-aminoetila))morfolina amida (9)

Figura 5: mostra os espectros ^1H RMN para 17-des(ciclopentano-2-ácido carboxílico)-17-(ciclobutano-2-ácido carboxílico)borrelidina (4-aminometila)piridina amida (10)

Figura 6: mostra os espectros ^1H RMN para 17-des(ciclopentano-2-ácido carboxílico)-17-(ciclobutano-2-ácido carboxílico)borrelidina (3-aminometila)piridina amida (11)

Figura 7: mostra os espectros ^1H RMN para 17-des(ciclopentano-2-ácido carboxílico)-17-(ciclobutano-2-ácido carboxílico)borrelidina (2-aminometila)piridina amida (12)

Figura 8: mostra os espectros ^1H RMN para 17-des(ciclopentano-2-ácido carboxílico)-17-(ciclobutano-2-ácido carboxílico)borrelidina (3-(2-aminoetila))piridina amida (13)

Figura 9: mostra os espectros ^1H RMN para 17-des(ciclopentano-2-ácido carboxílico)-17-(ciclobutano-2-ácido carboxílico)borrelidina amida (14)

Figura 10: Estruturas dos compostos (6-14) produzidos nos exemplos.

EXEMPLOS

Métodos Gerais

Fermentação de culturas

A produção de análogos de borrelidina foi realizada como descrito previamente em WO 2004/058976 e um exemplo típico é fornecido abaixo (Exemplo 1).

Procedimento de análise LCMS para análise de caldo de fermentação e estudos de transformação in vivo

Caldo de cultura (1 mL) e acetato de etila (1 mL) foram misturados por 15 min seguido por centrifugação por 10 min. 0,5 mL da

camada orgânica foi coletado, evaporado até secar e então re-dissolvido em 0,25 mL de metanol. LCMS foi realizado em um sistema integrado Agilent HP1100 HPLC em combinação com um espectrômetro de massa por electrospray Bruker Daltonics Esquire 3000+ operando em modo de íon positivo. Cromatografia foi atingida por uma coluna Phenomenex Hyperclone (C₁₈ BDS, 3u, 150 x 4,6 mm) eluindo durante 25 min em uma vazão de 1 mL/min com um gradiente linear de água + 0,1% de ácido fórmico para acetonitrila + 0,1% de ácido fórmico.

Síntese

Todas as reações foram conduzidas em condições anidras a menos que de outra maneira determinado, em vidraria seca no forno que foi resfriado sob vácuo, e usando solventes secos. Reações foram monitoradas por LC-UV-MS em instrumento quádruplo simples Micromass Platform. Cromatografia foi atingida por sílica de fase reversa usando uma coluna Atlantis dC18 (50 x 2,1 mm, 5 micron) eluindo em 1 ml/min com o seguinte gradiente: T = 0, 100% A; T = 2,5, 100% B; fase móvel A, água + 0,1% de ácido fórmico; fase móvel B, acetonitrila + 0,1% de ácido fórmico. Detecção de UV foi realizada em 215 nm.

Verificação de solubilidade em água

Solubilidade em água pode ser testada como segue: Uma solução estoque de 10 mM do análogo de Borrelidina é preparada em 100% de DMSO em temperatura ambiente. Alíquotas de 0,01 mL triplicadas são constituídas para 0,5 mL ou com solução de 0,1 M de PBS, pH 7,3 ou 100% de DMSO em frascos de âmbar. As soluções resultantes de 0,2 mM são agitadas no escuro, em temperatura ambiente em um agitador IKA® vibrax VXR por 6 h, seguido por transferência das soluções ou suspensões resultantes em tubos Eppendorf de 2 mL e centrifugação por 30 min a 13200 rpm. Alíquotas do fluido de sobrenadante são então analisadas pelo método de LCMS como descrito acima.

Verificação de permeabilidade celular

Permeabilidade celular pode ser testada como segue: O composto de teste é dissolvido para 10mM em DMSO e então diluído adicionalmente em tampão para produzir uma concentração de dosagem final de 10 μ M. O marcador de fluorescência amarelo lúcer também é incluído para monitorar integridade de membrana. Composto de teste é então aplicado à superfície apical de monocamadas de célula Caco-2 e permeação de composto no compartimento basolateral é medida. Isto é realizado na direção reversa (basolateral para apical) para investigar transporte ativo. LC-MS/MS é usado para quantificar níveis tanto do composto de teste como de controle padrão (tal como Propanolol e Acebutolol).

Determinação de estrutura RMN de compostos sintéticos

Espectros ^1H RMN foram registrados em 400 MHz em uma máquina Bruker 400. Compostos foram dissolvidos em CDCl_3 e referenciados como o próton residual ressonante em $\delta = 7,26$ ppm.

Bioensaio in vitro para atividade anticâncer

Avaliação in vitro de compostos para atividade anticâncer em um quadro de 12 linhagens humanas de célula de tumor em um ensaio de proliferação em monocamada foi realizada no Oncotest Testing Facility, Institute for Experimental Oncology, Oncotest GmbH, Freiburg. As características das 12 linhagens celulares selecionadas estão resumidas em Tabela I.

Tabela I – Linhagens celulares de teste

#	Linhagem celular	Características
1	MCF-7	Mama, NCI padrão
2	MDA-MB-231	Mama - PTEN positivo, resistente a 17-AAG
3	MDA-MB-468	Mama - PTEN negativo, resistente a 17-AAG
4	NCI-H460	Pulmão, NCI padrão
5	SF-268	CNS, NCI padrão
6	OVCAR-3	Ovariano - p85 mutado. AKT amplificado.
7	A498	Renal, alta expressão MDR,
8	GXF 251L	Gástrico
9	MEXF 394NL	Melanoma

10	UXF 1138L	Útero
11	LNCAP	Próstata - PTEN negativo
12	DU145	Próstata - PTEN positivo

As linhagens celulares de Oncotest foram estabelecidas a partir de xenoenxertos de tumor humano como descrito por Roth et al., (1999). A origem dos xenoenxertos doadores foi descrita por Fiebig et al., (1999). Outras linhagens celulares foram ou obtidas a partir do NCI (H460, SF-268, OVCAR-3, DU145, MDA-MB-231, MDA-MB-468) ou adquiridas a partir de DSMZ, Braunschweig, Germany (LNCAP).

Todas as linhagens celulares, a menos que de outra forma especificado, foram cultivadas a 37 °C em uma atmosfera umidificada (95 % de ar, 5 % de CO₂) em um meio ‘pré-misturado’ contendo meio RPMI 1640, 10 % de soro bovino fetal, e 0,1 mg/mL de gentamicina (PAA, Cölbe, Germany).

Ensaio de monocamada – breve descrição de protocolo:

Um ensaio modificado de iodeto de propídio foi usado para verificar os efeitos do(s) composto(s) de teste no crescimento de linhagens celulares de tumor humano (Dengler et al., (1995)).

Resumidamente, células foram coletadas de culturas em fase exponencial por tripsinização, contadas e emplacadas em placas de microtítulo de fundo plano de 96 poços em uma densidade celular dependente da linhagem celular (5 - 10.000 células viáveis/poço). Depois de recuperação por 24 h para permitir que células retornem ao crescimento exponencial, 0,010 mL de meio de cultura (6 poços de controle por placa) ou meio de cultura contendo macbecina foram adicionados aos poços. Cada concentração foi emplacada em triplicata. Compostos foram aplicados em duas concentrações (0,001 mM e 0,01 mM). Seguindo 4 dias de exposição contínua, meio de cultura celular com ou sem composto de teste foi substituído por 0,2 mL de uma solução aquosa de iodeto de propídio (PI) (7 mg/L). Para medir a proporção de células vivas, células foram

permeabilizadas congelando as placas. Depois de descongelar as placas, fluorescência foi medida usando o leito de microplaca Cytofluor 4000 (excitação 530 nm, emissão 620 nm), gerando uma relação direta para o número total de células viáveis.

5 A inibição de crescimento média através do quadro de 12 linhagens celulares foi expressa como tratado/controle x 100 (% T/C).

A atividade de análogos de borrelidina mostrada neste ensaio de inibição de crescimento de célula de câncer é pensada ocorrer amplamente através de inibição de treonil tRNA sintetase.

10 Exemplo 1: Fermentação e isolamento de 17-des(ciclopentano-2-ácido carboxílico)-17-(ciclobutano-2-ácido carboxílico)borrelidina (6)

O exemplo dado é específico para a produção de 6 mas o método geralmente é para todos os análogos de borrelidina, uma pessoa de verso na arte irá perceber como adaptar o método específico descrito abaixo para a produção de análogos de borrelidina alternativos. Fermentadores 3 x 7 L Applikon foram corridos como descrito e os caldos de fermentação combinados para extração.

Um frasco de inseminação contendo meio NYG (30 mL em um frasco Erlenmyer de 250 mL) foi inoculado com *S. parvulus* 20 Tü4055/borG::aac3(IV)) (WO 2004/058976) de uma cultura estoque miceliana (0,5 mL; gerada por diluição 1:1 de uma cultura inseminada de 2 dias com crio-conservante (20% w/v de glicerol e 10% w/v de lactose em água deionizada)). Meio NYG contém, em água deionizada: extrato de carne (0,3% w/v), Bacto peptona (0,5% w/v), glicose (1% w/v) e extrato de 25 levedura (0,5% w/v).

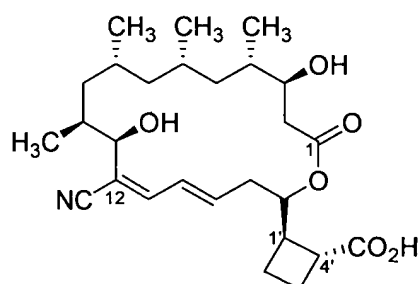
Sementes secundárias também foram preparadas como acima (mas com 250 mL de NYG em frascos Erlenmyer de 2 L). Meio de produção PYDG (4 L) com 0,01% v/v de Pluronic L0101 para prevenir espumação foi inoculado com os inóculos de semente secundária (10% v/v). Meio PYDG

contém, em água deionizada: nutriente de leite peptonizado (1,5% w/v), autolisado de levedura (0,15% w/v), dextrina (4,5% w/v) e glicose (0,5% w/v) ajustado para pH 7,0. Isto foi deixado para fermentar em um fermentador Applikon de 7 L por 6 dias a 30 °C. Depois de 24 h ciclobutano1,2-trans-diácido carboxílico em metanol foi adicionado para gerar uma concentração final de 4 mM. Fluxo de ar foi ajustado em 0,75 vvm, com septos inclinados e a velocidade de impulsão controlada eletronicamente entre 250 e 600 rpm a fim de manter tensão de oxigênio dissolvido em ou acima 30% de saturação do ar. O caldo de fermentação de três tais fermentadores foi combinado (12 L) e ensaiado; um total de 339 mg de 6 foi produzido (em um título médio 28 mg/L).

O caldo de fermentação foi ajustado para pH ~5.5 (conc. HCl) e então clarificado por centrifugação. O sobrenadante foi extraído com etilacetato (2 x 1 volume equivalente), e a pelota celular extraída com metanol (2 x 1 volume equivalente). Os extratos orgânicos combinados foram evaporados para produzir uma suspensão aquosa marrom. Esta foi diluída com água (para 1 L) e extraída com etilacetato (3 x 1 L). Os extratos orgânicos combinados foram evaporados para produzir óleo marrom (~4,5 g). O óleo foi dissolvido em acetona, gel de sílica “flash” 60 foi adicionado (150 g) e o solvente removido por evaporação. Este foi aplicado a uma coluna de sílica “flash” (5 x 25 cm) pré-preparada em heptano. A coluna foi eluída com um gradiente escalonado de 100% de heptano a 100% de acetato de etila. Frações contendo 6 foram identificadas por TLC, combinadas, e o solvente removido por evaporação para gerar um óleo amarelo (~1 g). Este óleo foi então dissolvido no volume mínimo de mistura de solvente (heptano:CHCl₃:etanol, 10:10:1) e aplicado a uma coluna de Sephadex LH-20 (2,5 x 60 cm) pré-preparada na mesma mistura de solvente. The column was eluted under gravity with approx. 3 L da mesma mistura de solvente, coletando frações de 12 mL. Frações contendo 6 foram combinadas e o

solvente removido por evaporação. O sólido amarelo pálido resultante (550 mg) foi cristalizado dissolvendo em uma quantidade mínima de CHCl_3 e então adicionando hexano até que se tornasse nebuloso. A solução resultante foi armazenada a -20°C durante a noite e o sólido resultante coletado por filtração e então lavado com hexano frio. O licor mãe foi tratado similarmente de novo. Os dois grupos foram combinados para produzir 6 (190 mg).

Espectros RMN para 6 foram registrados em um espectrômetro Bruker Advance 500 a 298 K operando em 500 MHz e 125 MHz para ^1H e ^{13}C respectivamente. Programas de pulso Bruker padrão foram usados para adquirir os espectros ^1H - ^1H COSY, APT, HMQC e HMBC; constantes de acoplamento são dadas em hertz. Experimentos RMN foram corridos em CDCl_3 e foram referenciados para o próton residual ressonante em d_{H} 7,26 e carbono em d_{C} 77,0 para CDCl_3 .



(6)

15 Tabela II

Posição		δ_{C}	δ_{H} (mult., Hz)	H-H COSY	H-C HMBC
1	O-C=O	172,3	-	-	-
2	CH_2	34,3	2,35 dd (16,7, 2,0) 2,47 dd(16,7, 10,3)	3	1,3, 4
3	CH-OH	70,0	3,89 dt (10,4, 2,2)	2, 4	1,4, 5,18
4	CH	35,7	1,61 m	3, 5a, 18	
5	CH_2	43,1	1,24 ddd (10,4,10,4, 2,2) 0,90 ddd (19,0, 8,3, 2,7)	4, 6	3,4,7,18,19
6	CH	27,4	1,54 m	5, 7, 19	
7	CH_2	47,6	1,12 ddd 0,96 m	6 8	5,8,9,19,20
8	CH	26,2	1,60 m	7, 9, 20	
9	CH_2	37,4	1,04 m 0,71td (14,3,3,1)	8,9b, 10 8,9a	8,10,11,20,21
10	CH	35,2	1,86 m	9a, 11, 21	

Posição		δ_C	δ_H (mult., Hz)	H-H COSY	H-C HMBC
11	CH-OH	73,1	4,11 d (9,7)	10	9,10, 12,13,21
12	C=	118,2	-	-	-
13	CH=	144,0	6,80 d (11,3)	14	11, 12, 15, 22
14	CH=	126,9	6,39 dd (14,9, 11,5)	13, 15	13, 22
15	CH=	138,5	6,10 ddd (8,9, 3,4, 3,0)	14, 16	13 17
16	CH ₂	34,3	2,46 m	15, 17	15,17, 1'
17	CH-O	75,5	5,11 m	16, 1'	1',2',1, 15
18	4-CH ₃	17,0	0,84 d (6,7)	4	3, 4,5
19	6-CH ₃	18,2	0,79 d (6,3)	6	5
20	8-CH ₃	20,2	0,82 d (5,2)	8	7, 8,9
21	10-CH ₃	14,9	1,04 d (6,4)	10	9,11
22	-CN	115,9	-	-	-
1'	CH	40,2	2,89 quint (9,0)	17, 2', 4'	2', 4',5',17
2'	CH	41,9	3,08 quad (9,0)	1', 3'	1',3', 5',17
3'	CH ₂	21,5	2,15 m	2', 4'	1'
4'	CH ₂	21,1	2,02 m 1,76 quint (9,6)	1', 3'	1',3',17
5'	-CO ₂ H	177,3	-	-	-

ESI-MS m/z : 498,4 $[M+Na]^+$, 476,3 $[M+H]^+$, 458,4 $[M-18]^+$; 474,5 $[M-H]^-$, 456,4 $[M-18]^-$

UV: λ_{max} (DAD) = 258 nm

Exemplo 2: Síntese de 17-des(ciclopentano-2-ácido carboxílico)-17-(ciclobutano-2-ácido carboxílico)borrelidina (4-(2-hidroxietila))morfolina éster (7)

Uma solução agitada de análogo de borrelidina 6 (125 mg, 0,263 mmol) em tetrahidrofurano anidro (THF) (7 mL) foi tratada sob nitrogênio com 1-hidroxitriazol (35 mg, 0,263 mmol), N-(3-dimetilaminopropila)-N'-etilcarbodiimida (EDCI) (64 mg, 0,33 mmol) e DMAP (73 mg, 0,60 mmol). Depois de 30 min 4-(2-hidroxietila)morfolina (344 mg, 0,32 mL, 2,63 mmol) foi adicionada. Depois de 3 h adicionais a mistura foi evaporada até seca. O resíduo foi absorvido em diclorometano (DCM), lavado duas vezes com água e seco por sulfato de magnésio. Depois de filtração e evaporação o resíduo foi purificado por 'Combiflash' eluindo com um gradiente de 0-90% de acetato de etila em DCM. O produto foi evaporado até seca e azeotropado duas vezes com clorofórmio para produzir

um vidro sem cor. Produção = 61 mg, 39%. Pureza (por LCMS) >95%. ¹H RMN foi consistente com o composto correto (Figura 2).

Exemplo 3: Síntese de 17-des(ciclopentano-2-ácido carboxílico)-17-(ciclobutano-2-ácido carboxílico)borrelidina (2-(2-hidroxietila)piridina éster
5 (8)

Este composto foi preparado como descrito em exemplo 2 usando as mesmas quantidades de material mas com 2-(2-hidroxietila)piridina (323 mg, 0,30 mL, 2,63 mmol) em lugar da 4-(2-hidroxietila)morfolina. Produção = 89 mg, 58%. Pureza (por LCMS) >95%. ¹H RMN foi consistente
10 com o composto correto (Figura 3).

Exemplo 4: Síntese de 17-des(ciclopentano-2-ácido carboxílico)-17-(ciclobutano-2-ácido carboxílico)borrelidina (4-(2-aminoetila))morfolina
amida (9)

Uma solução agitada de 6 (100 mg, 0,204 mmol) em THF seco
15 (7,5 mL) foi resfriada para -20°C e tratada, sob nitrogênio, com trietilamina seca (0,03 mL, 0,225 mmol) seguido por cloroformiato de isobutila (0,03 mL, 0,225 mmol). Depois de agitar a -20°C por 30 min a mistura foi filtrada para remover cloridrato de trietilamina. O filtrado foi novamente resfriado a -20°C e tratado, sob nitrogênio, com 4-(2-aminoetila)morfolina (0,17 mL, 1,3
20 mmol). A temperatura foi deixada crescendo até ambiente pelas próximas 3 h, depois de cujo tempo a mistura foi evaporada até secura. O resíduo foi absorvido em DCM, lavado três vezes com água e seco por sulfato de magnésio. Depois de filtragem o solvente foi removido por evaporação em temperatura ambiente. O produto foi purificado por 'Combiflash' eluindo com
25 um gradiente de 0-90% de acetato de etila em DCM, seguido por 5% de trietilamina em acetato de etila. Depois de evaporação o produto foi obtido como um vidro ligeiramente amarelo. Produção = 84 mg, 54%. Pureza (por LCMS) >99%. ¹H RMN foi consistente com o composto correto (Figura 4).

Exemplo 5: Síntese de 17-des(ciclopentano-2-ácido carboxílico)-17-

(ciclobutano-2-ácido carboxílico)borrelidina (4-aminometila)piridina amida
(10)

Este composto foi preparado como descrito em exemplo 4 mas usando as seguintes quantidades de material: análogo de borrelidina 6 (125 mg, 0,263 mmol), THF seco (10 mL), trietilamina seca (29 mg, 0,04 mL, 0,289 mmol), cloroformiato de isobutila (39 mg, 0,04 mL, 0,289 mmol) e 4-(aminometila)piridina (181 mg, 0,17 mL, 1,68 mmol). Purificação foi realizada usando 'Combiflash' usando 0-90% de acetato de etila em DCM, seguido por acetato de etila líquido. O produto foi isolado como um sólido branco. Produção = 32 mg, 21,5%. Pureza (por LCMS) >97%. ¹H RMN foi consistente com o composto correto mas requereu a adição de algum d₆-DMSO para auxiliar solubilidade do produto (Figura 5).

Exemplo 6: Síntese de 17-des(ciclopentano-2-ácido carboxílico)-17-(ciclobutano-2-ácido carboxílico)borrelidina (3-aminometila)piridina amida
(11)

Este composto foi preparado como descrito em exemplo 4 usando as mesmas quantidades de material mas com 3-(aminometila)piridina (181 mg, 0,17 mL, 1,68 mmol) em lugar de 4-(2-aminoetila)morfolina. Purificação foi realizada usando 'Combiflash' usando 0-90% de acetato de etila seguido por 90% de acetato de etila em DCM (o produto eluído depois de um subproduto). O produto foi azeotropado duas vezes com clorofórmio para gerar um vidro sem cor. Produção = 121 mg, 81%. Pureza (por LCMS) 100%. ¹H RMN foi consistente com o composto correto (Figura 6).

Exemplo 7: Síntese de 17-des(ciclopentano-2-ácido carboxílico)-17-(ciclobutano-2-ácido carboxílico)borrelidina (2-aminometila)piridina amida
(12)

Este composto foi preparado como descrito em exemplo 4 usando as mesmas quantidades de material mas com 2-(aminometila)piridina (181 mg, 0,17 mL, 1,68 mmol) em lugar de 4-(2-aminoetila)morfolina.

Purificação como exemplo 4 para gerar o produto como um vidro sem cor. Produção = 137 mg, 92%. Pureza (por LCMS) 100%. ¹H RMN foi consistente com o composto correto (Figura 7).

Exemplo 8: Síntese de 17-des(ciclopentano-2-ácido carboxílico)-17-(ciclobutano-2-ácido carboxílico)borrelidina (3-(2-aminoetila))piridina amida (13)

Este composto foi preparado como descrito em exemplo 4 usando as mesmas quantidades de material mas com 3-(2-aminoetila)piridina (205 mg, 0,27 mL, 1,68 mmol) em lugar de 4-(2-aminoetila)morfolina. Purificação como exemplo 4 para gerar o produto como um vidro sem cor. Produção = 98 mg, 64%. Pureza (por LCMS) 100%. ¹H RMN foi consistente com o composto correto (Figura 8).

Exemplo 9: Síntese de 17-des(ciclopentano-2-ácido carboxílico)-17-(ciclobutano-2-ácido carboxílico)borrelidina amida (14)

Este composto foi preparado como descrito em exemplo 4 usando as mesmas quantidades de material mas com amônia aquosa (0,1 mL) em lugar de 4-(2-aminoetila)morfolina. Três gotas de ácido acético glacial foram adicionadas imediatamente antes de processamento e então purificação como exemplo 4 para gerar o produto como um vidro sem cor. Produção = 90 mg, 72%. Pureza (por LCMS) >99%. ¹H RMN foi consistente com o composto correto (Figura 9).

Exemplo 10: Estudos de clivagem de derivados de éster 7 & 8 e derivados de amida 9 & 13

Compostos 7, 8, 9 & 13 foram incubados em sangue de rato e avaliados por sua clivagem para gerar o ácido parental 6.

Compostos 7, 8, 9 & 13 foram adicionados a sangue de rato (contendo EDTA) em uma concentração final de 0,01 mg/mL e incubados a 37 °C. Amostras foram tomadas em 2, 30, 60, 120 e 180 minutos e extraídas usando cartuchos SPE. Resumidamente, amostra (0,1 mL) foi transferida para

um tubo de propileno de 2 mL e padrão interno foi adicionado. A amostra foi diluída para um volume de 1 mL por adição de 0,1 M de KH_2PO_4 aquoso. A amostra foi turbilhonada por um período de 5 min e centrifugada a 3000 rpm por 5 min. Um cartucho Oasis MAX (1 cc/30 mg) foi condicionado com 1 mL de MeOH e 1 mL de água sucessivamente. O sobrenadante foi transferido para o cartucho condicionado em uma vazão de 1-2 mL/min. O cartucho foi lavado com 2% de NH_4OH em água e 30 % de MeOH (contendo 2 % de ácido fórmico) a 1-2 mL/min. Finalmente, o analito foi eluído com 80 % de MeOH (contendo 2 % de ácido fórmico) a 1-2 mL/min. Os extratos foram transferidos para frascos de amostrador automático e imediatamente analisados por LC/MS. Amostras foram comparadas com uma curva de calibração padrão para 6.

As amostras com tempo de 2 minutos para cada composto foram serialmente diluídas depois de extração e analisadas por LC-MS para assegurar que sua resposta fosse linear ao longo de um intervalo de concentração de 3-100%. LCMS foi realizado em um espectrômetro de massa Bruker Daltonics Esquire 3000+ equipado com uma fonte de electrospray acoplada ao HPLC. As condições de HPLC foram: 20 % de B por 1 min seguido por um gradiente linear para 100 % de B por um período de 7 min e um período isocrático de 2 min a 100 % de B. Volume de injeção: 0,05 mL. HPLC foi realizado em uma coluna Waters Symmetry C8 de 3,5 microns, 50 mm x 2,1 mm, correndo uma fase móvel de: fase móvel A: 0,1% de ácido fórmico em água; fase móvel B: 0,1% de Ácido fórmico em acetonitrila; vazão: 1 mL/minuto.

Composto 6 mostra um íon $[\text{M}-\text{H}]^-$ intenso a m/z 474. Fragmentação desta espécie molecular resulta em um espectro com íons intensos a m/z 271 e 412. O íon irmão a m/z 412 pode ser idealmente selecionado para quantificação.

Usando estes métodos os derivados de amida 9 & 13 se

clivaram para gerar qualquer composto parental 6. Os dois derivados de éster 7 & 8 se clivaram rapidamente para gerar o composto parental 6. A meia-vida para a clivagem de 7 foi estimada em 12 min, e para 8 a taxa de clivagem foi muito rápida para calcular usando este protocolo.

- 5 Baseado nestes dados os derivados de éster 7 e 8 são considerados como atuando como pró-fármacos potenciais de 6. Os derivados de amida não funcionam do como pró-fármacos de 6.

Exemplo 11:Dados biológicos – Avaliação in vitro de atividade anticâncer dos derivados de borrelidina

- 10 Avaliação in vitro dos compostos de teste para atividade anticâncer em um quadro de linhagens celulares de tumor humano em um ensaio de proliferação em monocamada foi realizada como descrito nos métodos gerais usando um ensaio modificado de iodeto de propídio. Esta triagem pode ser usada como um modelo para os efeitos tóxicos de compostos
- 15 ao inibir crescimento celular geral.

Os resultados são apresentados em Tabela III abaixo; cada resultado representa a média de experimentos em triplicata, exceto para compostos 1 e 6 para os quais os resultados representam a média de experimentos em duplicata.

20 Tabela III –dados de linhagem celular in vitro

Composto #	Média de %T/C	
	a 1 μ M	a 10 μ M
1	7	6
6	33	8
7	36	8
8	40	6
9	101	43
10	104	57
11	97	20
12	87	15
13	97	37
14	92	26

Compostos 9, 10, 11, 12, 13 e 14 resultaram em pouca ou nenhuma inibição de crescimento celular a 1 mM e portanto estes compostos

podem ser dito terem um perfil de segurança relativamente bom. Compostos 7 e 8 foram melhorados em relação a composto 6 o próprio melhorado em relação a composto 1.

Exemplo 12: Dados biológicos – avaliação de atividade anti-angiogênica de derivados de borrelidina usando um ensaio de membrana corioalantóica (CAM) de frango

Ovos férteis frescos foram incubados por 3 dias em uma incubadora de ovos padrão a 37°C por 3 dias. Em Dia 3, ovos foram rachados em condições estéreis e embriões foram colocados em placas de plástico de 20 × 100 mm e cultivados a 37°C em uma incubadora de embriões com um reservatório de água na prateleira de baixo. Ar foi continuamente borbulhado no reservatório de água usando uma bomba pequena de forma que a umidade na incubadora foi mantida constante. Em Dia 6, um anel “o” de silicone estéril foi colocado em cada CAM e uma quantidade estabelecida de composto de teste dissolvida em 10 µl de 0,5% de metilcelulose foi liberada em cada anel “o” em uma coifa estéril. Embriões foram retornados para a incubadora depois de adição de material de teste. Embriões de controle receberam 10 µL de veículo apenas. Em Dia 8, embriões foram removidos da incubadora e mantidos em temperatura ambiente enquanto que densidade de vasos sanguíneos foi determinada em cada anel “o” usando um sistema de captura de imagens em uma magnificação de 160×.

A densidade de vasos sanguíneos foi medida semi-quantitativamente usando um sistema de pontuação de angiogênese, no qual números exponenciais 1 a 32 foram usados para indicar número de vasos sanguíneos presente nos sítios de tratamento no CAM. Número 32 representou a maior densidade e 0 representou nenhuma angiogênese. O percentual de inibição em cada sítio de dosagem foi calculado usando o escore registrado para aquele sítio dividido pelo escore médio obtido a partir das amostras de controle apropriadas para cada experimento individual. O

percentual de inibição para cada dose de um dado composto foi calculado combinando todos os resultados obtidos para aquela dose.

Os resultados são apresentados em Tabela IV abaixo; cada escore médio de densidade de vasos sanguíneos representa a média de dez experimentos. A inibição percentual de linhagens de células de câncer a 1uM foi calculada subtraindo a %T/C média a 1uM de tabela III de 100. Um valor maior na proporção de inibição de vasculatura CAM para inibição de célula de câncer in vitro deve sugerir um aumento relativo em atividade antiangiogênica comparado com inibição de crescimento celular geral, ou atividade de tRNA sintetase.

Tabela IV – Dados de ensaio CAM e proporção de inibição de célula de câncer para inibição de angiogênese

Composto #	Escore médio de densidade de vasos sanguíneos	Inibição percentual média de vasculatura CAM a 25ng/CAM	Inibição percentual média de linhagens de células de câncer a 1uM	Proporção de inibição de vasculatura CAM a 25ng/CAM para inibição de célula de câncer in vitro a 1uM
1	6,4	62	93	0,6
6	8,2	51	67	0,76
7	7,8	54	64	0,84
9	6,8	60	0	>60

A partir destes dados, parece que o índice terapêutico anti-angiogênico (proporção de anti-angiogênese para inibição celular geral) de 9 é especialmente bom, e 7 e 9 são melhorados, se comparados com 1 e 6.

Referências

Anderson, B.F., Herlt, A.J., Rickards, R.W., and Robertson, G.B. (1989) Crystal and molecular structures of two isomorphous solvates of the macrolide antibiotic borrelidin: absolute configuration determination by incorporation of a chiral solvent in the in the crystal lattice. Aust. J. Chem. 42:717-730.

Anderton, K. and R. W. Rickards (1965). "Some structural features of borrelidin, an anti-viral antibiotic." Nature 206(981): 269.

Berger, J., Jampolsky, L.M., and Goldberg, M.W. (1949) Borrelidin, a new antibiotic with anti-Borrelia activity and penicillin enhancement properties. Arc. Biochem. 22:476-478.

Dengler W.A., Schulte J., Berger D.P., Mertelsmann R. and Fiebig HH. (1995) Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assay. Anti-Cancer Drugs, 6:522-532.

Dickinson, L., Griffiths, A.J., Mason, C.G., and Mills, R.F. (1965) Anti-viral activity of two antibiotics isolated from a species of Streptomyces. Nature 206:265-268.

Duffey, M. O., A. LeTiran, et al. (2003). "Enantioselective total synthesis of borrelidin", J Am Chem Soc 125(6): 1458-1459.

Eastwood, E. L. and S. E. Schaus (2003). "Borrelidin induces the transcription of amino acid biosynthetic enzymes via a GCN4-dependent pathway." Bioorg Med Chem Lett 13(13): 2235-7.

Folkman, J. (1986) How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Cloves Memorial Lecture. Cancer Res. 51:467-473.

Funahashi, Y., Wakabayashi, T., Semba, T., Sonoda, J., Kitoh, K., and Yoshimatsu, K. (1999) Establishment of a quantitative mouse dorsal air sac model and its application to evaluate a new angiogenesis inhibitor. Oncol. Res. 11:319-329.

Furniss B.S., Hannaford A.J., Smith P.W.G. and Tatchell A.R. (1989) Vogel's textbook of practical organic chemistry, 5th Ed, Pearson, Prentice Hall, Harlow, UK

Hanessian, S., Y. Yang, et al. (2003). "Application of conformation design in acyclic stereoselection: total synthesis of borrelidin as the crystalline benzene solvate." J Am Chem Soc 125(45): 13784-92.

Kawamura, T., D. Liu, et al. (2003). "Anti-angiogenesis effects of borrelidin are mediated through distinct pathways: threonyl-tRNA

synthetase and caspases are independently involved in suppression of proliferation and induction of apoptosis in endothelial cells." J Antibiot (Tokyo) 56(8): 709-15.

Keller-Schierlein, W. (1967). "[Metabolic products of microorganisms. Concerning the constitution of borrelidin]." Helv Chim Acta 50(3): 731-53.

Kuo, M. S., D. A. Yurek, et al. (1989). "Assignment of ^1H and ^{13}C RMN signals and the alkene geometry at C-7 in borrelidin." Journal of Antibiotics 42(6): 1006-1007.

Lumb, M., Macey, P.E., Spyvee, J., Whitmarsh, J.M. and Wright, R.D. (1965). "Isolation of vivomycin and borrelidin, two antibiotics with anti-viral activity, from a species of *Streptomyces*." Nature 206: 263-265.

Maehr, H. and R. H. Evans (1987). "Identity of borrelidin with treponemycin." Journal of Antibiotics 40(10): 1455-1456.

Matter, A., (2001) Tumor angiogenesis as a therapeutic target. Drug Dis. Todia 6:1005-1024.

Moss, S. J., I. Carletti, C. Olano, R. M. Sheridan, M. Ward, V. Math, M. Nur-E-Alam, A. F. Braña, M. Q. Zhang, P. F. Leadlay, C. Méndez, J. A. Salas and B. Wilkinson. (2006) "Biosynthesis of the angiogenesis inhibitor borrelidin: directed biosynthesis of novel analogues". Chem. Commun., in press.

Nagamitsu, T., Takano, D., Fukuda, T., Otoguro, K., Kuwajima, I., Harigaya, Y. and Ōmura, S. (2004) Total synthesis of (-)-borrelidin. Org. Lett., 6, 1865-1867.

Olano C, Wilkinson B, Moss SJ, Brana AF, Mendez C, Leadlay PF, Salas JA. (2003), "Evidence from engineered gene fusions for the repeated use of a module in a modular polyketide synthase." Chem. Commun. 2780-2782.

Olano C, Wilkinson B, Sanchez C, Moss SJ, Sheridan R, Math V, Weston AJ, Brana AF, Martin CJ, Oliynyk M, Mendez C, Leadlay PF, Salas JA. (2004a) "Biosynthesis of the angiogenesis inhibitor borrelidin by *Streptomyces parvulus* Tu4055: cluster analysis and assignment of functions." Chem. Biol., 11, 87-97.

Olano C, Moss SJ, Brana AF, Sheridan RM, Math V, Weston AJ, Mendez C, Leadlay PF, Wilkinson B, Salas JA. (2004b) "Biosynthesis of the angiogenesis inhibitor borrelidin by *Streptomyces parvulus* Tu4055: insights into nitrile formation." Mol. Microbiol., 52, 1745-1756.

Otani, A., Slike, B.M., Dorrell, H.I., Hood, J., Kinder, K., Cheresch, D.A., Schimmel, P., and Friedlander, M. (2002) A fragment of human TrpRS as a potent antagonist of ocular angiogenesis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 99:178-183.

Otoguru, K., Ui, H., Ishiyama, A., Kobayashi, M., Togashi, H., Takahashi, Y., Masuma, R., Tanaka, H., Tomado, H., Yamada, H., and Ōmura, S. (2003) In vitro and in vivo antimalarial activities of a non-glycosidic 18-membered macrolide antibiotic, borrelidin, against drug-resistant strains of *Plasmodia*. J. Antibiot. 56:727-729.

Paetz, W., and Nass, G. (1973) Biochemical and immunological characterization of threonyl-tRNA synthetase of two borrelidin-resistant mutants of *Escherichia coli* K12. Eur. J. Biochem. 35:331-337.

Perrin, R.M., Konopatskaya, O., Qiu, Y., Harper, S., Bates, D.O. and Churchill, A.J. (2005) Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti- to pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor. Diabetologia, 48, 2422-2427.

Roth T., Burger A.M., Dengler W., Willmann H. and Fiebig H.H. Human tumor cell lines demonstrating the characteristics of patient tumors as useful models for anticancer drug screening. In: Fiebig HH, Burger

AM (eds). Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development. Contrib. Oncol. 1999, 54: 145 - 156.

Ruan B, Bovee ML, Sacher M, Stathopoulos C, Poralla K, Francklyn CS, Söll D. (2005) A unique hydrophobic cluster near the active site contributes to differences in borrelidin inhibition among threonyl-tRNA synthetases. J. Biol. Chem., 280, 571-577.

Singh, S.K., Gurusiddaiah, S., and Whalen, J.W. (1985) Treponemycin, a nitrile antibiotic active against *Treponema hyodysenteriae*. Antimicrob. Agents Chemother. 27:239-245.

Smith M.B. and March J. (2001) March's advanced organic chemistry, 5th Ed, John Wiley and Sons Inc., UK

Tsuchiya, E., Yukawa, M., Miyakawa, T., Kimura, K.I., and Takahashi, H. (2001) Borrelidin inhibits a cyclin-dependent kinase (CDK), Cdc28/Cln2, of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Antibiot. 54:84-90.

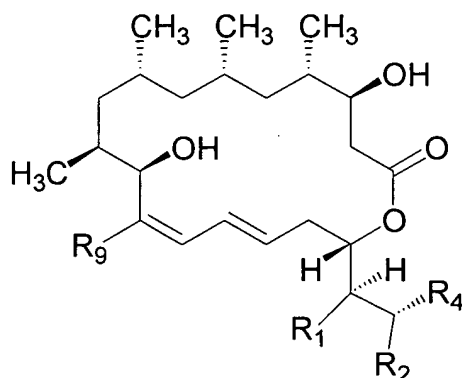
Vong, B.G., Kim, S.-H., Abraham, S. and Theodorakis, E.A. (2004) Stereoselective total synthesis of (-) -borrelidin. Angew. Chem. Int. Ed., 43, 3947-3951.

Wakabayashi, T., Kageyama, R., Naruse, N., Tsukahara, N., Funahashi, Y., Kitoh, K., and Watanabe, Y. (1997) Borrelidin is an angiogenesis inhibitor; disruption of angiogenic capilla vessels in a rat aorta matrix culture model. J. Antibiot. 50:671-676.

Wakasugi, K., T. Nakano, et al. (2005). "Oxidative Stress-Responsive Intracellular Regulation Specific for the Angiostatic Form of Human Tryptophanyl-tRNA Synthetase." Biochemistry 44(1): 225-32.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, o composto caracterizado pelo fato de ser de acordo com fórmula (I) abaixo:

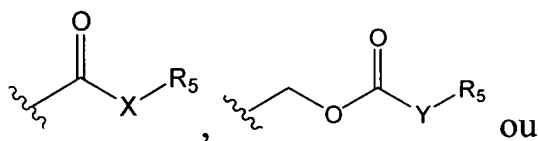


Fórmula (I)

onde:

R_1 e R_2 independentemente representam cada H, SR_3 ou um grupo alquila C1-C4 que pode ser opcionalmente substituído por um ou mais grupos selecionados a partir de OH, F, Cl ou SR_3 ; onde R_3 representa H, CH_3 ou $COCH_3$; alternativamente R_1 e R_2 junto com os carbonos com os quais eles são acoplados representam um anel de cicloalquila de 4 membros opcionalmente substituído por um ou mais átomos de halogênio ou um ou mais grupos alquila C1 a C3;

R_4 representa



-NHNHC(O) R_8 onde R_8 representa biotina, H ou um grupo alquila C1-C4 opcionalmente substituído por um ou mais grupos selecionados a partir de OH, F, Cl;

X representa -NH- ou -O-;

Y representa -NH-, -O- ou -CH₂-;

R_5 representa H ou -(CH₂)_n R_6 ,

n representa um número inteiro entre 1 e 3,

R_6 representa H, -OH, -OCH₃, -CO₂R₇, ou um grupo alquila C1 a C4 opcionalmente substituído por um ou mais grupos selecionados a partir de OH, F, Cl, -CO₂R₇, -COR₇, onde R₇ representa um grupo alquila C1-C4

5 ou R_6 representa:

i) um anel aromático de 6 membros,

ii) um anel heteroaromático de 5 a 7 membros contendo entre um e três átomos de N, S ou O,

iii) um grupo de cicloalquila de 5 a 7 membros ou

10 iv) um anel de heteroalquila de 5 a 7 membros contendo entre um e três átomos de N, S ou O,

cada um de i) a iv) acima pode ser opcionalmente substituído por um ou mais grupos selecionados a partir de CH₃, OCH₃, F, Cl ou Br; e

R_9 representa CN, CO₂H, CH₃ ou CONH₂,

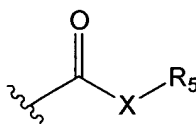
15 contanto, entretanto, que quando X representa -O- então R_5 não representa H.

2. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que R_9 representa CN.

3. Composto de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que R_1 e R_2 junto com os carbonos com os quais eles são acoplados representam um anel de cicloalquila de 4 membros.

4. Composto de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que R_1 e R_2 junto com os carbonos com os quais eles são acoplados representam um anel de cicloalquila de 4 membros, substituído apenas por R_4 .

5. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que R_4 representa



6. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que X representa –O–.

7. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que X representa –NH–.

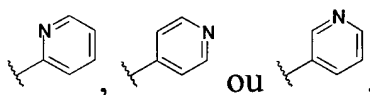
5 8. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que n representa 1.

9. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que n representa 2.

10 10. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que quando R_6 representa um anel heteroaromático de 6 membros contendo entre um e três átomos de N, S ou O.

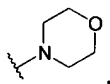
11. Composto de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que R_6 representa um anel heteroaromático de 6 membros contendo um átomo de N.

15 12. Composto de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que R_6 representa



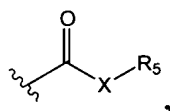
13. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que R_6 representa um anel de heteroalquila de 6 membros contendo entre um e três átomos de N, S ou O.

20 14. Composto de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que R_6 representa

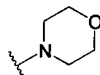


25 15. Composto de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que R_1 e R_2 junto com os carbonos com os quais eles são acoplados representam um anel de cicloalquila de 4 membros, substituído apenas por R_4 que representa

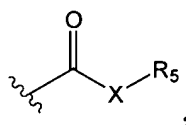
4



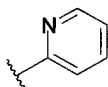
onde X representa $-\text{O}-$ e R_5 representa $-(\text{CH}_2)_n\text{R}_6$, onde n representa 2 e R_6 representa



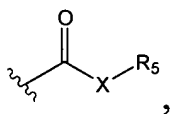
16. Composto de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que R_1 e R_2 junto com os carbonos com os quais eles são acoplados representam um anel de cicloalquila de 4 membros substituído apenas por R_4 que representa



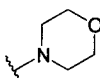
onde X representa $-\text{O}-$ e R_5 representa $-(\text{CH}_2)_n\text{R}_6$, onde n representa 2 e R_6 representa



17. Composto de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que R_1 e R_2 junto com os carbonos com os quais eles são acoplados representam um anel de cicloalquila de 4 membros substituído apenas por R_4 que representa

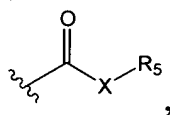


onde X representa $-\text{NH}-$ e R_5 representa $-(\text{CH}_2)_n\text{R}_6$, onde n representa 2 e R_6 representa

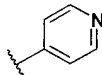


18. Composto de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que R_1 e R_2 junto com os carbonos com os quais eles são acoplados representam um anel de cicloalquila de 4 membros substituído apenas por R_4 que representa

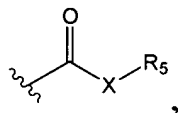
5



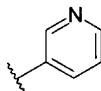
onde X representa -NH- e R_5 representa $\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{R}_6$, onde n representa 1 e R_6 representa



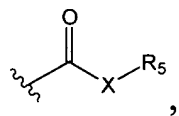
19. Composto de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que R_1 e R_2 junto com os carbonos com os quais eles são acoplados representam um anel de cicloalquila de 4 membros substituído apenas por R_4 que representa



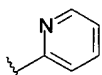
onde X representa -NH- e R_5 representa $\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{R}_6$, onde n representa 1 e R_6 representa



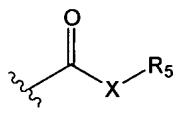
20. Composto de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que R_1 e R_2 junto com os carbonos com os quais eles são acoplados representam um anel de cicloalquila de 4 membros substituído apenas por R_4 que representa



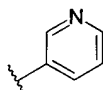
onde X representa -NH- e R_5 representa $\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{R}_6$, onde n representa 1 e R_6 representa



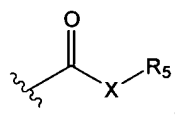
21. Composto de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que R_1 e R_2 junto com os carbonos com os quais eles são acoplados representam um anel de cicloalquila de 4 membros substituído apenas por R_4 que representa



onde X representa -NH- e R_5 representa $\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{R}_6$, onde n representa 2 e R_6 representa



22. Composto de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que R_1 e R_2 junto com os carbonos com os quais eles são acoplados representam um anel de cicloalquila de 4 membros substituído apenas por R_4 que representa



onde X representa -NH- e R_5 representa H.

23. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser:

10 17-des(ciclopentano-2-ácido carboxílico)-17-(ciclobutano-2-ácido carboxílico)borrelidina (4-(2-hidroxietila))morfolina éster;

17-des(ciclopentano-2-ácido carboxílico)-17-(ciclobutano-2-ácido carboxílico)borrelidina (2-(2-hidroxietila)piridina éster;

15 17-des(ciclopentano-2-ácido carboxílico)-17-(ciclobutano-2-ácido carboxílico)borrelidina (4-(2-aminoetila))morfolina amida;

17-des(ciclopentano-2-ácido carboxílico)-17-(ciclobutano-2-ácido carboxílico)borrelidina (4-aminometila)piridina amida;

17-des(ciclopentano-2-ácido carboxílico)-17-(ciclobutano-2-ácido carboxílico)borrelidina (3-aminometila)piridina amida;

20 17-des(ciclopentano-2-ácido carboxílico)-17-(ciclobutano-2-ácido carboxílico)borrelidina (2-aminometila)piridina amida;

17-des(ciclopentano-2-ácido carboxílico)-17-(ciclobutano-2-ácido carboxílico)borrelidina (3-(2-aminoetila))piridina amida;

17-des(ciclopentano-2-ácido carboxílico)-17-(ciclobutano-2-

ácido carboxílico)borrelidina amida;

ou um sal farmaceuticamente aceitável de qualquer um destes.

24. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, caracterizado pelo fato de ser para uso como um produto farmacêutico.

5 25. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, caracterizado pelo fato de ser para uso como um produto farmacêutico no tratamento de câncer ou malignidades de célula B.

10 26. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de compreender um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 23 junto com um ou mais diluentes ou carreadores farmaceuticamente aceitáveis.

15 27. Método de tratamento de câncer ou malignidades de célula B, caracterizado pelo fato de compreender administrar a um paciente uma quantidade eficaz de um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 23.

28. Uso de um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 23, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de um medicamento para o tratamento de câncer ou malignidades de célula B.

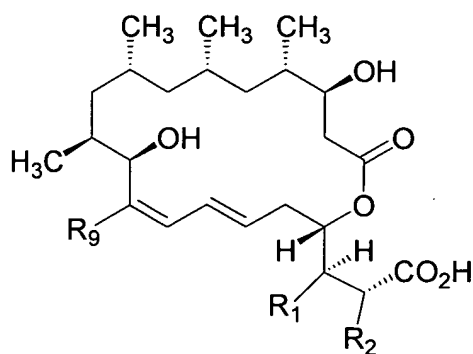
20 29. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, caracterizado pelo fato de ser para uso como um produto farmacêutico no tratamento de distúrbios oftálmicos em que angiogênese está implicada.

30. Composto de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o distúrbio oftálmico é retinopatia diabética.

25 31. Composto de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o distúrbio oftálmico é degeneração macular relacionada à idade, neovascularização corneana e retinopatia da prematuridade.

32. Processo para preparar um composto de fórmula (I) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 23, caracterizado pelo fato de compreender:

(a) reagir um composto de fórmula (II):



(II)

em que R₁, R₂ e R₉ são como definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 23,

5 ou um derivado protegido destes, usando qualquer um dos métodos descritos em (i) a (viii) abaixo:

(i) reação de um cloreto ácido formado a partir de um composto de fórmula (II) com um álcool ou amina adequada;

10 (ii) esterificação ou amidação direta de um composto de fórmula (II) na presença de carbodiimida, e uma base;

(iii) transesterificação de um éster, formado a partir de um composto de fórmula (II), com um álcool adequado;

(iv) reação de um éster de metila de um composto de fórmula (II) com uma amina adequada;

15 (v) formação de um éster ativo a partir de um composto de fórmula (II), então reação com um álcool ou amina adequada;

(vi) formação de um anidrido misturado a partir de um composto de fórmula (II), então reação com uma amina adequada;

20 (vii) redução de um anidrido misturado a partir de um composto de fórmula (II) com um hidreto metálico a um álcool;

(viii) alquilação e acilação de um álcool primário preparado a partir de um composto de fórmula (II).

ou

(b) converter um composto de fórmula (I) ou um sal deste em

outro composto de fórmula (I) ou outro sal farmaceuticamente aceitável do mesmo; ou

(c) desproteger um composto protegido de fórmula (I).

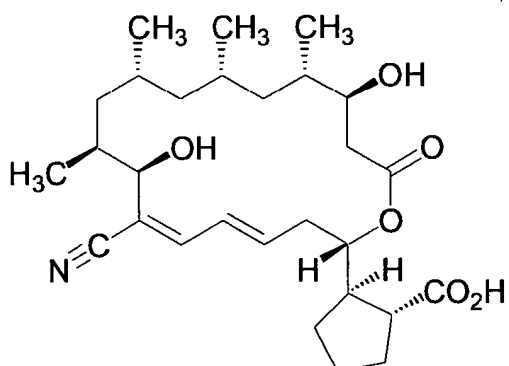
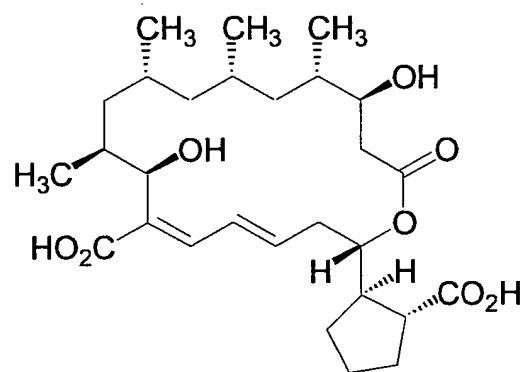
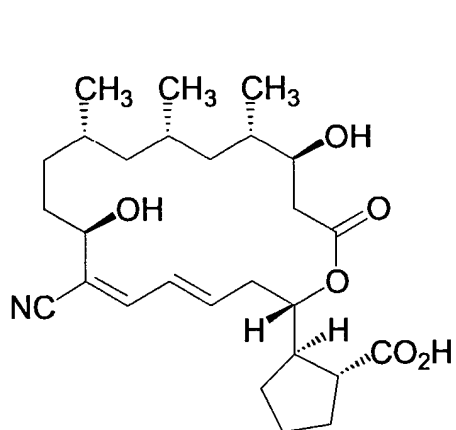
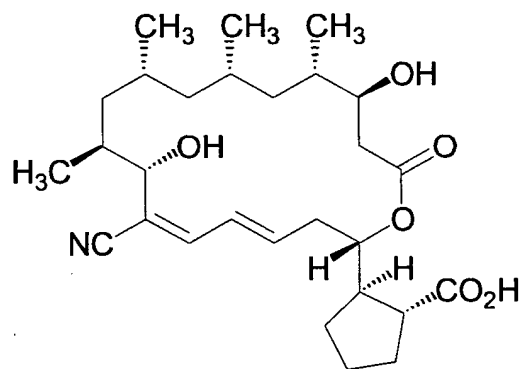
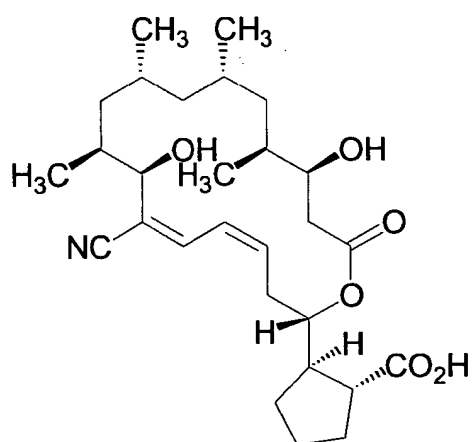
Figura 1**Borrelidina (1)****12-desnitrila-12-carboxil borrelidina (2)****10-desmetil borrelidina (3)****11-epi borrelidina (4)****14,15-cis borrelidina (5)**

Figura 2

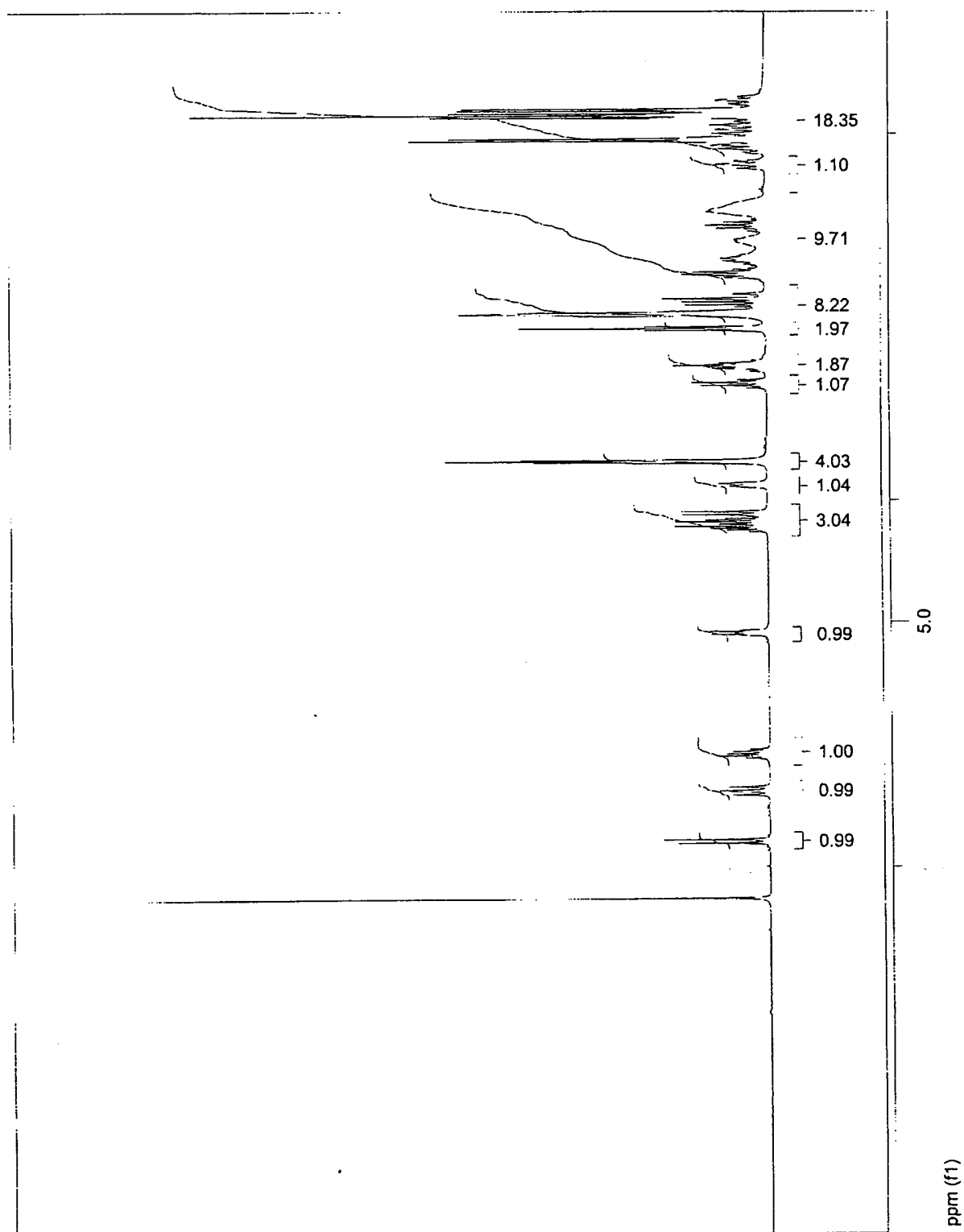


Figura 3

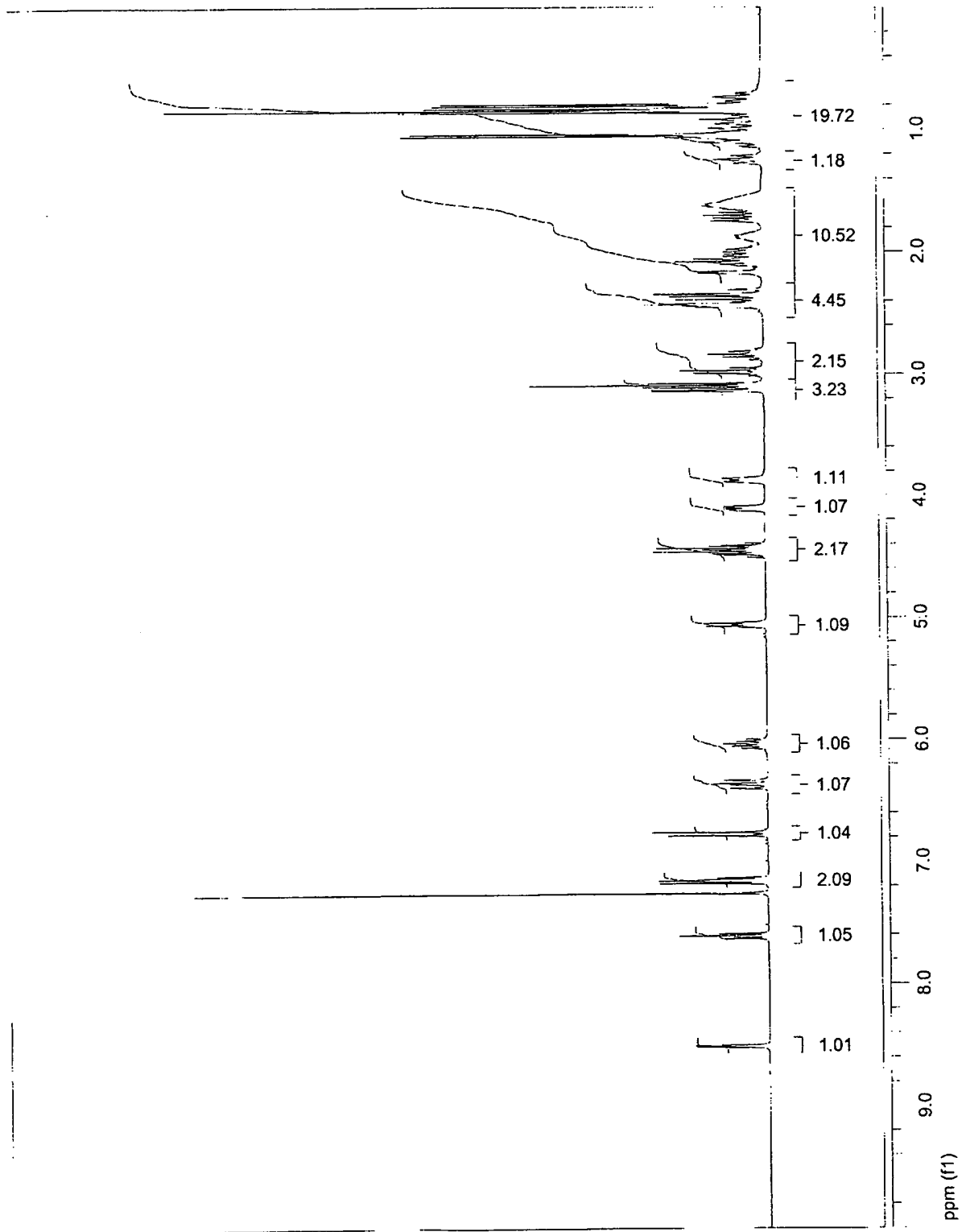


Figura 4

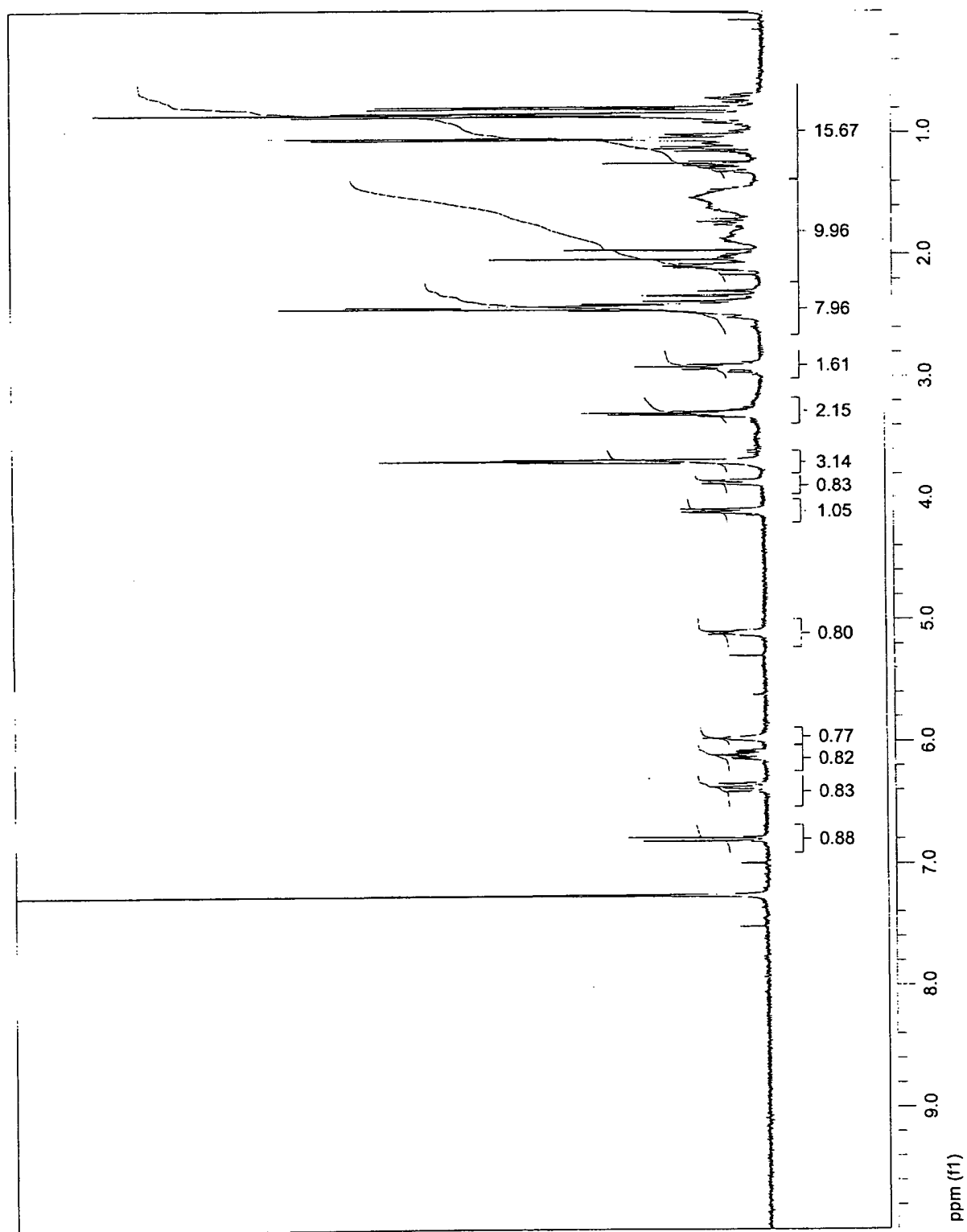


Figura 5

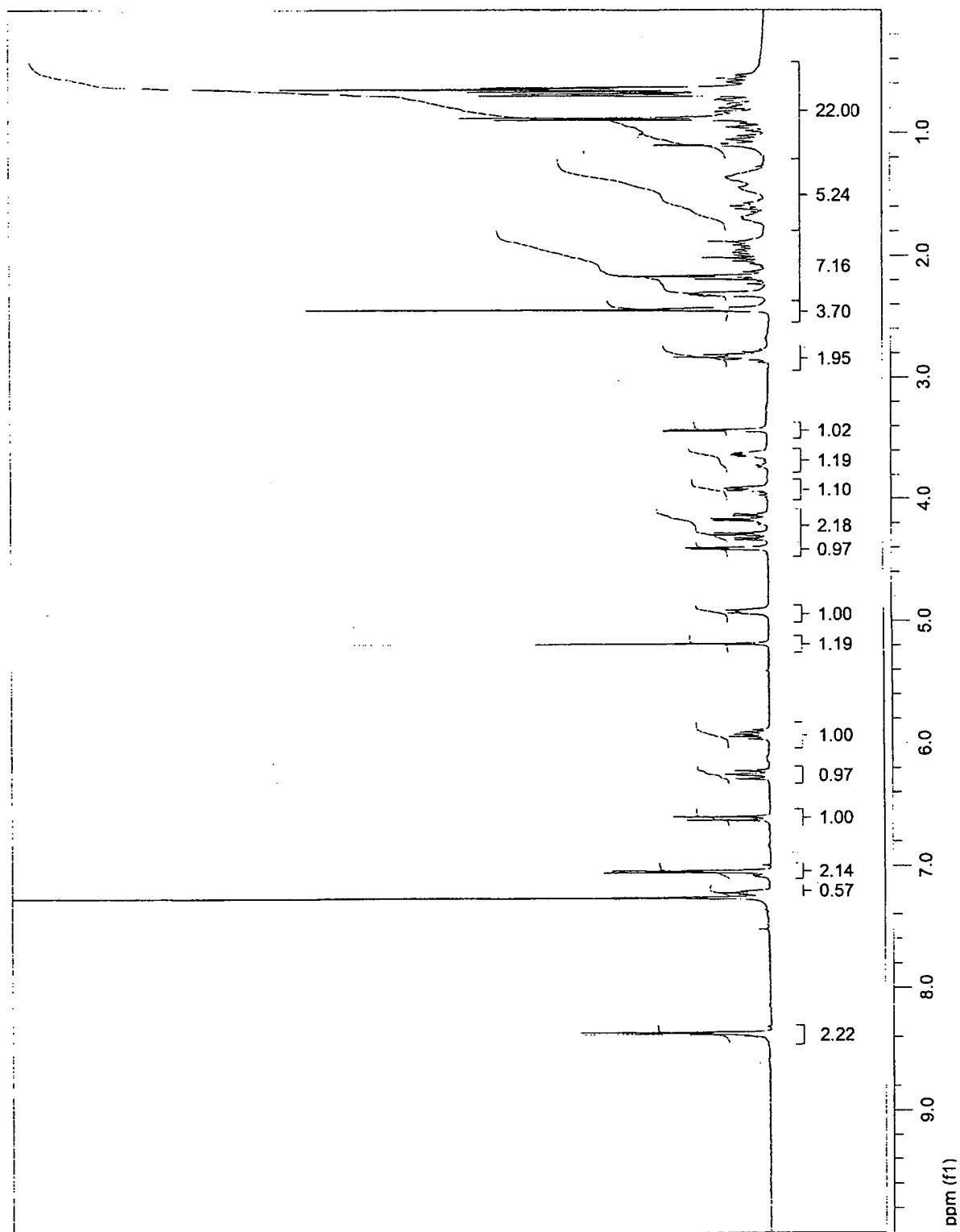


Figura 6

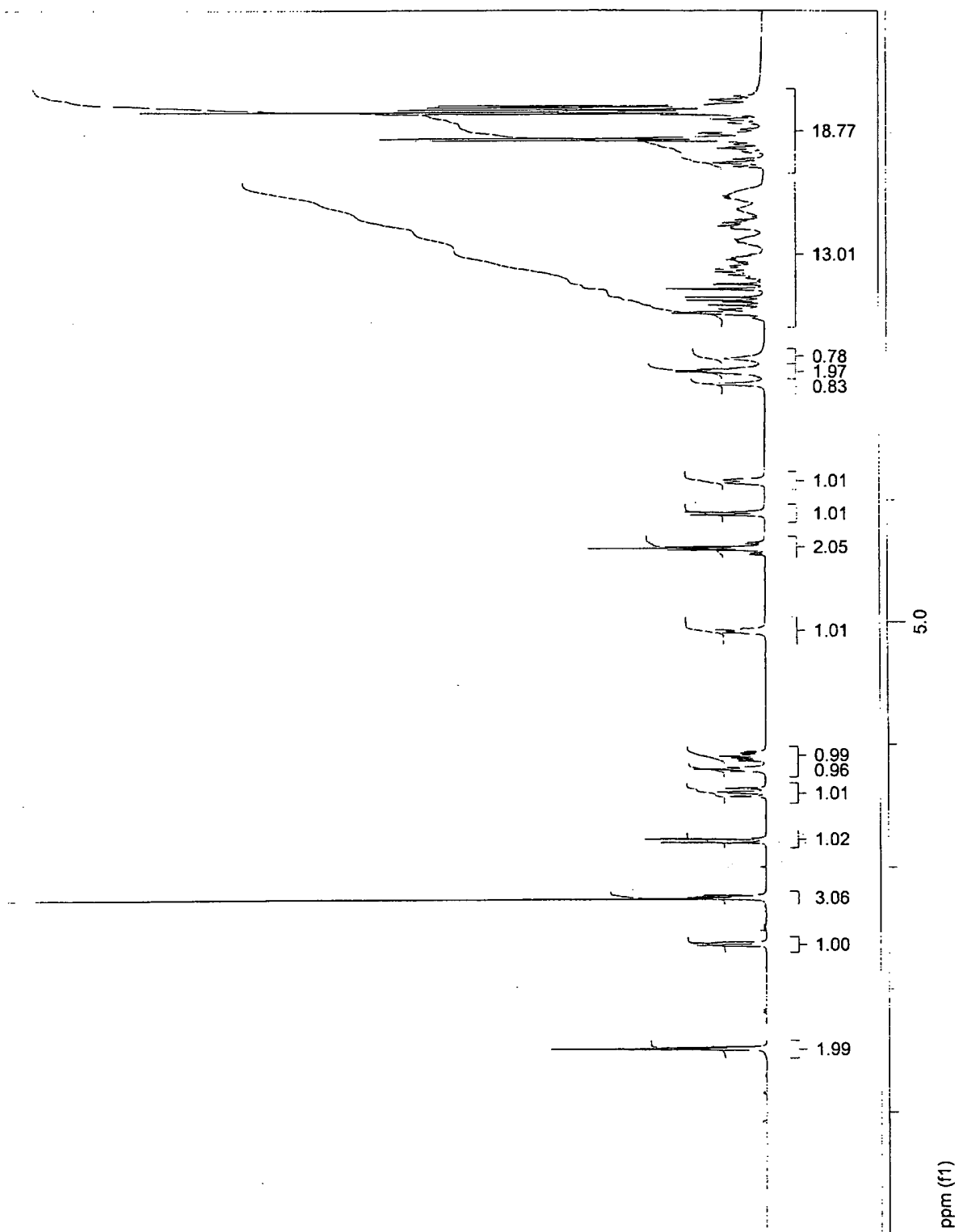


Figura 7

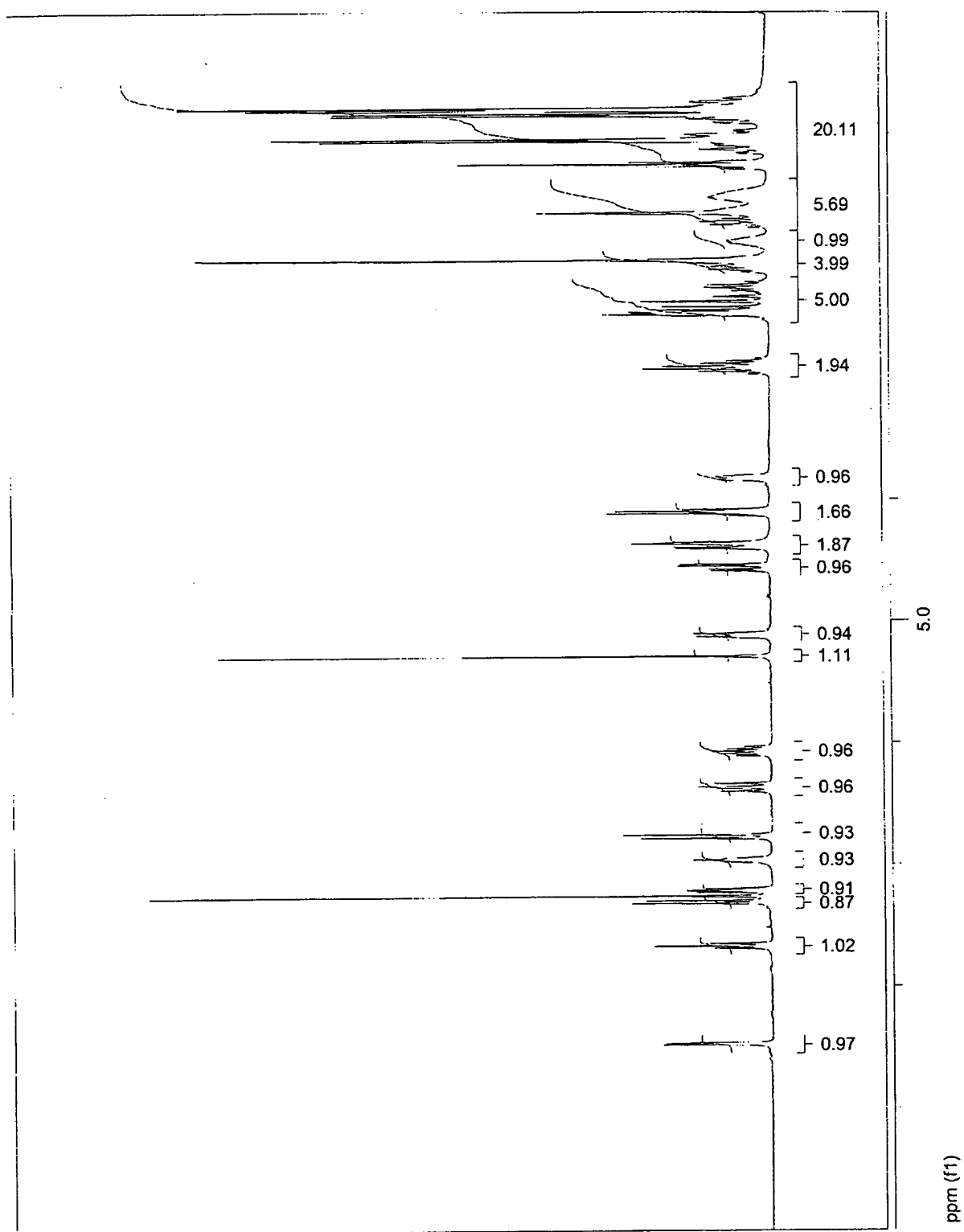


Figura 8

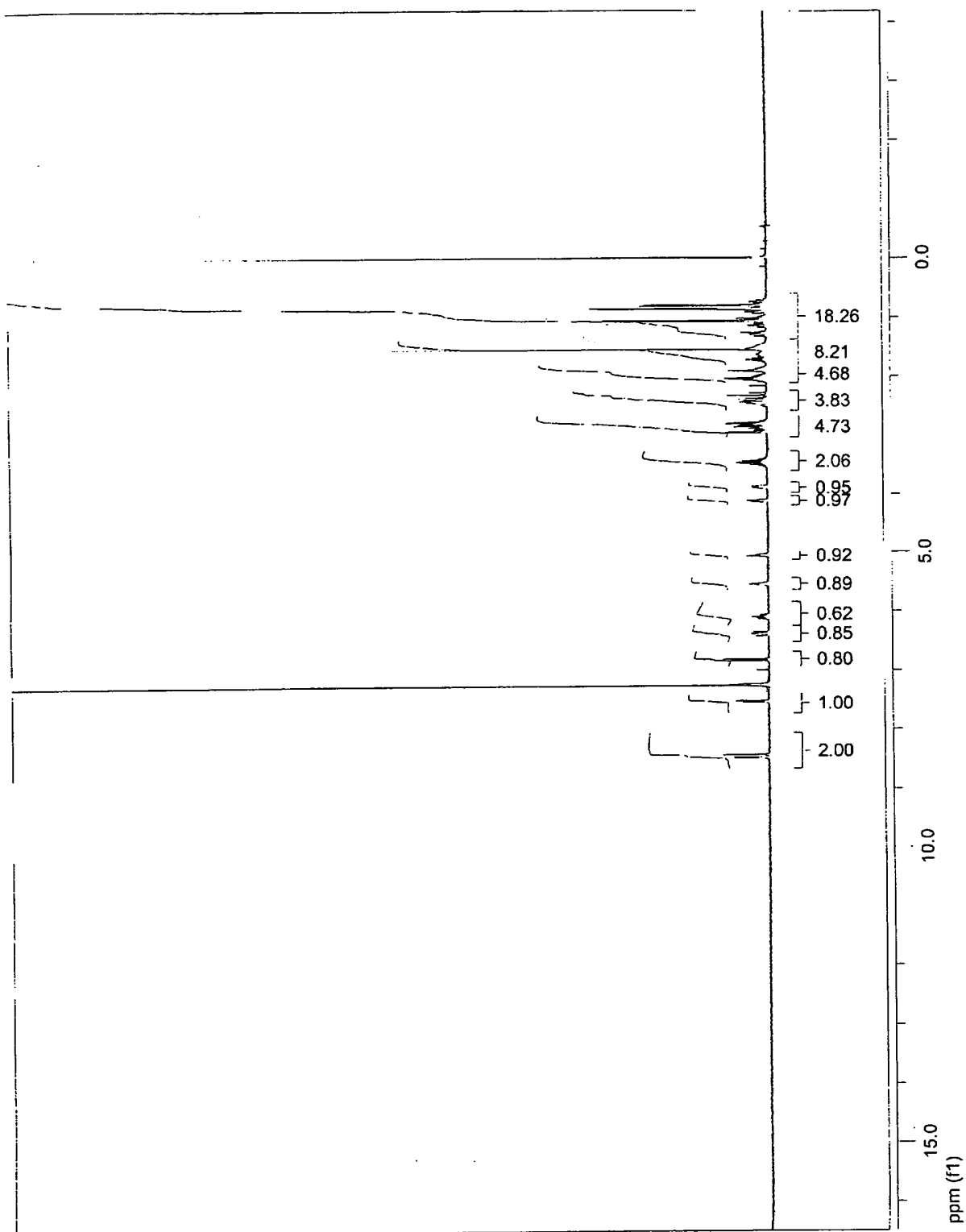


Figura 9

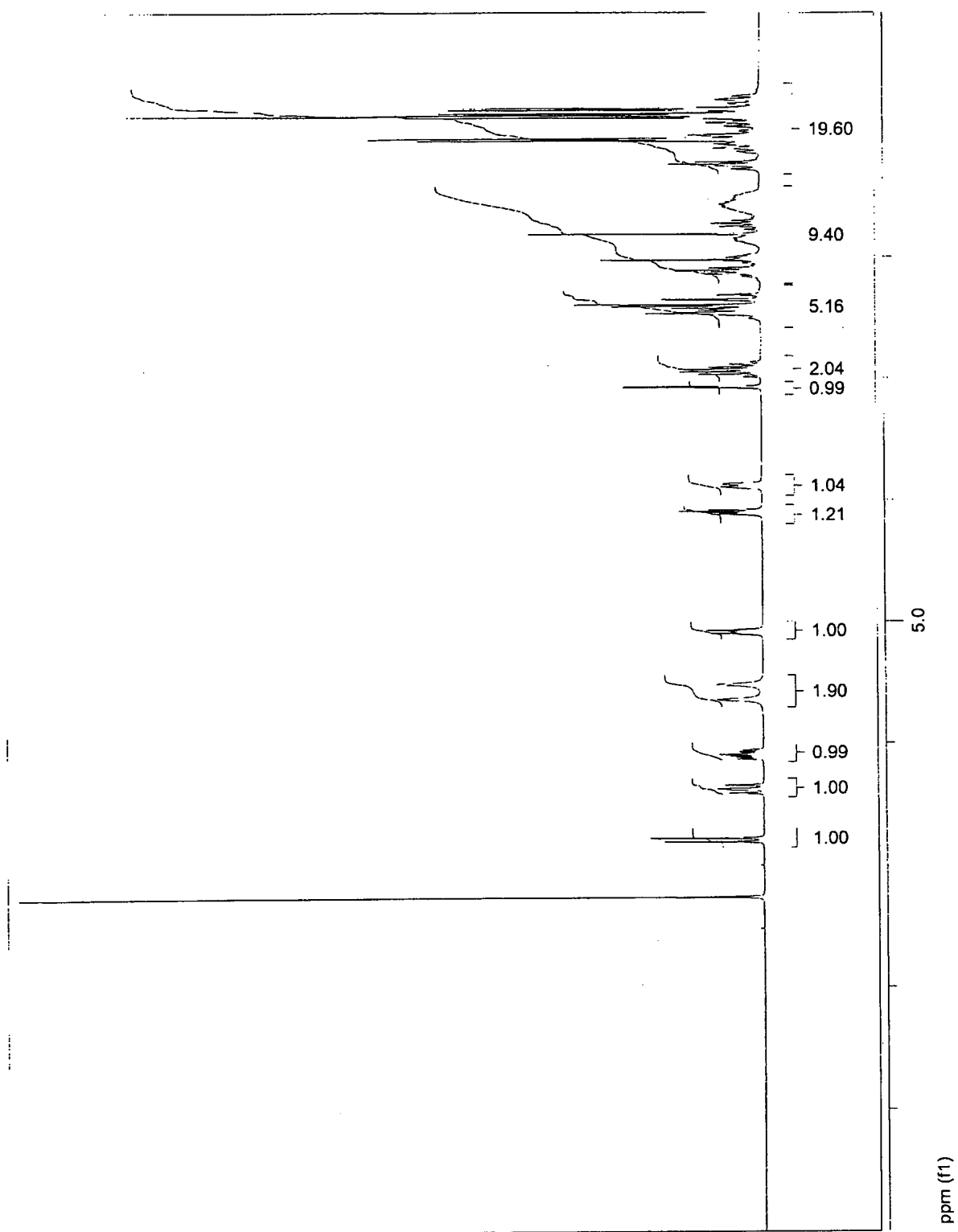
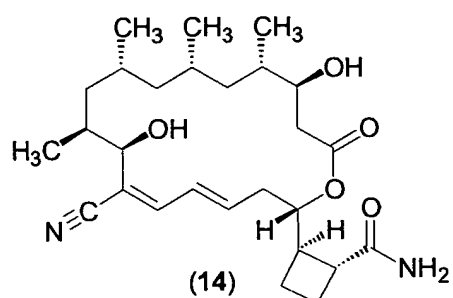
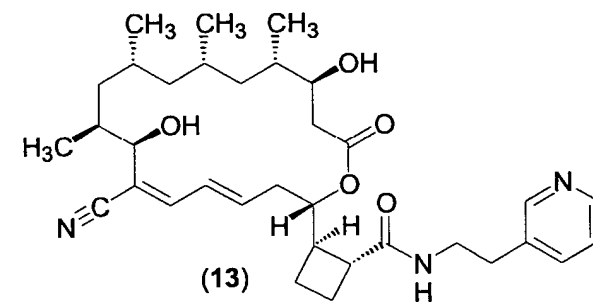
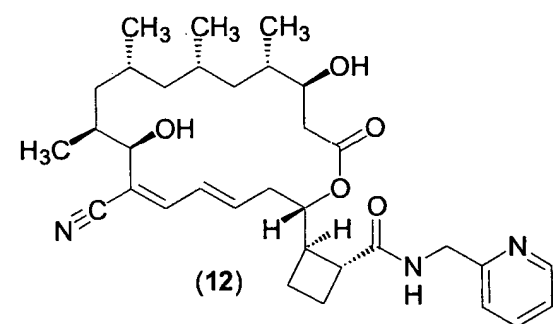
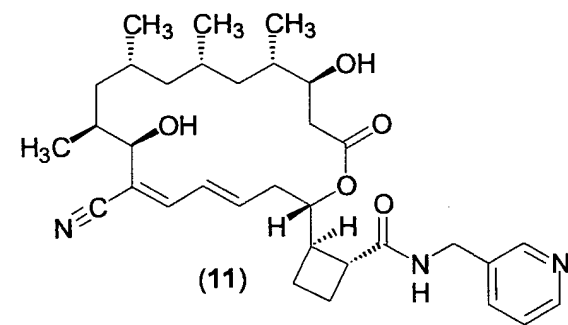
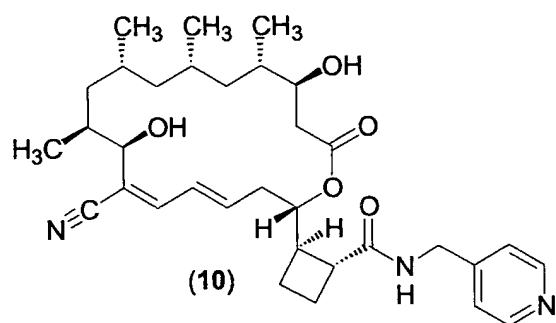
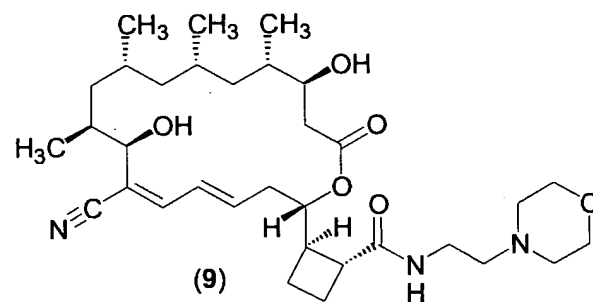
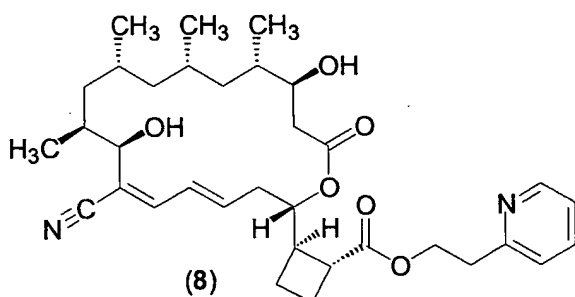
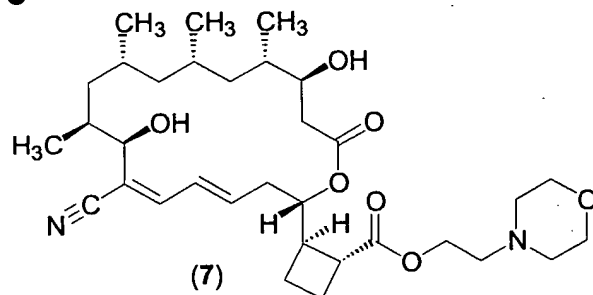
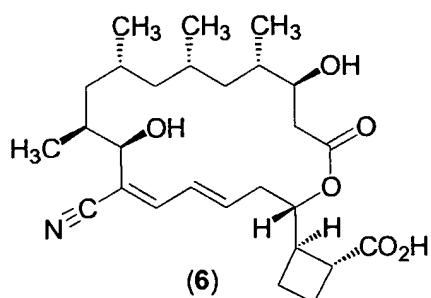


Figure 10



RESUMO

“COMPOSTO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO DE TRATAMENTO DE CÂNCER OU MALIGNIDADES DE CÉLULA B, USO DE UM COMPOSTO, E, PROCESSO PARA PREPARAR UM COMPOSTO”

A presente invenção se refere a derivados de borrelidina que são úteis em medicina, e.g. no tratamento de câncer ou malignidades de célula B, ou outras doenças nas quais angiogênese contribui para a patologia incluindo distúrbios oftálmicos tal como retinopatia diabética assim como degeneração macular relacionada à idade (AMD), neovascularização corneana e retinopatia ou prematuridade. A presente invenção também fornece métodos para a produção destes compostos e seu uso em medicina, em particular no tratamento e / ou profilaxia de câncer ou malignidades de célula B e outras doenças nas quais angiogênese está implicada no processo patogênico.