



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

(21) **PI0707264-3 A2**

(22) Data de Depósito: 22/01/2007
(43) Data da Publicação: 26/04/2011
(RPI 2103)



(51) *Int.Cl.:*
C07D 487/04

(54) Título: **AGENTES CITOTÓXICOS
COMPREENDENDO DERIVADOS DE TOMAIMICINA E
SEU USO TERAPÊUTICO**

(57) Resumo: AGENTES CITOTÓXICOS COMPREENDENDO DERIVADOS DE TOMAIMICINA E SEU USO TERAPÊUTICO A presente invenção refere-se aos novos derivados de tomamiema de fórmula 1, II, seu processo de preparação e seus usos terapêuticos.

(30) Prioridade Unionista: 25/01/2006 EP 06 290154.1

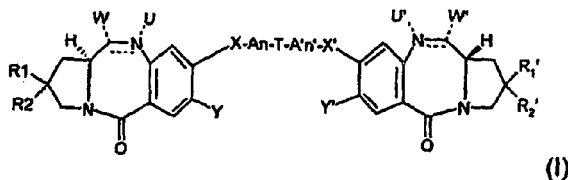
(73) Titular(es): Sanofi-Aventis

(72) Inventor(es): Alain Commercon, Hervé Bouchard, Laurence Gauzy, Ravi V. J. Chari, Robert Zhao, Wei Li, Yonghong Deng

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

(86) Pedido Internacional: PCT IB2007000142 de 22/01/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/085930 de 02/08/2007





PI0707264-3

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**AGENTES CITOTÓXICOS COMPREENDENDO DERIVADOS DE TOMAIMICINA E SEU USO TERAPÊUTICO**".

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção refere-se a novos agentes citotóxicos e seu uso terapêutico. Mais especificamente, a invenção refere-se a novos agentes citotóxicos compreendendo derivados de tomaimicina e seu uso terapêutico. Estes novos agentes citotóxicos têm uso terapêutico como um resultado de distribuição dos derivados de tomaimicina a uma população celular específica em um modelo alvejado quimicamente ligando-se o derivado de tomaimicina a um agente de ligação celular.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Muitos relatos apareceram sobre o alvejamento específico experimentado de células de tumor com conjugados de fármaco anticorpo monoclonais (Sela e outros, em *Immuno-conjugates*, 189-216 (C. Vogel, ed. 15 1987); Ghose e outros, em *Targeted Drugs* 1-22 (E. Goldberg, ed. 1983); Diener e outros, em *Antibody mediated delivery systems*, 1-23 (J. Rodwell, ed. 1988); Pietersz e outros, em *Antibody mediated delivery systems*, 25-53 (J. Rodwell, ed. 1988); Bumol e outros, em *Antibody mediated delivery systems*, 55-79 (J. Rodwell, ed. 1988); G.A. Pietersz & K. Krauer, 2, *J. Drug Targeting*, 183-215 (1994); R. V. J. Chari, 31 *Adv. Drug Delivery Revs.*, 89-104 (1998); W.A. Blattler & R.V.J. Chari, em *Anticancer Agents, Frontiers in Cancer Chemotherapy*, 317-338, ACS Symposium Series 796; e I. Ojima e outros eds, *American Chemical Society* 2001}. Todas as referências e patentes citadas aqui são incorporadas por referência.

Fármacos citotóxicos tais como metotrexato, daunorrubicina, doxorubicina, vincristina, vinblastina, melfalan, mitomicina C, e clorambucila foram conjugados em uma variedade de anticorpos monoclonais de murino. Em alguns casos, as moléculas de fármaco foram ligadas às moléculas de anticorpo através de uma molécula portadora intermediária tal como albumina de soro (Garnett e outros, 46, *Cancer Res.* 2407-2412 (1986); Ohkawa e outros 23, *Cancer Immunol. Immunother.* 81-86 (1986); Endo e outros, 47

Cancer Res. 1076-1080 (1980)), dextrano (Hurwitz e outros, 2 *Appl. Biochem.* 25-35 (1980); Manabi e outros, 34 *Biochem. Pharmacol.* 289-291 (1985); Dillman e outros, 46 *Cancer Res.*, 4886-4891 (1986); Shoal e outros, 85, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 8276-8280 (1988)), ou ácido poliglutâmico (Tsukada e outros, 73, *J. Natl. Canc. Inst.*, 721-729 (1984); Kato e outros 27 *J. Med. Chem.*, 1602-1607 (1984); Tsukada e outros, 52, *Ampl. J. Cancer*, 111-116 (1985)).

Uma ampla série de tecnologias ligantes foi empregada para a preparação de tais imunocombinados e tanto ligantes cliváveis quanto não cliváveis foram investigados. Na maioria dos casos, o potencial citotóxico total dos fármacos poderia apenas ser observado, entretanto, se as moléculas de fármaco puderem ser liberadas dos combinados em forma não modificada no sítio-alvo.

Um dos ligantes cliváveis que foi empregado para a preparação de combinados de fármaco de anticorpo é um ligante lábil ao ácido baseado em ácido *cis*-aconítico que tira vantagem do ambiente ácido de diferentes compartimentos intracelulares tais como os endossomas encontradas durante endocitose mediada por receptor e as lisossomas. Shen e Ryser introduziram este método para a preparação de combinados de daunorrubicina com veículos macromoleculares (102 *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1048-1054 (1981)). Yang e Reisfeld usaram a mesma técnica para combinar daunorrubicina em um anticorpo antimelanoma (80 *J. Natl. Canc. Inst.* 1154-1159 (1988)). Dillman e outros também usaram um ligante lábil ao ácido em um modelo similar para preparar combinados de daunorrubicina com um anticorpo anticélula T (48 *Cancer Res.* 6097-6102 (1988)).

Um método alternativo, explorado por Trouet e outros, envolveu ligação de daunorrubicina a um anticorpo por meio de um braço de espaçador de peptídeo (79 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 626-629 (1982)). Isto foi realizado sob a premissa de que o fármaco livre possa ser liberado de um tal combinado pela ação de peptidases lisossomais.

Testes de citotoxicidade *in vitro*, entretanto, revelaram que combinados de fármaco de anticorpo raramente alcançam a mesma potência

citotóxica como os fármacos não conjugados livres. Isto sugeriu que mecanismos pelos quais moléculas de fármaco são liberadas dos anticorpos podem ser muito ineficientes. Na área de imunotoxinas, conjugados formados por meio de pontes de dissulfeto entre os anticorpos monoclonais e toxinas de proteína cataliticamente ativas foram mostrados ser mais citotóxicos do que conjugados contendo outros ligantes. Vide, Lambert e outros, 260 *J. Biol. Chem.* 12035-12041 (1985); Lambert e outros, em *Immunotoxins* 175-209 (A. Frankel, ed. 1988); Ghetie e outros, 48, *Cancer Res.* 2610-2617 (1988). Isto foi atribuído à alta concentração intracelular de glutatona contribuindo para a clivagem eficiente da ligação de dissulfeto entre uma molécula de anticorpo e uma toxina. Apesar disto, existem apenas alguns exemplos relatados do uso de pontes de dissulfeto para a preparação de conjugados entre fármacos e macromoléculas. Shen e outros (260, *J. Biol. Chem.* 10905-10908 (1985)) descreveram a conversão de metotrexato em um derivado de mercaptoetilamida seguida por conjugação com poli-D-lisina por meio de uma ligação de dissulfeto. Outro relatório descreveu a preparação de um conjugado do trissulfeto contendo o fármaco tóxico caliqueamicina com um anticorpo (Hinman e outros., 53 *Cancer Res.* 3336-3342 (1993)).

Uma razão para a falta de conjugados de fármaco de anticorpo ligados por dissulfeto é a indisponibilidade de fármacos citotóxicos que possuem uma porção contendo átomo de enxofre que pode ser facilmente utilizada para ligar o fármaco a um anticorpo por meio de uma ponte de dissulfeto. Além disso, a modificação química de fármacos existentes é difícil sem diminuir seu potencial citotóxico.

Outra desvantagem principal com conjugados de fármaco de anticorpo existentes é sua incapacidade de liberar uma concentração suficiente de fármaco para o sítio-alvo por causa do número limitado de antígenos alvejados e da citotoxicidade relativamente moderada de fármacos cancerostáticos como metotrexato, daunorrubicina, e vincristina. A fim de alcançar citotoxicidade significativa, ligação de um grande número de moléculas de fármaco, diretamente ao anticorpo ou através de uma molécula portadora polimérica, torna-se necessária. Entretanto, tais anticorpos pesadamente

modificados freqüentemente exibem ligação prejudicada ao antígeno-alvo e depuração *in vivo* rápida da corrente sanguínea.

A despeito das dificuldades descritas acima, agentes citotóxicos úteis compreendendo porções de ligação celular e o grupo de fármacos citotóxicos conhecidos como maitansinóides foram relatados (USP 5.208.020, USP 5.416.064, e R. V. J. Chari, 31 *Advanced Drug Delivery Reviews* 89-104 (1998)). Similarmente, agentes citotóxicos úteis compreendendo porções de ligação celular e análogos e derivados do antibiótico antitumor potente CC-1065 também foram relatados (USP 5.475.092, USP 5.585.499 e USP 6.756.397).

Derivados de tomamicina são pirrol[1,4]benzodiazepínicos (PBDs), uma classe conhecida de compostos que exerce suas propriedades biológicas covalentemente ligando-se ao N2 de guanina no menor sulco de DNA. PBDs incluem vários aglutinantes de menor sulco tais como antramicina, neotramicina e DC-81. Atividade antitumor de tomamicina é entretanto limitada por causa de sua toxicidade não específica com respeito às células normais. Desta maneira existe uma necessidade de aumentar a atividade terapêutica, e diminuir os efeitos tóxicos não específicos de compostos de tomamicina. Os presentes inventores mostraram que esta necessidade pode ser alcançada por distribuição alvejada de compostos de tomamicina por ligação deles aos agentes de ligação celular. Adicionalmente, existe uma necessidade de desenvolver derivados de tomamicina que são solúveis e estáveis em soluções aquosas. Além disso, tomamicina não é suficientemente potente para ser utilizada em conjugados de agentes de ligação celular.

Recentemente, alguns novos derivados de PBD e sua atividade antitumor em modelos pré-clínicos foram descritos (WO 00/12508 e WO 2005/085260). Entretanto, experiências clínicas iniciais em seres humanos indicaram que compostos desta classe são severamente tóxicos, com base na dose muito baixa que pode ser administrada aos seres humanos (I. Puzanov, Proc. AACR-NCI-EORTC International Conference, Philadelphia, USA 2005, Abstract N° B117). Desta maneira, é desejado fornecer derivados alternativos que são mais potentes e/ou podem ser ligados aos agentes de

ligação celular.

Conseqüentemente, um método de tratar doenças com derivados de tomamicina em que seus efeitos colaterais são reduzidos sem comprometer sua citotoxicidade é grandemente necessário.

5 SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Como descrito em uma primeira modalidade, um objetivo da presente invenção é fornecer derivados de tomamicina que são altamente tóxicos e que podem ainda ser eficazmente utilizados no tratamento de muitas doenças.

10 Outro objetivo da presente invenção é fornecer novos derivados de tomamicina, opcionalmente ligáveis ou ligados a um agente de ligação celular.

Em uma segunda modalidade, a presente invenção fornece uma composição terapêutica compreendendo:

15 (a) uma quantidade eficaz de um ou mais derivados de tomamicina opcionalmente ligáveis ou ligados a um agente de ligação celular, e
(b) um veículo, diluente, ou excipiente farmacologicamente aceitável.

20 Em uma terceira modalidade, a presente invenção fornece um método de matar populações celulares selecionadas compreendendo contactar células-alvo ou tecido contendo células-alvo, com uma quantidade citotóxica de um agente citotóxico compreendendo um ou mais derivados de tomamicina, opcionalmente ligáveis ou ligados a um agente de ligação celular.

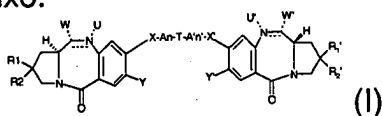
DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

25 Esta invenção é baseada na síntese de novos derivados de tomamicina que retêm alta citotoxicidade e que podem ser eficazmente ligados aos agentes de ligação celular. Foi previamente mostrado que a ligação de fármacos altamente citotóxicos aos anticorpos utilizando-se uma ligação clivável, tal como uma ligação de dissulfeto, assegura a liberação de fármacos totalmente ativos dentro da célula, e tais conjugados são citotóxicos de
30 uma maneira específica de antígeno (US 6.340.701; US 6.372.738; US 6.436.931). Entretanto, a técnica revela que é extremamente difícil modificar

fármacos existentes sem diminuir seu potencial citotóxico. A invenção descrita supera este problema modificando-se os derivados de tomaimicina descritos com porções químicas. Como um resultado, os novos derivados de tomaimicina descritos preservam, e em alguns casos podem ainda realçar a potência citotóxica de derivados de tomaimicina. Os complexos de derivado de tomaimicina de agente de ligação celular permitem a medida total da ação citotóxica dos derivados de tomaimicina a ser aplicada em um modelo alvejado contra células indesejáveis apenas, portanto, evitando efeitos colaterais devido ao dano às células saudáveis não alvejadas. Desta maneira, a invenção fornece agentes úteis para a eliminação de células doentes ou anormais que devem ser mortas ou lisadas tais como células de tumor (particularmente células de tumor sólido).

O agente citotóxico de acordo com a presente invenção compreende um ou mais derivados de tomaimicina, opcionalmente ligáveis ou ligados a um agente de ligação celular por meio de um grupo de ligação. O grupo de ligação é parte de uma porção química que é covalentemente ligada a um derivado de tomaimicina através de métodos convencionais. Em uma modalidade preferida, a porção química pode ser covalentemente ligada ao derivado de tomaimicina por meio de uma ligação de dissulfeto.

Os derivados de tomaimicina úteis na presente invenção têm a fórmula (I) mostrada abaixo:



em que

---- representa uma ligação simples opcional;

25 — representa uma ligação simples ou uma ligação dupla;

contanto que quando — representar uma ligação simples, U e U', iguais ou diferentes, independentemente representem H, e W e W', iguais ou diferentes, são independentemente selecionados do grupo consistindo em OH, um éter tal como -OR, um éster (por exemplo um acetato), tal como -OCOR, um carbonato tal como -OCOOR, um carbamato tal como -

30 OCONRR', um carbamato cíclico, de modo que N10 e C11 sejam uma parte

do ciclo, uma uréia tal como -NRCONRR', um tiocarbamato tal como -OCSNHR, um tiocarbamato cíclico de modo que N10 e C11 sejam uma parte do ciclo, -SH, um sulfeto tal como -SR, um sulfóxido tal como -SOR, uma sulfona tal como -SOOR, um sulfonato tal como -SO₃⁻, uma sulfonamida tal como -NRSOOR, uma amina tal como -NRR', amina opcionalmente cíclica de modo que N10 e C11 sejam uma parte do ciclo, um derivado de hidroxilamina tal como -NROR', uma amida tal como -NRCOR, um azido tal como -N₃, um ciano, um halo, um trialkil ou triarilfosfônio, um grupo derivado de aminoácido; Preferivelmente W e W' são iguais ou diferentes e são OH, O-Me, OEt, NHCONH₂, SMe;

5 e quando $\overset{\text{----}}{\text{---}}$ representar uma ligação dupla, U e U' estejam ausentes e W e W' representem H;

R1, R2, R1', R2' são iguais ou diferentes e independentemente escolhidos de Haleto ou Alquila opcionalmente substituída por um ou mais Hal, CN, NRR', CF₃, OR, Arila, Het, S(O)_qR, ou R1 e R2 e R1' e R2' formam juntos uma ligação dupla contendo grupo =B e =B' respectivamente.

15 Preferivelmente, R1 e R2 e R1' e R2' formam juntos uma ligação dupla contendo grupo =B e =B' respectivamente.

B e B' são iguais ou diferentes e independentemente escolhidos de Alquenila sendo opcionalmente substituída por um ou mais Hal, CN, NRR', CF₃, OR, Arila, Het, S(O)_qR ou B e B' representam um átomo de oxigênio.

Preferivelmente, B=B'.

Mais preferivelmente, B=B'= =CH₂ ou =CH-CH₃,

25 X, X' são iguais ou diferentes e independentemente escolhidos de um ou mais -O-, -NR-, -(C=O)-, -S(O)_q-.

Preferivelmente, X=X'.

Mais preferivelmente, X=X'=O.

A, A' são iguais ou diferentes e independentemente escolhidos de Alquila ou Alquenila opcionalmente contendo um átomo de oxigênio, nitrogênio ou enxofre, cada qual sendo opcionalmente substituído por um ou mais Hal, CN, NRR', CF₃, OR, S(O)_qR, Arila, Het, Alquila, Alquenila.

Preferivelmente, $A=A'$.

Mais preferivelmente, $A=A'$ =alquila não-substituída linear.

Y, Y' são iguais ou diferentes e independentemente escolhidos de H, OR;

5 Preferivelmente, $Y=Y'$.

Mais preferivelmente, $Y=Y'$ =OAlquila, mais preferivelmente OMetila.

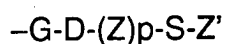
T é -NR-, -O-, -S(O)_q-, ou uma heteroarila, heterocíclica, cicloalquila, ou arila de 4 a 10 membros, cada qual sendo opcionalmente substituído por um ou mais Hal, CN, NRR', CF₃, R, OR, S(O)_qR, e/ou ligante(s), ou uma Alquila ramificada, opcionalmente substituída por um ou mais Hal, CN, NRR', CF₃, OR, S(O)_qR e/ou ligante(s), ou uma Alquila linear substituída por um ou mais Hal, CN, NRR', CF₃, OR, S(O)_qR e/ou ligante(s).

15 Preferivelmente, T é uma arila ou heteroarila de 4 a 10 membros, mais preferivelmente fenila ou piridila, opcionalmente substituída por um ou mais ligante(s).

O referido ligante compreende um grupo de ligação. Grupos de ligação adequados são bem-conhecidos na técnica e incluem tiol, sulfeto, grupos dissulfeto, grupos tioéter, grupos lábeis ao ácido, grupos fotolábeis, grupos lábeis à peptidase e grupos lábeis à esterase. Preferidos são grupos dissulfeto e grupos tioéter.

25 Quando o grupo de ligação for um grupo contendo tiol-, sulfeto (ou assim chamado tioéter -S-) ou dissulfeto (-S-S-) -, a cadeia lateral transportando o tiol, o grupo sulfeto ou dissulfeto pode ser linear ou ramificada, aromática ou heterocíclica. Alguém versado na técnica pode facilmente identificar cadeias laterais adequadas.

Preferivelmente, o referido ligante é de fórmula:



onde

30 G é uma ligação simples ou dupla, -O-, -S- ou -NR-;

D é uma ligação simples ou -E-, -E-NR-, -E-NR-F-, -E-O-, -E-O-F-, -E-NR-CO-, -E-NR-CO-F-, -E-CO-, -CO-E-, -E-CO-F-, -E-S-, -E-S-F-, -E-

NR-C-S-, -E-NR-CS-F-;

onde E e F são iguais ou diferentes e são independentemente escolhidos de $-(OCH_2CH_2)_i$ Alquil $(OCH_2CH_2)_j$ -, -Alquil $(OCH_2CH_2)_i$ -Alquil-, $-(OCH_2CH_2)_i$ -, $-(OCH_2CH_2)_i$ Cicloalquil $(OCH_2CH_2)_j$ -, $-(OCH_2CH_2)_i$ Heterocíclica $(OCH_2CH_2)_j$ -, $-(OCH_2CH_2)_i$ Aril $(OCH_2CH_2)_j$ -, $-(OCH_2CH_2)_i$ Heteroaril $(OCH_2CH_2)_j$ -, -Alquil- $(OCH_2CH_2)_i$ Alquil $(OCH_2CH_2)_j$ -, -Alquil- $(OCH_2CH_2)_i$ -, -Alquil- $(OCH_2CH_2)_i$ Cicloalquil $(OCH_2CH_2)_j$ -, -Alquil $(OCH_2CH_2)_i$ Heterocíclica $(OCH_2CH_2)_j$ -, -Alquil- $(OCH_2CH_2)_i$ Aril $(OCH_2CH_2)_j$ -, -Alquil $(OCH_2CH_2)_i$ Heteroaril $(OCH_2CH_2)_j$ -, -Cicloalquil-Alquil-, -Alquil-Cicloalquil-, -Heterocíclica-Alquil-, -Alquil-Heterocíclica-, -Alquil-Aril-, -Aril-Alquil-, -Alquil-Heteroaril-, -Heteroaril-Alquil- linear ou ramificado;

onde i e j, idênticos ou diferentes são números inteiros e independentemente escolhidos de 0, 1 a 2000;

Z é -Alquil- linear ou ramificado;

p é 0 ou 1;

Z' representa H, um grupo de proteção de tiol tal como COR, R₂₀ ou SR₂₀, em que R₂₀ representa H, metila, Alquila, Cicloalquila opcionalmente substituída, arila, heteroarila ou heterocíclica, contanto que quando Z' for H, o referido composto esteja em equilíbrio com o composto correspondente formado por ciclização intramolecular resultando de adição do grupo tiol -SH na ligação de imina -NH= de uma das porções PBD.

n, n', iguais ou diferentes são 0 ou 1.

q é 0, 1 ou 2.

R, R' são iguais ou diferentes e independentemente escolhidos de H, Alquila, Arila, cada qual sendo opcionalmente substituída por Hal, CN, NRR', CF₃, R, OR, S(O)_qR, Arila, Het;

ou seus sais, hidratos, ou sais hidratados farmacologicamente aceitáveis, ou as estruturas cristalinas polimórficas destes compostos ou seus isômeros óticos, racematos, diastereômeros ou enantiômeros.

A presente invenção refere-se às seguintes modalidades preferidas ou qualquer combinação de qualquer uma delas:

- G é uma ligação simples ou -O- ou -NR-;

- G é -O-;

- D é uma ligação simples ou -E-, -E-NR-CO-, -ECO-, -CO-E-;
- D é -E-, -E-NR-CO-;
- D é -E-NR-CO-;
- E é -Alquil- linear ou ramificada, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_t$ ou -Alquil-

5 Heterocíclica;

- E é -Alquil- linear ou ramificada;
- Z é $-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$;
- p é 0 ou 1;
- Z' é H ou SR_{20} , em que R_{20} representa Alquila, arila, heterocí-

10 clíca ou heteroarila;

- Z' é H ou SR_{20} , em que R_{20} representa Alquila.

Exemplos específicos dos ligantes contendo tiol, sulfeto ou disulfeto incluem

- $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
- 15 - $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{17}=\text{CR}_{18})(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_y(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
- $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{NR}_{19}\text{CO})(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
- $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{OCO})(\text{R}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
- $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CO})(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
- $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CONR}_{19})(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
- 20 - $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t$ -fenil-CO $(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$, - $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t$ -fúril-CO $(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$, -
 $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t$ -oxazolil-CO $(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$, - $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t$ -tiazolil-CO $(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$, -
 $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t$ -tienil-CO $(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$, - $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t$ -imidazolil-CO $(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$, -
 $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t$ -morfolino-CO $(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$, - $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t$ -piperazino-
CO $(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$, - $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t$ -N-metilpiperazin--CO $(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$,
- 25 - $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t$ -fenil-QSZ', - $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t$ -fúril-QSZ', - $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t$ -oxazolil-QSZ', -
 $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t$ -tiazolil-QSZ', - $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t$ -tienil-QSZ', - $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t$ -imidazolil-QSZ', -
 $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t$ -morfolino-QSZ', - $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t$ -piperazino-QSZ', - $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t$ -
N-metilpiperazino-QSZ', ou - $\text{O}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
- $\text{O}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{NR}_{19}\text{CO})(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
- 30 - $\text{O}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{17}=\text{CR}_{18})(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_t(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
- O-fenil-QSZ', -O-fúril-QSZ', -O-oxazolil-QSZ', -O-tiazolil-QSZ', -O-tienil-
QSZ', -O-imidazolil-QSZ', -O-morfolino-QSZ', -O-piperazino-QSZ',

- O-N-metilpiperazino-QSZ', $-OCO(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}CO)_v(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 $-OCO-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 $-OCONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$, -OCO-fenil-QSZ', -OCO-furil-QSZ', -OCO-oxazolil-QSZ', -OCO-tiazolil-QSZ', -OCO-tienil-QSZ', -OCO-imidazolil-QSZ',
5 -OCO-morfolino-QSZ', -OCO-piperazino-QSZ', -OCO-N-metilpiperazino-QSZ', ou
 $-CO(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 $-CO-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 $-CONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
10 -CO-fenil-QSZ', -CO-furil-QSZ', -CO-oxazolil-QSZ', -CO-tiazolil-QSZ', -CO-tienil-QSZ', -CO-imidazolil-QSZ', -CO-morfolino-QSZ', -CO-piperazino-QSZ', -CO-piperidino-QSZ', -CO-N-metilpiperazino-QSZ',
 $-NR_{19}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 $-NR_{19}CO(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
15 $-NR_{19}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 $-NR_{19}CO(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 $-NR_{19}CONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 $-NR_{19}CONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
- $NR_{19}CO$ -fenil-QSZ', - $NR_{19}CO$ -furil-QSZ', - $NR_{19}CO$ -oxazolil-QSZ', - $NR_{19}CO$ -tiazolil-QSZ', - $NR_{19}CO$ -tienil-QSZ', - $NR_{19}CO$ -imidazolil-QSZ', - $NR_{19}CO$ -morfolino-QSZ', - $NR_{19}CO$ -piperazino-QSZ', - $NR_{19}CO$ -piperidino-QSZ',
20 - $NR_{19}CO$ -N-metilpiperazino-QSZ', - NR_{19} -fenil-QSZ', - NR_{19} -furil-QSZ', - NR_{19} -oxazolil-QSZ', - NR_{19} -tiazolil-QSZ', - NR_{19} -tienil-QSZ', - NR_{19} -imidazolil-QSZ', - NR_{19} -morfolino-QSZ', - NR_{19} -piperazino-QSZ', - NR_{19} -piperidino-QSZ',
25 - NR_{19} -N-metilpiperazino-QSZ', - $NR_{19}CO$ - NR_{12} -fenil-QSZ', - $NR_{19}CO$ - NR_{12} -oxazolil-QSZ', - $NR_{19}CO$ - NR_{12} -tiazolil-QSZ', - $NR_{19}CO$ - NR_{12} -tienil-QSZ', - $NR_{19}CO$ - NR_{12} -piperidino-QSZ',
 $-S(O)_q(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 $-S(O)_q(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_t(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 $-SCONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
30 -SCO-morfolino-QSZ', -SCO-piperazino-QSZ', -SCO-piperidino-QSZ', e
-SCO-N-metilpiperazino-QSZ', em que:

Z' é H, um grupo de proteção de tiol tal como COR, R₂₀' ou SR₂₀'

em que R_{20}' representa H, alquila, arila, heterocíclica ou heteroarila,

em que Q é uma ligação direta ou uma alquila linear ou alquila ramificada tendo de 1-10 átomos de carbono ou um espaçador de polietileno glicol com 2 a 20 unidades etilenoóxi de repetição;

5 R_{19} e R_{12} são iguais ou diferentes e são alquila linear, alquila ramificada ou alquila cíclica tendo de 1 a 10 átomos de carbono, ou heterocíclica ou arila substituída ou simples, e R_{12} pode além disso ser H,

R_{13} , R_{14} , R_{15} e R_{16} são iguais ou diferentes e são H ou uma alquila linear ou ramificada tendo de 1 a 4 átomos de carbono,

10 R_{17} e R_{18} são H ou alquila,

u é um número inteiro de 1 a 10 e pode também ser 0,

T é um número inteiro de 1 a 10 e pode também ser 0,

y é um número inteiro de 1 a 20 e pode também ser 0.

15 Quando o composto de fórmula (I) estiver na forma de um íon (por exemplo sulfonato), o contra-íon poderá estar presente (por exemplo Na^+ ou K^+).

De acordo com um aspecto preferido, compostos da invenção são aqueles de fórmula (I) onde T = arila opcionalmente substituída por um ou mais Hal, CN, NRR' , CF_3 , R, OR, $S(O)_qR$, e/ou ligante(s) e A, A', X, X', U, U', W, W', m, m', n, n', ----, $\overset{\text{----}}{\text{----}}$ são definidos como acima.

20 De acordo com outro aspecto preferido, compostos da invenção são selecionados do grupo consistindo em:

8,8'-[1,3-benzenodiilbis(metilenoóxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

25 8,8'-[5-metóxi-1,3-benzenodiilbis(metilenoóxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[1,5-pentanodiilbis(óxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

30 8,8'-[1,4-butanodiilbis(óxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[3-metil-1,5-pentanodiilbis(óxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

- 8,8'-[2,6-piridinadiilbis(óxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[4-(3-terc-butoxicarbonilaminopropilóxi)-2,6-piridinadiilbis(metilenoóxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 5 8,8'-[5-(3-aminopropilóxi)-1,3-benzenodiilbis(metilenoóxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropil)-1,3-benzenodiilbis(metilenoóxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 10 8,8'-[5-(3-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)propilóxi)-1,3-benzenodiilbis(metilenoóxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[5-(3-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)propilóxi)-1,3-benzenodiilbis(metilenoóxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 15 8,8'-[5-acetiltiometil-1,3-benzenodiilbis(metilenoóxi)]-bis[(S)-2-metileno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] éster terc-butílico de ácido bis-{2-[(S)-2-metileno-7-metóxi-5-oxo-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-ilóxi]-etil}-carbâmico
- 8,8'-[3-(2-acetiltioetil)-1,5-pentanodiilbis(óxi)]-bis[(S)-2-metileno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 20 8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimetilbutanoil)amino-1,3-benzenodiilbis(metilenoóxi)]-bis[7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[5-(N-4-metilditio-4,4-dimetilbutanoil)-amino-1,3-benzenodiilbis(metilenoóxi)]-bis[7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 25 8,8'-[5-(N-metil-N-(2-mercapto-2,2-dimetiletil)amino-1,3-benzenodiil(metilenoóxi)]-bis[7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[5-(N-metil-N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-benzenodiil(metilenoóxi)]-bis[7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 30 8,8'-[5-(N-metil-N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-benzenodiil(metilenoóxi)]-bis[7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(4-(2-(4-mercapto-4-metil)-pentanamido-etóxi)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

5 8,8'-[(1-(2-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-etóxi)-benzeno-3,5-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-propóxi)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-ona]

10 8,8'-[(4-(4-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-butóxi)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

15 8,8'-[(4-(3-[4-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(1-(3-[4-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-benzeno-3,5-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

20 8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)-etóxi]-etóxi)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

25 8,8'-[(1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)-etóxi]-etóxi]-etóxi]-etóxi]-etóxi)-benzeno-3,5-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)-etóxi]-etóxi]-etóxi)-benzeno-3,5-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

30 8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)-etóxi]-etóxi]-etóxi]-etóxi]-etóxi)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(1-(2-[metil-(2-metil-2-metildissulfanil-propil)-amino]-etóxi)-benzeno-3,5-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

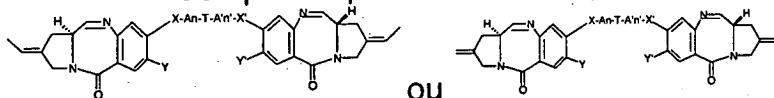
8,8'-[(4-(3-[metil-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(4-(3-[metil-(2-metil-2-metildissulfanil-propil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(1-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido)-benzeno-3,5-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

bem como os derivados de mercapto correspondentes, ou seus sais, hidratos, ou sais hidratados farmacologicamente aceitáveis, ou as estruturas cristalinas polimórficas destes compostos ou seus isômeros óticos, racematos, diastereômeros ou enantiômeros.

Compostos preferidos são aqueles de fórmula:



onde X, X', A, A', Y, Y', T, n, n' são definidos como acima.

Como utilizado anteriormente ou a seguir:

Alq representa alquila, alceno ou alquina.

"Alquila" significa um grupo hidrocarboneto alifático que pode ser linear ou ramificado tendo 1 a 20 átomos de carbono na cadeia ou cíclico tendo 3 a 10 átomos de carbono. Grupos alquila preferidos têm 1 a 12 átomos de carbono na cadeia. "Ramificado" significa que um ou mais grupos alquila inferior tal como metila, etila ou propila são ligados a uma cadeia de alquila linear. Grupos alquila exemplares incluem metila, etila, *n*-propila, *i*-propila, *n*-butila, *t*-butila, *n*-pentila, 3-pentila, octila, nonila, decila, ciclopentila e ciclohexila.

"Alceno" significa um grupo hidrocarboneto alifático contendo uma ligação dupla carbono-carbono e que pode ser linear ou ramificado ten-

do 2 a 15 átomos de carbono na cadeia. Grupos alquenila preferidos têm 2 a 12 átomos de carbono na cadeia; e mais preferivelmente cerca de 2 a 4 átomos de carbono na cadeia. Grupos alquenila exemplares incluem etenila, propenila, *n*-butenila, *i*-butenila, 3-metilbut-2-enila, *n*-pentenila, heptenila, octenila, nonenila, decenila.

"Alquina" significa um grupo hidrocarboneto alifático contendo uma ligação tripla carbono-carbono e que pode ser linear ou ramificado tendo 2 a 15 átomos de carbono na cadeia. Grupos alquinila preferidos têm 2 a 12 átomos de carbono na cadeia; e mais preferivelmente 2 a 4 átomos de carbono na cadeia. Grupos alquinila exemplares incluem etinila, propinila, *n*-butinila, 2-butinila, 3-metilbutinila, *n*-pentinila, heptinila, octinila e decinila.

"Átomo de halogênio" refere-se a átomo de flúor, cloro, bromo ou iodo; preferivelmente átomo de flúor e cloro.

"Arla" significa um sistema de anel de hidrocarboneto monocíclico ou multicíclico aromático de 6 a 14 átomos de carbono, preferivelmente de 6 a 10 átomos de carbono. Grupos arila exemplares incluem fenila ou naftila.

"Het" significa heterociclo ou heteroarila.

Como utilizado aqui, os termos "heterociclo" ou "heterocíclico" referem-se a um anel mono, bi ou multicíclico de 3 a 14, preferivelmente 5 a 10 membros estável não-aromático, saturado, parcialmente insaturado ou insaturado em que pelo menos um membro do anel é um heteroátomo. Tipicamente, heteroátomos incluem, porém não são limitados a, átomos de oxigênio, nitrogênio, enxofre, selênio, e fósforo. Heteroátomos preferíveis são oxigênio, nitrogênio e enxofre.

Heterociclos adequados são também descritos em *The Handbook of Chemistry and Physics*, 76ª Edição, CRC Press, Inc., 1995-1996, pp. 2-25 a 2-26, a descrição do qual é aqui incorporada por referência.

Heterocíclicos não-aromáticos preferidos incluem, porém não são limitados a pirrolidinila, pirazolidinila, imidazolidinila, oxiranila, tetraidrofurranila, dioxolanila, tetraidro-piranila, dioxanila, dioxolanila, piperidila, piperazinila, morfolinila, piranila, imidazolinila, pirrolinila, pirazolinila, tiazolidinila, tetraidrotiopiranila, ditianila, tiomorfolinila, diidro-piranila, tetraidropiranila,

diidropiranila, tetraidro-piridila, diidropiridila, tetraidropiridinila, diidrotopirani-
nila, azepanila, bem como os sistemas fundidos que resultam da condensa-
ção com um grupo fenila.

Como utilizado aqui, o termo "heteroarila" ou heterociclos aromáti-
cos refere-se a um anel hetero, mono-, bi- ou multicíclico aromático de 5 a 14,
5 preferivelmente 5 a 10 membros. Exemplos incluem pirrolila, piridila, pirazolila,
tienila, pirimidinila, pirazinila, tetrazolila, indolila, quinolinila, purinila, imidazolila,
tienila, tiazolila, benzotiazolila, furanila, benzofuranila, 1,2,4-tiadiazolila, isotiazo-
lila, triazoila, tetrazolila, isoquinolila, benzotienila, isobenzofurila, pirazolila, car-
10 bazolila, benzimidazolila, isoxazolila, piridil-N-óxido, bem como os sistemas
fundidos que resultam da condensação com um grupo fenila.

"Alquila", "cicloalquila", "alquenila", "alquinila", "arila", "heteroari-
la", "heterociclo" e similares referem-se também aos correspondentes "alqui-
leno", "cicloalquilenos", "alquenileno", "alquinileno", "arileno", "heteroarileno",
15 "heterociclona" e similares que são formados pela remoção de dois átomos
de hidrogênio.

Como utilizado aqui, a expressão "ligável a um agente de ligação
celular" refere-se aos derivados de tomamicina compreendendo pelo menos
um grupo de ligação, ou um precursor deste, adequado para ligar os referi-
dos derivados a um agente de ligação celular; grupos de ligação preferidos
20 são ligações de tiol ou dissulfeto, ou precursores destes.

Como utilizado aqui, a expressão "ligado a um agente de ligação
celular" refere-se à molécula conjugada compreendendo pelo menos um de-
rivado de tomamicina ligado a um agente de ligação celular por meio de um
25 grupo de ligação adequado, ou um precursor deste; grupos de ligação prefe-
ridos são ligações de tiol ou dissulfeto, ou precursores destes.

Como utilizado aqui, "precursor" de um determinado grupo refe-
re-se a qualquer grupo que pode resultar naquele grupo por qualquer des-
proteção, modificação química, ou reação de acoplamento.

30 Como utilizado aqui, o termo "paciente" refere-se a um animal,
tal como um animal valioso para propósitos de reprodução, companhia ou
preservação, ou preferivelmente um ser humano ou uma criança, que sofre

de, ou tem o potencial de sofrer de uma ou mais doenças e condições descritas aqui.

Como utilizado aqui, uma "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade de um composto da presente invenção que é eficaz na prevenção, redução, eliminação, tratamento ou controle dos sintomas das doenças e condições descritas aqui. O termo "controle" é pretendido referir-se a todos os processos em que neste contexto podem ser uma diminuição, interrupção, impedimento, ou parada da progressão das doenças e condições descritas aqui, porém não necessariamente indica uma eliminação total de todos os sintomas da doença e condição, e é pretendido incluir tratamento profilático.

Como utilizado aqui, o termo "farmaceuticamente aceitável" refere-se àqueles compostos, materiais, excipientes, composições ou formas de dosagem que são, dentro do escopo de diagnóstico médico seguro, adequados para contato com os tecidos de seres humanos e animais sem toxicidade excessiva, irritação, resposta alérgica ou outras complicações de problema comensuradas com uma relação risco/benefício razoável.

Como utilizado aqui, "sais farmaceuticamente aceitáveis" referem-se aos derivados dos compostos descritos em que o composto origem é modificado por preparação de sais de ácido ou base deste. Os sais farmaceuticamente aceitáveis incluem os sais não-tóxicos convencionais ou os sais de amônio quaternários do composto origem formado, por exemplo, de ácidos orgânicos ou inorgânicos não-tóxicos. Por exemplo, tais sais não-tóxicos convencionais incluem aqueles derivados de ácidos inorgânicos tais como clorídrico, hidrobromico, sulfúrico, sulfâmico, fosfórico, nítrico e similares; e os sais preparados de ácidos orgânicos tais como acético, propiônico, succínico, tartárico, cítrico, metanossulfônico, benzenossulfônico, glucorônico, glutâmico, benzóico, salicílico, toluenossulfônico, oxálico, fumárico, maléico, láctico e similares. Além disso, sais de adição incluem sais de amônio tais como trometamina, meglumina, epolamina, etc., sais de metal tais como sódio, potássio, cálcio, zinco ou magnésio.

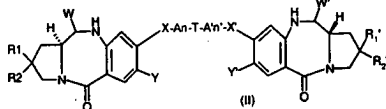
Os sais farmaceuticamente aceitáveis da presente invenção po-

dem ser sintetizados a partir do composto origem que contém uma porção básica ou acídica por métodos químicos convencionais. Geralmente, tais sais podem ser preparados por reação das formas de base ou ácido livre destes compostos com uma quantidade estequiométrica do ácido ou base apropriada em água ou em um solvente orgânico, ou em uma mistura dos dois. Geralmente, meios não-aquosos como éter, acetato de etila, etanol, isopropanol, ou acetonitrila são preferidos. As listas de sais adequados são encontradas em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17^a ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, p. 1418, a descrição do qual é aqui incorporada por referência.

Os compostos da fórmula geral (I) tendo geométricos e estereoisômeros são também uma parte da invenção.

A ligação dupla de N-10, C-11 de derivados de tomamicina de fórmula (I) é conhecida ser facilmente convertível de uma maneira reversível em adutos de imina correspondentes na presença de água, um álcool, um tiol, uma amina primária ou secundária, uréia e outross nucleófilos. Este processo é reversível e pode facilmente regenerar os derivados de tomamicina correspondentes na presença de um agente de desidratação, em um solvente orgânico não prótico, em vácuo ou em temperaturas elevadas (Z. Tozuka, 36, *J. Antibiotics*, 276 (1983)).

Desta maneira, esta invenção fornece também derivados reversíveis de derivados de tomamicina de fórmula geral (II):



onde A, X, Y, n, T, A', X', Y', n', R1, R2, R1', R2' são definidos como na fórmula (I) e W, W' são iguais ou diferentes e são selecionados do grupo consistindo em OH, um éter tal como -OR, um éster (por exemplo um acetato), tal como -OCOR, -COOR, um carbonato tal como -OCOOR, um carbamato tal como -OCONRR', um carbamato cíclico, de modo que N10 e C11 sejam uma parte do ciclo, uma uréia tal como -NRCONRR', um tiocarbamato tal como -OCSNHR, um tiocarbamato cíclico de modo que N10 e C11 sejam uma parte do ciclo, -SH, um sulfeto tal como -SR, um sulfóxido tal como -

SOR, uma sulfona tal como -SOOR, um sulfonato tal como $-\text{SO}_3^-$, uma sulfonamida tal como -NRSOOR, uma amina tal como -NRR', amina opcionalmente cíclica de modo que N10 e C11 sejam uma parte do ciclo, um derivado de hidroxilamina tal como -NROR', uma amida tal como -NRCOR, -NRCONRR', um azido tal como $-\text{N}_3$, um ciano, um halo, uma trialkila ou triarilfosfônio, um grupo derivado de aminoácido. Preferivelmente, W e W' são iguais ou diferentes e são OH, OMe, OEt, NHCONH_2 , SMe.

Compostos de fórmula (II) podem desse modo ser considerados como solvatos, incluindo água quando o solvente for água; estes solvatos podem ser particularmente úteis.

De acordo com ainda um outro objetivo, a presente invenção é também concernida ao processo de preparação dos compostos de fórmula (I).

Os compostos e processo da presente invenção podem ser preparados de várias maneiras bem-conhecidas por aqueles versados na técnica. Os compostos podem ser sintetizados, por exemplo, por aplicação ou adaptação dos métodos descritos abaixo, ou variações neles como apreciado pelo versado na técnica. As modificações e substituições apropriadas serão facilmente evidentes e bem-conhecidas ou facilmente obtíveis a partir da literatura científica por aqueles versados na técnica.

Em particular, tais métodos podem ser encontrados em R.C. La-rock, *Comprehensive Organic Transformations*, Wiley-VCH Publishers, 1999.

Será apreciado que os compostos da presente invenção podem conter um ou mais átomos de carbono assimetricamente substituídos, e podem ser isolados em formas opticamente ativas ou racêmicas. Desta maneira, todas as formas quirais, diastereoméricas, racêmicas e todas as formas isoméricas geométricas de uma estrutura são pretendidas, a menos que a forma isomérica ou estereoquímica específica seja especificamente indicada. Ela é bem-conhecida na técnica como para preparar e isolar tais formas opticamente ativas. Por exemplo, misturas de estereoisômeros podem ser separadas por técnicas-padrão incluindo, porém não limitadas a, resolução de formas racêmicas, cromatografia normal, de fase reversa, e quiral, formação de sal preferencial, recristalização, e similares, ou por síntese quiral de ma-

teriais de partida quirais ou por síntese deliberada de centros quirais alvo.

Compostos da presente invenção podem ser preparados por uma variedade de rotinas sintéticas. Os reagentes e materiais de partida são comercialmente disponíveis, ou facilmente sintetizados por técnicas bem-
5 conhecidas por alguém versado nas técnicas. Todos os substituintes, a menos que de outra maneira indicado, são como previamente definidos.

Nas reações descritas a seguir, pode ser necessário proteger grupos funcionais reativos, por exemplo grupos hidróxi, amino, imino, tio ou carbóxi, onde estes são desejados no produto final, para evitar sua partici-
10 pação indesejada nas reações. Grupos de proteção convencionais podem ser utilizados de acordo com prática-padrão, para exemplos vide T.W. Greene e P. G. M. Wuts em *Protective Groups in Organic Chemistry*, 3ª ed., John Wiley e Sons, 1999; J. F. W. McOmie em *Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press, 1973.

15 Algumas reações podem ser realizadas na presença de uma base. Não existe nenhuma restrição particular na natureza da base a ser utilizada nesta reação, e qualquer base convencionalmente utilizada nas reações deste tipo pode igualmente ser utilizada aqui, contanto que ela não tenha nenhum efeito adverso sobre outras partes da molécula. Exemplos de
20 bases adequadas incluem: hidróxido de sódio, carbonato de potássio, trietilamina, hidretos de metal de álcali, tal como hidreto de sódio e hidreto de potássio; compostos de alquilítio, tais como metilítio e butilítio; e alcóxidos de metal de álcali, tais como metóxido de sódio e etóxido de sódio.

Habitualmente, as reações são realizadas em um solvente adequado. Uma variedade de solventes pode ser utilizada, contanto que não
25 tenha nenhum efeito adverso sobre a reação ou sobre os reagentes envolvidos. Exemplos de solventes adequados incluem: hidrocarbonetos, que podem ser hidrocarbonetos aromáticos, alifáticos ou cicloalifáticos, tais como hexano, cicloexano, benzeno, tolueno e xileno; amidas, tais como dimetilformamida; álcoois tais como etanol e metanol e éteres, tais como éter dietílico e tetraidrofurano.
30

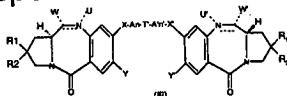
As reações podem ocorrer em uma ampla faixa de temperaturas.

Em geral, acha-se conveniente realizar a reação em uma temperatura de -20°C a 150°C (mais preferivelmente em torno da temperatura ambiente a 100°C). O tempo requerido para a reação pode também variar amplamente, dependendo de muitos fatores, notavelmente da temperatura de reação e da natureza dos reagentes. Entretanto, contanto que a reação seja realizada sob as condições preferidas esboçadas acima, um período de 3 horas a 20 horas habitualmente bastará.

O composto desse modo preparado pode ser recuperado da mistura reacional por métodos convencionais. Por exemplo, os compostos podem ser recuperados por destilação do solvente da mistura reacional ou, se necessário após destilação do solvente da mistura reacional, vertendo-se o resíduo em água seguido por extração com um solvente orgânico imiscível em água e destilação do solvente do extrato. Adicionalmente, o produto pode, se desejado, ser também purificado por várias técnicas bem-conhecidas, tal como recristalização, reprecipitação ou as várias técnicas de cromatografia, notavelmente cromatografia de coluna ou cromatografia de camada fina preparativa.

O processo de preparação de um composto de fórmula (I) da invenção é um outro objetivo da presente invenção.

De acordo com um primeiro aspecto, o processo de preparação dos compostos de fórmula (I) compreende a etapa de desproteção dos compostos de fórmula (III) correspondentes:

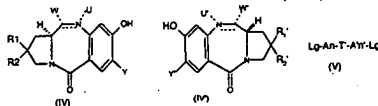


onde Y, Y', X, A, A', X', n, n', W, W', U, U', ----, R1, R2, R1', R2', ---- são definidos como na fórmula (I) e T' corresponde a T onde os grupo(s) funcionais foram protegidos.

Preferivelmente, a função de SH é protegida e preferivelmente o grupo de proteção é acetila, benzoíla, metanossulfonila, metiltio, piridiltio, nitropiridiltio, triisopropilsilila (TIPS). Geralmente, a etapa de desproteção é realizada utilizando-se condições clássicas tal como uma base para remover os grupos de proteção de acetila, benzoíla e metanossulfonila, um agente de redução tal como ditioneitol ou tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) para clivar

um grupo protetor de metiltio ou conhecidas para reação dos compostos com um fluoreto de amônio para remover o TIPS.

Os compostos de fórmula (II) podem ser obtidos de acoplamento de compostos correspondentes de fórmulas (IV), (IV') e (V):



5

onde Y, Y', A, A', n, n', T', W, W', U, U', ----, -----, R1, R2, R1', R2' são definidos como na fórmula (III), e Lg é um grupo de saída tal como um halogênio, OMs, OTs ou $OPPh_3^+$ (intermediário formado em uma reação Mitsunobu)

Os compostos de fórmulas (IV) e (IV') são geralmente conhecidos, como descrito por exemplo em pedidos de patente WO 00/12508, WW00/12507, WO 2005/040170, WO 2005/085260, ou comercialmente disponíveis, e/ou são disponíveis por síntese total (M. Mori e outros, 42 *Tetrahedron*, 3793-3806, 1986) ou produzidos pela espécie *Streptomyces*, em particular, seguindo o procedimento de patente francesa Fr. 1.516.743 ou podem ser preparados por aplicação ou adaptação dos procedimentos ilustrativos fornecidos nos exemplos.

15

Os compostos de fórmula (V) podem ser obtidos de compostos correspondentes de fórmula (VI):



20 onde A, A', n, n', T' são definidos como na fórmula (III).

Esta reação é geralmente realizada na presença de PPh_3 e $CHal_4$ ou por reação com um clorossulfonato na presença de uma base tal como trietilamina ou hidróxido de potássio, preferivelmente trietilamina.

Os compostos de fórmula (VI) podem ser obtidos de compostos correspondentes de fórmula (VII):

25



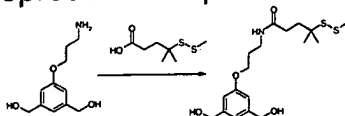
onde A, A', n, n' são definidos como na fórmula (III) e T'' é um grupo precursor de T.

Um grupo precursor de T refere-se a qualquer grupo que pode resultar em T por qualquer desproteção, modificação química, ou acoplamento. Preferivelmente, T é obtido por acoplamento de T' com a porção

30

complementar, onde T' e a porção complementar compreendem funções que são reativas uma a outra, por exemplo T' compreendendo uma função de amina e a porção complementar compreendendo uma função ácida.

Um exemplo representativo para esta reação é:



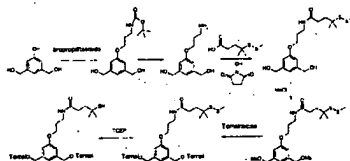
5

Geralmente, esta reação é realizada na presença de N-hidroxisuccinimida e HOBT.

Os compostos de fórmula (VII) podem ser comercialmente disponíveis ou preparados por adaptação ou aplicação de métodos conhecidos ou de acordo com os exemplos.

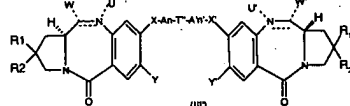
10

Esquema não limitante exemplar para esta modalidade do processo da invenção é fornecido abaixo:



15

De acordo com um segundo aspecto, o composto de fórmula (I) pode ser obtido do composto correspondente de fórmula (III'):



onde Y, Y', X, A, A', X', n, n', W, W', U, U', ----, ———, R1, R2, R1', R2' são definidos como na fórmula (I) e T'' é um grupo precursor opcionalmente protegido de T.

20

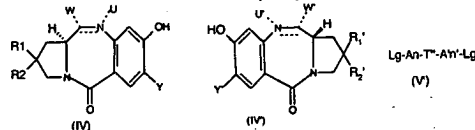
Um grupo precursor de T refere-se a qualquer grupo que pode resultar em T por modificação química, ou acoplamento. Preferivelmente, T é obtido por acoplamento de T' com a porção complementar correspondente, onde T' e a porção complementar compreendem funções que são reativas uma a outra, por exemplo T' compreendendo uma função de amina e a porção complementar compreendendo uma função ácida.

25

Geralmente, esta reação é realizada na presença de: N-hidroxisuccinimida e HOBT.

O composto de fórmula (III') pode ser obtido de acoplamento do

composto correspondente de fórmulas (IV), (IV') e (V'):



onde Y, Y', A, A', n, n', W, W', U, U', ----, --- , R1, R2, R1', R2' são definidos como na fórmula (III'), T'' é um grupo precursor opcionalmente protegido de T e Lg é um grupo de saída, tal como halogênio ou OMs, OTs ou PPh_3^+ (intermediário formado em uma reação Mitsunobu).

Os compostos de fórmulas (IV) e (IV') são geralmente conhecidos e são disponíveis por síntese total (M. Mori e outros, 42 *Tetrahedron*, 3793-3806, 1986) ou produzidos pela espécie *Streptomyces*, em particular, seguindo o procedimento de patente francesa Fr. 1.516.743.

Os compostos de fórmula (V') podem ser obtidos de compostos correspondentes de fórmula (VII):

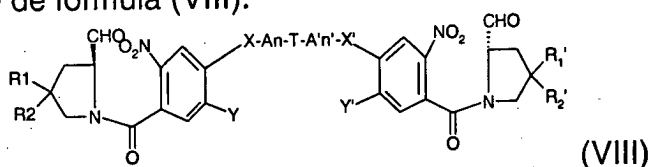


onde A, A', n, n' são definidos como na fórmula (I), T'' é um grupo precursor opcionalmente protegido de T'.

Esta reação é geralmente realizada na presença de PPh_3 e CHAl_4 .

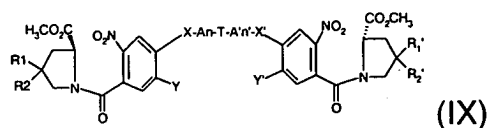
Os compostos de fórmula (VII) podem ser comercialmente disponíveis ou preparados por adaptação ou aplicação de métodos conhecidos ou de acordo com os exemplos.

De acordo com um terceiro aspecto, o processo de preparação do composto de fórmula (I) compreende a etapa de ciclização do composto correspondente de fórmula (VIII):



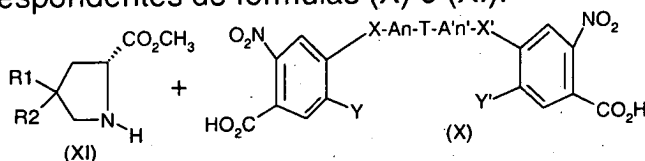
onde Y, Y', X, A, A', X', n, n', R1, R2, R1', R2', T são definidos como na fórmula (I). Geralmente, esta reação é realizada na presença de um reagente tal como hidrossulfeto de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), em um solvente apropriado tal como uma mistura de THF e água, seguido por adição de metanol e AcCl .

O composto de fórmula (VIII) pode ser obtido do composto correspondente de fórmula (IX):



onde Y, Y', A, A', n, n', R1, R2, R1', R2', T são definidos como na fórmula (I). Geralmente, esta reação é realizada na presença de um reagente tal como DIBAL-H em um solvente apropriado, tal como tolueno.

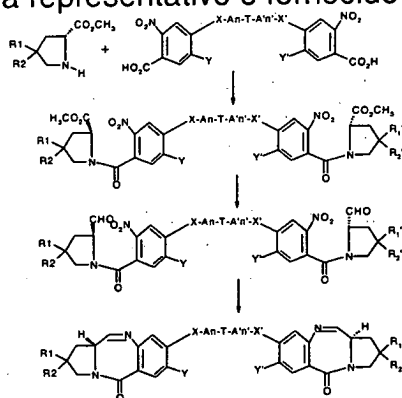
- 5 O composto de fórmula (IX) pode ser obtido de acoplamento dos compostos correspondentes de fórmulas (X) e (XI):



onde Y, Y', A, A', n, n', R1, R2, R1', R2', T são definidos como na fórmula (I).

- 10 Geralmente, esta reação é realizada por adição a (X) um reagente tal como cloreto de oxalila em um solvente apropriado, tal como DMF, seguido por adição de (XI) em um solvente apropriado, tal como THF.

Um esquema representativo é fornecido abaixo:



- 15 As reações acima podem ser realizadas pelo versado na técnica por aplicação ou adaptação dos métodos ilustrados nos exemplos a seguir.

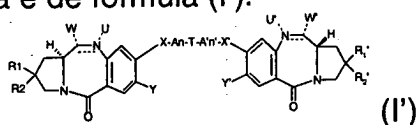
Além disso, o processo da invenção pode também compreender a etapa adicional de isolar o composto de fórmulas (I) e (II). Isto pode ser feito pelo versado na técnica por qualquer um dos métodos convencionais conhecidos, tais como os métodos de recuperação descritos acima.

- 20 Os produtos de partida são comercialmente disponíveis ou podem ser obtidos por aplicação ou adaptação de quaisquer métodos conhecidos ou aqueles descritos nos exemplos.

A síntese pode também ser realizada em um pote como uma

reação de multicomponentes.

De acordo com um outro objetivo, a presente invenção concerne uma molécula de conjugado compreendendo pelo menos um derivado de tomaimicina covalentemente ligado a um agente de ligação celular através de um grupo de ligação. O referido conjugado compreende um ou mais derivados de tomaimicina de acordo com a invenção exibindo um ligante compreendendo um grupo de ligação, tal como -S- ou -S-S-. O referido grupo de ligação covalentemente liga-se ao agente de ligação celular com o ligante do derivado de tomaimicina de acordo com um aspecto preferido, o referido derivado de tomaimicina é de fórmula (I'):



onde

---- representa uma ligação simples opcional;

==== representa uma ligação simples ou uma ligação dupla;

15 contanto que quando ---- representar uma ligação simples, U e U', iguais ou diferentes, independentemente representem H, e W e W', iguais ou diferentes, são independentemente selecionados do grupo consistindo em OH, um éter tal como -OR, um éster (por exemplo um acetato), tal como -OCOR, um carbonato tal como -OCOOR, um carbamato tal como -

20 OCONRR', um carbamato cíclico, de modo que N10 e C11 sejam uma parte do ciclo, uma uréia tal como -NRCONRR', um tiocarbamato tal como -OCSNHR, um tiocarbamato cíclico de modo que N10 e C11 sejam uma parte do ciclo, -SH, um sulfeto tal como -SR, um sulfóxido tal como -SOR, uma sulfona tal como -SOOR, um sulfonato tal como -SO₃⁻, uma sulfonamida tal

25 como -NRSOOR, uma amina tal como -NRR', amina opcionalmente cíclica de modo que N10 e C11 sejam uma parte do ciclo, um derivado de hidroxilamina tal como -NROR', uma amida tal como -NRCOR, um azido tal como -N₃, um ciano, um halo, uma trialkila ou triarilfosfônio, um grupo derivado de aminoácido; Preferivelmente W e W' são iguais ou diferentes e são OH,

30 OMe, OEt, NHCONH₂, SMe;

e quando ---- representar uma ligação dupla, U e U' estejam

ausentes e W e W' representem H;

R1, R2, R1', R2' são iguais ou diferentes e independentemente escolhidos de Haleto ou Alquila opcionalmente substituída por um ou mais Hal, CN, NRR', CF₃, OR, Arila, Het, S(O)_qR, ou R1 e R2 e R1' e R2' formam
5 juntos uma ligação dupla contendo grupos =B e =B' respectivamente.

Preferivelmente, R1 e R2 e R1' e R2' formam juntos uma ligação dupla contendo grupos =B e =B' respectivamente.

B e B' são iguais ou diferentes e independentemente escolhidos de Alquenila sendo opcionalmente substituída por um ou mais Hal, CN, NRR', CF₃,
10 OR, Arila, Het, S(O)_qR ou B e B' representam um átomo de oxigênio.

Preferivelmente, B=B'.

Mais preferivelmente, B=B'= =CH₂ ou =CH-CH₃,

X, X' são iguais ou diferentes e independentemente escolhidos de um ou mais -O-, -NR-, -(C=O)-, -S(O)_q-.

15 Preferivelmente, X=X'.

Mais preferivelmente, X=X'=O.

A, A' são iguais ou diferentes e independentemente escolhidos de Alquila ou Alquenila, cada qual opcionalmente contendo um átomo de oxigênio, nitrogênio ou enxofre e opcionalmente substituída por um ou mais
20 Hal, CN, NRR', CF₃, OR, S(O)_qR, Arila, Het, Alquila, Alquenila.

Preferivelmente, A=A'.

Mais preferivelmente, A=A'=alquila não-substituída linear.

Y, Y' são iguais ou diferentes e independentemente escolhidos de H, OR;

25 Preferivelmente, Y=Y'.

Mais preferivelmente, Y=Y'=OAlquila, mais preferivelmente OMetila.

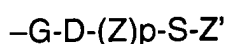
T é -Alquil-, -NR-, -O-, -S(O)_q, ou uma heteroarila, heterocíclica, cicloalquila, ou arila de 4 a 10 membros, cada qual sendo opcionalmente
30 substituída por um ou mais Hal, CN, NRR', CF₃, R, OR, S(O)_qR, e substituída por um ou mais ligantes.

Preferivelmente, T é uma arila ou heteroarila de 4 a 10 membros,

mais preferivelmente fenila ou piridila substituída por um ou mais ligante(s).

O referido ligante compreende um grupo de ligação. Grupos de ligação adequados são bem-conhecidos na técnica e incluem tiol, sulfeto, grupos dissulfeto, grupos tioéter, grupos lábeis ao ácido, grupos fotolábeis, grupos lábeis à peptidase e grupos lábeis à esterase. Preferidos são grupos dissulfeto e grupos tioéter.

Quando o grupo de ligação for um grupo contendo tiol, sulfeto ou dissulfeto, a cadeia lateral transportando o grupo tiol ou dissulfeto pode ser linear ou ramificada, aromática ou heterocíclica. Alguém versado na técnica pode facilmente identificar cadeias laterais adequadas. Preferivelmente, o referido ligante é de fórmula:



onde

G é uma ligação simples ou dupla, -O-, -S- ou -NR-;

D é uma ligação simples ou -E-, -E-NR-, -E-NR-F-, -E-O-, -E-O-F-, -E-NR-CO-, -E-NR-CO-F-, -E-CO-, -CO-E-, -E-CO-F-, -E-S-, -E-S-F-, -E-NR-C-S-, -E-NR-CS-F-;

onde E e F são iguais ou diferentes e são independentemente escolhidos de linear ou ramificada $-(OCH_2CH_2)_i$ Alquil $(OCH_2CH_2)_j$ -, Alquil $(OCH_2CH_2)_i$ -Alquil-, $-(OCH_2CH_2)_i$ -, $-(OCH_2CH_2)_i$ Cicloalquil $(OCH_2CH_2)_j$ -, $-(OCH_2CH_2)_i$ Heterocíclica $(OCH_2CH_2)_j$ -, $-(OCH_2CH_2)_i$ Aril $(OCH_2CH_2)_j$ -, $-(OCH_2CH_2)_i$ Heteroaril $(OCH_2CH_2)_j$ -, -Alquil- $(OCH_2CH_2)_i$ Alquil $(OCH_2CH_2)_j$ -, -Alquil- $(OCH_2CH_2)_i$ -, -Alquil- $(OCH_2CH_2)_i$ Cicloalquil $(OCH_2CH_2)_j$ -, -Alquil $(OCH_2CH_2)_i$ Heterocíclica $(OCH_2CH_2)_j$ -, -Alquil- $(OCH_2CH_2)_i$ Aril $(OCH_2CH_2)_j$ -, -Alquil $(OCH_2CH_2)_i$ Heteroaril $(OCH_2CH_2)_j$ -, -Cicloalquil-Alquil-, -Alquil-Cicloalquil-, -Heterocíclica-Alquil-, -Alquil-Heterocíclica-, -Alquil-Aril-, -Aril-Alquil-, -Alquil-Heteroaril-, -Heteroaril-Alquil-;

onde i e j, idênticos ou diferentes são números inteiros e independentemente escolhidos de 0,1 a 2000;

Z é -Alquil- linear ou ramificada;

p é 0 ou 1;

Z' representa H, um grupo de proteção de tiol tal como COR, R₂₀ ou SR₂₀, em que R₂₀ representa H, metila, Alquila, Cicloalquila opcionalmente substituída, arila, heteroarila ou heterocíclica, contanto que quando Z' for H, o referido composto esteja em equilíbrio com o composto correspondente
 5 formado por ciclização intramolecular resultando de adição do grupo tiol -SH na ligação de imina -NH= de uma das porções PBD.

n, n', iguais ou diferentes são 0 ou 1, com m=m' e n=n'.

q é 0, 1 ou 2.

R, R' são iguais ou diferentes e independentemente escolhidos
 10 de H, Alquila, Arila, cada qual sendo opcionalmente substituída por Hal, CN, NRR', CF₃, R, OR, S(O)_qR, Arila, Het;

ou seus sais, hidratos, ou sais hidratados farmacologicamente aceitáveis, ou as estruturas cristalinas polimórficas destes compostos ou seus isômeros óticos, racematos, diastereômeros ou enantiômeros,

15 o referido derivado sendo covalentemente ligado a um agente de ligação celular através do referido ligante.

A presente invenção refere-se às seguintes modalidades preferidas ou qualquer combinação de qualquer uma delas:

- G é uma ligação simples ou -O- ou -NR-;
- 20 - G é -O-;
- D é uma ligação simples ou -E-, -E-NR-, -E-NR-CO-, -E-CO-, -CO-E-;
- D é -E-, -E-NR-CO-, -CO-E-, -E-CO-;
- D é -E-NR-CO-;
- 25 - E é -Alquil- linear ou ramificada, -(OCH₂CH₂)_i- ou -Alquil-Heterocíclica;
- E é -Alquil- linear ou ramificada;
- Z é -(CH₂)₂-C(CH₃)₂-;
- p é 0 ou 1;
- 30 - Z' é H ou SR₂₀, em que R₂₀ representa Alquila, arila, heterocíclica ou heteroarila;
- Z' é H ou SR₂₀, em que R₂₀ representa Alquila.

Exemplos específicos dos ligantes contendo tiol, sulfeto ou disulfeto incluem

- $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
- $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{17}=\text{CR}_{18})(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_y(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
- 5 - $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{NR}_{19}\text{CO})(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
- $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{OCO})(\text{R}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
- $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CO})(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
- $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CONR}_{19})(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
- $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-fenil-CO}(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$, - $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-fúril-CO}(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$,
- 10 - $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-oxazolil-CO}(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$, - $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-tiazolil-CO}(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$,
- $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-tienil-CO}(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$, - $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-imidazolil-CO}(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$,
- $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-morfolino-CO}(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$, - $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-piperazino-CO}(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$,
- $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-N-metilpiperazino-CO}(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$,
- $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-fenil-QSZ}'$, - $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-fúril-QSZ}'$, - $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-oxazolil-QSZ}'$,
- 15 - $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-tiazolil-QSZ}'$, - $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-tienil-QSZ}'$, - $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-imidazolil-QSZ}'$,
- $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-morfolino-QSZ}'$, - $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-piperazino-QSZ}'$,
- $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-N-metilpiperazino-QSZ}'$, ou
- $\text{O}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
- $\text{O}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{NR}_{19}\text{CO})(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
- 20 - $\text{O}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{17}=\text{CR}_{18})(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_t(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
- $\text{O-fenil-QSZ}'$, - $\text{O-fúril-QSZ}'$, - $\text{O-oxazolil-QSZ}'$, - $\text{O-tiazolil-QSZ}'$,
- $\text{O-tienil-QSZ}'$, - $\text{O-imidazolil-QSZ}'$, - $\text{O-morfolino-QSZ}'$, - $\text{O-piperazino-QSZ}'$,
- $\text{O-N-metilpiperazino-QSZ}'$,
- $\text{OCO}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{NR}_{19}\text{CO})_v(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
- 25 - $\text{OCO}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{17}=\text{CR}_{18})(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
- $\text{OCONR}_{12}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
- $\text{OCO-fenil-QSZ}'$, - $\text{OCO-fúril-QSZ}'$, - $\text{OCO-oxazolil-QSZ}'$, - $\text{OCO-tiazolil-QSZ}'$,
- $\text{OCO-tienil-QSZ}'$, - $\text{OCO-imidazolil-QSZ}'$, - $\text{OCO-morfolino-QSZ}'$, - $\text{OCO-piperazino-QSZ}'$,
- $\text{OCO-N-metilpiperazino-QSZ}'$, ou
- 30 - $\text{CO}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
- $\text{CO}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{17}=\text{CR}_{18})(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
- $\text{CONR}_{12}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,

- CO-fenil-QSZ', -CO-furil-QSZ', -CO-oxazolil-QSZ', -CO-tiazolil-QSZ',
 -CO-tienil-QSZ', -CO-imidazolil-QSZ', -CO-morfolino-QSZ', -CO-
 piperazino-QSZ', -CO-piperidino-QSZ', -CO-N-metilpiperazino-QSZ',
 -NR₁₉(CR₁₃R₁₄)_t(CR₁₅R₁₆)_u(OCH₂CH₂)_ySZ',
 5 - NR₁₉CO(CR₁₃R₁₄)_t(CR₁₅R₁₆)_u(OCH₂CH₂)_ySZ',
 -NR₁₉(CR₁₃R₁₄)_t(CR₁₇=CR₁₈)(CR₁₅R₁₆)_t(OCH₂CH₂)_ySZ',
 -NR₁₉CO(CR₁₃R₁₄)_t(CR₁₇=CR₁₈)(CR₁₅R₁₆)_t(OCH₂CH₂)_ySZ',
 -NR₁₉CONR₁₂(CR₁₃R₁₄)_t(CR₁₅R₁₆)_u(OCH₂CH₂)_ySZ',
 -NR₁₉CO NR₁₂(CR₁₃R₁₄)_t(CR₁₇=CR₁₈)(CR₁₅R₁₆)_t(OCH₂CH₂)_ySZ',
 10 -NR₁₉CO-fenil-QSZ', -NR₁₉CO-furil-QSZ', -NR₁₉CO-oxazolil-QSZ',
 -NR₁₉CO-tiazolil-QSZ', -NR₁₉CO-tienil-QSZ', -NR₁₉CO-imidazolil-QSZ',
 -NR₁₉CO-morfolino-QSZ', -NR₁₉CO-piperazino-QSZ', -NR₁₉CO-
 piperidino-QSZ', -NR₁₉CO-N-metilpiperazino-QSZ', -NR₁₉-fenil-QSZ', -NR₁₉-
 furil-QSZ', -NR₁₉-oxazolil-QSZ', -NR₁₉-tiazolil-QSZ', -NR₁₉-tienil-QSZ', -NR₁₉-
 15 imidazolil-QSZ', -NR₁₉-morfolino-QSZ', -NR₁₉-piperazino-QSZ', -NR₁₉-
 piperidino-QSZ', -NR₁₉-N-metilpiperazino-QSZ', -NR₁₉CO-NR₁₂-fenil-QSZ', -
 NR₁₉CO-NR₁₂-oxazolil-QSZ', -NR₁₉CO-NR₁₂-tiazolil-QSZ', -NR₁₉CO-NR₁₂-
 tienil-QSZ', -NR₁₉CO-NR₁₂-piperidino-QSZ',
 -S(O)_q(CR₁₃R₁₄)_t(CR₁₅R₁₆)_u(OCH₂CH₂)_ySZ',
 20 -S(O)_q(CR₁₃R₁₄)_t(CR₁₇=CR₁₈)(CR₁₅R₁₆)_t(OCH₂CH₂)_ySZ',
 -SCONR₁₂(CR₁₃R₁₄)_t(CR₁₅R₁₆)_u(OCH₂CH₂)_ySZ',
 -SCO-morfolino-QSZ', -SCO-piperazino-QSZ', -SCO-piperidino-QSZ', e
 -SCO-N-metilpiperazino-QSZ', em que:

Z' é H, um grupo de proteção de tiol tal como COR, R₂₀' ou SR₂₀'
 25 em que R₂₀' representa alquila, arila, heterocíclica, ou heteroarila;

em que Q é uma ligação direta ou uma alquila linear ou alquila
 ramificada tendo de 1 a 10 átomos de carbono ou um espaçador de polieti-
 leno glicol com 2 a 20 unidades etileno óxi de repetição;

R₁₉ e R₁₂ são iguais ou diferentes e são alquila linear, alquila
 30 ramificada ou alquila cíclica tendo de 1 a 10 átomos de carbono, ou hetero-
 cíclica ou arila substituída ou simples, e R₁₂ pode além disso ser H,

R₁₃, R₁₄, R₁₅ e R₁₆ são iguais ou diferentes e são H ou uma al-

quila linear ou ramificada tendo de 1 a 4 átomos de carbono,

R₁₇, e R₁₈ são H ou alquila,

u é um número inteiro de 1 a 10 e pode também ser 0,

T é um número inteiro de 1 a 10 e pode também ser 0,

5 y é um número inteiro de 1 a 20 e pode também ser 0.

De acordo com este objetivo, compostos representativos de fórmula (I') são:

- 8,8'-[5-[3-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)propilóxi]-1,3-benzenodiilbis(metilenoóxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

10

- 8,8'-[5-acetiltiometil-1,3-benzenodiilbis(metilenoóxi)]-bis[(S)-2-metileno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

- 8,8'-[3-(2-acetiltioetil)-1,5-pentanodiilbis(óxi)]-bis[(S)-2-metileno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

15 8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimetilbutanoil)amino-1,3-benzenodiilbis(metilenoóxi)]-bis[7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[5-(N-4-metilditio-4,4-dimetilbutanoil)-amino-1,3-benzenodiilbis(metilenoóxi)]-bis[7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

20

8,8'-[5-(N-metil-N-(2-mercapto-2,2-dimetiletil)amino-1,3-benzenodiil(metilenoóxi)]-bis[7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

25 8,8'-[5-(N-metil-N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-benzenodiil(metilenoóxi)]-bis[7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(4-(2-(4-mercapto-4-metil)-pentanamido-etóxi)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

30 8,8'-[(1-(2-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-etóxi)-benzeno-3,5-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-propóxi)-
piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-
tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

5 8,8'-[(4-(4-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-butóxi)-piridin-
2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-
pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(4-(3-[4-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-
propil)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-
tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

10 8,8'-[(1-(3-[4-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-
propil)-benzeno-3,5-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-
1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)-etóxi]-
etóxi}-etóxi)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-
1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

15 8,8'-[(1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildissulfanil-
pentanoilamino)-etóxi]-etóxi}-etóxi]-etóxi}-etóxi)-benzeno-3,5-dimetil)-
dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-
c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

20 8,8'-[(1-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)-etóxi]-
etóxi}-etóxi)-benzeno-3,5-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-
1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

25 8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildissulfanil-
pentanoilamino)-etóxi]-etóxi}-etóxi]-etóxi}-etóxi)-piridin-2,6-dimetil)-
dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-
c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(1-(2-[metil-(2-metil-2-metildissulfanil-propil)-amino]-etóxi)-
benzeno-3,5-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-
tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

30 8,8'-[(4-(3-[metil-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoil)-amino]-
propil)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-
tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(4-(3-[metil-(2-metil-2-metildissulfanil-propil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(1-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido)-benzeno-3,5-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

bem como os derivados de mercapto correspondentes, ou seus sais, hidratos, ou sais hidratados farmacêuticamente aceitáveis, ou as estruturas cristalinas polimórficas destes compostos ou seus isômeros óticos, racematos, diastereômeros ou enantiômeros.

Agentes de ligação celular podem ser de qualquer tipo e incluem peptídeos e não-peptídeos. Geralmente, estes podem ser anticorpos (especialmente anticorpos monoclonais) ou um fragmento de um anticorpo que contém pelo menos um sítio de ligação, linfocinas, hormônios, fatores de crescimento, moléculas de transporte de nutriente (tal como transferrina), ou qualquer outra substância ou molécula de ligação celular. Mais exemplos específicos de agentes de ligação celular que podem ser utilizados incluem: anticorpos monoclonais; anticorpos quiméricos; anticorpos humanizados; anticorpos totalmente humanos; anticorpos de cadeia simples; fragmentos de anticorpos tais como Fab, Fab', F(ab')₂ e F_v {Parham, 131 *J. Immunol.* 2895-2902 (1983); Spring e outros, 113 *J. Immunol.* 470-478 (1974); Nisonoff e outros, 89 *Arch. Biochem. Biophys.* 230-244 (1960)}; interferons; peptídeos; linfocinas tais como IL-2, IL-3, IL-4, IL-6; hormônios tais como insulina, TRH (hormônios de liberação de tirotrópina), MSH (hormônio de estimulação de melanócito), hormônios esteróides, tais como androgênios e estrogênios; fatores de crescimento e fatores de estimulação de colônia tais como EGF, TGF α , fator de crescimento similar à insulina (IGF-I, IGF-II) G-CSF, M-CSF e GM-CSF {Burgess, 5 *Immunology Today* 155-158 (1984)}; vitaminas, tais como folato e transferrina {O'Keefe e outros, 260 *J. Biol. Chem.* 932-937 (1985)}.

A expressão "agente de ligação celular" inclusa aqui também inclui agentes de ligação celular modificados, em que o referido agente de ligação celular é modificado por um agente de modificação para melhorar a

reatividade do referido agente de ligação celular com respeito ao grupo de ligação do ligante do derivado de tomamicina. Os referidos agentes de modificação incluem N-sulfossuccinimidil-4-(5-nitro-2-piridilditio)butanoato (SSNPB), 4-[N-maleimidometil]cicloexano-1-carboxilato de succinimidila (SMCC), éster de N-hidroxissuccinimida de ácido 4-(2-piridilditio)butanóico (SPDB), e assim por diante como descrito abaixo.

10 Tecnologia de anticorpo monoclonal permite a produção de agentes de ligação celular extremamente seletivos na forma de anticorpos monoclonais específicos. Particularmente bem-conhecidas na técnica são técnicas para criar anticorpos monoclonais produzidos por camundongos imunizados, ratos, *hamsters* ou qualquer outro mamífero com o antígeno de interesse tal como a célula-alvo intacta, antígenos isolados da célula-alvo, vírus inteiro, vírus inteiro atenuado, e proteínas virais tais como proteínas de revestimento virais.

15 Seleção do agente de ligação celular apropriado é um assunto de escolha que depende da população celular particular que deve ser alvejada, porém em geral anticorpos monoclonais são preferidos se um agente apropriado está disponível.

20 Por exemplo, o anticorpo monoclonal MY9 é um anticorpo IgG₁ de murino que se liga especificamente ao Antígeno CD33 {J.D. Griffin e outros 8 *Leukemia Res.*, 521 (1984)} e pode ser utilizado se as células-alvo expressarem CD33 como na doença de leucemia mielógena aguda (AML). Similarmente, o anticorpo monoclonal anti-B4 é um IgG₁ de murino, que se liga ao antígeno CD19 nas células B {Nadler e outros, 131 *J. Immunol.* 244-250 (1983)} e pode ser utilizado se as células-alvo forem células B ou células doentes que expressam este antígeno tal como em linfoma de não Hodgkin ou leucemia linfoblástica crônica. Como relatado acima, os anticorpos MY9 e anti-B4 podem ser de murino, quiméricos, humanizados ou totalmente humanos.

30 Adicionalmente, GM-CSF que se liga às células mielóides pode ser utilizado como um agente de ligação celular para células doentes de leucemia mielógena aguda. IL-2, que se liga às células T ativadas, pode ser

utilizada para prevenção de rejeição de enxerto de transplante, para terapia e prevenção de doença enxerto versus hospedeiro, e para o tratamento de leucemia de célula T aguda. MSH, que se liga a melanócitos, pode ser utilizado para o tratamento de melanoma.

5 As moléculas de conjugado da invenção podem ser formadas utilizando-se quaisquer técnicas. Os derivados de tomamicina da invenção podem ser ligados a um anticorpo ou outro agente de ligação celular por meio de um ligante lábil ao ácido, ou por um ligante fotolábil. Os derivados podem ser condensados com um peptídeo tendo uma seqüência adequada e subsequente ligados a um agente de ligação celular para produzir
10 um ligante lábil à peptidase. Os conjugados podem ser preparados para conter um grupo hidroxila primário, que pode ser succinilado e ligado a um agente de ligação celular para produzir um conjugado que pode ser clivado por esterases intracelulares para liberar o derivado livre. Preferivelmente, os
15 derivados são sintetizados para conter um grupo tiol protegido ou livre, e então um ou mais derivados contendo dissulfeto ou tiol são cada qual covalentemente ligados ao agente de ligação celular por meio de uma ligação de dissulfeto ou uma ligação de tioéter.

 Métodos numerosos de conjugação são ensinados em USP
20 5.416.064 e USP 5.475.092. Os derivados de tomamicina podem ser modificados para produzir um grupo amino livre e em seguida ligados a um anticorpo ou outro agente de ligação celular por meio de um ligante lábil ao ácido ou um ligante fotolábil. Os derivados de tomamicina com um grupo carboxila ou amino livre podem ser condensados com um peptídeo e subsequente ligados a um agente de ligação celular para produzir um ligante
25 lábil à peptidase. Os derivados de tomamicina com um grupo hidroxila livre sobre o ligante podem ser succinilados e ligados a um agente de ligação celular para produzir um conjugado que pode ser clivado por esterases intracelulares para liberar fármaco livre. Mais preferivelmente, os derivados de
30 tomamicina são tratados para criar um grupo tiol protegido ou livre, e em seguida os dímeros de tomamicina contendo dissulfeto ou tiol são ligados ao agente de ligação celular por meio de ligação de dissulfetos.

Conjugados representativos da invenção são anticorpo-derivado de tomamicina, anticorpo-derivado de fragmento de tomamicina, fator de crescimento epidérmico (EGF)-derivado de tomamicina, hormônio de estimulação de melanócito (MSH)-derivado de tomamicina, hormônio de estimulação de tireóide (TSH)-derivado de tomamicina, estrogênio derivado de tomamicina, análogo de estrogênio derivado de tomamicina, androgênio-derivado de tomamicina, análogo de androgênio-derivado de tomamicina, e folato derivado de tomamicina.

Conjugados de derivado de tomamicina de anticorpos, fragmentos de anticorpo, hormônios de peptídeo ou proteína, fatores de crescimento de peptídeo ou proteína e outras proteínas são preparados da mesma maneira por métodos conhecidos. Por exemplo, peptídeos e anticorpos podem ser modificados com reagentes de reticulação tais como 3-(2-piridilditio)propionato de *N*-succinimidila, 4-(2-piridilditio)pentanoato de *N*-succinimidila (SPP), 4-succinimidil-oxicarbonil- α -metil- α -(2-piridilditio)-tolueno (SMPT), *N*-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirato (SDPB), piridil-ditiopropionato de succinimidila (SPDP), éster de *N*-hidrossuccinimida de ácido 4-(2-piridilditio)butanóico (SPDB), 4-[*N*-maleimidometil]cicloexano-1-carboxilato de succinimidila (SMCC), *N*-sulfossuccinimidil-3-(2-(5-nitro-piridilditio)butirato (SSNPB), 2-iminotiolano, ou anidrido *S*-acetilsuccínico por métodos conhecidos. Vide, Carlsson e outros, 173 *Biochem. J.* 723-737 (1978); Blattler e outros, 24 *Biochem.* 1517-1524 (1985); Lambert e outros, 22 *Biochem.* 3913-3920 (1983); Klotz e outros, 96 *Arch. Biochem. Biophys.* 605 (1962); e Liu e outros, 18 *Biochem.* 690 (1979), Blakey e Thorpe, 1 *Antibody, Imunoconjugateds & Radio-pharmaceuticals*, 1-16 (1988), Worrell e outros 1 *Anti-Cancer Drug Design* 179-184 (1986). O agente de ligação celular contendo tiol protegido ou livre desse modo derivado é em seguida reagido com um derivado de tomamicina contendo tiol ou dissulfeto para produzir conjugados. Os conjugados podem ser purificados por HPLC ou por filtração de gel.

Preferivelmente, conjugados derivados de anticorpo monoclonal ou agente de ligação celular-tomamicina são aqueles que são ligados por meio da ligação de dissulfeto, como descrito acima, que são capazes de li-

berar derivados de tomaimicina. Tais conjugados de ligação celular são preparados por métodos conhecidos tal como modificando anticorpos monoclonais com succinimidil piridil-ditiopropionato (SPDP) (Carlsson e outros, 173 *Biochem. J.* 723-737 (1978)). O grupo tiopiridila resultante é então removido por tratamento com derivados de tomaimicina contendo tiol para produzir conjugados ligados a dissulfeto. Alternativamente, no caso dos derivados de arilditio-tomaimicina, a formação do conjugado de ligação celular é afetada por remoção direta do aril-tiol do derivado de tomaimicina por grupos sulfidri-
5 la previamente introduzidos nas moléculas de anticorpo. Conjugados contendo 1 a 10 derivados de fármacos de tomaimicina ligados por meio de uma ponte de dissulfeto são facilmente preparados por qualquer dos métodos.

Mais especificamente, uma solução do anticorpo modificado de ditio-nitropiridila em uma concentração de 2,5 mg/ml em 0,05 M tampão de fosfato de potássio, em pH 7,5 contendo 2 mM de EDTA é tratado com o derivado de tomaimicina contendo tiol (1,3 molar de eq./grupo ditiopiridila). A liberação de ditio-nitropiridina do anticorpo modificado é monitorada espectrofotometricamente a 325 nm e está completa em cerca de 16 horas. O conjugado de anticorpo-derivado de tomaimicina é purificado e livre de fármaco não reagido e outros material de baixo peso molecular por filtração de gel por meio de uma coluna de Sephadex G-25 ou Sephacila S300. O número de derivado de porções de tomaimicina ligadas por molécula de anticorpo pode ser determinado avaliando-se a relação da absorvência a 230 nm e 275 nm. Uma média de 1-10 moléculas de derivado de tomaimicina/ molécula de anticorpo pode ser ligada por meio de ligação de dissulfetos por este método.

O efeito de conjugação sobre a afinidade de ligação para as células expressando antígeno pode ser determinado utilizando-se os métodos previamente descritos por Liu e outros, 93 *Proc. Natl. Acad. Sci* 8618-8623 (1996). A citotoxicidade dos derivados de tomaimicina e seu anticorpo conjugados às linhagens celulares pode ser avaliada por re-extrapolação de curvas de proliferação celular como descrito em Goldmacher e outros, 135 *J. Immunol.* 3648-3651 (1985). A citotoxicidade destes compostos para linhagens celulares aderentes pode ser determinada por ensaios clonogênicos

como descrito em Goldmacher e outros, 102 *J. Cell Biol.* 1312-1319 (1986).

Conjugados representativos da invenção são conjugados de derivados de tomamicina com anticorpos, fragmentos de anticorpo, fator de crescimento epidérmico (EGF), hormônio de estimulação de melanócito (MSH), hormônio de estimulação de tireóide (TSH), estrogênio, análogos de estrogênio, androgênio, e análogos de androgênio.

Exemplos representativos da preparação de vários conjugados de derivados e agentes de ligação celular são descritos abaixo.

Ligantes de dissulfeto: por exemplo, o anticorpo monoclonal MY9 é um anticorpo murino IgG₁ que liga-se especificamente ao antígeno CD33 {J.D. Griffin e outros 8 *Leukemia Res.*, 521 (1984)} e pode ser utilizado se as células-alvo expressarem CD33 como a doença de leucemia mielógena aguda (AML). Similarmente, o anticorpo monoclonal anti-B4 é um IgG₁ de murino, que se liga ao antígeno CD19 em células B {Nadler e outros, 131 *J. Immunol.* 244-250 (1983)} e pode ser utilizado se as células-alvo forem células B ou células doentes que expressam este antígeno tal como em linfoma de não Hodgkin ou leucemia linfoblástica crônica.

Adicionalmente, GM-CSF que se liga à células mielóides pode ser utilizado como um agente de ligação celular à células doentes de leucemia mielógena aguda. IL-2, que se liga a células T ativadas, pode ser utilizada para prevenção de rejeição de enxerto de transplante, para terapia e prevenção de doença enxerto-versus-hospedeiro, e para o tratamento de leucemia de célula T aguda. MSH, que se liga a melanócitos, pode ser utilizada para o tratamento de melanoma.

O anticorpo ou outro agente de ligação celular é modificado com propionato de N-succinimidil-3-piridilditio como previamente descrito {J. Carlsson, H. Drevin & R. Axen, *Biochem. J.*, 173:723 (1978)} para introduzir, na média, 4 grupos de piridilditio por molécula de anticorpo. O anticorpo modificado é reagido com o derivado contendo tiol para produzir um conjugado ligado a um dissulfeto.

Alternativamente, os conjugados podem ser preparados por aplicação e/ou adaptação do método descrito em WO 2004/103272, cujo ensi-

namento é incluído aqui por referência.

Ligantes de Tioéter: Derivados contendo tiol da presente invenção podem ser ligados a anticorpos e outross agentes de ligação celular por meio de uma ligação de tioéter como previamente descrito (Patente dos Estados Unidos nº 5.208.020). O anticorpo ou outro agente de ligação celular pode ser modificado com os compostos comercialmente disponíveis tais como *N*-succinimidila-4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato (SMCC), *N*-succinimidil-4-(*N*-maleimidometil)-cicloexano-1-carbóxi-(6-amido-caproato), que é um análogo de "cadeia longa" de SMCC (LC-SMCC). Estes reagentes de reticulação formam ligantes não-cliváveis derivados de porções com base em maleimido.

Reagentes de reticulação compreendendo uma porção com base em haloacetila incluem aminobenzoato de *N*-succinimidil-4-(iodoacetil) (SIAB), iodoacetato de *N*-succinimidila (SIA), bromoacetato de *N*-succinimidila (SBA) e 3-(bromo-acetamido)propionato de *N*-succinimidila (SBAP). Estes reagentes de reticulação formam ligantes não-cliváveis derivados de porções com base em haloacetila.

Ligantes lábeis ao ácido: derivados da presente invenção contendo grupo amino podem ser ligados a anticorpos e outross agentes de ligação celular por meio de um ligante lábil ao ácido como previamente descrito {W. A. Blattler e outros, *Biochemistry* 24, 1517-1524 (1985); Patente dos Estados Unidos nº 4.542.225, 4.569.789, 4.618.492, 4.764.368}.

Similarmente, um derivado da presente invenção contendo grupo hidrazido pode ser ligado à porção de carboidrato de anticorpos e outross agentes de ligação celular por meio de um ligante de hidrazona lábil ao ácido {para Exemplos de ligantes de hidrazona, vide B. C. Laguzza e outros, *J. Med. Chem.*, 32, 548-555 (1989); R. S. Greenfield e outros, *Cancer Res.*, 50, 6600-6607 (1990)}.

Ligantes Foto-Lábil: grupo amina contendo derivados da presente invenção pode ser ligado a anticorpos e outross agentes de ligação celular por meio de um ligante fotolábil como previamente descrito {P. Senter e outros, *Photochemistry e Photobiology*, 42, 231-237 (1985); Patente dos Estados Unidos nº 4.625.014}.

Ligantes Lábeis à Peptidase: derivados contendo grupo amina da presente invenção podem também ser ligados a agentes de ligação celular por meio de espaçadores de peptídeo. Foi anteriormente mostrado que espaçadores de peptídeo curtos entre fármacos e veículos de proteína macromolecular são estáveis em soro, porém são facilmente hidrolizados por peptidases intracelulares {A. Trouet e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79, 626-629 (1982)}. Os derivados contendo grupo amino podem ser condensados com peptídeos utilizando-se agentes de condensação tal como 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)carbodiimida-HCl (EDC-HCl) para fornecer um derivado de peptídeo que pode ser ligado a agentes de ligação celular.

Ligantes Lábeis à Esterase: derivados da presente invenção transportando um grupo hidroxil alquila pode ser succinilado com anidrido succínico e em seguida ligado a um agente de ligação celular para produzir um conjugado que pode ser clivado por esterases intracelulares para liberar fármaco livre. {Para exemplos vide E. Aboud-Pirak e outros, *Biochem Pharmacol.*, 38, 641-648 (1989)}.

Os conjugados preparados para os métodos acima podem ser purificados por técnicas de cromatografia padrão tal como cromatografia de adsorção, por exclusão de tamanho, incluindo, porém não limitadas a, permuta de íon, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de afinidade, cromatografia em hidroxiapatita de cerâmica ou em Porapak, ou por HPLC. Purificação por diálise ou diafiltração pode ser também utilizada.

Preferivelmente, conjugados entre anticorpos monoclonais ou agentes de ligação celular e derivados da presente invenção são aqueles que são ligados por meio da ligação de dissulfeto, como descrito acima. Tais conjugados de ligação celular são preparados por métodos conhecidos tal como modificando anticorpos monoclonais com piridil-ditiopropionato de succinimidila (SPDP) {Carlsson e outros, 173 *Biochem. J.* 723-737 (1978)}. O grupo tiopiridila resultante é então removido por tratamento com derivado contendo tiol para produzir conjugados ligados por dissulfeto. Conjugados contendo 1 a 10 derivados ligados por meio de uma ponte de dissulfeto são facilmente preparados por este método. Conjugação por este método é to-

talmente descrita na Patente dos Estados Unidos 5.585.499, que é incorporada por referência.

De acordo com um aspecto preferido, o agente de ligação celular é um anticorpo, em particular um anticorpo monoclonal.

5 De acordo com outro aspecto preferido, o agente de ligação celular é um fragmento de anticorpo específico de antígeno, tal como sFV, Fab, Fab', ou F(ab')₂.

De acordo com um outro objetivo, a presente invenção também concerne composições farmacêuticas compreendendo uma molécula de conjugado da invenção ou um composto de fórmula (I) como definido acima
10 juntamente com um veículo farmacêuticamente aceitável.

De acordo com um outro objetivo, a presente invenção também concerne um método de matar ou inibir o crescimento de células, preferivelmente populações celulares selecionadas compreendendo contatar as células-alvo ou tecido contendo células-alvo com uma quantidade eficaz da
15 composição farmacêutica de acordo com a invenção.

A população celular selecionada são aquelas células cancerosas e/ou proliferativas.

De acordo com um outro objetivo, a presente invenção também
20 concerne um método para o tratamento, preferivelmente tratamento seletivo, de câncer compreendendo administrar uma quantidade eficaz da composição farmacêutica de acordo com a invenção a um paciente em necessidade desta.

De acordo com a presente invenção, "tratamento seletivo de câncer" refere-se a matar células cancerosas e/ou proliferativas substancialmente sem matar células normais e/ou não-proliferativas.
25

De acordo com um outro objetivo, a presente invenção também concerne o uso de uma molécula de conjugado da invenção ou um composto de fórmula (I) como definido acima para a preparação de um medicamento para tratar câncer.

30 O método para inibir o crescimento de populações celulares selecionadas pode ser praticado *in vitro*, *in vivo*, ou *ex vivo*.

Exemplos de usos *in vitro* incluem tratamentos de culturas celu-

lares a fim de matar todas as células exceto para variantes desejadas que não expressam o antígeno-alvo; ou matar variantes que expressam antígeno indesejado.

5 As condições de uso não-clínico *in vitro* são facilmente determinadas pelo versado na técnica.

Exemplos de usos *ex vivo* incluem tratamentos de medula óssea autóloga antes de seu transplante para dentro do mesmo paciente, a fim de matar células doentes ou malignas: tratamentos de medula óssea antes de seu transplante a fim de matar células T competentes e prevenir doença enxerto-versus-hospedeiro-(GVHD).

10 Tratamento clínico *ex vivo* para remover células de tumor ou células linfóides de medula óssea antes do transplante autólogo em tratamento de câncer ou no tratamento de doença auto-imune, ou para remover células T e outras células linfóides de medula óssea alogênica ou tecido antes do transplante a fim de prevenir GVHD, pode ser realizado como segue. A medula óssea é colhida do paciente ou outro indivíduo e em seguida incubada em meio contendo soro, ao qual é adicionado o agente citotóxico da invenção, as concentrações variam de cerca de 10 μ M a 1 pM, durante cerca de 15 30 minutos a cerca de 48 horas a cerca de 37 °C. As condições exatas de concentração e tempo de incubação (=dose) são facilmente determinadas pelo versado na técnica. Após incubação as células de medula óssea são lavadas com meio contendo soro e retornadas ao paciente por infusão i.v. de acordo com métodos conhecidos. Em circunstâncias onde o paciente recebe outros tratamento tal como um curso de quimioterapia ablativa ou irradiação corporal total entre o tempo de coleta da medula e a reinfusão das células tratadas, as células de medula tratadas são armazenadas congeladas em 20 nitrogênio líquido utilizando-se equipamento médico padrão.

25 Para uso clínico *in vivo*, o agente citotóxico da invenção será fornecido como soluções que são testadas quanto à esterilidade e quanto aos níveis de endotoxina ou como um sólido liofilizado que pode ser redissolvido em água estéril para injeção. Exemplos de protocolos adequados de administração de conjugado são como segue. Os conjugados são adminis-

trados semanalmente durante 6 semanas como um bolo i.v.. As doses de bolo são administradas em 50 a 400 ml de salina normal à qual albumina de soro humana (por exemplo 0,5 a 1 mL de uma solução concentrada de albumina de soro humana, 100 mg/mL) pode ser adicionada. Dosagens serão de cerca de 50 µg a 10 mg/kg de peso corporal por semana, i.v. (varia de 10 µg a 100 mg/kg por injeção). Seis semanas após o tratamento, o paciente pode receber um segundo curso de tratamento. Protocolos clínicos específicos com respeito à rotina de administração, excipientes, diluentes, dosagens, tempos, etc., podem ser determinados pelo versado na técnica como garantias da situação clínica.

Exemplos de condições médicas que podem ser tratadas de acordo com os métodos *in vivo* ou *ex vivo* de matar populações celulares selecionadas incluem malignidade de qualquer tipo incluindo, por exemplo, câncer do pulmão, mama, cólon, próstata, rins, pâncreas, ovário, e órgãos linfáticos; melanomas; doenças auto-imunes, tal como lúpus sistêmico, artrite reumatóide, e esclerose múltipla; rejeições de enxerto, tal como rejeição de transplante renal, rejeição de transplante do fígado, rejeição de transplante do pulmão, rejeição de transplante cardíaco, e rejeição de transplante de medula óssea; doença de enxerto versus hospedeiro; infecções virais, tais como infecção por CMV, infecção por HIV, AIDS, etc.; infecção bacteriana; e infecções por parasitas, tal como giardíase, amebíase, esquistossomíase, e outras como determinado por alguém versado na técnica.

A identificação daqueles indivíduos que estão em necessidade de tratamento de doenças e condições descritas aqui inclui-se bem na capacidade e conhecimento de alguém versado na técnica. Um veterinário ou um médico versado na técnica pode facilmente identificar, pelo uso de testes clínicos, exame físico, histórico médico/familiar ou testes biológicos e diagnósticos, aqueles indivíduos que estão em necessidade de tal tratamento.

A quantidade terapêuticamente eficaz pode ser facilmente determinada pelo diagnosticador atendente, como alguém versado na técnica, pelo uso de técnicas convencionais e observando-se os resultados obtidos sob circunstâncias análogas. Na determinação da quantidade terapêutica-

mente eficaz, diversos fatores são considerados pelo diagnosticador atendente, incluindo, porém não limitados a: as espécies de indivíduo; seu tamanho, idade, e saúde geral; a doença específica envolvida; o grau de envolvimento ou a severidade da doença; a resposta do paciente individual; o composto particular administrado; o modo de administração; a biodisponibilidade característica da preparação administrada; o regime de dose selecionado; o uso de medicação concomitante; e outras circunstâncias relevantes.

A quantidade de um composto de fórmula (I) ou conjugado, que é requerida para obter o efeito biológico desejado, variará dependendo de diversos fatores, incluindo as características químicas (por exemplo hidrofobicidade) dos compostos empregados, a potência dos compostos, o tipo de doença, as espécies às quais o paciente pertence, o estado do paciente doente, a rotina de administração, a biodisponibilidade do composto pela rotina escolhida, todos os fatores que ditam as quantidades de dose requeridas, liberação e regime a ser administrado.

"Farmaceuticamente" ou "farmaceuticamente aceitável" refere-se à entidades moleculares e composições que não produzem uma reação adversa, alérgica ou outra desfavorável quando administradas a um animal, ou um ser humano, como apropriado.

Como utilizado aqui, "excipiente farmaceuticamente aceitável" inclui quaisquer veículos, diluentes, adjuvantes, ou veículos, tal como agentes de preservação ou antioxidantes, cargas, disintegrates, agentes umectantes, agentes emulsificantes, agentes de suspensão, solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e retardantes da absorção e similares. O uso de tais meios e agentes para substâncias farmacêuticas ativas é bem-conhecido na técnica. Exceto à medida em que quaisquer meios convencionais ou agente é incompatível com o ingrediente ativo, seu uso nas composições terapêuticas é contemplado. Ingredientes ativos suplementares podem também ser incorporados nas composições como combinações terapêuticas adequadas.

No contexto da invenção, o termo "tratando" ou "tratamento", como utilizado aqui, significa reverter, aliviar, inibir o progresso de, ou preve-

nir o distúrbio ou condição ao qual o termo aplica-se, ou um ou mais sintomas de tal distúrbio ou condição.

"Quantidade terapeuticamente eficaz" significa uma quantidade de um composto/ medicamento de acordo com a presente invenção eficaz na prevenção ou tratamento da condição patológica aqui referida.

De acordo com a invenção, o termo "paciente", ou "paciente em necessidade deste", destina-se a um animal ou um ser humano afetado ou provável de ser afetado com a condição patológica referida aqui. Preferivelmente, o paciente é um ser humano.

Em termos gerais, os compostos desta invenção podem ser fornecidos em uma solução de tampão fisiológica aquosa contendo 0,1 a 10% peso/volume do composto para administração parenteral. Doses típicas variam de 1 µg/kg a 0,1 g/kg de peso corporal por dia; uma faixa de dose preferida é de 0,01 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal por dia ou uma dose equivalente em uma criança humana. A dosagem preferida de fármaco a ser administrada é provavelmente dependente de tais variáveis como o tipo e extensão da progressão da doença ou distúrbio, o estado de saúde geral do paciente particular, a eficácia biológica relativa do composto selecionado, a formulação do composto, a rotina de administração (intravenosa, intramuscular, ou outra), as propriedades farmacocinéticas do composto pela rotina de liberação escolhida, e a velocidade (infusão em bolo ou contínua) e escala de administrações (número de repetições em um determinado período de tempo).

Os compostos da presente invenção são também capazes de ser administrados em formas de dose única, em que o termo "dose única" significa uma dose única que é capaz de ser administrada a um paciente, e que pode ser facilmente manipulada e embalada, permanecendo como uma dose única fisicamente e quimicamente estável compreendendo ou o composto ativo sozinho, ou como uma composição farmacologicamente aceitável, como descrito aqui a seguir. Como tal, faixas de dose diária total típicas são de 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal. A título de orientação geral, doses unitárias para humanos variam de 1 mg a 3000 mg por dia. Preferivelmente a faixa de dose unitária é de 1 a 500 mg administrada uma a seis vezes ao

dia, e ainda mais preferivelmente de 10 mg a 500 mg, uma vez ao dia. Os compostos fornecidos aqui podem ser formulados em composições farmacêuticas por mistura com um ou mais excipientes farmacêuticamente aceitáveis. Tais composições de dose unitária podem ser preparadas para uso por administração oral, particularmente na forma de comprimidos, cápsulas simples, ou cápsulas de gel macias; ou intranasalmente, particularmente na forma de pós, gotas nasais, ou aerossóis; ou dermicamente, por exemplo, topicamente em unguentos, cremes, loções, géis ou *sprays*, ou por meio de emplastos transdérmicos.

10 As composições podem convenientemente ser administradas em forma de dosagem unitária e podem ser preparadas por quaisquer dos métodos bem-conhecidos na técnica farmacêutica, por exemplo, como descrito em *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20^a edição; Gennaro, A. R., Ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2000.

15 As formulações preferidas incluem composições farmacêuticas em que um composto da presente invenção é formulado para administração oral ou parenteral.

Para administração oral, comprimidos, pílulas, pós, cápsulas, comprimidos e similares podem conter um ou mais de quaisquer dos seguintes ingredientes, ou compostos de uma natureza similar: um aglutinante tal como celulose microcristalina, ou goma tragacanto; um diluente tal como amido ou lactose; um desintegrante tal como derivados de amido e celulose; um lubrificante tal como estearato de magnésio; um deslizante tal como dióxido de silício coloidal; um agente adoçante tal como sacarose ou sacarina; ou um agente aromatizante tal como hortelã-pimenta, ou salicilato de metila. Cápsulas podem ser na forma de uma cápsula dura ou cápsula macia, que são geralmente feitas de misturas de gelatina opcionalmente misturadas com plastificantes, bem como uma cápsula de amido. Além disso, as formas unitárias de dosagem podem conter vários outros materiais que modificam a forma física da unidade de dosagem, por exemplo, revestimentos de açúcar, goma-laca, ou agentes entéricos. Outras formas orais de dosagem de xarope ou elixir podem conter agentes adoçantes, conservantes, tintas, coloran-

tes, e aromatizantes. Além disso, os compostos ativos podem ser incorporados em preparações e formulações de liberação modificada, ou liberação controlada, de rápida dissolução, e em que tais formulações de liberação controlada são preferivelmente bimodais. Comprimidos preferidos contêm
5 lactose, amido de milho, silicato de magnésio, croscarmelose sódica, povidona, estearato de magnésio, ou talco em qualquer combinação.

Preparações líquidas para administração parenteral incluem soluções, suspensões e emulsões aquosas estéreis ou não-aquosas. As composições líquidas podem também incluir aglutinantes, tampões, conservantes,
10 tes, agentes de quelação, adoçantes, aromatizantes, agentes de coloração, e similares. Solventes não-aquosos incluem álcoois, propileno glicol, polietileno glicol, óleos vegetais tal como óleo de oliva, e ésteres orgânicos tal como oleato de etila. Veículos aquosos incluem misturas de álcoois e água, meios tamponados, e salina. Em particular, polímero de lactídeo biodegradável biocompatível, copolímero lactídeo/glicolídeo, ou copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno podem ser excipientes úteis para controlar a liberação dos
15 compostos ativos. Veículos intravenosos podem incluir fluido e reabastecedores de nutriente, reabastecedores de eletrólito, tal como aqueles com base em dextrose de Ringer, e similares. Outros sistemas de liberação parenteral potencialmente úteis para estes compostos ativos incluem partículas de copolímero de acetato de etileno vinila, bombas osmóticas, sistemas de infusão implantáveis, e lipossomas.

Modos alternativos de administração incluem formulações para inalação, que incluem tais meios como pó seco, aerossol, ou gotas. Eles podem ser soluções aquosas contendo, por exemplo, éter de polioxietileno-9-laurila, glicocolato e deoxicolato, ou soluções oleosas para administração na
25 forma de gotas nasais, ou como um gel a ser aplicado intranasalmente. Formulações para administração bucal incluem, por exemplo, losangos ou pastilhas e podem também incluir uma base aromatizada, tal como sacarose ou acácia, e outros excipientes tal como glicocolato. Formulações adequadas para administração retal estão preferivelmente presentes como supositórios
30 de dose única, com um veículo de base sólida, tal como manteiga de cacau, e

podem incluir um salicilato. Formulações para aplicação tópica à pele, preferivelmente toma a forma de um unguento, creme, loção, pasta, gel, *spray*, aerossol, ou óleo. Veículos que podem ser utilizados incluem vaselina, lanolina, polietileno glicóis, álcoois, ou suas combinações. Formulações adequadas para administração transdérmica podem ser apresentadas como emplastos discretos e podem ser emulsões lipofílicas ou tamponadas, soluções aquosas, dissolvidas e/ou dispersas em um polímero ou um adesivo.

FIGURAS

Figura 1a representa potência *in vitro* de composto de huB4-SPDB de exemplo 16 para células BJAB positivas de antígeno e células MOLT-4 negativas de antígeno.

Figura 1b representa potência *in vitro* de huB4-SMCC – composto de exemplo 16 para células BJAB positivas de antígeno e células MOLT-4 negativas de antígeno.

Figura 1c representa potência *in vitro* de composto livre de exemplo 16 para células BJAB e MOLT-4.

Figura 2a representa potência *in vitro* de composto de huB4-SPDB de exemplo 17 para células BJAB positivas de antígeno e células MOLT-4 negativas de antígeno.

Figura 2b representa potência *in vitro* de composto de huB4-SMCC de exemplo 17 para células BJAB positivas de antígeno e células MOLT-4 negativas de antígeno.

Figura 2c representa potência *in vitro* de composto livre de exemplo 17 para células BJAB e MOLT-4.

Figura 3a representa potência *in vitro* de composto de huMy9-6-SPDB de exemplo 16 para células HL60/GC positivas de antígeno e células Ramos negativas de antígeno.

Figura 3b representa potência *in vitro* de composto livre de exemplo 16 para células HL60/GC e Ramos.

A invenção é também ilustrada porém não restrita pela descrição nos seguintes exemplos.

Parte experimental

Método A1: Cromatografia Líquida de Alta Pressão-Espectrometria de Massa (LCMS)

Um *software* Micromass MassLynx é utilizado e a análise é realizada em um Agilent 1100 série HPLC com uma coluna THERMO Hypersil Gold C18 3 μm (50 x 3 mm) utilizando-se eluição gradiente com uma mistura de (A) acetonitrila e (B) água/0,1% ácido fórmico (gradiente: 5% A: 95% B até 95% A: 5% B durante 5 minutos, 95% A: 5% B durante 0,5 minuto, 95% A: 5% B até 5% A: 95% B durante 1 minuto, 5% A: 95% B durante 0,5 minuto) com uma taxa de fluxo de 0,8 mL/minuto; Espectrômetro Waters-Micromass Platform I, Platform II ou ZQ com Eletrovaporização (ionização positiva e negativa); Disposição de Diodo em linha (190-490 nm); detector auxiliar Sedere (França), detector de Dispersão de Luz Evaporativa (ELS) Modelo SEDEX 65.

Método A2: Cromatografia Líquida de Alta Pressão-Espectrometria de Massa (LCMS)

Um *software* Micromass MassLynx é utilizado e a análise é realizada em um Waters Alliance HPLC com uma coluna WATERS XBridge C18 3,5 μm (100 x 3 mm) utilizando-se eluição gradiente com uma mistura de (A) metanol e (B) água/0.1% ácido fórmico (gradiente: 5% A: 95% B até 95% A: 5% B durante 10 minutos, 95% A: 5% B até 5% A: 95% B durante 1 minuto, 5% A: 95% B durante 2 minutos) com uma taxa de fluxo de 1,1 mL/minuto; Espectrômetro Waters-Micromass Platform II com Eletrovaporização (ionização positiva e negativa); Disposição de Diodo em linha (190-500 nm); detector auxiliar Sedere (França), detector de Dispersão de Luz Evaporativa (ELS) Modelo SEDEX 85 .

Método A3: Cromatografia Líquida de Alta Pressão-Espectrometria de Massa (LCMS)

Um *software* Micromass MassLynx é utilizado e a análise é realizada em uma HPLC Agilent série 1100 com uma coluna XBridge C18 2,5 μm (50 x 3 mm) utilizando-se eluição gradiente com uma mistura de (A) acetonitrila e (B) água/0,1% ácido fórmico (gradiente: 5% A: 95% B até 100% A durante 5 minutos, 100% A durante 0,5 minutos, 100% A até 5% A: 95% B du-

rante 1 minuto, 5% A: 95% B durante 0,5 minutos) com uma taxa de fluxo de 1,1 mL/minuto; espectrômetro Waters-Micromass ZQ com Eletrovaporização; Disposição de Diodo em linha (210-254 nm)

5 Método B: Purificação por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC)

Purificação por HPLC foi realizada em uma coluna Macherey Nagel Nucleodur C18 Gravidade de 5 μ M (21x100 mm, catálogo número 762101), eluindo com uma mistura de (A) acetonitrila e (B) água (gradiente: 5% A: 95% B durante 5 minutos, 5% A: 95% B até 100% A durante 20 minutos, 100% A durante 8 minutos, 100% A a 5% A: 95% B durante 1 minuto, 5% A: 95% B for 11 minutos) com uma taxa de fluxo de 15 mL/minuto (Método B1) ou 20 mL/minuto (Método B2).

Método C: Espectros de Massa de Ionização Eletrônica (EI)

15 Os espectros de massa EI foram registrados utilizando-se um espectrômetro de massa Finnigan SSQ 7000 (modo EI: 70 eV, temperatura de fonte = 150°C, introdução direta)

Método D: Espectros de Massa de Ionização Química (CI)

Espectros de massa CI foram registrados utilizando-se um espectrômetro de massa Finnigan SSQ 7000 (amônia)

20 Método E: Espectros de Ressonância Magnética Nuclear ^1H (RMN).

Os espectros de ^1H RMN foram registrados ou em um espectrômetro Bruker Avance Drx-500, A Bruker Avance Drx-400 ou A Bruker Avance DRX-300.

25 Método F: Purificação por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC)

Purificação por HPLC foi realizada em um Macherey Nagel VP 250/40 mm NUCLEODUR GRAVIDADE 100 - 10 C18 (Catálogo número 762250), eluindo com uma mistura de (A) acetonitrila e (B) água/ HCOONH_4 0,01M/ NH_4OH pH9-10 (gradiente: 10% A: 90% B durante 3 minutos, 10% A: 90% B até 95% A: 5%B durante 37 minutos, 95% A: 5%B durante 8 minutos, 95% A: 5%B a 10% A: 90% B durante 1 minuto, 10% A: 90% B durante 1

minuto) com taxa de fluxo de 70 mL/minuto.

Método G1: Cromatografia Líquida de Alta Pressão-Espectrometria de Massa (LCMS).

Um software Micromass MassLynx é utilizado e a análise é realizada em um Acquity UPLC com uma coluna Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm (2,1x100 mm) utilizando-se eluição gradiente com uma mistura de (A) acetonitrila e (B) água/0.1% ácido fórmico (gradiente: 5% A: 95% B até 95% A: 5% B durante 4.7 minutos, 95% A: 5% B até 5% A: 95% B durante 0.5 minuto, 5% A: 95% B durante 0,8 minuto) com uma taxa de fluxo de 1,1 mL/minuto; espectrômetro Quattro Premier com Eletrovaporização; Disposição de Diodo em linha (210-400 nm).

Método G2: Cromatografia Líquida de Alta Pressão-Espectrometria de Massa (LCMS).

Um *software* Micromass MassLynx é utilizado e a análise é realizada em um Acquity UPLC com uma coluna Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm (2,1x100 mm) utilizando-se eluição gradiente com uma mistura de (A) acetonitrila e (B) água/0,1% ácido fórmico (gradiente: 5% A: 95% B até 95% A: 5% B durante 10 minutos, 95% A: 5% B até 5% A: 95% B durante 1 minuto, 5% A: 95% B durante 2 minutos) com uma taxa de fluxo de 0,6 mL/minuto; espectrômetro Quattro Premier com Eletrovaporização; Disposição de Diodo em linha (210-400 nm).

Método H: Purificação por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC).

Método de purificação por HPLC foi realizado em um Varian HPLC utilizando-se uma coluna Kromasil 16 μm C18 (250 x 21,2 mm, PN A0490-250x212, Lote No. DT0259, SN 9772196), eluindo com uma mistura de (A) água e (B) acetonitrila com uma taxa de fluxo de 20 mL/minuto. A duração da coleção foi de 80 segundos. Espectros de Massa dos compostos foram obtidos em um instrumento Bruker Esquire 3000. Os espectros de RMN foram registrados em um espectrômetro Bruker Avance operando a 400 MHz.

Gradientes para eluir a coluna:

1. Purificação de 8,8'-[5-(N-4-metilditio-4,4-dimetilbutanoil)amino-

1,3-benzenodiilbis(metilenoóxi)]-bis[7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona].

55% A: 45% B durante 8 minutos, 55% A: 45% B a 50% A: 50% B durante 14 minutos, 50% A: 50% B a 10% A: 90% B durante 4 minutos, 10% A: 90% B durante 5 minutos, 10% A: 90% B a 55% A: 45% B durante 1 minuto, 55% A: 45% B durante 3 minutos.

2. Purificação de 8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimetilbutanoil)amino-1,3-benzenodiilbis(metilenoóxi)]-bis[7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona].

60% A: 40% B durante 4 minutos, 60% A: 40% B a 55% A: 45% B durante 5 minutos, 55% A: 45% B durante 4 minutos, 55% A: 45% B a 50% A: 50% B durante 13 minutos, 50% A: 50% B a 10% A: 90% B durante 10 segundos, 10% A: 90% B durante 5 minutos, 10% A: 90% B a 60% A: 40% B durante 10 segundos, 60% A: 40% B durante 3 minutos.

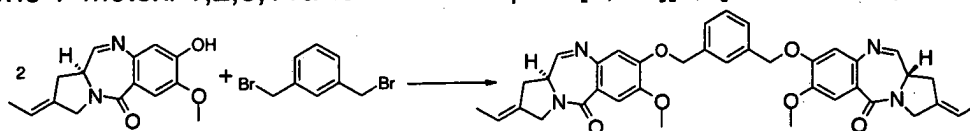
3. Purificação de 8,8'-[5-(N-metil-N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-benzenodiil(metilenoóxi)]-bis[7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona].

60% A: 40% B durante 8 minutos, 60% A: 40% B a 45% A: 55% B durante 16 minutos, 45% A: 55% B a 10% A: 90% B durante 2 minutos, 10% A: 90% B durante 5 minutos, 10% A: 90% B a 60% A: 40% B durante 1 minuto, 60% A: 40% B durante 3 minutos.

4. Purificação de 8,8'-[5-(N-metil-N-(2-mercapto-2,2-dimetiletil)amino-1,3-benzenodiil(metilenoóxi)]-bis[7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

65% A: 35% B a 60% A: 40% B durante 8 minutos, 60% A: 40% B a 50% A: 50% B durante 19 minutos, 50% A: 50% B a 10% A: 90% B durante 10 segundos, 10% A: 90% B durante 5 minutos, 10% A: 90% B a 65% A: 35% B durante 10 segundos, 65% A: 35% B durante 3 minutos.

Exemplo 1: 8,8'-[1,3-benzenodiilbis(metilenoóxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]



Carbonato de potássio (22,8 mg), α,α' -dibromo-*m*-xileno (7,3 mg) e iodeto de potássio (9,1 mg) foram adicionados a uma solução agitada de pré-tomaimicina (15 mg) em dimetilformamida (0,5 mL). A reação foi agitada durante 20 horas em 30°C.

- 5 Os sólidos foram filtrados, lavados duas vezes com dimetilformamida (0,2 mL) em seguida descartados. Água (0,4 mL) foi adicionada à solução de dimetilformamida combinada e a solução resultante foi injetada para purificação por HPLC de acordo com o método B1. As frações apropriadas foram combinadas e concentradas por evaporação centrífuga sobre um
- 10 aparelho Jouan Modelo RC10.10. para fornecer 8,8'-[1,3-benzenodiilbis(metilenoóxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] como um pó branco (3,33 mg):

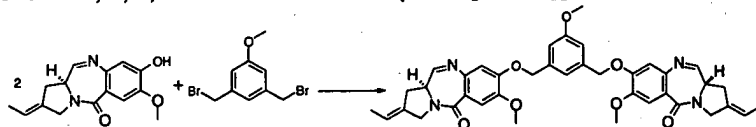
LC/MS (Método A1, Plataforma II):

ES: $m/z=647$ MH^+

- 15 Tempo de retenção = 3,53 minutos

1H RMN (500 MHz, $CDCl_3-d_1$, δ em ppm): 1,75 (d, $J = 7,0$ Hz, 6H); 2,96 (m, 4H); 3,89 (m, 2H); 3,96 (s, 6H); 4,27 (s amplo, 4H); 5,17 (d, $J = 12,5$ Hz, 2H); 5,23 (d, $J = 12,5$ Hz, 2H); 5,60 (m, 2H); 6,85 (s, 2H); de 7,36 a 7,43 (m, 3H); 7,51 (s amplo, 1H); 7,53 (s, 2H); 7,63 (d, $J = 4,5$ Hz, 2H).

- 20 Exemplo 2: 8,8'-[5-metóxi-1,3-benzenodiilbis(metilenoóxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]



- 25 8,8'-[5-metóxi-1,3-benzenodiilbis(metilenoóxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de 8,8'-[1,3-benzenodiilbis(metilenoóxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (Exemplo 1), iniciando com 1,3-bis-bromometil-5-metóxi-benzeno:

LC/MS (Método A1, Plataforma II):

- 30 ES: $m/z = 677$ MH^+

Tempo de retenção = 4,17 minutos

^1H RMN (300 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$, δ em ppm): 1,75 (d, $J = 7,0$ Hz, 6H); 2,96 (m, 4H); 3,81 (s, 3H); 3,89 (m, 2H); 3,96 (s, 6H); 4,26 (s amplo, 4H); 5,14 (d, $J = 12,5$ Hz, 2H); 5,21 (d, $J = 12,5$ Hz, 2H); 5,60 (m, 2H); 6,82 (s, 2H); 6,95 (s amplo, 2H); 7,07 (s amplo, 1H); 7,53 (s, 2H); 7,63 (d, $J = 4,5$ Hz, 2H).

5 1,3-bis-bromometil-5-metóxi-benzeno pode ser preparado como segue:



Tetrabrometo de carbono (663 mg) foi adicionado a uma solução agitada de 1-bromometil-3-hidroximetil-5-metóxi-benzeno (420 mg) em diclorometano anidroso (10 mL) sob argônio. Após resfriamento da solução resultante em 0°C , uma solução de trifenilfosfina (500 mg) em diclorometano anidroso (10 mL) foi adicionada gota a gota. A mistura reacional foi agitada em temperatura ambiente durante 20 horas e em seguida concentrada em vácuo para um resíduo. O resíduo foi purificado por cromatografia de sílica-gel
15 (coluna de 30 g Merck SuperVarioFlash, Si60 15-40 μm , eluído com diclorometano/heptano, 40:60) para fornecer 1,3-bis-bromometil-5-metóxi-benzeno (170 mg):

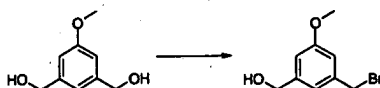
EI (Método C): $m/z = 292 \text{ M}^+$

$m/z = 213 [\text{M} - \text{Br}]^+$

20 $m/z = 134 [213 - \text{Br}]^+$

^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6 , δ em ppm): 3,77 (s, 3H); 4,65 (s, 4H); 6,98 (s amplo, 2H); 7,10 (s amplo, 1H)

1-bromometil-3-hidroximetil-5-metóxi-benzeno pode ser preparado como segue:



25

Tetrabrometo de carbono (3,47 g) foi adicionado a uma solução agitada de 1,3-diidroximetil-5-metóxi-benzeno (800 mg) em diclorometano anidroso (16 mL) sob argônio. Após resfriamento da solução resultante em 0°C , uma solução de trifenilfosfina (2,68 g) em diclorometano anidroso (16
30 mL) foi adicionada gota a gota. A mistura reacional foi agitada em temperatura ambiente durante 20 horas e em seguida concentrada em vácuo para um

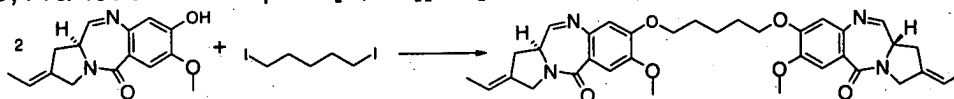
resíduo. O resíduo foi purificado por cromatografia de sílica-gel (coluna de 90 g Merck SuperVarioPrep, Si60 15-40 μm , eluído com metanol/dicloro-
metano, 4:96) para fornecer 1-bromometil-3-hidroximetil-5-metóxi-benzeno
(420 mg):

5 EI (Método C): $m/z=230 \text{ M}^+$

$m/z = 151 [\text{M} - \text{Br}]^+$

$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d_6 , δ em ppm): 3,75 (s, 3H); 4,46 (d
amplo, $J = 5,5 \text{ Hz}$, 2H); 4,65 (s, 2H); 5,22 (t amplo, $J = 5,5 \text{ Hz}$, 1H); 6,83 (s
amplo, 1H); 6,88 (s amplo, 1H); 6,97 (s amplo, 1H)

10 Exemplo 3: 8,8'-[1,5-pentanodiilbis(óxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-
1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]



Carbonato de potássio (22,8 mg) e 1,5-diiodopentano (8,2 μL) fo-
ram adicionados a uma solução agitada de pré-tomaimicina (15 mg) em dimetil-
15 formamida (0,5 mL). A reação foi agitada durante 20 horas em temperatura
ambiente e uma porção adicional de carbonato de potássio (8 mg) foi adiciona-
da. A reação foi agitada durante mais 20 horas em temperatura ambiente.

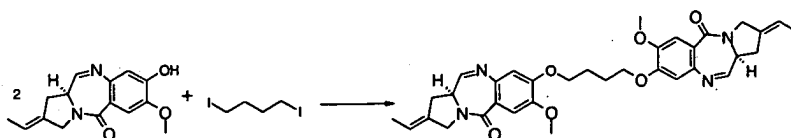
Os sólidos foram filtrados e a solução de dimetilformamida foi
injetada para purificação por HPLC de acordo com o método B2. As frações
20 apropriadas foram combinadas e concentradas por evaporação centrífuga
sobre um aparelho Jouan Modelo RC10.10. para fornecer 8,8'-[1,5-pentano-
diilbis(óxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-
c][1,4]benzodiazepin-5-ona] como um pó branco (4 mg):

LC/MS (Método A2): ES: $m/z=613 \text{ MH}^+$

25 Tempo de retenção = 9,04 minutos

$^1\text{H RMN}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$, δ em ppm): 1,66 (m parcialmente
mascarado, 2H); 1,75 (d amplo, $J = 7,0 \text{ Hz}$, 6H); 1,96 (m, 4H); 2,97 (d amplo, J
= 7,0 Hz, 4H); 3,89 (m, 2H); 3,94 (s, 6H); 4,06 (m, 2H); 4,13 (m, 2H); 4,26 (s
amplo, 4H); 5,60 (m, 2H); 6,80 (s, 2H); 7,50 (s, 2H); 7,66 (d, $J = 4,5 \text{ Hz}$, 2H)

30 Exemplo 4: 8,8'-[1,4-butanodiilbis(óxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,
3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]



8,8'-[1,4-butanodiilbis(óxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de 8,8'-[1,5-pentano-

5 diilbis(óxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (Exemplo 3), iniciando com 1,4-diiodobutano:

LC/MS (Método A1, Plataforma II):

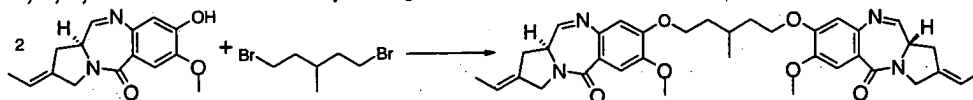
ES: $m/z = 599 \text{ MH}^+$

$m/z = 318,5 \text{ (M + H + K)}^{2+}/2$

10 Tempo de retenção = 3,23 minutos

$^1\text{H RMN}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$, δ em ppm): 1,75 (d amplo, $J = 7,0$ Hz, 6H); 2,10 (m, 4H); 2,98 (d amplo, $J = 7,0$ Hz, 4H); 3,90 (m, 2H); 3,93 (s, 6H); 4,11 (m, 2H); 4,20 (m, 2H); 4,27 (s amplo, 4H); 5,60 (m, 2H); 6,82 (s, 2H); 7,50 (s, 2H); 7,66 (d, $J = 4,5$ Hz, 2H)

15 Exemplo 5: 8,8'-[3-metil-1,5-pentanodiilbis(óxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]



8,8'-[3-metil-1,5-pentanodiilbis(óxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] pode ser

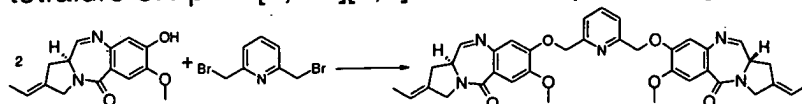
20 preparado seguindo o procedimento para a preparação de 8,8'-[1,3-benzodiazepinodiilbis(metilenoóxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (Exemplo 1), iniciando com 1,5-dibromo-3-metilpentano:

LC/MS (Método A1, Plataforma II):

25 ES: $m/z = 627 \text{ MH}^+$

Tempo de retenção = 3,92 minutos

Exemplo 6: 8,8'-[2,6-piridinadiilbis(óxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]



8,8'-[2,6-piridinadiilbis(óxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de 8,8'-[1,3-benzendiilbis(metilenoóxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (Exemplo 1), iniciando com 2,6-bis-bromometil-piridina:

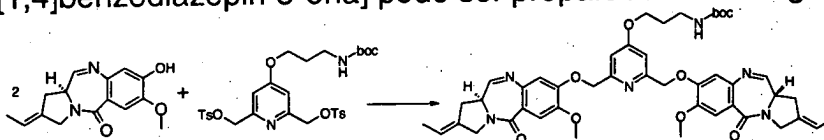
LC/MS (Método A1, ZQ):

ES: $m/z = 648 \text{ MH}^+$

Tempo de retenção = 3,21 minutos

10 ^1H RMN (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$, δ em ppm): 1,75 (d amplo, $J = 6,5$ Hz, 6H); de 2,94 a 2,99 (m, 4H); 3,90 (m, 2H); 3,99 (s, 6H); 4,27 (s amplo, 4H); 5,32 (s, 4H); 5,60 (m, 2H); 6,86 (s, 2H); 7,48 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); 7,56 (s, 2H); 7,64 (d, $J = 4,5$ Hz, 2H); 7,74 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H).

15 Exemplo 7: 8,8'-[4-(3-terc-butoxicarbonilaminopropilóxi)-2,6-piridinadiilbis(metilenoóxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] pode ser preparado como segue:



A uma solução agitada de pré-tomaimicina (30 mg) em dimetilformamida (0,5 mL), foram adicionados carbonato de potássio (45,7 mg), uma solução de 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propóxi)-2,6-bis-(tosiloximetil)-piridina (41 mg) em dimetilformamida (0,5 mL) e iodeto de potássio (18,3 mg). A reação foi agitada durante 20 horas em 30°C. Os sólidos foram filtrados e lavados com dimetilformamida (0,2 mL). Água (0,5 mL) foi adicionada à solução de dimetilformamida combinada e ácido fórmico foi adicionado até dissolução completa do precipitado. A solução resultante foi injetada para purificação por HPLC de acordo com o método B1. As frações apropriadas foram combinadas e concentradas por evaporação centrífuga sobre um aparelho Jouan Modelo RC10.10. para fornecer 8,8'-[4-(3-terc-butoxicarbonilaminopropilóxi)-2,6-piridina-diilbis(metilenoóxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (8,3 mg).

LC/MS (Método A1, Plataforma I):

ES: $m/z = 857 \text{ MH}^+ + 2 \text{ H}_2\text{O}$

$m/z = 839 \text{ MH}^+ + \text{H}_2\text{O}$

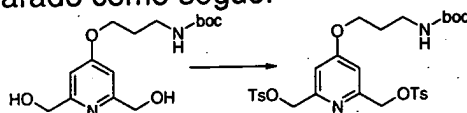
$m/z = 821 \text{ MH}^+$

$m/z = 721 [\text{M}-\text{C}_5\text{O}_2\text{H}_8] + \text{H}^+$

5 Tempo de retenção = 3,67 minutos

$^1\text{H RMN}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{CO}_2\text{D}-d_4$, δ em ppm): 1,41 (s, 9H); 1,71 (d, $J = 6,5$ Hz, 6H); 2,08 (m, 2H); 2,95 (m, 4H); 3,34 (m, 2H); 3,90 (s, 6H); 4,06 (m, 2H); 4,18 (m, 2H); de 4,24 a 4,36 (m, 4H); 4,43 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H); 5,50 (s amplo, 4H); 5,61 (m, 2H); de 6,80 a 7,70 (m muito amplo, 2H); 6,95 (s amplo, 2H); de 7,48 a 7,58 (m, 4H).

4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propóxi)-2,6-bis-(tosiloximetil)-piridina pode ser preparado como segue:



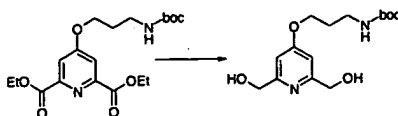
A uma solução pré-resfriada (0°C) de 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina (76 mg) em diclorometano (0,7 mL), foi adicionada uma solução de hidróxido de potássio (30 mg) em água (0,3 mL). Cloreto de tosilato (93,7 mg) foi adicionado, e a mistura heterogênea resultante foi agitada vigorosamente durante 1 hora e em seguida lavada em funil separatório utilizando-se diclorometano e água. As camadas foram separadas, e a camada aquosa foi extraída três vezes com diclorometano. As soluções orgânicas combinadas foram secadas sobre sulfato de magnésio, e concentradas em vácuo para um resíduo. O resíduo foi purificado por cromatografia de sílica-gel (coluna de 10 g Interchrom Puriflash, $\text{SiOH } 15-35 \mu\text{m}$), utilizando-se eluição gradiente com uma mistura de heptano (A) e acetato de etila (B) (gradiente: 90% de A: 10% de B até 50% de A: 50% de B) para fornecer 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propóxi)-2,6-bis-(tosiloximetil)piridina (56 mg):

LC/MS (Método A1, Plataforma I):

ES: $m/z = 621 \text{ MH}^+$

Tempo de retenção = 4,90 minutos

4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina pode ser preparado como segue:



A uma solução de éster dietílico de ácido 4-(3-terc-butoxicarbo-
nilamino-propóxi)-piridina-2,6-dicarboxílico (150 mg) em etanol absoluto (5 mL)
foram adicionados boroidreto de sódio (43 mg) e cloreto de cálcio (128 mg).
5 Após agitação durante 4 horas, a evolução de hidrogênio cessou, e a reação foi
extinguida com água. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O resí-
duo foi em seguida lavado em funil separatório utilizando-se diclorometano e
água. As camadas foram separadas, e a camada aquosa foi extraída três vezes
com diclorometano. As soluções orgânicas combinadas foram secadas sobre
10 sulfato de magnésio, e concentradas em vácuo para fornecer 4-(3-terc-
butoxicarbonilamino-propóxi)-2,6-bis-(hidroximetil) piridina (80 mg):

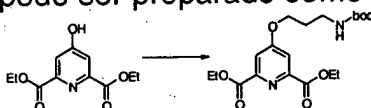
LC/MS (Método A1, ZQ):

ES $m/z = 313 \text{ MH}^+$

Tempo de retenção = 1,90 minutos

15 $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , δ em ppm): 1,37 (s, 9H); 1,84 (m,
2H); 3,08 (q, $J = 6,5 \text{ Hz}$, 2H); 4,05 (t, $J = 6,5 \text{ Hz}$, 2H); 4,45 (d, $J = 6,0 \text{ Hz}$,
4H); 5,32 (t, $J = 6,0 \text{ Hz}$, 2H); 6,84 (s, 2H); 6,90 (t amplo, $J = 6,5 \text{ Hz}$, 1H).

Éster dietílico de ácido 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propóxi)-
piridina-2,6-dicarboxílico pode ser preparado como segue:



20

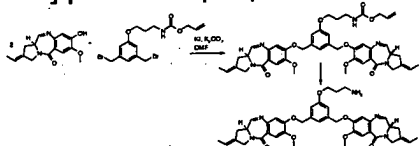
O éster dietílico de ácido quelidâmico (Scrimin, P.; Tecilla, P.;
Tonellato, U.; Vendrame, T. *J. Org. Chem.* 1989, 54, 5988) (150mg) foi dis-
solvido em dimetilformamida seca (2 mL). Brometo de 3-(terc-Butóxi-amino)-
propila (164 mg) e carbonato de potássio (130 mg) foram adicionados. A
25 mistura resultante foi agitada durante 15 horas em 70°C. A reação foi extin-
guida com uma solução aquosa de cloreto de amônio saturado e em seguida
lavada em funil separatório utilizando-se acetato de etila. As camadas foram
separadas, e a camada aquosa foi extraída 3 vezes com acetato de etila. As
soluções orgânicas combinadas foram secadas sobre sulfato de magnésio, e
30 concentradas em vácuo para um resíduo. O resíduo foi purificado por cromatografia

tografia de sílica-gel (coluna de 30 g Merck SuperVarioFlash, Si60 15-40 μ m), utilizando-se eluição gradiente com uma mistura de heptano (A) e acetato de etila (B) (gradiente: 60% de A: 40% de B até 50% de A: 50% de B) para fornecer éster dietílico de ácido 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propóxi)-piridina-2,6-dicarboxílico (150 mg):

CI (Método D): $m/z = 397 \text{ MH}^+$

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6 , δ em ppm): 1,34 (t, $J = 7,0$ Hz, 6H); 1,36 (s, 9H); 1,86 (m, 2H); 3,10 (q, $J = 6,5$ Hz, 2H); 4,21 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H); 4,37 (q, $J = 7,0$ Hz, 4H); 6,89 (m amplo, 1H); 7,71 (s, 2H)

10 Exemplo 8: 8,8'-[5-(3-aminopropilóxi)-1,3-benzenodilbis(metilenoóxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] pode ser preparado como segue:



A uma solução agitada de pré-tomamicina (21 mg) em dimetilformamida (0,7 mL), foram adicionados carbonato de potássio (32 mg), 1-(3-
15 aliloxicarbonilamino-propilóxi)-3,5-bis-(bromometil)-benzeno (16,2 mg) e iodeto de potássio (12,8 mg). A reação foi agitada durante 20 horas em 30°C. Os sólidos foram filtrados, lavados duas vezes com dimetilformamida (0,2 mL) em seguida descartados. Água (0,5 mL) foi adicionada à solução de dimetilformamida
20 combinada e o precipitado resultante foi filtrado, lavado com água e secado por evaporação centrífuga sobre um aparelho Jouan Modelo RC10.10.

Ao composto bruto (27 mg) dissolvido em dimetilformamida (0,8 mL), tetracis(trifenilfosfina) paládio (2 mg), trifenilfosfina (0,9 mg) e pirrolidina (5,6 μ L) foram adicionados. Após agitação durante 15 horas em 30°C, tetra-
25 cis(trifenilfosfina) paládio (2 mg), trifenilfosfina (1 mg) e pirrolidina (2,8 μ L) foram adicionados e a mistura reacional foi agitada em temperatura ambiente durante mais 15 horas. Água (0,4 mL) foi adicionada à solução de dimetilformamida e ácido fórmico foi adicionado até dissolução completa do precipitado. A solução resultante foi injetada para purificação por HPLC de acordo
30 com o método B1. As frações apropriadas foram combinadas e concentra-

das por evaporação centrífuga sobre um aparelho Jouan Modelo RC10.10. para fornecer 8,8'-[5-(3-aminopropilóxi)-1,3-benzenodiilbis-(metilenoóxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (0,2 mg).

5 LC/MS (Método A1, Plataforma II):

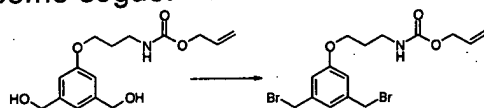
ES: $m/z = 800 \text{ MH}^+$

Tempo de retenção = 2,84 minutos

1-(3-aliloxicarbonilamino-propilóxi)-3,5-bis-(bromometil)-benzeno

pode ser preparado como segue:

10



A uma suspensão de 1-(3-aliloxicarbonilamino-propilóxi)-3,5-bis-(hidróxi-metil)-benzeno (70 mg) em diclorometano (3 mL) foram adicionados tetrabrometo de carbono (248 mg) e uma solução de trifenilfosfina (199 mg) em diclorometano (2 mL). Após refluxo durante 3 horas, a mistura reacional foi purificada por cromatografia de sílica-gel (coluna de 25 g Merck SuperVa-
rioFlash, Si60 15-40 μm), eluída com diclorometano para fornecer 1-(3-
aliloxicarbonilamino-propilóxi)-3,5-bis-(bromometil)-benzeno (52 mg):

15

LC/MS (Método A1, Plataforma II):

ES $m/z = 420 \text{ MH}^+$

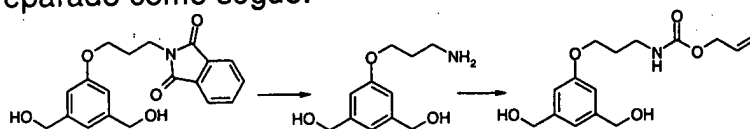
20

Tempo de retenção = 4,50 minutos

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6 , δ em ppm): 1,85 (m, 2H); 3,15 (q, $J = 6,5 \text{ Hz}$, 2H); 3,99 (t, $J = 6,5 \text{ Hz}$, 2H); 4,46 (d amplo, $J = 5,5 \text{ Hz}$, 2H); 4,65 (s, 4H); 5,16 (d amplo, $J = 11,0 \text{ Hz}$, 1H); 5,26 (d amplo, $J = 17,5 \text{ Hz}$, 1H); 5,90 (m, 1H); 6,96 (d, $J = 1,5 \text{ Hz}$, 2H); 7,09 (t, $J = 1,5 \text{ Hz}$, 1H); 7,29 (t amplo, $J = 6,5 \text{ Hz}$, 1H).

25

1-(3-aliloxicarbonilamino-propilóxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno pode ser preparado como segue:



5-(3-Ftalimido-propilóxi)-1,3-bis-(hidroximetil)-benzeno (1,45 g)

30 foi dissolvido em uma mistura de diclorometano e etanol (25 mL, 25: 75).

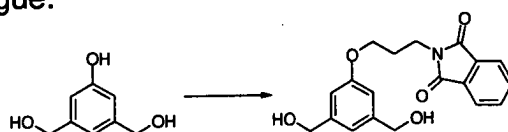
Hidrato de hidrazina (0,62 mL) foi adicionado e a mistura reacional foi refluída durante 1 hora. O solvente foi removido em vácuo e o resíduo dissolvido em diclorometano. O resíduo insolúvel foi filtrado e purificado por cromatografia de sílica-gel (coluna de 70 g Merck SuperVarioPrep, Si60 15-40 μm),
 5 eluído com metanol/diclorometano, 20:80 em seguida hidróxido de amônio/metanol/diclorometano, 0,5:25:75 para fornecer 1-(3-amino-propilóxi)-3,5-bis-(hidróxi-metil)-benzeno (1g) adequado para outra transformação.

Uma amostra de 1-(3-amino-propilóxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno (100 mg) foi dissolvida em metanol (5 mL). À solução resfriada (0°C) foi
 10 adicionada uma solução de carbonato de sódio (120 mg) em água (5 mL) e cloroformiato de alila (42 μL). Após agitação durante 30 minutos em 0°C, a mistura reacional foi conduzida em temperatura ambiente durante mais 15 horas. O solvente foi removido em vácuo. O resíduo foi em seguida lavado em funil separatório utilizando-se acetato de etila e água. As camadas foram
 15 separadas, e a camada aquosa foi extraída duas vezes com acetato de etila. As soluções orgânicas combinadas foram secadas sobre sulfato de magnésio, e concentradas em vácuo para fornecer 5-(3-aliloxicarbonilamino-propilóxi)-2,6-bis-(hidroximetil) benzeno (75 mg):

20 EI (Método C): $m/z = 295 \text{ M}^+$
 $m/z = 142 (\text{M} - \text{C}_8\text{H}_9\text{O}_3)^+$
 $m/z = 41 \text{ C}_3\text{H}_5^+$

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6 , δ em ppm): 1,85 (m, 2H); 3,14 (q, $J = 6,5$ Hz, 2H); 3,96 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H); de 4,41 a 4,48 (m, 6H); 5,11 (t parcialmente mascarado, $J = 5,5$ Hz, 2H); 5,16 (qd, $J = 1,5$ e 10,5 Hz, 1H); 5,26
 25 (qd, $J = 1,5$ e 17,0 Hz, 1H); 5,90 (m, 1H); 6,72 (s amplo, 2H); 6,83 (s amplo, 1H); 7,26 (t amplo, $J = 6,5$ Hz, 1H)

5-(3-ftalimido-propilóxi)-1,3-bis-(hidroximetil)-benzeno pode ser preparado como segue:



30 3,5-Bis-hidroximetilfenol (Felder, D.; Gutiérrez Nava, M.; del Pilar Carreon, M.; Eckert, J.F.; Luccisano, M.; Schall, C.; Masson, P.; Gallani, J.L.;

Heinrich, B.; Guillon, D.; Nierengarten, J.F. *Helv. Chimica Acta* 2002, 85, 288) (2,35 g), N-(3-bromo-propil)-ftalimida (4,49 g) e carbonato de potássio (10,53 g) foram misturados em acetonitrila (25 mL) e refluxados durante 12 horas. A mistura reacional foi resfriada para a temperatura ambiente e o solvente removido sob pressão reduzida. O resíduo foi redissolvido em diclorometano e o resíduo insolúvel filtrado. O filtrado foi lavado com água, secado sobre sulfato de magnésio, e concentrado em vácuo para um resíduo. O resíduo foi purificado por cromatografia de sílica-gel (coluna de 90 g Merck SuperVarioPrep, Si60 15-40 μm), eluído com metanol/diclorometano, 4:96 para fornecer 5-(3-ftalimido-propilóxi)-1,3-bis-(hidroximetil) benzeno (1,45 g):

LC/MS (Método A1, Plataforma II):

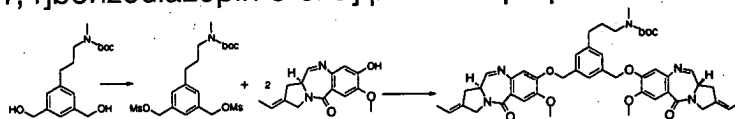
ES $m/z = 342 \text{ MH}^+$

$m/z = 324 (\text{MH}^+ - \text{H}_2\text{O})$

Tempo de retenção = 2,90 minutos

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6 , δ em ppm): 2,05 (m, 2H); 3,76 (t, $J = 6,5 \text{ Hz}$, 2H); 3,99 (t, $J = 6,5 \text{ Hz}$, 2H); 4,40 (d, $J = 5,5 \text{ Hz}$, 4H); 5,09 (t, $J = 5,5 \text{ Hz}$, 2H); 6,59 (s amplo, 2H); 6,82 (s amplo, 1H); de 7,80 a 7,90 (m, 4H)

Exemplo 9: 8,8'-[5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropil)-1,3-benzeno-diilbis(metilenoóxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] pode ser preparado como segue:



A uma solução resfriada (0°C) de 5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropil)-1,3-bis-(hidroximetil)-benzeno (50 mg) e trietilamina (113 μL) em diclorometano (2 mL), foi adicionado cloreto de metanossulfonila (26 μL). Após 30 minutos, a mistura reacional foi lavada duas vezes com água e a solução de diclorometano resultante foi secada sobre sulfato de magnésio, e concentrada em vácuo para um óleo viscoso (50,3 mg).

Uma solução de pré-tomaimicina (15 mg) em dimetilformamida (0,5 mL) foi adicionada a uma mistura (13 mg), carbonato de potássio (23 mg) e iodeto de potássio (9 mg). A mistura reacional foi agitada durante 20 horas em 30°C . Outra amostra do composto bruto foi adicionada (6 mg), e a

mistura reacional foi agitada durante mais 20 horas em 30°C. Os sólidos foram filtrados, lavados com dimetilformamida (0,2 mL) em seguida descartados. Água (0,4 mL), uma gota de ácido fórmico e mais água (1,5 mL) foram adicionados à solução de dimetilformamida combinada.

- 5 Uma amostra da suspensão resultante (2 mL) foi filtrada e o sólido resultante foi secado sob vácuo para fornecer 8,8'-[5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropil)-1,3-benzenodilbis(metilenoóxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (3,1 mg):

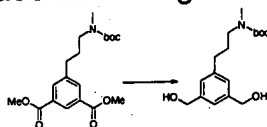
LC/MS (Método A1, Plataforma II):

10

ES: $m/z = 818 \text{ MH}^+$

Tempo de retenção = 4,11 minutos

5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropil)-1,3-bis-(hidroximetil)-benzeno pode ser preparado como segue:



15

A uma solução resfriada (-5°C) de éster dietílico de ácido 5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropil)-benzeno-1,3-dicarboxílico (100 mg) em tetraidrofurano (2 mL) foi lentamente adicionada uma solução a 1 M de hidreto de alumínio de lítio em éter dietílico (0,55 mL). 10 minutos após o fim da adição, decaidrato de sulfato de sódio foi adicionado até a evolução de gás cessar. O sólido foi filtrado, lavado duas vezes com acetato de etila e as soluções orgânicas combinadas foram concentradas em vácuo para fornecer 5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropil)-1,3-bis-(hidroximetil)-benzeno (66,8 mg) como um óleo viscoso:

20

CI (Método D): $m/z = 327 \text{ MNH}_4^+$

25

$m/z = 310 \text{ MH}^+$

$m/z = 271 \text{ (MNH}_4^+ - \text{C}_4\text{H}_8)$

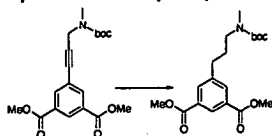
$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6 , δ em ppm): 1,37 (s amplo, 9H); 1,75 (m, 2H); de 2,45 a 2,54 (m mascarado, 2H); 2,77 (s, 3H); 3,18 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H); 4,45 (d, $J = 5,5$ Hz, 4H); 5,08 (t, $J = 5,5$ Hz, 2H); 7,00 (s amplo, 2H);

30

7,08 (s amplo, 1H)

Éster dietílico de ácido 5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopro-

propil)-benzeno-1,3-dicarboxílico pode ser preparado como segue:



A uma solução de éster dietílico de ácido 5-(N-metil-3-terc-butoxycarbonilaminopropin-1-il)-benzeno-1,3-dicarboxílico (890 mg) em metanol (10 mL) foi adicionado paládio a 10% sobre carbono (89 mg) e a solução foi agitada em temperatura ambiente sob uma atmosfera de hidrogênio 0,1 MPa (1bar) durante 18 horas. O sólido foi filtrado e o solvente foi removido em vácuo para fornecer éster dietílico de ácido 5-(N-metil-3-terc-butoxycarbonilaminopropil)-benzeno-1,3-dicarboxílico (767 mg) como um óleo amarelo:

10 EI (Método C): $m/z = 365 M^+$

$m/z = 309 (M - C_4H_8)^+$

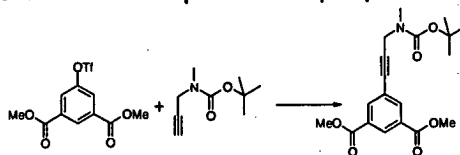
$m/z = 265 (m/z = 309 - CO_2)^+$

$m/z = 57 C_4H_9^+$

$m/z = 44 C_2H_6N^+$

15 1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6 , δ em ppm): 1,32 (s amplo, 9H); 1,79 (m, 2H); 2,70 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H); 2,76 (s, 3H); 3,16 (m, 2H); 3,87 (s, 6H); 8,06 (d, $J = 2,0$ Hz, 2H); 8,32 (t, $J = 2,0$ Hz, 1H)

Éster dietílico de ácido 5-(N-metil-3-terc-butoxycarbonilaminopropin-1-il)-benzeno-1,3-dicarboxílico pode ser preparado como segue:



20

Ester dimetílico de ácido 5-trifluorometanossulfonilóxi-isoftálico (Bodwell, G.J.; Fleming, J.J.; Mannion, M.R.; Miller, D.O. *J. Org. Chem.* 2000, 65 (17), 5360) (1g) foi dissolvido em 2 mL de acetonitrila. N-Metil-N-terc-butoxycarbonil-propargilamina (Bradbury, B.J.; Baumgold, J.; Jacobsen, 25 K.A. *J. Med. Chem.* 1990, 33 (2), 741) (643 mg), cloreto de bis(trifenilfosfina)paládio (205 mg), iodeto de cobre (56 mg) e trietilamina (591 mg) foram adicionados. A mistura resultante foi agitada durante 15 horas em temperatura ambiente. O solvente foi removido por evaporação sob pressão reduzida e o resíduo foi em seguida lavado em funil separatório utilizando-se

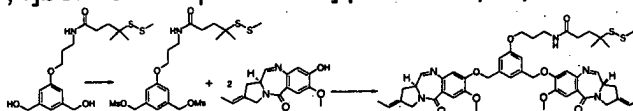
acetato de etila e água. As camadas foram separadas, e a camada aquosa foi extraída uma vez com acetato de etila. As soluções orgânicas combinadas foram lavadas com uma solução aquosa de cloreto de sódio saturado, secadas sobre sulfato de magnésio, e concentradas em vácuo para um resíduo. O resíduo foi purificado por cromatografia de sílica-gel (coluna de 100 g Biotage FLASH 40+M, SiOH 32-63 μm , eluído com acetato de etila/heptano, 20:80) para fornecer éster dietílico de ácido 5-(N-metil-3-terc-butoxicarbo-

5 nilaminopropin-1-il)-benzeno-1,3-dicarboxílico (896 mg):

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6 , δ em ppm): 1,43 (s, 9H); 2,90 (s, 3H); 3,90 (s, 6H); 4,30 (s, 2H); 8,16 (d, $J = 1,5$ Hz, 2H); 8,42 (t, $J = 1,5$ Hz, 1H)

10

Exemplo 10: 8,8'-{5-[3-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)propilóxi]-1,3-benzenodiilbis(metilenoóxi))-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] pode ser preparado como segue:



15 A uma solução resfriada (0°C) de 1-[3-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)-propilóxi]-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno (45 mg) e trietilamina (49 μL) em diclorometano (1,5 mL), foi adicionado cloreto de metanossulfonila (19 μL). Após 30 minutos, a mistura reacional foi lavada duas vezes com água e a solução de diclorometano resultante foi secada sobre sulfato

20 de magnésio, e concentrada em vácuo para um óleo viscoso (39 mg).

A uma solução de pré-tomaimicina (26 mg) em dimetilformamida (0,9 mL) foi adicionado carbonato de potássio (40 mg), iodeto de potássio (16 mg) e uma amostra do composto bruto (31 mg). A mistura reacional foi agitada durante 20 horas em 30°C. Outra amostra do composto bruto foi adicionada (6

25 mg), e a mistura reacional foi agitada durante mais 20 horas em 30°C. Os sólidos foram filtrados, lavados com dimetilformamida (0,3 mL) em seguida descartados. Água (1,6 mL) foi adicionada à solução de dimetilformamida combinada e o sólido resultante foi filtrado, lavado com água e secado em vácuo para fornecer um resíduo. O resíduo foi purificado por cromatografia de sílica-gel (colu-

30 na de 2 g Interchrom Puriflash, SiOH 15-35 μm , eluído com diclorometano/metanol, 95:5) em seguida outra purificação por cromatografia de sílica-gel

(coluna de 2 g Chromabond OH, 45 μm , eluído com diclorometano para fornecer 8,8'-{5-[3-(4-metil-4-metildissulfanilpentanoil-amino)propilóxi]-1,3-benzenodiilbis(metilenoóxi)}-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzo-diazepin-5-ona] (0,2 mg):

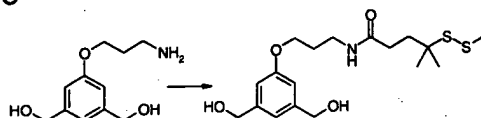
5 LC/MS (Método A1, Plataforma I):

ES: $m/z = 896 \text{ MH}^+$

Tempo de retenção = 4,09 minutos

^1H RMN (500 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$, δ em ppm): 1,29 (s, 6H); 1,75 (d, $J = 6,5$ Hz, 6H); de 1,92 a 2,03 (m, 4H); 2,28 (m, 2H); 2,39 (s, 3H); 2,97 (m, 10 4H); 3,45 (q, $J = 6,0$ Hz, 2H); 3,89 (q, $J = 5,5$ Hz, 2H); 3,96 (s, 6H); 4,04 (t, $J = 5,0$ Hz, 2H); 4,27 (s amplo, 4H); 5,14 (d, $J = 12,5$ Hz, 2H); 5,20 (d, $J = 12,5$ Hz, 2H); 5,60 (m, 2H); 5,84 (t amplo, $J = 6,0$ Hz, 1H); 6,83 (s, 2H); 6,94 (s, 2H); 7,09 (s, 1H); 7,53 (s, 2H); 7,64 (d, $J = 5,0$ Hz, 2H).

15 1-[3-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)-propilóxi]-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno



A uma solução de 1-(3-amino-propilóxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno (50 mg) em dimetilformamida (1 mL) foi adicionado ácido 4-metil-4-metildissulfanil-pentanóico (44 mg), N,N'-diisopropilcarbodiimida (35 mL) e 20 hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (5,8 mg). Após 15 horas em temperatura ambiente, água foi adicionada à mistura reacional e a solução aquosa foi extraída duas vezes com acetato de etila. As soluções orgânicas combinadas foram lavadas com uma solução aquosa de cloreto de sódio saturado, secadas sobre sulfato de magnésio e concentradas em vácuo para um resí- 25 duo. O resíduo foi purificado por cromatografia de sílica-gel (coluna de 5 g Interchrom Puriflash, SiOH 15-35 μm), eluído com metanol/diclorometano, 5:95 para fornecer 1-[3-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)-propilóxi]-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno (48 mg):

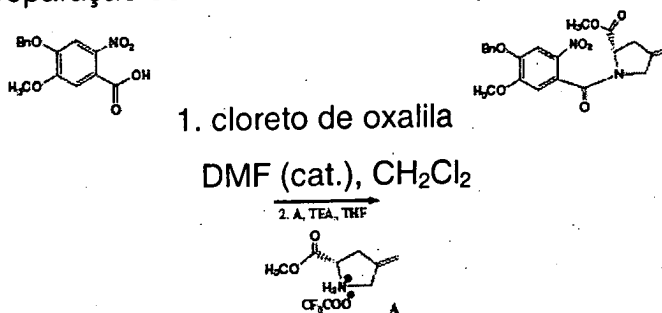
LC/MS (Método A1, ZQ):

30 ES $m/z = 388 \text{ MH}^+$

Tempo de retenção = 3,03 minutos

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6 , δ em ppm): 1,24 (s, 6H); de 1,76 a 1,87 (m, 4H); 2,16 (m, 2H); 2,40 (s, 3H); 3,19 (q, $J = 6,5$ Hz, 2H); 3,95 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H); 4,44 (d amplo, $J = 5,5$ Hz, 4H); 5,12 (d, $J = 5,5$ Hz, 2H); 6,73 (s amplo, 2H); 6,83 (s amplo, 1H); 7,92 (t amplo, $J = 5,5$ Hz, 1H)

5 Exemplo 11: Preparação de intermediários e/ou produtos de partida

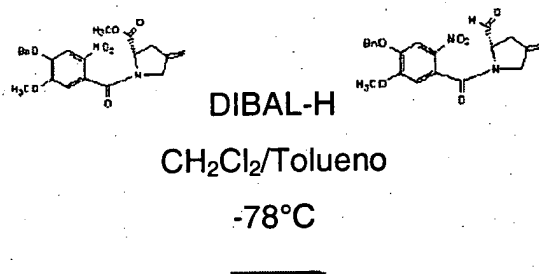


A uma solução de ácido 4-benzilóxi-5-metóxi-2-nitrobenzóico (4,8 g, 16 mmols) em diclorometano anidroso (80 mL) e THF (5 mL) foi adicionado cloreto de oxalila (2,8 mL, 32 mmols) e DMF (30 μL , 0,38 mmol) em temperatura ambiente. Quantidades grandes de bolha formaram-se após a adição de DMF. A mistura foi agitada durante a noite em seguida os solventes foram removidos por evaporação giratória em vácuo. O resíduo foi co-evaporado mais uma vez por adição de diclorometano anidroso para fornecer o cloreto de acetila como um sólido amarelo.

A uma solução de éster metílico de 4-metileno-*L*-prolina, composto A, (3,95 g, 15,5 mmols) em THF anidroso (80 mL) foi adicionada trietilamina (6,7 mL, 48 mmols) em 0°C . Após 2 minutos o cloreto de acetila acima em THF anidroso (80 mL) foi adicionado rapidamente em 10 minutos por meio de uma cânula na mesma temperatura. A solução turva amarela obtida foi agitada em $0 \sim 5^\circ\text{C}$ durante 30 minutos em seguida em temperatura ambiente durante 4 horas. A solução reacional foi diluída com acetato de etila e água. A camada aquosa foi extraída com acetato de etila duas vezes e as camadas orgânicas combinadas foram lavadas com solução de HCl a 2% e salmoura, secadas sobre sulfato de magnésio anidroso. Ela foi filtrada e os solventes foram removidos. O resíduo foi purificado por cromatografia instantânea (Hexanos/AcOEt, 1:1, 1:1,5) para fornecer éster metílico de ácido (2*S*)-4-(metileno)-1-[5-metóxi-2-nitro-4-(fenilmetóxi)-benzoil]-2-pirrolidinacarboxílico

como um sólido amarelo (5,6 g, $y = 85\%$). ^1H RMN (400 Hz, CDCl_3): o composto aparece como um par de rotômeros distintos. δ 7,76 (s, 0,7H), 7,73 (s, 0,3H), 7,43 - 7,29 (m, 5H), 6,83 (s, 0,7H), 6,80 (s, 0,3H), 5,17 (s, 1,4H), 5,16 (s, 0,6H), 5,10 - 4,89 (m, 2,7H), 4,57 (d, $J = 16$ Hz, 0,3H), 4,19 - 4,12 (m, 0,7H), 3,95 - 3,77 (m, 6,3H), 3,57 (s, 1H), 3,06 - 2,96 (m, 1H), 2,73 - 2,62 (m, 1H); ^{13}C RMN (400 Hz, CDCl_3): 171,8, 171,7, 166,5, 166,2, 154,9, 154,4, 148,25, 148,18, 141,7, 141,3, 137,19, 137,13, 135,3, 135,2, 128,7, 128,43, 128,41, 127,5, 127,3, 109,5, 109,1, 109,0, 108,9, 71,3, 60,6, 58,1, 56,7, 56,5, 52,39, 52,37, 52,0, 50,2, 37,1, 35,5; MS (ESI): m/z 449,3 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$.

10



15

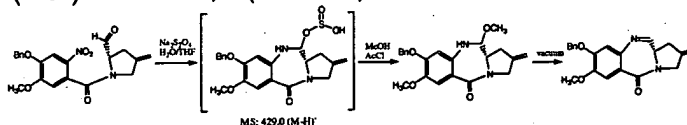
20

25

30

A uma solução do éster (3,15 g, 7,39 mmols) em diclorometano anidro (9 mL) e tolueno (27 mL) foi adicionado dibal-H (15 mL, 1,0 M em tolueno) gota a gota por meio de uma bomba de seringa em 30 minutos em -78°C . A mistura continuou a agitar em -78°C durante 2 horas e TLC (hexanos/AcOEt, 1:1,5) mostrou todo o material de partida consumido. A reação foi extinguida com metanol (0,3 mL, 7,4 mmols) em -78°C e HCl a 5% (20 mL) foi adicionado seguido por adição de AcOEt (50 mL). O banho de gelo seco/acetona foi removido e a mistura foi aquecida para 0°C e agitada durante 15 minutos. A camada aquosa foi extraída com AcOEt duas vezes e as camadas orgânicas combinadas foram lavadas com HCl a 5% frio e salmoura, secadas sobre sulfato de sódio anidro. Ela foi filtrada através de celita e os solventes foram removidos. O resíduo foi purificado por cromatografia instantânea (Hexanos/AcOEt, 1:1, 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:5, 100% de AcOEt) para fornecer (2S)-4-(metileno)-1-[5-metóxi-2-nitro-4-(fenilmetóxi)benzoil]-2-pirrolidinacarboxaldeído como um sólido amarelo macio (2,69 g, $y = 92\%$). ^1H RMN (400 Hz, CDCl_3): o composto aparece como um par de rotômeros distintos. δ 9,75 (s, 0,7H), 9,32 (s, 0,3H), 7,76 (s, 0,7H), 7,69 (s, 0,3H), 7,45 - 7,31 (m, 5H), 6,85 (s, 0,7H), 6,80 (s, 0,3H), 5,19 - 4,82 (m, 4,7H), 4,56 (d, $J = 16$ Hz, 0,3H), 4,14 - 3,79 (m, 5H),

2,99 - 2,68 (m, 2H); ^{13}C RMN (400 Hz, CDCl_3): 198,3, 197,1, 167,1, 155,0, 154,6, 148,4, 141,3, 140,4, 137,2, 135,2, 128,7, 128,5, 128,4, 127,5, 126,9, 126,6, 109,8, 109,4, 109,3, 109,2, 109,1, 71,3, 66,6, 64,3, 56,7, 56,6, 52,2, 50,6, 33,2, 31,9; MS (ESI): m/z 419,2 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$.



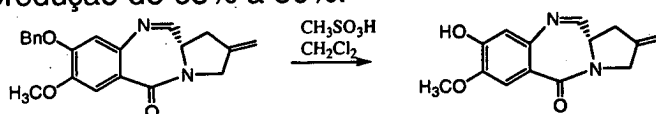
5

Procedimento 1: a uma solução de (2S)-4-(metileno)-1-[5-metóxi-2-nitro-4-(fenilmetóxi)benzoil]-2-pirrolidinacarboxaldeído (1,0 equivalente) em THF/ H_2O (v/v, 1,7:1, 0,03 M) foi adicionado hidrossulfito de sódio (5~8 equivalentes) em porções dentro de 2 minutos em temperatura ambiente. A mistura foi também agitada durante 6~20 horas e monitorada por TLC (hexanos/AcOEt 1:2 e $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 5:1). Após o aldeído ser quase consumido, a reação foi extinguida com metanol (em torno do mesmo volume como o THF utilizado). Os solventes foram removidos por evaporação giratória em vácuo (temperatura < 40°C) e o sólido restante foi colocado em vácuo elevado para tornar-se completamente seco. O sólido foi suspenso em metanol anidro (0,03 M) e AcCl (8~10 equivalentes) foi adicionado gota a gota em temperatura ambiente. Após agitada durante 15 minutos, a solução turva foi filtrada e o sólido foi lavado com metanol anidro. O filtrado amarelo claro foi agitado em temperatura ambiente durante 1 a 2 horas e foi extinguido com bicarbonato de sódio saturado. Após a maioria do metanol ser removido por evaporação giratória, o restante foi diluído com diclorometano e água. A camada aquosa foi extraída com AcOEt. As camadas orgânicas combinadas foram secadas sobre sulfato de sódio anidro e filtradas. Os solventes foram removidos e o resíduo foi purificado por cromatografia instantânea (hexanos/AcOEt, 1:3, 1:5) para fornecer (11aS)-7-metóxi-2-metileno-8-(fenilmetóxi)-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona em produção de 70% a 85%. Os espectros de RMN são coerentes com a literatura relatada. MS (ESI): m/z 371,2 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$. MS (ESI, com CH_3OH): m/z 403,3 ($\text{M} + \text{CH}_3\text{OH} + \text{Na}$) $^+$. MS (ESI, com H_2O): m/z 389,2 ($\text{M} + \text{H}_2\text{O} + \text{Na}$) $^+$.

Procedimento 2: a uma solução de (2S)-4-(metileno)-1-[5-metóxi-2-nitro-4-(fenilmetóxi)benzoil]-2-pirrolidinacarboxaldeído (1,0 equivalente) em MeOH/ H_2O (v/v, 3,2:1, 0,03 M) foi adicionado hidrossulfito de sódio (6~8

30

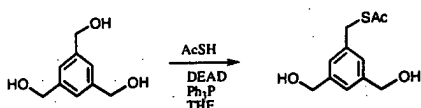
equivalentes) em porções dentro de 2 minutos em temperatura ambiente, seguido por adição de hidrossulfato de sódio (0,5~1,0 equivalente). A mistura foi também agitada durante 12~20 horas e monitorada por TLC (hexanos/AcOEt 1:2 e CH₂Cl₂/MeOH 5:1). Após o intermediário [MS (ESI): 459,0 (M - H)] ser quase consumido, a reação foi extinguida com bicarbonato de sódio saturado para pH 5~6. Os solventes foram removidos por evaporação giratória em vácuo (temperatura < 40°C) e o sólido restante foi colocado em vácuo elevado para tornar-se completamente seco. O sólido foi suspenso em metanol anidroso (0,03 M) e AcCl (8~10 equivalentes) foi adicionado gota a gota em temperatura ambiente. Após agitada durante 15 minutos, a solução turva foi filtrada e o sólido foi lavado com metanol anidroso. O filtrado amarelo claro foi agitado em temperatura ambiente durante 1 a 2 horas e foi extinguido com bicarbonato de sódio saturado. Após a maioria do metanol ser removido por evaporação giratória, o restante foi diluído com diclorometano e água. A camada aquosa foi extraída com AcOEt. As camadas orgânicas combinadas foram secadas sobre sulfato de sódio anidroso e filtradas. Os solventes foram removidos e o resíduo foi purificado por cromatografia instantânea (hexanos/AcOEt, 1:3, 1:5) para fornecer (11aS)-7-metóxi-2-metileno-8-(fenilmetóxi)-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona em produção de 65% a 80%.



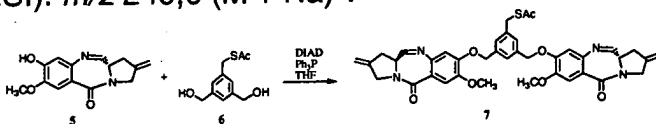
A uma solução do material de partida (98 mg, 0,28 mmol) em diclorometano anidroso (2 mL) foi adicionada uma solução recentemente misturada de ácido metanossulfônico (2 mL) em diclorometano anidroso (4 mL) em temperatura ambiente. A mistura foi agitada em temperatura ambiente durante 1,5 hora e foi vertida em gelo (~30 g), extinguida com NaHCO₃ saturado e diluída com diclorometano. A camada aquosa foi extraída com diclorometano uma vez e as camadas orgânicas combinadas foram secadas sobre sulfato de sódio anidroso, filtradas e os solventes foram removidos. O resíduo foi purificado por cromatografia instantânea (CH₂Cl₂/MeOH, 15:1) para fornecer o produto como um sólido amarelo (29 mg). A camada aquosa

acima foi agitada em temperatura ambiente durante a noite e extraída com diclorometano e AcOEt subsequentemente. Os diclorometano e AcOEt combinados foram secados sobre sulfato de sódio anidro, filtrados e os solventes foram removidos para fornecer (11aS)-8-hidróxi-7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona (25 mg). A produção total é 74%. ¹H RMN (400 Hz, CDCl₃): δ 7,65 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 7,48 (s, 1H), 6,87 (s, 1H), 6,35 (bs, 1H), 5,17 (t, J = 1,6 Hz, 1H), 5,14 (7, J = 1,6 Hz, 1H), 4,26 (s, 2H), 3,93 (s, 3H), 3,87 - 3,83 (m, 1H), 3,12 - 3,05 (m, 1H), 2,91 (d, J = 16 Hz, 1H); MS (ESI): *m/z* 281,0 (M + Na)⁺. MS (ESI, com água): *m/z* 258,9 (M + H)⁺, *m/z* 299,1 (M + H₂O + Na)⁺.

Exemplo 12: 8,8'-[5-acetiltiometil-1,3-benzenodiilbis(metileno-óxi)]-bis[(S)-2-metileno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]-benzodiazepin-5-ona]



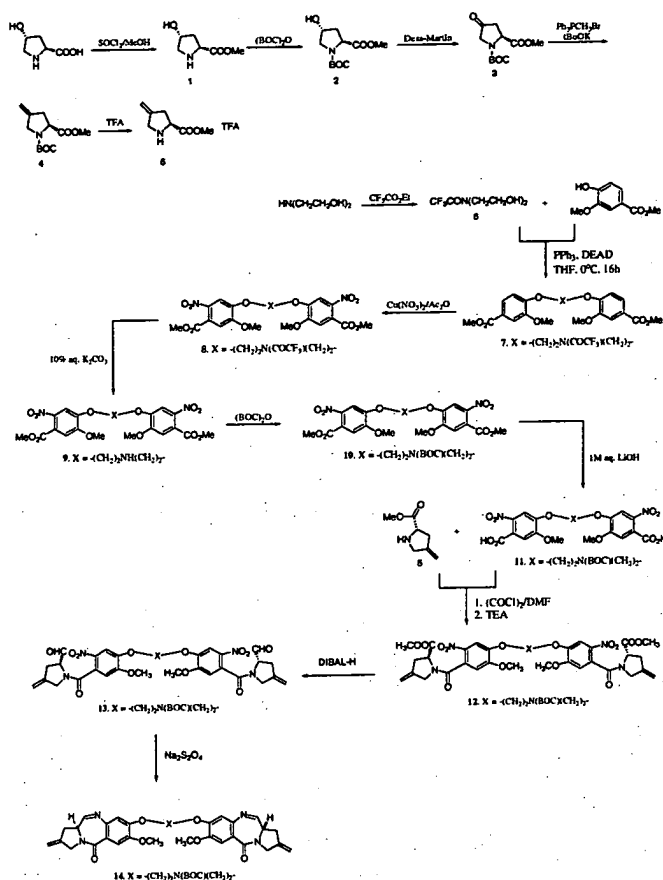
A uma solução de trifenilfosfina (577 mg, 2,2 mmols) em THF anidro (5 mL) foi adicionado azodicarboxilato de dietila (2,2 M em tolueno, 791 µL, 1,7 mmol) gota a gota em 0°C. Após agitada em 0°C durante 50 minutos, uma solução de 1,3,5-tri(hidroximetil)benzeno (269 mg, 1,6 mmol, preparado por redução de 1,3,5-benzenotricarboxilato de trimetila com hidreto de alumínio de lítio em THF, co-evaporado com benzeno seco e secado em vácuo elevado durante par de horas antes do uso) e ácido tioacético (108 µL, 1,45 mmol) em THF seco (4 mL) foi adicionada gota a gota. Após 1 hora, o banho de gelo/água foi removido e a reação foi agitada em temperatura ambiente durante 15 horas. Os solventes foram removidos por evaporação giratória em vácuo. O resíduo foi purificado por cromatografia instantânea para fornecer 5-acetiltiometil-1,3-bis(hidroximetil)-benzeno como sólido incolor (110 mg). ¹H RMN (400 Hz, CDCl₃): δ 7,13 - 6,99 (m, 3H), 4,45 (apt, J = 20,4 Hz, 4H), 3,98 (apt, J = 20,4 Hz, 4H), 3,73 (bs, 2H), 2,24 (apt, J = 20,4 Hz, 3H); MS (ESI): *m/z* 249,0 (M + Na)⁺.



A uma solução de trifetilfosfina (28 mg, 0,1 mmol) em THF anidro (0,3 mL) foi adicionado azodicarboxilato de disopropila (19 μ L, 0,09 mmol) gota a gota em 0°C. Após agitada em 0°C durante 35 minutos, uma solução de (11aS)-8-hidróxi-7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona, composto 5, (18 mg, 0,07 mmol, co-evaporado com benzeno seco e secado em vácuo elevado durante par de horas antes do uso) em THF seco (0,2 mL) foi adicionada. A mistura continuou a agitar durante 10 minutos antes de 5-acetiltiometil-1,3-bis(hidroxi-metil)-benzeno, composto 6, (6,6 mg, 0,03 mmol, co-evaporado com benzeno seco e secado em vácuo elevado durante par de horas antes do uso) em THF seco (0,2 mL) ser adicionado. A mistura reacional foi deixada agitar em 0°C durante 35 minutos. O banho de gelo/água foi removido e a solução foi agitada em temperatura ambiente durante 21 horas. Os solventes foram removidos por evaporação giratória em vácuo. O resíduo foi purificado por cromatografia instantânea para fornecer o produto bruto que foi também purificado por HPLC preparativa (coluna C18, CH₃CN/H₂O) para fornecer 0,7 mg de 8,8'-[5-acetiltiometil-1,3-benzenodilbis(metilenoóxi)]-bis[(S)-2-metileno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona], composto 7. MS (ESI, com H₂O): *m/z* 765,3 (M + 2H₂O + Na)⁺, 747,3 (M + H₂O + Na)⁺, 729,2 (M + Na)⁺, 707,3 (M + H)⁺, 663,2 (M - Ac)⁻.

Exemplo 13: Éster terc-butílico de ácido Bis-{2-[(S)-2-metileno-7-metóxi-5-oxo-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-ilóxi]-etil}-carbâmico

Esquema 1



Composto 1. Cloreto de tionila (5,6 mL, 76,3 mmols) foi adicionado gota a gota a metanol seco (76 mL) em -20°C , seguido por adiçã

5 aquecer para a temperatura ambiente e agitada durante 20 horas. O solvente foi removido sob pressão reduzida, e o resíduo foi também secado sob vácuo elevado para fornecer éster metílico de *trans*-4-hidróxi-*L*-prolina 1 como um sólido branco: ^1H RMN (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 2,18 – 2,23 (m, 2H), 3,06 (m, 1H), 3,32 – 3,36 (m, 2H), 3,76 (s, 3H), 4,42 (amplo s, 1H), 4,48 (dd, $J = 5,4, 8,1$ Hz, 1H), 5,56 (br s, 1H); EIMS m/z 146 ($[\text{M}]^+ + 1$).

10

Composto 2. A uma solução de éster metílico de *trans*-4-hidróxi-*L*-prolina 1 (4,48 g, 30,9 mmols) e bicarbonato de sódio (1,56 g, 18,5 mmols) em DMF anidroso (42 mL) foi adicionada solução de $(\text{BOC})_2\text{O}$ em DMF (20 mL) em 0°C sob argônio. Após agitação durante uma noite em temperatura ambiente, a reação foi extinguida por uma adição de 100 mL de H_2O em 0°C , e extraída com EtOAc (4 x 80 mL). A camada orgânica combinada foi lavada com salmoura (100 mL), secada (MgSO_4), filtrada e concentrada com *rotavapor*. O resíduo foi purificado por cromatografia instantânea (sílica-gel, 1:1 de hexanos/EtOAc)

15

para fornecer éster metílico de *trans*-4-hidróxi-*L*-prolina protegido por N-BOC 2 como óleo incolor: ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3 , rotâmeros) δ 1,38 e 1,43 (2 x s, 9H), 2,04 – 2,07 (m, 1H), 2,23 – 2,27 (m, 2H), 3,54 – 3,63 (m, 2H), 3,70 (s, 3H), 4,34 – 4,38 (m, 1H), 4,46 (amplo s, 1H).

5 Composto 3. (Franco Manfre, Jean-Marc Kern, e Jean-Francois Biellmann *J. Org. Chem.* 1992, 57, 2060-2065). Composto éster metílico de *trans*-4-hidróxi-*L*-prolina protegido por N-BOC 2 (3,24 g, 13,2 mmols) foi dissolvido em CH_2Cl_2 (132 mL) e resfriado para 0°C. Piridina e periodinano de Dess-Martin foram adicionados e a agitação foi continuada até TLC não
10 mostrar nenhum resto de SM. A mistura reacional foi diluída com CH_2Cl_2 , lavada com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ aquoso a 10% (3 x 50 mL), 1N de HCl aquoso (50 mL), NaHCO_3 aquoso saturado (50 mL), salmoura (50 mL), secada sobre MgSO_4 , filtrada e concentrada. Purificação do resíduo por cromatografia instantânea (sílica-gel, 7:3 de hexanos/EtOAc) forneceu éster metílico de 4-oxo-*L*-prolina
15 protegido por N-BOC 3 como óleo amarelo claro: ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3 , rotâmeros) δ 1,44 (s, 9H), 2,53 – 2,57 (m, 1H), 2,85 – 2,96 (m, 1H), 3,72 e 3,74 (2 x s, 3H), 3,85 – 3,87 (m, 2H), 4,67 – 4,77 (m, 1H).

Composto 4. (Kuei-Ying Lin, Mark Matteucci US 5414077). Uma solução de potássio-*t*-butóxido (2,51 g, 22,3 mmols) em THF anidroso (40 mL)
20 foi adicionada a uma suspensão de brometo de metiltrifenilfosfônio (7,99 g, 22,3 mmols) em THF (40 mL) em 0°C. A suspensão de ileto amarela resultante foi agitada em 0°C durante 2 horas antes da adição da solução de éster metílico de 4-oxo-*L*-prolina protegido por N-BOC 3 (2,72 g, 11,2 mmols) em THF (32 mL). Após agitação em temperatura ambiente durante 1 hora, a mistura reacio-
25 nal foi diluída com EtOAc (100 mL), lavada com H_2O (80 mL), salmoura (80 mL), secada (MgSO_4), e concentrada. Purificação do resíduo por cromatografia instantânea (sílica-gel, 9:1 de hexanos/EtOAc) produziu éster metílico de 4-metileno-*L*-prolina protegido por N-BOC, composto 4, como óleo incolor: ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3 , rotâmeros) δ 1,40 e 1,45 (2 x s, 9H), 2,58 – 2,62 (m, 1H), 2,88 – 2,98 (m, 1H), 3,69 e 3,70 (2 x s, 3H), 4,03 – 4,06 (m, 2H), 4,36 –
30 4,49 (m, 1H), 4,97 – 4,99 (m, 2H); EIMS m/z 264 ($[\text{M}]^+ + \text{Na}$).

Composto 5. Éster metílico de 4-metileno-*L*-prolina protegido por

N-BOC, composto 4, (0,8 g, 3,31 mmols) foi dissolvido em CH₂Cl₂ (6,5 mL) e resfriado para 0°C. Uma solução de ácido trifluoroacético (6,5 mL) em CH₂Cl₂ (6,5 mL) foi adicionada gota a gota e a mistura resultante foi agitada em temperatura ambiente durante 1,5 hora. Após remoção de solventes voláteis com *rotavapor*, o resíduo marrom foi dissolvido em 10 mL de H₂O, lavado com Et₂O (3 x 5 mL). Solução aquosa foi concentrada, a qual foi também secada sob vácuo elevado para produzir éster metílico de 4-metileno-L-prolina 5 como sal de TFA: ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃, rotâmeros) δ 2,83 – 2,87 (m, 1H), 3,05 – 3,11 (m, 1H), 3,80 e 3,81 (2 x s, 3H), 4,00 – 4,10 (m, 2H), 4,55 (dd, *J* = 5,7, 5,7 Hz, 1H), 5,17 – 5,21 (m, 2H); ¹³C RMN □ 34,0, 49,1, 53,8, 59,3, 111,7, 137,6, 169,8; EIMS *m/z* 142 ([M]⁺+1).

Composto 6 (Kamal, A.; e outros *J. Med. Chem.* 2002, 45, 4679-4688)

Dietanolamina (3,57 g, 34 mmols) foi dissolvido em metanol (20 mL) e tratado com Et₃N (4,7 mL, 34 mmols) e trifluoroacetato de etila (4,90 g, 34 mmols) durante 20 horas em temperatura ambiente, seguido por adição de mais 1 mL de CF₃COOEt. Após mais 20 horas, a remoção de solventes voláteis sob vácuo elevado produziu o composto N-trifluoroacetil-dietanolamina 6 como óleo amarelo claro, que foi utilizado sem outra purificação.

Composto 7. Azodicarboxilato de dietila (7,66 g, 44 mmols) foi adicionado gota a gota a uma solução agitada de vanilato de metila (7,30 g, 40,1 mmols) e trifenilfosfina (15,67 g, 59,7 mmols) em THF anidroso (57 mL) em 0 °C, e a mistura resultante foi agitada durante 1 hora nesta temperatura seguido por adição de uma solução de N-trifluoroacetil-dietanolamina 6 (7,30 g, 40,1 mmols) em THF anidroso (20 mL). Após agitação durante uma noite em temperatura ambiente, a reação foi extinguida com H₂O (100 mL), e extraída com Et₂O (3 x 80 mL). As camadas de Et₂O combinadas foram lavadas com salmoura (100 mL), secadas (MgSO₄), e concentradas. Purificação do resíduo por cromatografia instantânea (sílica-gel, 8:2 a 7:3 de hexanos/EtOAc) produziu N-trifluoroacetil-N,N-di[2-(4-metoxicarbonil-2-metóxi-fenóxi)etil]amina, composto 7, como um sólido branco: ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 3,81 (s, 3H), 3,84 (s, 3H), 3,87 (s, 3H), 3,88 (s, 3H), 4,04 – 4,08 (m,

4H), 4,28 – 4,32 (m, 4H), 6,84 e 6,85 (2 x d, $J = 6,3$ Hz, 2H), 7,50 e 7,51 (2 x d, $J = 1,5$ Hz, 2H), 7,61 (dd, $J = 1,5, 6,3$ Hz, 2H).

Composto 8. $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ sólido (2,33 g, 12,41 mmols) foi adicionado a uma solução agitada de N-trifluorocetil-N,N-di[2-(4-metoxicarbonil-2-metóxi-fenóxi)etil]amina 7 (2,62 g, 4,96 mmols) em anidrido acético (50 mL) em 0°C. A mistura reacional foi agitada em 0°C durante 1 hora e temperatura ambiente durante 2 horas, em seguida vertida em 200 mL de água gelada. A agitação foi continuada durante mais 1 hora. O precipitado amarelo resultante foi coletado por filtração. Outra purificação com cromatografia instantânea (sílica-gel, 6:4 de hexanos/EtOAc) produziu N-trifluorocetil-N,N-di[2-(4-metoxicarbonil-2-metóxi-5-nitro-fenilóxi)etil]amina, composto 8, como sólido amarelo claro: ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 3,86 (s, 3H), 3,88 (s, 3H), 3,886 (s, 3H), 3,890 (s, 3H), 4,04 – 4,09 (m, 4H), 4,30 – 4,35 (m, 4H), 6,98 e 6,99 (2 x s, 2H), 7,37 e 7,40 (2 x s, 2H).

Composto 9. Uma solução de N-trifluorocetil-N,N-di[2-(4-metoxicarbonil-2-metóxi-5-nitro-fenilóxi)etil]amina 8 (2,58 g, 4,16 mmols) em THF-MeOH (1:2, 48 mL) foi tratada com K_2CO_3 aquoso a 10% (16 mL) em temperatura ambiente durante 12 horas. Após remoção de volátil com *rotavapor*, o resíduo foi diluído com 100 mL de H_2O , extraído com EtOAc (3 x 100 mL). As camadas de EtOAc combinadas foram lavadas com salmoura (100 mL), secadas (MgSO_4), e concentradas produzindo N,N-di[2-(4-metoxicarbonil-2-metóxi-5-nitro-fenilóxi)etil]amina, composto 9, em sólido amarelo, que foi utilizado sem outra purificação: ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) \square 3,17 (t, $J = 3,9$ Hz, 4H), 3,89 (s, 6H), 3,93 (s, 6H), 4,19 (t, $J = 3,9$ Hz, 4H), 7,05 (s, 2H), 7,47 (s, 2H).

Composto 10. N,N-di[2-(4-metoxicarbonil-2-metóxi-5-nitrofenilóxi)etil]amina, composto 9, (bruto, 4,16 mmols) e NaHCO_3 (210 mg, 2,50 mmols) foram suspensos em THF, e tratados com $(\text{BOC})_2\text{O}$ (999 mg, 4,58 mmols) em 0°C e a agitação foi continuada em temperatura ambiente durante 3 horas. Após remoção de THF, o resíduo foi dividido entre H_2O e EtOAc (100/100 mL). A camada aquosa foi também extraída com EtOAc (2 x 50 mL). As camadas de EtOAc combinadas foram lavadas com salmoura (80 mL), secadas (MgSO_4), e concentradas. Purificação do resíduo por cromatografia ins-

tantânea (sílica-gel, 6:4 de hexanos/EtOAc) produziu N-terc-butoxicarbonil-N,N-di[2-(4-metoxicarbonil-2-metóxi-5-nitro-fenilóxi)etil]amina, composto 10, como sólido amarelo claro: ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 1,44 (s, 9H), 3,77 (m, 4H), 3,83, 3,86 e 3,87 (3 x s, 12H), 4,20 e 4,26 (2 x t, $J = 3,9$ Hz, 4H), 6,97 e 6,99 (2 x s, 2H), 7,36 e 7,40 (2 x s, 2H); EIMS m/z 646 ($[\text{M}]^+ + \text{Na}$).

Composto 11. N-terc-butoxicarbonil-N,N-di[2-(4-metoxicarbonil-2-metóxi-5-nitro-fenilóxi)etil]amina, composto 10 (2,11 g, 3,39 mmols) foi suspenso em THF-MeOH- H_2O (3:1:1, 65 mL) e tratado com 1M de LiOH aquoso (14 mL) em temperatura ambiente durante 3 horas. Após remoção de solventes voláteis, o resíduo foi diluído com H_2O (25 mL). A solução aquosa resultante foi acidificada para pH ~ 1 com HCl concentrado. O N-terc-butoxicarbonil-N,N-di[2-(4-carbóxi-2-metóxi-5-nitro-fenilóxi)etil]amina precipitado, composto 11, foi coletado por filtração, lavado com H_2O , e também secado sob vácuo elevado: ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3 , rotâmeros) δ 1,39 (s, 9H), 3,70 (m, 4H), 3,88 e 3,89 (2 x s, 6H), 4,29 (m, 4H), 7,29 e 7,31 (2 x s, 2H), 7,63 (s, 2H), 13,60 (amplo s, 2H); ^{13}C RMN δ 27,8, 46,2 e 46,6, 56,3 e 56,4, 67,2, 79,2, 107,9 e 108,0, 111,3, 141,4 e 141,5, 149,1, 151,7, 154,5, 165,9; HRMS m/z calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_{14}\text{Na}$ 618.1547, encontrado 618.1552 ($[\text{M}]^+ + \text{Na}$).

Composto 12. Uma quantidade catalítica de DMF (2 gotas) foi adicionada a uma solução de N-terc-butoxicarbonil-N,N-di[2-(4-carbóxi-2-metóxi-5-nitro-fenilóxi)etil]amina 11 (194 mg, 0,33 mmol) e cloreto de oxalila (72,7 μL , 0,81 mmol) em THF anidro (6,5 mL) e a mistura resultante foi agitada em temperatura ambiente durante uma noite. Excesso de THF e cloreto de oxalila foi removido com *rotavapor*. O cloreto de actila foi ressuspenso em THF fresco (4 mL) e foi adicionado gota a gota a uma solução de éster metílico de 4-metileno-*L*-prolina 5 (206,7 mg, 0,81 mmol), Et_3N (0,19 mL, 1,39 mmol), e H_2O (0,4 mL) em THF (1 mL) em 0°C sob atmosfera de argônio. A mistura reacional foi deixada aquecer para a temperatura ambiente e a agitação foi continuada durante 2 horas. Após remoção de THF, o resíduo foi dividido entre H_2O e EtOAc (10/10 mL). A camada aquosa foi também extraída com EtOAc (2 x 8 mL). As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura (10 mL), secadas (MgSO_4) e concentradas. Purificação do resíduo por cromatografia ins-

tantânea (sílica-gel, 2:8 de hexanos/EtOAc) produziu éster terc-butílico de ácido bis{2-[5-metóxi-2-nitro-4-[(S)-4-metileno-2-metoxicarbonil-1-pirrolidinilcarbonil]-fenilóxi]-etil}-carbâmico 12 como óleo amarelo claro (rotâmeros): $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3 , rotâmeros) δ 1,46 (s, 9H), 2,68 – 2,75 (m, 2H), 2,99 – 3,10 (m, 2H), 3,60 – 4,28 (m, 24H), 4,56 – 5,12 (m, 6H), 6,78 – 6,83 (m, 2H), 7,63 – 7,71 (m, 2H); EIMS m/z 864 ($[\text{M}]^+ + \text{Na}$).

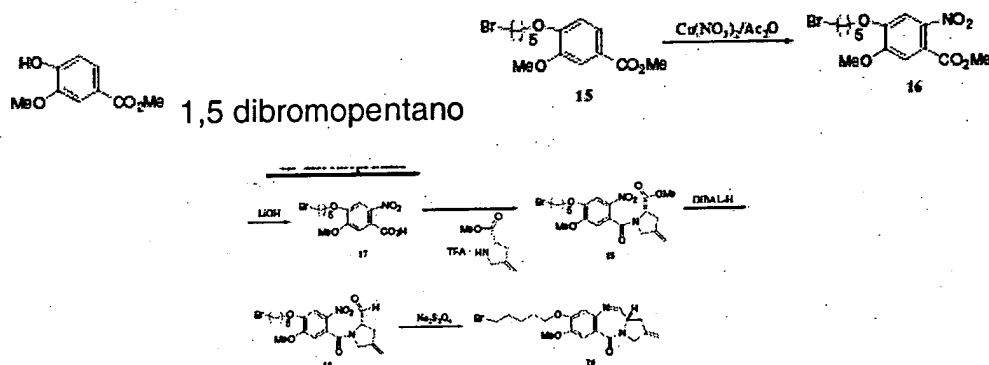
Composto 13. A uma solução vigorosamente agitada de éster terc-butílico de ácido bis{2-[5-metóxi-2-nitro-4-[(S)-4-metileno-2-metoxicarbonil-1-pirrolidinilcarbonil]fenilóxi]-etil}-carbâmico 12 (100 mg, 0,12 mmol) em tolueno anidroso (2,4 mL) foi adicionada gota a gota solução de DIBAL-H (480 μL de uma solução a 1M em tolueno) em -78°C sob atmosfera de argônio. Após a mistura ser agitada durante um adicional de 45 minutos, excesso de reagente foi decomposto por adição de cinco gotas de metanol seguido por HCl a 5% (4 mL). A mistura resultante foi deixada aquecer para 0°C . As camadas foram separadas e a camada aquosa foi também extraída com CH_2Cl_2 (3 x 3 mL). As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura, secadas (MgSO_4) e concentradas. Purificação do resíduo por cromatografia instantânea (sílica-gel, 95:5 de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) produziu éster terc-butílico de ácido bis{2-[5-metóxi-2-nitro-4-[(S)-4-metileno-2-formil-1-pirrolidinilcarbonil]fenilóxi]-etil}-carbâmico 13 como óleo amarelo claro (84 mg, 91%).

Composto 14. Uma mistura de éster terc-butílico de ácido bis{2-[5-metóxi-2-nitro-4-[(S)-4-metileno-2-formil-1-pirrolidinilcarbonil]fenilóxi]-etil}-carbâmico 13 (180 mg, 0,23 mmol), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (1,84 mmol, 8 equivalentes), 3,5 mL de THF, e 2,2 mL de H_2O foi agitada em temperatura ambiente durante 20 horas. Os solventes foram removidos sob vácuo elevado. O resíduo foi ressuspenso em MeOH (30 mL), e AcCl foi adicionado gota a gota até pH ~ 2. A mistura resultante foi agitada em temperatura ambiente durante 1 hora. A reação foi preparada por remoção da maioria do MeOH, em seguida diluída com EtOAc (25 mL). A solução de EtOAc foi lavada com NaHCO_3 aquoso saturado, salmoura, secada (MgSO_4), e concentrada. Purificação do resíduo por cromatografia instantânea (sílica-gel, 97:3 de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) produziu éster terc-butílico de ácido bis-{2-[(S)-2-metileno-7-metóxi-5-oxo-

1,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-ilóxi-etil}-carbâmico 14 como sólido branco (86 mg, 50%).

Exemplo 14: (11aS)-7-(5-bromopentilóxi)-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona

5 Esquema 2



Composto 15. A uma solução de vanilato de metila (9,109 g, 50 mmols) em acetona (200 mL) foram adicionados K_2CO_3 (27,64 g, 200 mmols) e 1,5-dibromopentano (20,4 mL, 150 mmols). A mistura resultante foi aquecida até o refluxo. Após 6 horas, TLC não mostrou nenhum resto de material de partida. A mistura foi resfriada para a temperatura ambiente, e o sólido foi removido por filtração. O filtrado foi concentrado. Purificação por cromatografia instantânea (sílica-gel, 8:2 de hexanos/EtOAc) forneceu éster metílico de ácido 4-(5-bromopentilóxi)-3-metóxi-benzóico 15 como sólido branco (13,65 g, 82%): 1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,60 – 1,66 (m, 2H), 1,85 – 1,97 (m, 4H), 3,42 (t, $J = 5,0$ Hz, 2H), 3,87 (s, 3H), 3,89 (s, 3H), 4,06 (t, $J = 5,0$ Hz, 2H), 6,85 (d, $J = 6,3$ Hz, 1H), 7,52 (d, $J = 1,5$ Hz, 1H), 7,63 (dd, $J = 6,3, 1,5$ Hz, 1H); EIMS m/z 353 e 355 ($[M]^+ + Na$).

Composto 16. $Cu(NO_3)_2 \cdot xH_2O$ sólido (3,64 g, 19,42 mmols) foi adicionado a uma solução agitada de éster metílico de ácido 4-(5-bromopentilóxi)-3-metóxi-benzóico 15 (5,36 g, 16,18 mmols) em anidrido acético (81 mL) em $0^\circ C$. A mistura reacional foi agitada em $0^\circ C$ durante 1 hora e temperatura ambiente durante 2 horas, em seguida vertida em 200 mL de água gelada. A agitação foi continuada durante mais 1 hora. O precipitado amarelo resultante foi coletado por filtração e lavado com água. Além disso secado sob vácuo elevado produziu o composto éster metílico de ácido 4-(5-

bromopentilóxi)-5-metóxi-2-nitro-benzóico 16 como sólido amarelo claro (5,98 g), que foi utilizado diretamente para a próxima etapa: ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 1,59 – 1,70 (m, 2H), 1,85 – 1,98 (m, 4H), 3,43 (t, $J = 5,1$ Hz, 2H), 3,89 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 4,08 (t, $J = 4,8$ Hz, 2H), 7,05 (s, 1H), 7,42 (s, 1H). EIMS m/z 398 e 400 ($[\text{M}]^+ + \text{Na}$).

Composto 17. Éster metílico de ácido 4-(5-bromopentilóxi)-5-metóxi-2-nitro-benzóico 16 (5,98 g, 15,9 mmols) foi suspenso em THF-MeOH- H_2O (3:1:1, 157 mL) e tratado com 1M de LiOH aquoso (31 mL) em temperatura ambiente durante 5 horas. Após remoção de solventes voláteis, o resíduo foi diluído com H_2O (70 mL). A solução aquosa resultante foi acidificada para pH ~ 2 com HCl concentrado. O ácido 4-(5-bromopentilóxi)-5-metóxi-2-nitro-benzóico precipitado 17 foi coletado por filtração, lavado com H_2O , e também secado sob vácuo elevado (5,47 g): ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 1,64 – 1,68 (m, 2H), 1,87 – 1,98 (m, 4H), 3,43 (t, $J = 4,8$ Hz, 2H), 4,08 (s, 3H), 4,10 (t, $J = 5,1$ Hz, 2H), 7,21 (s, 1H), 7,35 (s, 1H), 13,60 (amplo s, 1H); EIMS m/z 384 e 386 ($[\text{M}]^+ + \text{Na}$).

Composto 18. Uma quantidade catalítica de DMF (2 gotas) foi adicionada a uma solução de ácido 4-(5-bromopentilóxi)-5-metóxi-2-nitro-benzóico 17 (270 mg, 0,74 mmol) e cloreto de oxalila (80 μL , 0,89 mmol) em THF anidroso (7,5 mL) e a mistura resultante foi agitada em temperatura ambiente durante uma noite. Excesso de THF e cloreto de oxalila foram removidos com *rotavapor*. O cloreto de acetila foi ressuspenso em THF fresco (6 mL) e foi adicionado gota a gota a uma solução de éster metílico de 4-metileno-*L*-prolina 5 (228 mg, 0,89 mmol), Et_3N (0,32 mL, 2,31 mmols), e H_2O (0,15 mL) em THF (1,5 mL) em 0 °C sob atmosfera de argônio. A mistura reacional foi deixada aquecer para a temperatura ambiente e a agitação foi continuada durante 4 horas. Após remoção de THF, o resíduo foi dividido entre H_2O e EtOAc (20/20 mL). A camada aquosa foi também extraída com EtOAc (3 x 10 mL). As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura (20 mL), secadas (MgSO_4) e concentradas. Purificação do resíduo por cromatografia instantânea (sílica-gel, 6:4 de hexanos/EtOAc) produziu éster metílico de 1-[4-(5-bromopentilóxi)-5-metóxi-2-nitro-benzoil]-4-metileno-

L-prolina 18 como óleo amarelo claro (rotâmeros): ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3 , rotâmeros) δ 1,62 – 1,68 (m, 2H), 1,86 – 1,98 (m, 4H), 2,64 – 2,75 (m, 1H), 2,99 – 3,08 (m, 1H), 3,43 (t, $J = 5,1$ Hz; 2H), 3,59 – 3,96 (m, 7H), 4,05 – 4,21 (m, 3H), 4,57 – 4,61 e 4,90 – 5,12 (m, 3H), 6,80 e 6,83 (2 s, 1H), 7,64 e 7,67 (2 s, 1H); EIMS m/z 507 e 509 ($[\text{M}]^+ + \text{Na}$).

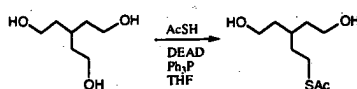
Composto 19. A uma solução vigorosamente agitada de éster metílico de 1-[4-(5-bromopentilóxi)-5-metóxi-2-nitro-benzoil]-4-metileno-*L*-prolina 18 (61 mg, 0,12 mmol) em tolueno anidroso – CH_2Cl_2 (3:1, 2,5 mL) foi adicionada gota a gota solução de DIBAL-H (188 μL de uma solução a 1M em tolueno) em -78 °C sob atmosfera de argônio. Após a mistura ser agitada durante um adicional de 45 minutos, excesso de reagente foi decomposto por adição de três gotas de metanol seguido por HCl a 5% (2 mL). A mistura resultante foi deixada aquecer para 0°C . As camadas foram separadas e a camada aquosa foi também extraída com CH_2Cl_2 (3 x 2 mL). As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura, e secadas (MgSO_4) e concentradas. Purificação do resíduo por cromatografia instantânea (sílica-gel, 1:1 de hexanos/EtOAc) produziu (S)-1-[4-(5-bromopentilóxi)-5-metóxi-2-nitro-benzoil]-4-metileno-2-pirrolidinacarboxaldeído 19 como óleo amarelo claro (44 mg, 80%).

Composto 20. Uma mistura de (S)-1-[4-(5-bromopentilóxi)-5-metóxi-2-nitro-benzoil]-4-metileno-2-pirrolidinacarboxaldeído 19 (43,7 mg, 0,096 mmol), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (0,58 mmol, 6 equiv), 1,5 mL de THF, e 0,9 mL de H_2O foi agitada em temperatura ambiente durante 18 horas. Os solventes foram removidos sob vácuo elevado. O resíduo foi ressuspenso em MeOH (6 mL), e AcCl foi adicionado gota a gota até pH ~ 2. A mistura resultante foi agitada em temperatura ambiente durante 1 hora. A reação foi preparada por remoção da maioria do MeOH, em seguida diluída com EtOAc (20 mL). A solução de EtOAc foi lavada com NaHCO_3 aquoso saturado, salmoura, e secada (MgSO_4) e concentrada. Purificação do resíduo por cromatografia instantânea (sílica-gel, 98:2 de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) produziu (11aS)-7-(5-bromopentilóxi)-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona 20 como óleo amarelo claro (31 mg, 74%): ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 1,58 -

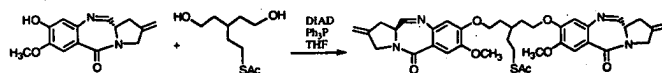
1,66 (m, 2H), 1,84 – 1,99 (m, 4H), 2,91 – 2,95 (m, 1H), 3,08 – 3,14 (m, 1H), 3,42 (t, $J = 5,1$ Hz, 2H), 3,93 (s, 3H), 3,87 – 4,27 (m, 5H), 5,15 (br s, 1H), 5,18 (br s, 1H), 6,84 (s, 1H), 7,49 (s, 1H), 7,71 (d, $J = 4,0$ Hz, 1H); EIMS m/z 429 e 431 ($[M]^+ + Na$).

5 O Composto 20 pode em seguida ser acoplado a uma porção de PBD preparada como no exemplo 11 para formar um composto da invenção.

Exemplo 15: 8,8'-[3-(2-acetiltioetil)-1,5-pentanodiilbis(óxi)]-bis[(S)-2-metileno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzo-diazepin-5-ona]



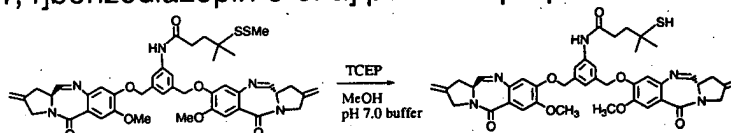
10 A uma solução de trifetilfosfina (1,77 g, 6,8 mmols) em THF anidroso (15 mL) foi adicionado azodicarboxilato de dietila (2,2 M em tolueno, 2,4 mL, 5,4 mmols) gota a gota em 0°C. Após agitada em 0°C durante 55 minutos, uma solução de 3-(2-hidroxi)etil)pentano-1,5-diol (740 mg, 5 mmols) e ácido tioacético (335 μ L, 4,5 mmols) em THF seco (7 mL) foi adicionada
15 gota a gota. Após 1 hora o banho de gelo/água foi removido e a reação foi agitada em temperatura ambiente durante 16 horas. Os solventes foram removidos por evaporação giratória em vácuo. O resíduo foi purificado por cromatografia instantânea ($CHCl_3/MeOH$, 20:1, 15:1, 10:1, 4:1) para fornecer
20 material de partida recuperado (406 mg). 1H RMN (400 Hz, $CDCl_3$): δ 3,65 - 3,63 (m, 4H), 3,45 (bs, 2H), 2,84 - 2,80 (m, 2H), 2,28 (s, 3H), 1,73 - 1,67 (m, 1H), 1,55 - 1,49 (m, 6H). MS (ESI): m/z 229,0 ($M + Na$)⁺.



25 A uma solução de trifetilfosfina (53 mg, 0,2 mmol) em THF anidroso (0,4 mL) foi adicionado azodicarboxilato de disopropila (36 μ L, 0,17 mmol) gota a gota em 0°C. Após agitada em 0°C durante 25 minutos, uma solução de (11aS)-8-hidróxi-7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona, o monômero de PBD, (38 mg, 0,14 mmol, co-evaporado com benzeno seco e secado em vácuo elevado durante duas horas
30 antes do uso) em THF seco (0,2 mL) foi adicionada. A mistura continuou a agi-

tar durante 10 minutos antes do composto tioacetato (12 mg, 0,058 mmol, co-
 evaporado com benzeno seco e secado em vácuo elevado durante duas horas
 antes do uso) em THF seco (0,2 mL) ser adicionado. A mistura reacional foi
 deixada agitar em 0°C durante 35 minutos. O banho de gelo/água foi removido
 5 e a solução foi agitada em temperatura ambiente durante 12 horas. Os solven-
 tes foram removidos por evaporação giratória em vácuo. O resíduo foi purifica-
 do por cromatografia instantânea (CHCl₃/MeOH, 100:1, 50:1, 25:1, 20:1) para
 fornecer 8,8'-[3-(2-acetiltioetil)-1,5-pentanodilbis(óxi)]-bis[(S)-2-metileno-7-
 metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (19 mg, $y =$
 10 47%). ¹H RMN (400 Hz, CDCl₃): δ 7,66 (d, $J = 4,4$ Hz, 2H), 7,46 (s, 2H), 6,78 (s,
 2H), 5,17 (s, 2H), 5,14 (s, 2H), 4,26 (s, 4H), 4,17 - 4,09 (m, 4H), 3,88 (s, 6H),
 3,87 - 3,83 (m, 2H), 3,13 - 3,06 (m, 2H), 2,94 - 2,90 (m, 4H), 2,29 (s, 3H), 1,95
 (bs, 3H), 1,68 (bs, 4H). MS (ESI, com H₂O): m/z 745,3 (M + 2H₂O + Na)⁺, 727,3
 (M + H₂O + Na)⁺, 709,2 (M + Na)⁺.

15 Exemplo 16: 8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimetilbutanoil)amino-1,3-benze-
 nodiilbis(metilenoóxi)]-bis[7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-
 pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] pode ser preparado como segue:



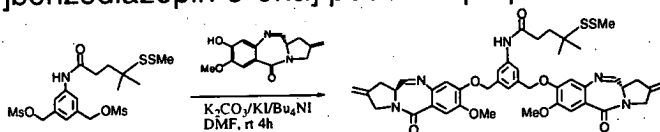
A uma suspensão de cloridrato de Tris(2-carboxietil)fosfina
 20 (TCEP, 52 mg, 0,18 mmol) em água (0,3 mL) foi adicionado bicarbonato de
 sódio saturado (~0,6 mL) gota a gota para ajustar o pH para 6~7. Um tam-
 pão de fosfato (pH 7,0, 10 mM, Na₂HPO₄/H₃PO₄, 0,5 mL) foi em seguida a-
 dicionado a ela. Esta solução de TCEP obtida foi adicionada a uma mistura
 de 8,8'-[5-(N-4-metilditio-4,4-dimetilbutanoil)-amino-1,3-benzenodiilbis(me-
 25 tilenoóxi)]-bis[7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]-
 benzodiazepin-5-ona] (29 mg, 0,036 mmol) em metanol (2,2 mL) e agitada
 em temperatura ambiente durante 3 horas. A reação foi extinguida com um
 tampão de fosfato (pH 6,5) e extraída com diclorometano. As camadas orgâ-
 nicas combinadas foram lavadas com salmoura, secadas sobre sulfato de
 30 sódio anidro, filtradas e os solventes foram removidos sob pressão reduzi-
 da para fornecer um sólido branco. O sólido foi dissolvido em diclo-

rometano/MeOH (2:1) e evaporado novamente. Diclorometano foi adicionado e evaporado. O resíduo foi submetido a vácuo elevado e purificado por coluna C18 de fase reversa {CH₃CN/H₂O, o sólido foi dissolvido em CH₃CN/H₂O (3:1, 2 mL) e agitado durante 30 minutos antes de carregar sobre a coluna} para fornecer 8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimetilbutanoato)-amino-1,3-benzenodiilbis(metilenoóxi)]-bis[7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (11 mg) como um sólido branco (método H).

MS (ESI): m/z = 786,3 MNa⁺

10 m/z = 804,2 MNa⁺ + H₂O

8,8'-[5-(N-4-metilditio-4,4-dimetilbutanoil)amino-1,3-benzenodiilbis(metilenoóxi)]-bis[7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] pode ser preparado como segue:



15 A uma solução de 5-(N-4-metilditio-4,4-dimetilbutanoil)-amino-1,3-bis-(mesiloximetil)-benzeno (89 mg, 0,18 mmol) dissolvido em DMF anidroso (2 mL) foram adicionados 8-hidróxi-7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona (93 mg, 0,36 mmol), pó de carbonato de potássio (100 mg, 0,72 mmol), pó de iodeto de potássio (15 mg, 0,09 mmol) e iodeto de tetrabutilamônio (13 mg, 0,036 mmol) em temperatura ambiente. Após a mistura ser agitada durante uma hora, uma segunda porção de 8-hidróxi-7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona foi adicionada (22 mg, 0,085 mmol). A solução continuou a agitar em temperatura ambiente durante mais 3 horas. A reação foi em seguida extinguida com água e diluída com diclorometano. A camada orgânica foi separada e a camada aquosa foi extraída com diclorometano. As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura, secadas sobre sulfato de sódio anidroso. Ela foi filtrada e o filtrado foi evaporado sob pressão reduzida seguida por vácuo elevado para remover o DMF residual. O resíduo foi em seguida purificado por 20 25 30 coluna C18 de fase reversa (CH₃CN/H₂O) para fornecer 8,8'-[5-(N-4-metilditio-4,4-dimetilbutanoil)amino-1,3-benzenodiilbis(metilenoóxi)]-bis[7-metóxi-2-

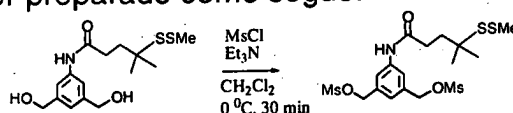
metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (29 mg) como um sólido branco (método H).

MS (ESI): $m/z = 832,2 \text{ MNa}^+$

$m/z = 850,2 \text{ MNa}^+ + \text{H}_2\text{O}$

5 ^1H RMN (400 Hz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$, em δ ppm): 7,67 (bs, 2H), 7,58 - 7,26 (m, 5H), 6,82 (s, 2H), 5,21 - 5,14 (m, 8H), 4,30 (s, 4H), 4,02 - 3,88 (m, 9H), 3,16 - 3,10 (m, 2H), 2,97 - 2,93 (m, 2H), 2,45 - 2,40 (m, 5H), 2,09 - 2,03 (m, 2H), 1,34 (s, 6H)

10 5-(N-4-metilditio-4,4-dimetilbutanoil)amino-1,3-bis-(mesiloxime-til)-benzeno pode ser preparado como segue:



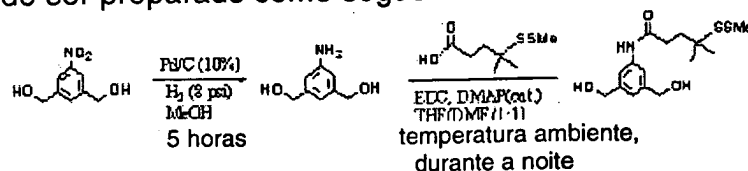
A uma suspensão de 5-(N-4-metilditio-4,4-dimetilbutanoil)-amino-1,3-bis-(hidroximetil)-benzeno (329 mg, 1,0 mmol) em diclorometano anidroso (7 mL) foi adicionada trietilamina (348 μL , 2,5 mmols) seguido por cloreto de metanossulfonila (193 μL , 2,5 mmols) gota a gota durante 10 minutos em -2°C . A solução foi agitada em 0°C durante mais 30 minutos e foi em seguida extinguida com uma mistura de gelo e água. A mistura foi extraída com diclorometano frio e as camadas de diclorometano combinadas foram lavadas com água fria, secadas sobre sulfato de sódio anidroso. Ela foi filtrada e o filtrado foi evaporado por evaporação giratória em vácuo. O resíduo foi rapidamente purificado por uma coluna de sílica-gel curta (Diclorometano/Hexanos/Etilacetato, 1:2:4) para fornecer 5-(N-4-metilditio-4,4-dimetilbutanoil)-amino-1,3-bis-(mesiloximetil)-benzeno como um óleo incolor (410 mg).

MS (ESI): $m/z = 508,0 \text{ MNa}^+$

25 $m/z = 483,9 \text{ M-H}$

$m/z = 519,9 \text{ M-H} + 2\text{H}_2\text{O}$

5-(N-4-metilditio-4,4-dimetilbutanoil)-amino-1,3-bis-(hidroximetil)-benzeno pode ser preparado como segue:



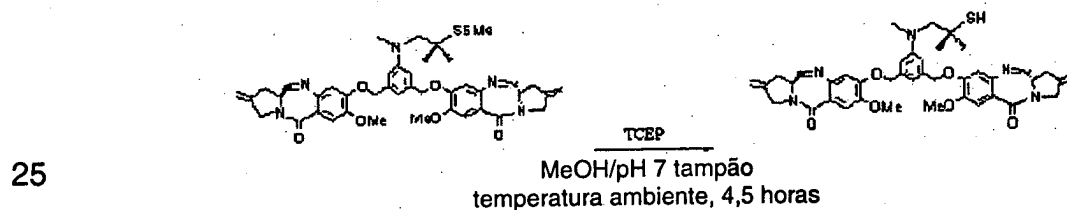
30

A uma solução de 5-Nitro-*m*-xileno- α,α' -diol (890 mg, 5,4 mmols) em metanol (50 mL) foi adicionado Pd/C (10%, 287 mg). Uma atmosfera de hidrogênio foi introduzida e a mistura foi hidrogenada sob pressão (H_2 , 34,5 + 55,15 Kpa (5~8 psi)) durante 5 horas em temperatura ambiente. A solução
 5 foi filtrada através de celita e o filtrado foi evaporado por evaporação giratória em vácuo para fornecer 5-amino-*m*-xileno- α,α' -diol, que foi em seguida dissolvido em THF (10 mL)/DMF (15 ml). Ácido butanóico de 4-metilditio-4,4-dimetila (1,05 g, 5,4 mmols) dissolvido em THF (5 ml) foi adicionado em temperatura ambiente seguido pela adição de cloridrato de 1-(3-dimetilamino-
 10 nopropil)-3-etilcarbodiimida (2,1 g, 10,8 mmols) e piridina de 4-dimetilamino (66 mg, 0,54 mmol). A mistura obtida foi agitada em temperatura ambiente durante a noite em seguida extinguida com cloreto de amônio a 10%, extraída com acetato de etila, lavada e secada. Ela foi filtrada e os solventes foram removidos por evaporação giratória em vácuo. O resíduo foi purificado
 15 por cromatografia instantânea ($CH_2Cl_2/MeOH$, 15:1, 10:1, 7:1) para fornecer 5-(N-4-metilditio-4,4-dimetilbutanoil)-amino-1,3-bis-(hidroximetil)-benzeno como um sólido branco (729 mg).

MS (ESI): $m/z = 352,1 MNa^+$

1H RMN (400 Hz, $CDCl_3-d_1$, in δ ppm): 7,47 (s, 2H), 7,10 (s, 1H),
 20 4,58 (s, 4H), 2,52 - 2,47 (m, 2H), 2,42 (s, 3H), 2,02 - 1,98 (m, 2H), 1,34 (s, 6H).

Exemplo 17: 8,8'-[5-(N-metil-N-(2-mercapto-2,2-dimetiletil)amino-1,3-benzodiazepin-5-ona)]-bis[7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] pode ser preparado como segue:



A uma suspensão de cloridrato de Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP, 64 mg, 0,22 mmol) em água (0,05 mL) foi adicionado bicarbonato de sódio saturado (~0,7 mL) gota a gota para ajustar o pH para 6~7. Um tampão de fosfato
 30 (pH 7,0, 10 mM, Na_2HPO_4/H_3PO_4 , 0,8 mL) foi em seguida adicionado a ela. Esta solução de TCEP obtida foi adicionada a uma mistura de 8,8'-[5-(N-metil-N-

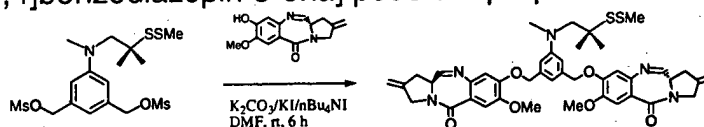
(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-benzenodiil(metilenoóxi)]-bis[7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (35 mg, 0,045 mmol) em metanol (5 mL) e agitada em temperatura ambiente durante 4,5 horas. A reação foi extinguida com um tampão de fosfato (pH 6,5) e extraída com diclorometano. As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura, secadas sobre sulfato de sódio anidro, filtradas e os solventes foram removidos sob pressão reduzida para fornecer um sólido branco. O sólido foi dissolvido em diclorometano/MeOH (2:1) e evaporado novamente. Diclorometano foi adicionado e evaporado. O resíduo foi submetido a vácuo elevado e purificado por coluna C18 de fase reversa {CH₃CN/H₂O, o sólido foi dissolvido em CH₃CN/H₂O (3:1, 2 mL) e agitado durante 30 minutos antes de carregar sobre a coluna} para fornecer 8,8'-[5-(N-metil-N-(2-mercapto-2,2-dimetiletil)amino-1,3-benzenodiil(metilenoóxi)]-bis[7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (10,5 mg, $y = 32\%$) como um sólido branco (método H).

MS (ESI): $m/z = 758,2 \text{ MNa}^+$

$m/z = 776,2 \text{ MNa}^+ + \text{H}_2\text{O}$

$m/z = 794,3 \text{ MNa}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$

8,8'-[5-(N-metil-N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-benzenodiil(metilenoóxi)]-bis[7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] pode ser preparado como segue:



A uma solução de 5-(N-metil-N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bis-(mesiloximetil)-benzeno (105 mg, 0,23 mmol) em DMF anidro (2,5 mL) foram adicionados 8-hidróxi-7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona (119 mg, 0,46 mmol), pó de carbonato de potássio (127 mg, 0,92 mmol), pó de iodeto de potássio (20 mg, 0,12 mmol) e iodeto de tetrabutilamônio (17 mg, 0,046 mmol) em temperatura ambiente. Após a mistura ser agitada durante 1,5 hora, a segunda porção de 8-hidróxi-7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona foi adicionada (23 mg, 0,089 mmol). A solução continuou a

agitar em temperatura ambiente durante 4,5 horas. A reação foi em seguida extinguida com água e diluída com diclorometano. A camada orgânica foi separada e a camada aquosa foi extraída com diclorometano. As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura, e secadas sobre sulfato de sódio anidro. A solução foi filtrada e o filtrado foi evaporado sob pressão reduzida, em seguida submetido a vácuo elevado para remover o DMF residual. O resíduo foi suspenso em CH₃CN/H₂O (10:1) e filtrado. O filtrado foi evaporado e o produto bruto foi purificado por coluna C18 de fase reversa (CH₃CN/H₂O) para fornecer 8,8'-[5-(N-metil-N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)-amino-1,3-benzenodil(metilenoóxi)]-bis[7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (39 mg) como um sólido branco (método H).

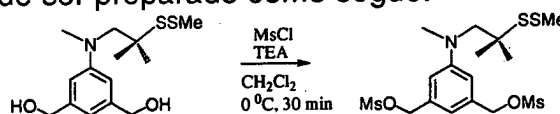
MS (ESI): m/z = 804,2 MNa⁺

m/z = 822,2 MNa⁺ + H₂O

15 m/z = 840,2 MNa⁺ + 2H₂O

¹H RMN (400 Hz, CDCl₃-d₁, em δ ppm): 7,64 (bs, 2H), 7,50 (s, 2H), 6,83 - 6,76 (m, 5H), 5,18 - 5,10 (m, 8H), 4,27 (s, 4H), 3,95 (s, 6H), 3,90 - 3,84 (m, 3H), 3,51 (s, 2H), 3,13 - 3,07 (m, 2H), 3,01 (s, 3H), 2,94 - 2,90 (m, 2H), 2,41 (s, 3H), 1,30 (s, 6H)

20 5-(N-metil-N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bis-(mesiloximetil)-benzeno pode ser preparado como segue:

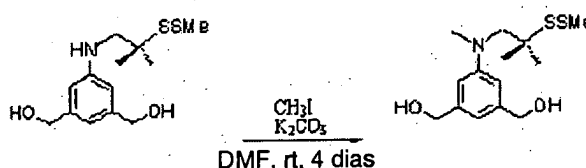


A uma solução de 5-(N-metil-N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bis-(hidroximetil)-benzeno (135 mg, 0,45 mmol) em diclorometano anidro (3 mL) foi adicionada trietilamina (153 μL, 1,1 mmol) seguida por cloreto de metanossulfonila (87 μL, 1,1 mmol) gota a gota durante 10 minutos em -2°C. A solução foi agitada em 0°C durante mais 30 minutos e foi em seguida extinguida com gelo/água. A mistura foi extraída com diclorometano frio e as camadas de diclorometano combinadas foram lavadas com água fria, e secadas sobre sulfato de sódio anidro. Ela foi em seguida filtrada e o filtrado foi evaporado por evaporação giratória em vácuo. O resíduo foi purifi-

cado por uma placa de TLC preparativa (hexanos/acetato de etila, 1:1,5) para fornecer 5-(N-metil-N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bis-(mesiloximetil)-benzeno como um óleo incolor (105 mg).

MS (ESI): $m/z = 480,0 \text{ MNa}^+$

- 5 5-(N-metil-N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bis-(hidroximetil)-benzeno pode ser preparado como segue:

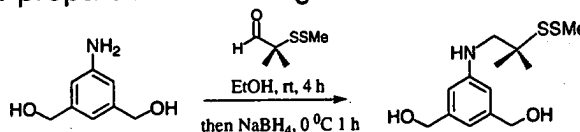


- A uma solução de 5-(N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bis-
 10 (hidroximetil)-benzeno (226 mg, 0,78 mmol) em DMF (4 mL) foi adicionado iodometano (149 μL , 2,4 mmols) seguido por pó de carbonato de potássio (108 mg, 0,78 mmol). Após agitação em temperatura ambiente durante 4 dias, a mistura foi extinguida com cloreto de amônio saturado e em seguida diluída com diclorometano. A camada orgânica foi separada e a camada a-
 15 quosa foi extraída com diclorometano. As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura, secadas sobre sulfato de sódio anidro. A solução foi filtrada e o filtrado foi evaporado sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia instantânea (hexanos/acetato de etila, 1:2) para fornecer 5-(N-metil-N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bis-(hidroxi-
 20 metil)-benzeno como espuma incolor (152 mg).

MS (ESI): $m/z = 324,1 \text{ MNa}^+$

^1H RMN (400 Hz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$, em δ ppm): 6,70 (s, 2H), 6,66 (s, 1H), 4,06 (s, 4H), 3,54 (s, 2H), 3,04 (s, 3H), 2,46 (s, 3H), 1,37 (s, 6H)

- 5-(N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bis-(hidroximetil)-
 25 benzeno pode ser preparado como segue:



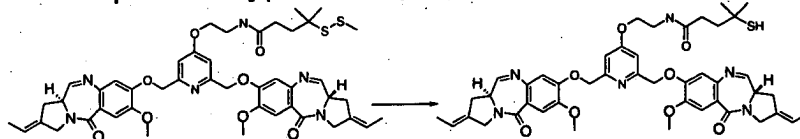
A uma solução de 5-amino-1,3-bis-hidroxilmetil-benzeno (765 mg, 5 mmols) em etanol absoluto (25 mL) foi adicionado 2-(metilditio)-isobutiraldeído (751 mg, 5 mmols). Após agitação em temperatura ambiente

durante 4 horas, a solução foi resfriada para 0°C com um banho de gelo/água e boroidreto de sódio (220 mg, 5,8 mmols) foi adicionado. A mistura continuou a agitar em 0°C durante uma hora e em seguida foi extinguida com ácido clorídrico a 5% frio e diluída com diclorometano. Bicarbonato de sódio saturado foi adicionado para tornar a solução ligeiramente básica. A camada orgânica foi separada e a camada aquosa foi extraída com diclorometano. As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura, secadas sobre sulfato de sódio anidro. A solução foi filtrada e o filtrado foi evaporado sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia instantânea (CH₂Cl₂/MeOH, 15:1, 10:1) para fornecer 5-(N-(2-metilditio-2,2-dimetiletil)amino-1,3-bis-(hidroximetil)-benzeno como óleo incolor (832 mg).

MS (ESI): m/z = 310,0 MNa⁺

Exemplo 18:

8,8'-[(4-(2-(4-mercapto-4-metil)-pentanamido-etóxi)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] pode ser preparado como segue:



A uma solução de 8,8'-[(4-(2-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-etóxi)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (60mg) em metanol (1,6 mL) foi adicionado DMF (0,2 mL) e uma solução de cloridrato de tris(2-carboxietil)fosfina (48 mg) em 0,2 mL de água. A mistura reacional foi agitada durante 18 horas em temperatura ambiente e o solvente foi removido em vácuo para fornecer um resíduo que foi purificado por cromatografia de sílica-gel (coluna de 10 g Merck SuperVarioFlash, Si60 15-40 μm), utilizando-se eluição gradiente com uma mistura de metanol (A)/diclorometano/acetonitrila 9:1 (B), (gradiente: 100% de B até 10% de A: 90% de B) para fornecer 8,8'-[(4-(2-(4-mercapto-4-metil)-pentanamido-etóxi)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (17mg):

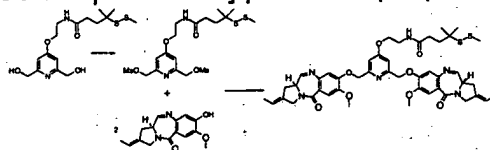
LC/MS (Método A1, ZQ):

ES: $m/z = 855 \text{ MH}^+ + \text{H}_2\text{O}$

$m/z = 837 \text{ MH}^+$

Tempo de retenção = 3,70 minutos

- 8,8'-[(4-(2-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-etóxi)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] pode ser preparado como segue:



- A uma solução resfriada (0°C) de 4-(2-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-etóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina (360 mg) e trietilamina (810 μL) em diclorometano (4 mL), foi adicionada uma solução de cloreto de metanossulfonila (298 μL) em diclorometano (4 mL). Após 2 horas, água foi adicionada. As camadas foram separadas, e a camada aquosa foi extraída duas vezes com diclorometano. As soluções orgânicas combinadas foram secadas sobre sulfato de magnésio, e concentradas em vácuo para um resíduo. O resíduo foi purificado por cromatografia de sílica-gel (coluna de 20 g Interchrom Puriflash, SiOH 15-35 μm), utilizando-se eluição gradiente com uma mistura de metanol (A)/diclorometano (B), (gradiente: 100% de B até 3% de A: 97% de B) para fornecer 280 mg do composto mesilato.

- A uma solução de pré-tomamicina (120 mg) em dimetilformamida (4 mL) foram adicionados carbonato de potássio (244 mg), iodeto de potássio (147 mg) e uma amostra do composto mesilato (137 mg). A mistura reacional foi agitada durante 20 horas em 30°C. Água (20 mL) foi adicionada e o sólido resultante foi filtrado, lavado com água e secado em vácuo para fornecer um resíduo. O resíduo foi purificado por cromatografia de sílica-gel (coluna de 20 g Interchrom Puriflash, SiOH 15-35 μm), utilizando-se eluição gradiente com uma mistura de metanol (A)/diclorometano (B), (gradiente: 100% de B até 6% de A: 94% de B) para fornecer o composto bruto, que foi dissolvido em 1:1 de água/acetonitrila em seguida concentrado em vácuo para fornecer 8,8'-[(4-(2-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-etóxi)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-

pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (120 mg):

LC/MS (Método A1, ZQ):

ES: $m/z = 919 \text{ MH}^+ + 2 \text{ H}_2\text{O}$

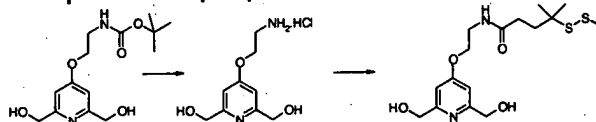
$m/z = 901 \text{ MH}^+ + \text{H}_2\text{O}$

5 $m/z = 883 \text{ MH}^+$

Tempo de retenção = 3,82 minutos

^1H RMN (500 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$, δ em ppm): $\delta = 1,28$ (s, 6H); 1,75 (d, $J = 6,5$ Hz, 6H); 1,94 (m, 2H); 2,29 (m, 2H); 2,39 (s, 3H); 2,97 (m, 4H); de 3,50 a 4,20 (m, 6H); 4,00 (s, 6H); 4,27 (s, 4H); 5,27 (m, 4H); 5,61 (m, 2H); 10 5,87 (t amplo, $J = 5,5$ Hz, 1H); 6,83 (s, 2H); 6,97 (s, 2H); 7,55 (s, 2H); 7,64 (d, $J = 4,5$ Hz, 2H).

4-(2-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-etóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina pode ser preparado como segue:



15 A uma solução de 4-(2-terc-butoxicarbonilamino-etóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina (656 mg) em dioxano (3,5 mL) foi adicionada uma solução de 4 N de ácido clorídrico em dioxano (5,5 mL). Após 20 horas em temperatura ambiente, a mistura reacional foi concentrada em vácuo para um resíduo (603 mg).

20 A uma solução de uma amostra do resíduo prévio (150 mg) em dimetilformamida (3,5 mL) foram adicionados trietilamina (267 μL), ácido 4-metil-4-metildissulfanil-pentanóico (149 mg), N,N'-diisopropilcarbodiimida (119 μL) e hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (49 mg). Após 15 horas em temperatura ambiente, água foi adicionada à mistura reacional e a solução aquosa foi extraída três vezes com acetato de etila. As soluções orgânicas combinadas foram lavadas com uma solução aquosa de cloreto de sódio saturado, secadas sobre sulfato de magnésio e concentradas em vácuo para um resíduo. O resíduo foi purificado por cromatografia de sílica-gel (coluna de 20 g Interchrom Puriflash, SiOH 15-35 μm), utilizando-se eluição gradiente com uma mistura de metanol (A)/diclorometano (B), (gradiente: 100% de B até 10% de A: 90% de B) para fornecer 4-(2-(4-metil-4-metildissulfanil)-

25

30

pentanamido-etóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina (81 mg):

LC/MS (Método A3):

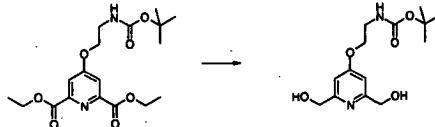
ES $m/z = 375 \text{ MH}^+$

$m/z = 156 \text{ C}_7\text{H}_{10}\text{NO}_3^+$

5 Tempo de retenção = 2,2 minutos

$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , δ em ppm): $\delta = 1,22$ (s, 6H); 1,79 (m, 2H); 2,19 (m, 2H); 2,39 (s, 3H); 3,43 (q, $J = 5,5$ Hz, 2H); 4,06 (t, $J = 5,5$ Hz, 2H); 4,45 (d amplo, $J = 6,0$ Hz, 4H); 5,33 (d, $J = 6,0$ Hz, 2H); 6,84 (s, 2H); 8,13 (t amplo, $J = 5,5$ Hz, 1H).

10 4-(2-terc-butoxicarbonilamino-etóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina



4-(2-terc-butoxicarbonilamino-etóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)piridina, iniciando com 15 éster dietílico de ácido 4-(2-terc-butoxicarbonilamino-etóxi)-piridina-2,6-dicarboxílico:

LC/MS (Método A3):

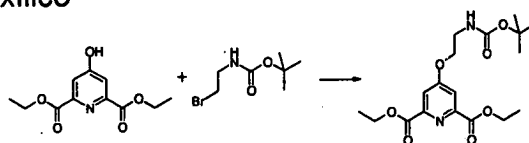
ES $m/z = 299 \text{ MH}^+$

$m/z = 156 \text{ C}_7\text{H}_{10}\text{NO}_3^+$

20 Tempo de retenção = 1,7 minuto

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6 , δ em ppm): $\delta = 1,39$ (s, 9H); 3,32 (m parcialmente mascarado, 2H); 4,03 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H); 4,46 (d, $J = 6,0$ Hz, 4H); 5,30 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H); 6,83 (s, 2H); 7,00 (t amplo, $J = 6,0$ Hz, 1H).

Éster dietílico de ácido 4-(2-terc-butoxicarbonilamino-etóxi)- 25 piridina-2,6-dicarboxílico



Éster dietílico de ácido 4-(2-terc-butoxicarbonilamino-etóxi)-piridina-2,6-dicarboxílico pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de éster dietílico de ácido 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propóxi)-

piridina-2,6-dicarboxílico, utilizando-se brometo de 2-terc-butoxicarbonilamino-etila:

LC/MS (Método A3):

ES $m/z = 383 \text{ MH}^+$

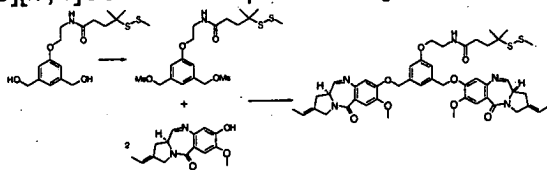
5 $m/z = 240 \text{ C}_{11}\text{H}_{14}\text{NO}_5^+$

Tempo de retenção = 3,6 minutos

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6 , δ em ppm): $\delta = 1,23$ (t, $J = 7,0$ Hz, 6H); 1,37 (s, 9H); 3,33 (m parcialmente mascarado, 2H); 4,22 (t, $J = 5,5$ Hz, 2H); 4,38 (q, $J = 7,0$ Hz, 4H); 7,01 (t amplo, $J = 5,5$ Hz, 1H); 7,71 (s, 2H).

10 Exemplo 19:

8,8'-[(1-(2-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-etóxi)-benzeno-3,5-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]



15 8,8'-[(1-(2-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-etóxi)-benzeno-3,5-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de 8,8'-[(4-(2-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-etóxi)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-

20 1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona], iniciando com 1-(2-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-etóxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno:

LC/MS (Método A1, Plataforma I):

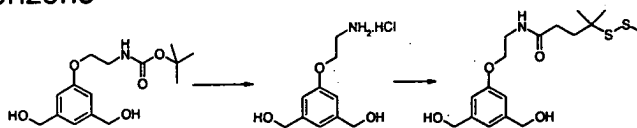
ES: $m/z = 882 \text{ MH}^+$

Tempo de retenção = 4,13 minutos

25 ^1H RMN (500 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-}d_1$, δ em ppm): 1,30 (s, 6H); 1,75 (d, $J = 6,5$ Hz, 6H); 1,96 (m, 2H); 2,31 (m, 2H); 2,40 (s, 3H); 2,97 (m, 4H); 3,66 (m, 2H); 3,89 (m, 2H); 3,97 (s, 6H); 4,04 (t, $J = 5,5$ Hz, 2H); 4,27 (s amplo, 4H); 5,14 (d, $J = 12,5$ Hz, 2H); 5,19 (d, $J = 12,5$ Hz, 2H); 5,61 (m, 2H); 5,93 (t, $J = 6,0$ Hz, 1H); 6,82 (s, 2H); 6,94 (s amplo, 2H); 7,09 (s amplo, 1H); 7,53

30 (s, 2H); 7,64 (d, $J = 4,5$ Hz, 2H).

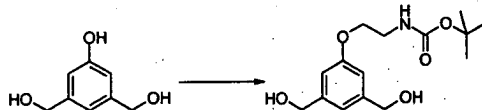
1-(2-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-etóxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno



5 1-(2-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-etóxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de 4-(2-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-etóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina, utilizando-se 1-(2-terc-butoxicarbonilamino-etóxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno:

10 ^1H RMN (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$, δ em ppm): $\delta = 1,22$ (s, 6H); 1,80 (m, 2H); 2,20 (m, 2H); 2,39 (s, 3H); 3,40 (q, $J = 6,0$ Hz, 2H); 3,95 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H); 4,44 (d, $J = 6,0$ Hz, 4H); 5,11 (t amplo, $J = 6,0$ Hz, 2H); 6,73 (s amplo, 2H); 6,84 (s amplo, 1H); 8,09 (t amplo, 1H).

15 1-(2-terc-butoxicarbonilamino-etóxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno



20 1-(2-terc-butoxicarbonilamino-etóxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de 5-(3-ftalimido-propóxi)-1,3-bis-(hidroximetil)-benzeno, utilizando-se brometo de 2-terc-butoxicarbonilamino-etila:

20 LC/MS (Método A3):

ES $m/z = 298$ MH^+

$m/z = 242$ ($\text{M} + 2\text{H} - \text{tBu}$) $^+$

$m/z = 224$ ($m/z = 242 - \text{H}_2\text{O}$) $^+$

$m/z = 206$ ($m/z = 224 - \text{H}_2\text{O}$) $^+$

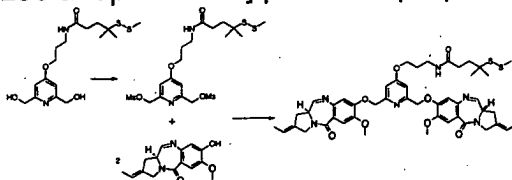
25 $m/z = 162$ ($m/z = 206 - \text{CO}_2$) $^+$

Tempo de retenção = 2,7 minutos

30 ^1H RMN (500 MHz, DMSO-d_6 , δ em ppm): $\delta = 1,39$ (s, 9H); 3,28 (q, $J = 6,0$ Hz, 2H); 3,91 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H); 4,44 (d, $J = 6,0$ Hz, 4H); 5,14 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H); 6,72 (s amplo, 2H); 6,83 (s amplo, 1H); 7,01 (t amplo, $J = 7,0$ Hz, 1H).

Exemplo 20:

8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-propóxi)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-ona] pode ser preparado como segue:



5

A uma solução resfriada (0°C) de 4-(3-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-propóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina (55 mg) e trietilamina (99 µL) em diclorometano (2 mL), foi adicionado cloreto de metanossulfonila (36 µL). Após 30 minutos, água foi adicionada. As camadas foram separadas, e a camada aquosa foi extraída duas vezes com diclorometano. As soluções orgânicas combinadas foram secadas sobre sulfato de magnésio, e concentradas em vácuo para um resíduo (95 mg).

A uma solução agitada de pré-tomamicina (50 mg) em dimetilformamida (0,75 mL), foram adicionados carbonato de potássio (114 mg), uma solução do resíduo prévio (55 mg) em dimetilformamida (1 mL) e iodeto de potássio (46 mg). A reação foi agitada durante 20 horas em 30°C. Os sólidos foram filtrados e lavados com dimetilformamida. Água foi adicionada à solução de dimetilformamida combinada e ácido fórmico foi adicionado até dissolução completa do precipitado. A solução resultante foi injetada para purificação por HPLC de acordo com o método B. As frações apropriadas foram combinadas e concentradas por evaporação centrífuga sobre um aparelho Jouan Modelo RC10.10. para fornecer 8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-propóxi)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-ona] (13,5mg).

25

LC/MS (Método A3):

ES m/z = 897 MH⁺

m/z = 664 (M - C₁₀H₂₀NOS₂ + 2H)⁺

m/z = 234 C₁₀H₂₀NOS₂⁺

Tempo de retenção = 3,7 minutos

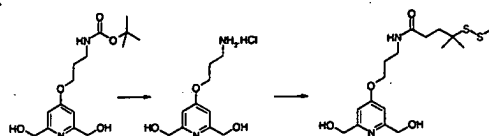
30

¹H RMN (500 MHz, CD₃COOD-d₄, δ em ppm): δ = 1,25 (s, 6H); de

1,60 a 2,20 (m parcialmente mascarado, 10H); 2,35 (m, 5H); de 2,80 a 4,44 (m, 14H); 3,91 (s, 6H); 5,40 (s, 4H); 5,62 (m, 2H); de 6,83 a 7,95 (m, 8H).

4-(3-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-propóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina

5



4-(3-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-propóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de 4-(2-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-etóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina, utilizando-se 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina:

10

LC/MS (Método A3):

ES $m/z = 389 \text{ MH}^+$

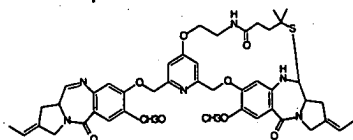
$m/z = 234 \text{ (M} - \text{C}_7\text{H}_8\text{NO}_3\text{)}^+$

$m/z = 156 \text{ C}_7\text{H}_{10}\text{NO}_3^+$

15

Tempo de retenção = 2,3 minutos

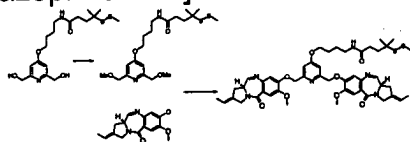
O derivado de tiol (SH) derivando do composto do exemplo 20 está em equilíbrio com o composto de fórmula:



Exemplo 21:

20

8,8'-[(4-(4-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-butóxi)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]



25

8,8'-[(4-(4-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-butóxi)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-ona] pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de 8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-propóxi)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-

1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-ona], utilizando-se 4-(4-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-butóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina:

LC/MS (Método A1, Plataforma II):

ES: $m/z = 947 \text{ MH}^+ + 2 \text{ H}_2\text{O}$

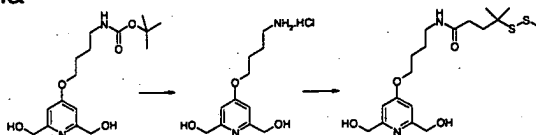
5 $m/z = 929 \text{ MH}^+ + \text{H}_2\text{O}$

$m/z = 911 \text{ MH}^+$

Tempo de retenção = 3,74 minutos

^1H RMN (500 MHz, $\text{CD}_3\text{COOD-d}_4$, δ em ppm): $\delta = 1,26$ (s, 6H); de 1,59 a 1,76 (m, 8H); de 1,81 a 1,94 (m, 4H); 2,35 (m, 5H); de 2,80 a 4,40 (m, 14H); 3,92 (s, 6H); 5,39 (m, 4H); 5,50 (m, 2H); de 6,72 a 7,95 (m, 8H).

4-(4-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-butóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina



15 4-(4-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-butóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de 4-(2-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-etóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina, utilizando-se 4-(4-terc-butoxicarbonilamino-butóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina:

LC/MS (Método A3):

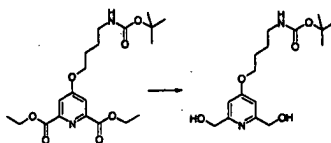
20 ES $m/z = 403 \text{ MH}^+$

$m/z = 248 (\text{M} - \text{C}_7\text{H}_8\text{NO}_3)^+$

$m/z = 156 \text{ C}_7\text{H}_{10}\text{NO}_3^+$

Tempo de retenção = 2,3 minutos

25 4-(4-terc-butoxicarbonilamino-butóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina



4-(4-terc-butoxicarbonilamino-butóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propóxi)-2,6-bis-(hidroximetil) piridina, iniciando

do com éster dietílico de ácido 4-(4-terc-butoxicarbonilamino-butóxi)-piridina-2,6-dicarboxílico:

LC/MS (Método A3):

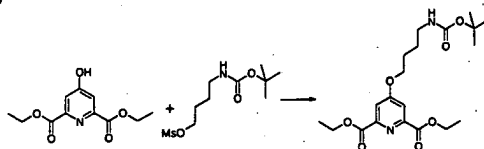
ES $m/z = 411 \text{ MH}^+$

5 $m/z = 355 \text{ (M} + 2\text{H} - \text{tBu)}^+$

$m/z = 240 \text{ C}_{11}\text{H}_{14}\text{NO}_5^+$

Tempo de retenção = 3,9 minutos

Éster dietílico de ácido 4-(4-terc-butoxicarbonilamino-butóxi)-piridina-2,6-dicarboxílico



10

Éster dietílico de ácido 4-(4-terc-butoxicarbonilamino-butóxi)-piridina-2,6-dicarboxílico pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de éster dietílico de ácido 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propóxi)-piridina-2,6-dicarboxílico, utilizando-se éster 4-terc-butoxicarbonilamino-butílico de ácido metanossulfônico (Cazenave Gassiot, A.; Charton, J.; Girault-Mizzi, S.; Gilleron, P.; Debreu-Fontaine, M-A.; Sergheraert, C.; Melnyk, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005, 15(21), 4828):

15

LC/MS (Método A3): ES $m/z = 327 \text{ MH}^+$

$m/z = 271 \text{ (M} + 2\text{H} - \text{tBu)}^+$

20

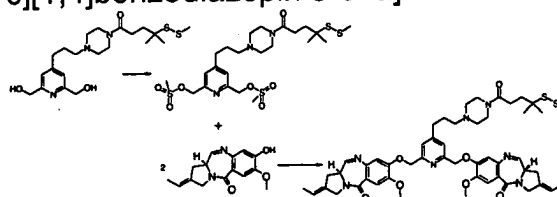
$m/z = 156 \text{ C}_7\text{H}_{10}\text{NO}_3^+$

Tempo de retenção = 2,0 minutos

Exemplo 22:

25

8,8'-[(4-(3-[4-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]



8,8'-[(4-(3-[4-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-

tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de 8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-propóxi)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-ona], utilizando-se

5 4-(3-[4-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina:

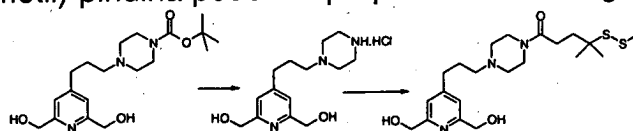
LC/MS (Método A1, Plataforma II):

ES: $m/z = 950 \text{ MH}^+$

Tempo de retenção = 3,32 minutos

10 $^1\text{H RMN}$ (500 MHz, CDCl_3 , δ em ppm): $\delta = 1,32$ (s, 6H); 1,76 (d, $J = 6,5$ Hz, 6H); 1,80 (m, 2H); 1,94 (m, 2H); de 2,27 a 2,46 (m, 11H); 2,67 (m, 2H); 2,97 (m, 4H); de 3,40 a 3,70 (m, 4H); 3,90 (m, 2H); 4,00 (s, 6H); 4,27 (s amplo, 4H); 5,29 (s amplo, 4H); 5,60 (q amplo, $J = 6,5$ Hz, 2H); 6,86 (s, 2H); 7,30 (s, 2H); 7,56 (s, 2H); 7,65 (d, $J = 4,5$ Hz, 2H).

15 4-(3-[4-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina pode ser preparado como segue:



A uma solução de 4-(3-(4-terc-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-propil)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina (610 mg) em dioxano (10 mL) foi adicionada

20 uma solução de ácido clorídrico a 4N em dioxano (2,5 mL). Após 4 horas em temperatura ambiente, a mistura reacional foi concentrada em vácuo para um resíduo (560 mg).

A uma solução de uma amostra do resíduo prévio (160 mg) em dimetilformamida (2,5 mL) foram adicionados N,N-diisopropiletilamina (181

25 μL), ácido 4-metil-4-metildissulfanil-pentanóico (158 mg), N,N'-diisopropilcarbodiimida (88 μL) e hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (15 mg). Após 15 horas em temperatura ambiente, os sólidos foram filtrados e a solução de dimetilformamida foi injetada para purificação por HPLC de acordo com o método F. As frações apropriadas foram combinadas e concentradas por sacagem por congelamento para fornecer 4-(3-[4-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina (105 mg):

30

LC/MS (Método A3):

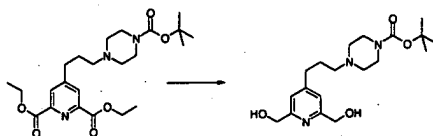
ES $m/z = 442 \text{ MH}^+$

$m/z = 266 (\text{M} + 2\text{H} - \text{C}_7\text{H}_{13}\text{OS}_2)^+$

Tempo de retenção = 2,3 minutos

5 ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6 , δ em ppm): $\delta = 1,27$ (s, 6H); de 1,70 a 1,83 (m, 4H); de 2,25 a 2,39 (m, 8H); 2,40 (s, 3H); 2,63 (m, 2H); 3,43 (m, 4H); 4,49 (s, 4H); 5,28 (m amplo, 2H); 7,18 (s, 2H).

4-(3-(4-terc-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-propil)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina



10

4-(3-(4-terc-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-propil)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)piridina, iniciando com éster dietílico de ácido 4-[3-(4-terc-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-propil]-piridina-2,6-dicarboxílico:

15

LC/MS (Método A3):

ES $m/z = 366 \text{ MH}^+$

$m/z = 310 (\text{M} + 2\text{H} - \text{tBu})^+$

$m/z = 266 (\text{M} + 2\text{H} - \text{CO}_2\text{tBu})^+$

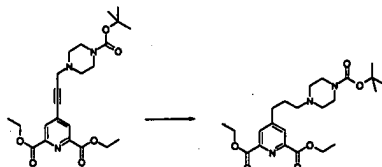
20

Tempo de retenção = 0,5 minuto

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6 , δ em ppm): $\delta = 1,39$ (s, 9H); 1,73 (m, 2H); 2,29 (m, 6H); 2,61 (m, 2H); 3,30 (m parcialmente mascarado, 4H); 4,49 (d, $J = 6,0 \text{ Hz}$, 4H); 5,30 (t amplo, $J = 6,0 \text{ Hz}$, 2H); 7,18 (s, 2H).

25

Éster dietílico de ácido 4-[3-(4-terc-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-propil]-piridina-2,6-dicarboxílico



Éster dietílico de ácido 4-[3-(4-terc-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-propil]-piridina-2,6-dicarboxílico pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de éster dietílico de ácido 5-(3-terc-butoxicarbonil-N-

metil-amino-propil)-benzeno-1,3-dicarboxílico, iniciando com éster dietílico de ácido 4-[3-(4-terc-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-prop-1-inil]-piridina-2,6-dicarboxílico:

LC/MS (Método A3):

5

ES $m/z = 450 \text{ MH}^+$

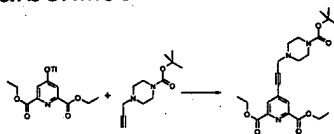
$m/z = 394 \text{ (M} + 2\text{H} - \text{tBu)}^+$

$m/z = 350 \text{ (M} + 2\text{H} - \text{CO}_2\text{tBu)}^+$

Tempo de retenção = 2,4 minutos

$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , δ em ppm): $\delta = 1,35$ (t, $J = 7,0$ Hz, 6H); 1,39 (s, 9H); 1,79 (m, 2H); 2,27 (m, 6H); 2,80 (m, 2H); 3,29 (m, 4H); 4,39 (q, $J = 7,0$ Hz, 4H); 8,12 (s, 2H).

Éster dietílico de ácido 4-[3-(4-terc-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-prop-1-inil]-piridina-2,6-dicarboxílico



15

Ester dietílico de ácido 4-[3-(4-terc-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-prop-1-inil]-piridina-2,6-dicarboxílico pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de éster dietílico de ácido 5-(3-terc-butoxicarbonil-N-metil-amino-propin-1-il)-benzeno-1,3-dicarboxílico, iniciando com éster dietílico de ácido 4-trifluorometanossulfonilóxi-piridina-2,6-dicarboxílico e terc-butil-4-propargil-piperazina-1-carboxilato (Zheng, H.; Weiner, L.M.; Bar-Am, O.; Epsztejn, S.; Cabantchik, Z.I.; Warshawsky, A.; Youdim, M.B.H.; e Fridkin, M. *Bioorg. Med. Chem.* 2005, 3, 773)

20

EI (Método C) $m/z = 445 \text{ M}^+$

$m/z = 388 \text{ (M} - \text{C}_4\text{H}_9)^+$

25

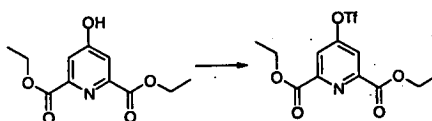
$m/z = 344 \text{ (m/z} = 388 - \text{CO}_2)^+$

$m/z = 57 \text{ C}_4\text{H}_9^+$

$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-}d_1$, δ em ppm): $\delta = 1,46$ (t, $J = 7,0$ Hz, 6H); 1,48 (s, 9H); 2,60 (m amplo, 4H); 3,52 (m amplo, 4H); 3,62 (s amplo, 2H); 4,49 (q, $J = 7,0$ Hz, 4H); 8,23 (s, 2H).

30

Éster dietílico de ácido 4-trifluorometanossulfonilóxi-piridina-2,6-dicarboxílico pode ser preparado como segue:



A uma solução resfriada (0°C) de éster dietílico de ácido quelidâmico (Chaubet, F.; Nguyen van duong, M.; Gref, A.; Courtieu, J.; Crumbliss, A.L.; Gaudemer, A. *Tetrahedron Lett.* 1990, 31(40), 5729-5732) (3,5 g) em piridina (35 mL), foi adicionado gota a gota cloreto de trifluorometanosulfonila (2,6 mL). A reação foi em seguida agitada em temperatura ambiente durante 3 horas. Água e acetato de etila foram adicionados. As camadas foram separadas, e a camada aquosa foi extraída duas vezes com acetato de etila. As soluções orgânicas combinadas foram secadas sobre sulfato de magnésio, e concentradas em vácuo para um resíduo. O resíduo foi purificado por cromatografia de sílica-gel (coluna de 90 g Merck SuperVarioPrep, Si60 15-40 μ m), eluído com diclorometano para fornecer éster dietílico de ácido 4-trifluorometanosulfonilóxi-piridina-2,6-dicarboxílico (4,2g).

LC/MS (Método A1, Plataforma I):

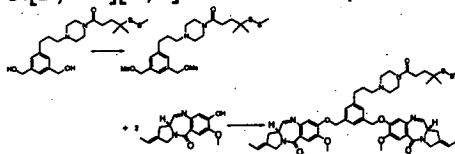
15

ES m/z = 372 MH⁺

Tempo de retenção = 4,38 minutos

Exemplo 23:

8,8'-[(1-(3-[4-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-benzeno-3,5-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]



20

8,8'-[(1-(3-[4-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-benzeno-3,5-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de 8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-propóxi)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-ona], utilizando-se 1-(3-[4-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno:

25

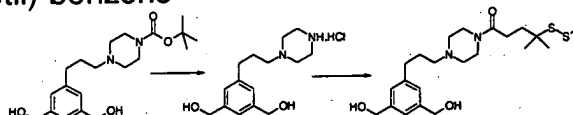
LC/MS (Método A3):

ES $m/z = 949 \text{ MH}^+$

$m/z = 475,3 (M + 2H)^{2+} / 2$

Tempo de retenção = 3,3 minutos

5 1-(3-[4-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-
3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno



10 1-(3-[4-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-
3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno pode ser preparado seguindo o procedimento
para a preparação de 4-(3-[4-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoil)-piperazin-
1-il]-propil)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina, iniciando com 1-(3-(4-terc-butoxi-
carbonil-piperazin-1-il)-propil)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno:

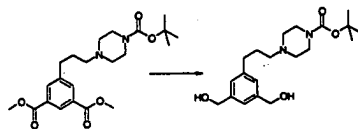
LC/MS (Método A3):

ES $m/z = 441 \text{ MH}^+$

15 Tempo de retenção = 2,4 minutos

$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , δ em ppm): $\delta = 1,26$ (s, 6H); 1,71 (m, 2H); 1,79 (m, 2H); de 2,22 a 2,40 (m, 8H); 2,39 (s, 3H); 2,58 (m, 2H); 3,44 (m, 4H); 4,45 (d; $J = 6,0$ Hz, 4H); 5,09 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H); 7,00 (s amplo, 2H); 7,08 (s amplo, 1H).

20 1-(3-(4-terc-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-propil)-3,5-bis-
(hidroximetil)-benzeno



25 1-(3-(4-terc-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-propil)-3,5-bis-(hidroxi-
metil)-benzeno pode ser preparado seguindo o procedimento para a prepa-
ração de 5-(3-terc-butoxicarbonil-N-metil-amino-propil)-1,3-bis-(hidroximetil)-
benzeno, iniciando com éster dimetilíco de ácido 5-[3-(4-terc-butoxicarbonil-
piperazin-1-il)-propil]-isoftálico:

LC/MS (Método A3):

ES $m/z = 365 \text{ MH}^+$

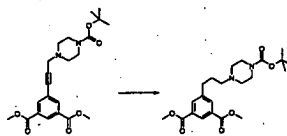
30 $m/z = 309 (M + 2H - t\text{Bu})^+$

Tempo de retenção = 2,0 minutos

^1H RMN (300 MHz, DMSO-d₆, δ em ppm): δ = 1,39 (s, 9H); 1,71 (m, 2H); 2,28 (m, 6H); 2,57 (m, 2H); 3,29 (m parcialmente mascarado, 4H); 4,44 (d, J = 6,0 Hz, 4H); 5,08 (t, J = 6,0 Hz, 2H); 7,00 (s amplo, 2H); 7,08 (s amplo, 1H).

5

Éster dimetílico de ácido 5-[3-(4-terc-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-propil]-isofáltico



10 Ester dimetílico de ácido 5-[3-(4-terc-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-propil]-isofáltico pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de éster dietílico de ácido 5-(3-terc-butoxicarbonil-N-metil-amino-propil)-benzeno-1,3-dicarboxílico, iniciando com éster dimetílico de ácido 5-[3-(4-terc-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-prop-1-inil]-isofáltico:

LC/MS (Método A3):

15

ES m/z = 421 MH⁺

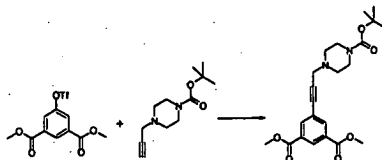
m/z = 365 (M + 2H - tBu)⁺

m/z = 321 (M + 2H - CO₂tBu)⁺

Tempo de retenção = 2,7 minutos

20 ^1H RMN (400 MHz, DMSO-d₆, δ em ppm): δ = 1,39 (s, 9H); 1,74 (m, 2H); 2,28 (m, 6H); 2,75 (m, 2H); 3,30 (m parcialmente mascarado, 4H); 3,89 (s, 6H); 8,08 (d, J = 2,0 Hz, 2H); 8,32 (t, J = 2,0 Hz, 1H).

Éster dimetílico de ácido 5-[3-(4-terc-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-prop-1-inil]-isofáltico



25

Éster dimetílico de ácido 5-[3-(4-terc-butoxicarbonil-piperazin-1-il)-prop-1-inil]-isofáltico pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de éster dietílico de ácido 5-(3-terc-butoxicarbonil-N-metil-amino-propin-1-il)-benzeno-1,3-dicarboxílico, iniciando com terc-butil-4-propargil-piperazina-1-carboxilato:

LC/MS (Método A3):

ES $m/z = 417 \text{ MH}^+$

$m/z = 361 \text{ (M} + 2\text{H} - \text{tBu)}^+$

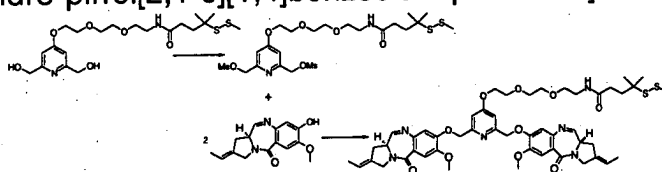
$m/z = 317 \text{ (M} + 2\text{H} - \text{CO}_2\text{tBu)}^+$

5 Tempo de retenção = 3,1 minutos

$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , δ em ppm): $\delta = 1,40$ (s, 9H); 2,50 (m mascarado, 4H); 3,35 (m, 4H); 3,61 (s, 2H); 3,90 (s, 6H); 8,14 (s amplo, 2H); 8,40 (s amplo, 1H).

Exemplo 24:

10 8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)-etóxi]-etóxi)-piridin-2,6-dimetil]-dióxi)-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]



15 8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)-etóxi]-etóxi)-piridin-2,6-dimetil]-dióxi)-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de 8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-propóxi)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi)-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-ona],
20 utilizando-se 4-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)-etóxi]-etóxi)-etóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina:

LC/MS (Método A3):

ES $m/z = 971 \text{ MH}^+$

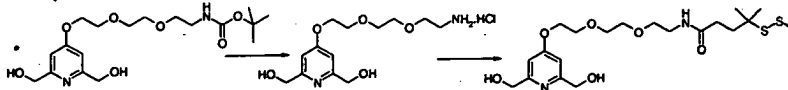
$m/z = 486,3 \text{ (M} + 2\text{H)}^{2+} / 2$

25 Tempo de retenção = 3,60 minutos

$^1\text{H RMN}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-}d_1$, δ em ppm): $\delta = 1,28$ (s, 6H); 1,76 (d, $J = 6,5$ Hz, 6H); 1,94 (m, 2H); 2,26 (m, 2H); 2,40 (s, 3H); 2,98 (m, 4H); de 3,36 a 3,95 (m, 12H); 4,00 (s, 6H); 4,18 (m, 2H); 4,28 (s amplo, 4H); 5,27 (m, 4H); 5,61 (m, 2H); 5,97 (m amplo, 1H); 6,84 (s, 2H); 7,01 (s amplo, 2H); 7,56 (s, 2H); 7,64 (d, $J = 4,5$ Hz, 2H).

30

4-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)-etóxi]-etóxi}-
etóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina



- 5 4-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)-etóxi]-etóxi}-
etóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina pode ser preparado seguindo o procedi-
mento para a preparação de 4-(3-[4-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoil)-
piperazin-1-il]-propil)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina, iniciando com 4-(2-{2-[2-
terc-butoxicarbonilamino-etóxi]-etóxi}-etóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina:

LC/MS (Método A3):

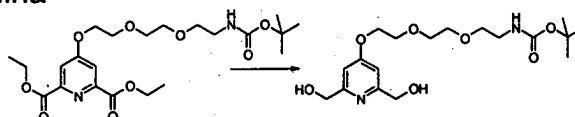
10

ES $m/z = 463 \text{ MH}^+$

Tempo de retenção = 2,3 minutos

- ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6 , δ em ppm): $\delta = 1,22$ (s, 6H); 1,79
(m, 2H); 2,15 (m, 2H); 2,39 (s, 3H); 3,18 (q, $J = 6,0$ Hz, 2H); 3,40 (t, $J = 6,0$
Hz, 2H); 3,52 (m, 2H); 3,60 (m, 2H); 3,76 (m, 2H); 4,18 (m, 2H); 4,45 (s, 4H);
15 5,32 (m amplo, 2H); 6,85 (s, 2H); 7,90 (t amplo, $J = 6,0$ Hz, 1H).

4-(2-{2-[2-terc-butoxicarbonilamino-etóxi]-etóxi}-etóxi)-2,6-bis-
(hidroximetil)-piridina



- 20 4-(2-{2-[2-terc-butoxicarbonilamino-etóxi]-etóxi}-etóxi)-2,6-bis-
(hidroximetil)-piridina pode ser preparado seguindo o procedimento para a
preparação de 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)
piridina, iniciando com éster dietílico de ácido 4-(2-{2-[2-terc-butoxicarbonila-
mino-etóxi]-etóxi}-etóxi)-piridina-2,6-dicarboxílico:

LC/MS (Método A3):

25

ES $m/z = 387 \text{ MH}^+$

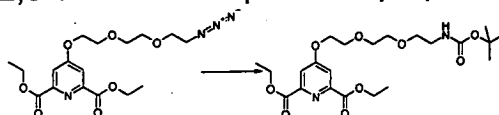
$m/z = 331$ ($M + 2H - t\text{Bu}$) $^+$

Tempo de retenção = 2,0 minutos

- ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6 , δ em ppm): $\delta = 1,37$ (s, 9H); 3,07
(q, $J = 6,0$ Hz, 2H); 3,39 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H); 3,51 (m, 2H); 3,59 (m, 2H); 3,73
30 (m, 2H); 4,18 (m, 2H); 4,45 (d, $J = 6,0$ Hz, 4H); 5,31 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H); 6,73

(t amplo, J = 6,0 Hz, 1H); 6,85 (s, 2H).

Éster dietílico de ácido 4-(2-{2-[2-terc-butoxicarbonilamino-etóxi]-etóxi}-etóxi)-piridina-2,6-dicarboxílico pode ser preparado como segue:



- 5 A uma solução de éster dietílico de ácido 4-(2-{2-[2-azido-etóxi]-etóxi}-etóxi)-piridina-2,6-dicarboxílico (Roy, B.C.; Santos, M.; Mallik, S.; D. Campiglia, A.D. *J. Org. Chem.* 2003, 68(10), 3999) (900 mg) em acetato de etila (18 mL) foram adicionados diterc-butil-dicarbonato (545 mg) e paládio a 10% sobre carbono (73 mg). A solução foi agitada em temperatura ambiente sob uma atmosfera de hidrogênio 200 Kpa (2 bar) durante 18 horas. O sólido foi filtrado e solvente foi removido em vácuo para um resíduo. O resíduo foi purificado por cromatografia de sílica-gel (Analogix Super Flash SiO₂ SF 25-34 g), utilizando-se eluição gradiente com uma mistura de diclorometano (A) e metanol (B) (gradiente: 100% de A até 97,5% de A: 2,5% de B) para fornecer éster dietílico de ácido 4-(2-{2-[2-terc-butoxicarbonilamino-etóxi]-etóxi}-etóxi)-piridina-2,6-dicarboxílico (760 mg):

LC/MS (Método A3):

ES m/z = 471 MH⁺

m/z = 415 (M + 2H - tBu)⁺

20 m/z = 371 (M + 2H - CO₂tBu)⁺

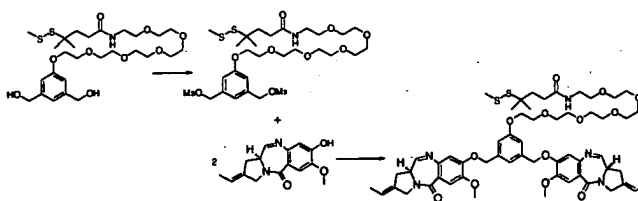
Tempo de retenção = 3,6 minutos

¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆, δ em ppm): δ = 1,32 (t, J = 7,0 Hz, 6H); 1,36 (s, 9H); 3,04 (q, J = 6,0 Hz, 2H); 3,38 (t, J = 6,0 Hz, 2H); 3,51 (m, 2H); 3,59 (m, 2H); 3,79 (m, 2H); 4,25 (m mascarado, 2H); 4,29 (q, J = 7,0 Hz, 4H); 6,70 (t amplo, J = 6,0 Hz, 1H); 7,73 (s, 2H).

Exemplo 25:

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(2-(2-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)-etóxi]-etóxi)-etóxi]-etóxi)-etóxi)-benzeno-3,5-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

30



8,8'-[(1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoila-
 mino)-etóxi]-etóxi]-etóxi]-etóxi]-etóxi]-etóxi)-benzeno-3,5-dimetil)-dióxi]-
 bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzo-
 5 diazepin-5-ona] pode ser preparado seguindo o procedimento para a prepa-
 5 ração de 8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-propóxi)-piridin-
 2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pir-
 rol[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-ona], utilizando-se 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-
 4-metildissulfanil-pentanoilamino)-etóxi]-etóxi]-etóxi]-etóxi]-etóxi)-3,5-
 10 bis-(hidroximetil)-benzeno:

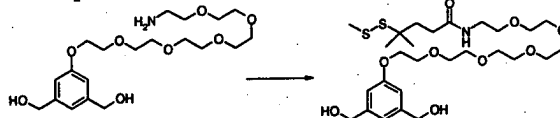
LC/MS (Método A1, Plataforma II):

ES: $m/z = 1102 \text{ MH}^+$

Tempo de retenção = 4,49 minutos

^1H RMN (500 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$, δ em ppm): $\delta = 1,30$ (s, 6H); 1,75
 15 (d, $J = 6,5$ Hz, 6H); 1,95 (m, 2H); 2,28 (m, 2H); 2,41 (s, 3H); 2,97 (m, 4H); de
 3,33 a 3,96 (m, 24H); 3,96 (s, 6H); 4,12 (m, 2H); 4,27 (s amplo, 4H); de 5,07
 a 5,24 (m, 4H); 5,60 (m, 2H); 6,21 (m amplo, 1H); 6,81 (s, 2H); 6,96 (s, 2H);
 7,07 (s, 1H); 7,51 (s, 2H); 7,65 (d, $J = 4,5$ Hz, 2H).

1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)-
 20 etóxi]-etóxi]-etóxi]-etóxi]-etóxi]-etóxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno



1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)-
 etóxi]-etóxi]-etóxi]-etóxi]-etóxi]-etóxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno pode ser
 preparado seguindo o procedimento para a preparação de 1-(3-(4-metil-4-
 25 metildissulfanil)-pentanamido-propóxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno, iniciando
 com 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-amino-etóxi]-etóxi]-etóxi]-etóxi]-etóxi)-3,5-
 bis-(hidroximetil)-benzeno:

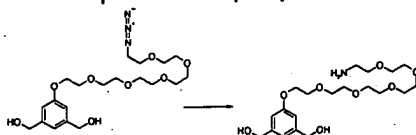
LC/MS (Método G1):

ES $m/z = 594 \text{ MH}^+$

Tempo de retenção = 1,9 minuto.

1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-amino-etóxi]-etóxi}-etóxi)-etóxi]-etóxi]-etóxi}-
3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno pode ser preparado como segue:

5



A uma solução de 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-azido-etóxi]-etóxi]-etóxi]-etóxi]-
etóxi]-etóxi]-etóxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno (540 mg) em THF (5,5 mL)
foram adicionados trifenilfosfina (320 mg) e água (22 μL). A solução foi agi-
tada em temperatura ambiente durante 18 horas e solvente foi removido em
10 vácuo para um resíduo. O resíduo foi purificado por cromatografia de sílica-
gel (coluna de 30 g Merck SuperVarioFlash, Si60 15-40 μm , eluído com di-
clorometano/metanol 95:5, em seguida diclorometano/metanol/ NH_4OH
75:25:2,5 para fornecer 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-amino-etóxi]-etóxi]-etóxi]-etóxi]-
etóxi]-etóxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno (430 mg):

15

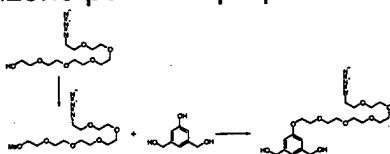
LC/MS (Método A3):

ES: $m/z = 418 \text{ MH}^+$

Tempo de retenção = 1,3 e 1,7 minuto

1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-azido-etóxi]-etóxi]-etóxi]-etóxi]-etóxi]-etóxi)-
3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno pode ser preparado como segue:

20

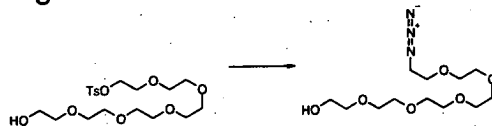


A uma solução resfriada (0°C) de 2-[2-(2-{2-[2-(2-Azido-etóxi)-
etóxi]-etóxi]-etóxi]-etanol (1,6 g) e trietilamina (1,45 mL) em diclorome-
tano (40 mL), foi adicionada cloreto de metanossulfonila (617 μL). Após 1
hora, água foi adicionada. As camadas foram separadas e a camada orgâni-
ca foi secada sobre sulfato de magnésio, e concentrada em vácuo para um
25 resíduo (1,83 g). Uma amostra do resíduo (1,4 g), 3,5-bis-hidroximetilfenol
(510 mg) e carbonato de potássio (686 mg) foram misturados em dimetilfor-
mamida (8 mL) e aquecidos em 70°C durante 15 horas. A mistura reacional
foi resfriada para a temperatura ambiente, água foi adicionada e a solução

aquosa foi extraída três vezes com acetato de etila. As soluções orgânicas combinadas foram lavadas com uma solução aquosa de cloreto de sódio saturado, secadas sobre sulfato de magnésio e concentradas em vácuo para um resíduo. O resíduo foi purificado por cromatografia de sílica-gel (coluna de 70 g Merck SuperVarioPrep, Si60 15-40 μm), eluído com uma mistura de metanol (A)/diclorometano (B), (gradiente: 2% de A: 98% de B a 10% de A: 90% de B) para fornecer 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-azido-etóxi]-etóxi}-etóxi)-etóxi]-etóxi]-etóxi}-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno (540 mg):

CI (Método D): $m/z = 461 \text{ MNH}_4^+$

10 2-[2-(2-{2-[2-(2-Azido-etóxi)-etóxi]-etóxi]-etóxi)-etóxi]-etanol pode ser preparado como segue:

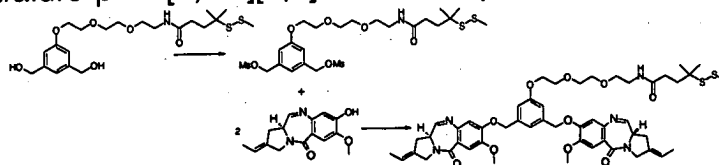


A uma solução de 2-[2-(2-{2-[2-(2-tosilóxi-etóxi)-etóxi]-etóxi]-etóxi]-etóxi]-etanol (Loiseau, F. A.; Hii, K. K.; Hill, A. M. *J. Org. Chem.* 2004, 69, 639) (4,5 g) em dimetilformamida (30 mL), foi adicionado azida de sódio (0,89 g). A solução foi agitada em 70°C durante 18 horas e o solvente foi em seguida removido em vácuo para um resíduo. Diclorometano foi adicionado e o precipitado resultante foi filtrado. A camada orgânica foi concentrada em vácuo para fornecer 2-[2-(2-{2-[2-(2-Azido-etóxi)-etóxi]-etóxi]-etóxi]-etóxi]-etanol (3,1 g):

20 CI (Método D): $m/z = 325 \text{ MNH}_4^+$

Exemplo 26:

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)-etóxi]-etóxi]-etóxi)-benzeno-3,5-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]



25

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)-etóxi]-etóxi]-etóxi)-benzeno-3,5-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de 8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-me-

tildissulfanil)-pentanamido-propóxi)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-ona], utilizando-se 1-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)-etóxi]-etóxi}-etóxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno:

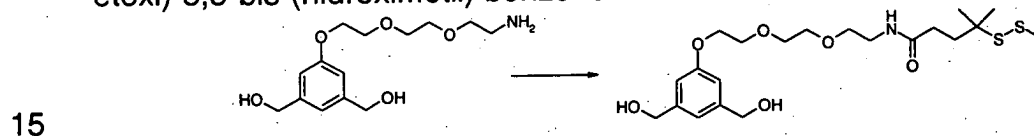
5 LC/MS (Método A1, Plataforma II):

ES: $m/z = 970 \text{ MH}^+$

Tempo de retenção = 3,89 minutos

^1H RMN (500 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$, δ em ppm): $\delta = 1,27$ (s, 6H); 1,75 (d, $J = 6,5$ Hz, 6H); 1,94 (m, 2H); 2,26 (m, 2H); 2,40 (s, 3H); 2,98 (m, 4H); de 10 3,35 a 3,92 (m, 12H); 3,96 (s, 6H); 4,15 (m, 2H); 4,28 (s amplo, 4H); de 5,10 a 5,23 (m, 4H); 5,60 (q amplo, $J = 6,5$ Hz, 2H); 6,05 (t amplo, $J = 6,0$ Hz, 1H); 6,81 (s, 2H); 6,98 (s, 2H); 7,09 (s, 1H); 7,53 (s, 2H); 7,64 (d, $J = 4,5$ Hz, 2H).

1-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)-etóxi]-etóxi}-etóxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno



1-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)-etóxi]-etóxi}-etóxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de 1-(3-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-propóxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno, iniciando com 1-(2-{2-[2-amino-etóxi]-etóxi}-etóxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno:

20

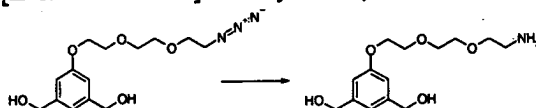
LC/MS (Método A3):

ES: $m/z = 462 \text{ MH}^+$

$m/z = 444$ ($M + H - \text{H}_2\text{O}$) $^+$

Tempo de retenção = 3,0 minutos

25 1-(2-{2-[2-amino-etóxi]-etóxi}-etóxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno



1-(2-{2-[2-amino-etóxi]-etóxi}-etóxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-amino-etóxi]-etóxi}-etóxi)-etóxi]-etóxi}-etóxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno, iniciando com 1-(2-{2-[2-azido-etóxi]-etóxi}-etóxi)-3,5-

30

bis-(hidroximetil)-benzeno:

LC/MS (Método A3):

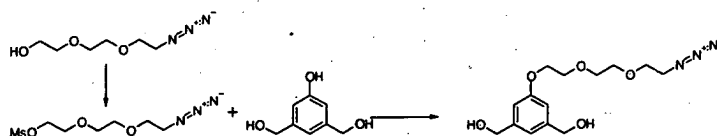
ES: $m/z = 286 \text{ MH}^+$

$m/z = 268 \text{ (M + H - H}_2\text{O)}^+$

5

Tempo de retenção = 0,8 minuto

Azido de 1-(2-{2-[2-azido-etóxi]-etóxi}-etóxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno



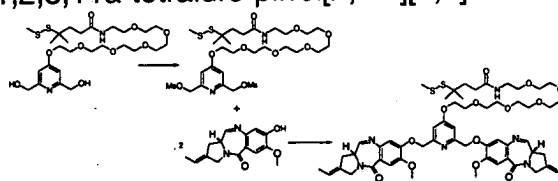
1-(2-{2-[2-azido-etóxi]-etóxi}-etóxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno

10 pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-azido-etóxi]-etóxi}-etóxi)-etóxi]-etóxi}-etóxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno, iniciando com 2-[2-(2-Azido-etóxi)-etóxi]-etanol (Roy, B.C; Santos, M.; Mallik, S.; Campiglia, A.D. *J. Org. Chem.* 2003, 68(10), 3999):

Cl (Método D) $m/z = 329 \text{ MNH}_4^+$.

15 Exemplo 27:

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)-etóxi]-etóxi)-etóxi]-etóxi]-etóxi)-etóxi)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]



20

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)-etóxi]-etóxi)-etóxi]-etóxi]-etóxi)-etóxi)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de 8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-propóxi)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-ona], utilizando-se 4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)-etóxi]-etóxi)-etóxi]-etóxi)-etóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina:

LC/MS (Método A3):

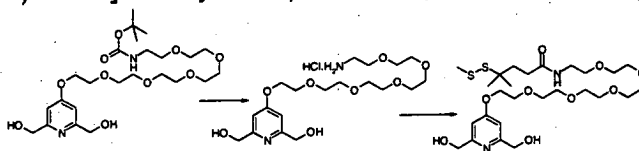
ES: $m/z = 1103 \text{ MH}^+$

$m/z = 552 (M + 2H)^{2+} / 2$

Tempo de retenção = 3,7 minutos

$^1\text{H RMN}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$, δ em ppm): $\delta = 1,29$ (s, 6H); 1,75 (d, $J = 6,5$ Hz, 6H); 1,94 (m, 2H); 2,28 (m, 2H); 2,40 (s, 3H); 2,97 (m, 4H); de 3,33 a 3,95 (m, 24H); 3,99 (s, 6H); 4,18 (m, 2H); 4,28 (s amplo, 4H); 5,27 (m, 4H); 5,60 (m, 2H); 6,19 (m amplo, 1H); 6,82 (s, 2H); 7,00 (s amplo, 2H); 7,55 (s, 2H); 7,64 (d, $J = 4,5$ Hz, 2H).

4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)-etóxi]-etóxi]-etóxi)-etóxi]-etóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina



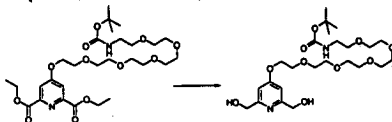
4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)-etóxi]-etóxi]-etóxi)-etóxi]-etóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de 4-(3-[4-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-propil)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina, iniciando com 4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-terc-butoxicarbonilamino-etóxi]-etóxi]-etóxi)-etóxi]-etóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina:

LC/MS (Método A3):

ES: $m/z = 596 \text{ MH}^+$

Tempo de retenção = 2,4 minutos

4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-terc-butoxicarbonilamino-etóxi]-etóxi]-etóxi)-etóxi]-etóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina



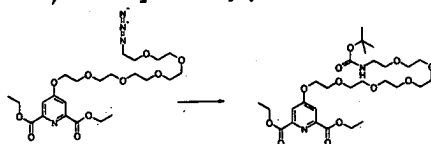
4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-terc-butoxicarbonilamino-etóxi]-etóxi]-etóxi)-etóxi]-etóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propóxi)-2,6-bis-(hidroximetil) piridina, iniciando com éster dietílico de ácido 4-{2-[2-(2-{2-[2-(2-terc-butoxicarbonilamino-etóxi)-etóxi]-etóxi)-etóxi]-etóxi]-piridina-2,6-dicarboxílico:

LC/MS (Método A3):

ES: $m/z = 519 \text{ MH}^+$

Tempo de retenção = 2,2 minutos

5 Éster dietílico de ácido 4-{2-[2-(2-[2-(2-(2-terc-butoxicarbonilamino-etóxi)-etóxi]-etóxi)-etóxi)-etóxi]-etóxi]-piridina-2,6-dicarboxílico



10 Éster dietílico de ácido 4-{2-[2-(2-[2-(2-(2-terc-butoxicarbonilamino-etóxi)-etóxi]-etóxi)-etóxi)-etóxi]-etóxi]-piridina-2,6-dicarboxílico pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de éster dietílico de ácido 4-(2-[2-(2-terc-butoxicarbonilamino-etóxi)-etóxi]-etóxi)-piridina-2,6-dicarboxílico, iniciando com éster dietílico de ácido 4-{2-[2-(2-[2-(2-(2-Azido-etóxi)-etóxi)-etóxi)-etóxi]-etóxi]-piridina-2,6-dicarboxílico:

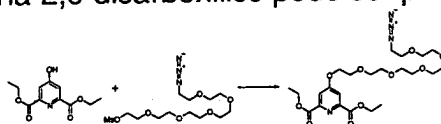
LC/MS (Método A3):

ES: $m/z = 603 \text{ MH}^+$

15 $m/z = 271 (\text{M} + 2\text{H} - \text{CO}_2\text{tBu})^+$

Tempo de retenção = 3,6 minutos

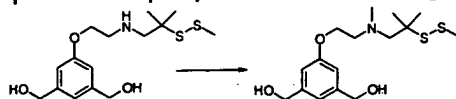
Éster dietílico de ácido 4-{2-[2-(2-[2-(2-(2-Azido-etóxi)-etóxi)-etóxi]-etóxi)-etóxi]-piridina-2,6-dicarboxílico pode ser preparado como segue:



20 A uma solução de éster dietílico de ácido quelidâmico (1,03 g) em dimetilformamida (10 mL) foram adicionados éster 2-[2-(2-[2-(2-(2-azido-etóxi)-etóxi)-etóxi]-etóxi)-etóxi]-etilico de de ácido metanossulfônico (1,82 g) e carbonato de potássio (893 mg). A mistura resultante foi aquecida em 70°C durante 15 horas, em seguida foi resfriada para a temperatura ambiente.

25 Água foi adicionada e a solução aquosa foi extraída três vezes com acetato de etila. As soluções orgânicas combinadas foram lavadas com uma solução aquosa de cloreto de sódio saturado, secadas sobre sulfato de magnésio e concentradas em vácuo para um resíduo. O resíduo foi purificado por cromatografia de sílica-gel (coluna de 70 g Merck SuperVarioPrep, Si60 15-40

1-(2-[metil-(2-metil-2-metildissulfanil-propil)-amino]-etóxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno pode ser preparado como segue:



A uma suspensão resfriada (5°C) de 1-(2-(2-metil-2-metildissulfanil-propil)-amino-etóxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno (280 mg) em formaldeído (228 µL), foi adicionado ácido fórmico (319 µL). A mistura resultante foi aquecida em 100°C durante 1 hora e 15 minutos, em seguida foi resfriada para a temperatura ambiente. Água e gelo foram adicionados, seguido por uma solução aquosa de hidróxido de sódio até pH = 12. A solução aquosa resultante foi extraída três vezes com acetato de etila e as soluções orgânicas combinadas foram secadas sobre sulfato de magnésio e concentradas em vácuo para um resíduo. O resíduo foi purificado por cromatografia de sílica-gel (coluna de 25 g Merck SuperVarioFlash, Si60 15-40 µm), eluído com uma mistura de metanol (A)/diclorometano (B), (gradiente: 2% de A: 98% de B a 5% de A: 95% de B) para fornecer 1-(2-[metil-(2-metil-2-metildissulfanil-propil)-amino]-etóxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno (210 mg):

LC/MS (Método A3):

ES: m/z = 346 MH⁺

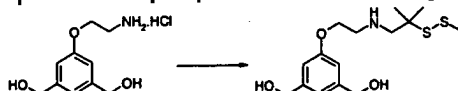
m/z = 212 (M + 2H - C₅H₁₁S₂)⁺

20 m/z = 135 C₅H₁₁S₂⁺

Tempo de retenção = 2,1 minutos

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆, δ em ppm): δ = 1,27 (s, 6H); 2,39 (s, 3H); 2,40 (s, 3H); 2,60 (s, 2H); 2,85 (t, J = 6,0 Hz, 2H); 4,02 (t, J = 6,0 Hz, 2H); 4,44 (d, J = 6,0 Hz, 4H); 5,10 (t, J = 6,0 Hz, 2H); 6,72 (s amplo, 2H); 25 6,82 (s amplo, 1H).

1-(2-(2-metil-2-metildissulfanil-propil)-amino-etóxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno pode ser preparado como segue:



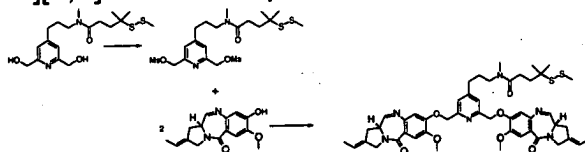
A uma suspensão de cloridrato de 1-(2-amino-etóxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno (900 mg) em tetraidrofurano (4,5 mL) foi adicionada trietilamina (1,07 mL). Após agitação durante 15 minutos, 2-(metildi-

tio)isobutiraldeído (530 µL) e isopropóxido de titânio (1,42 mg) foram adicionados e a mistura resultante foi agitada em temperatura ambiente durante 2 horas. Etanol (9 mL) e cianoboroidreto de sódio (242 mg) foram adicionados e a nova mistura foi agitada em temperatura ambiente durante 18 horas. Os sólidos foram filtrados e o filtrado foi concentrado em vácuo para um resíduo. O resíduo foi em seguida diluído em acetato de etila e os sólidos resultantes foram filtrados. A solução orgânica foi em seguida lavada com água e com uma solução aquosa de cloreto de sódio saturado, secada sobre magnésio e concentrada em vácuo para um novo resíduo que foi purificado por cromatografia de sílica-gel (coluna de 30 g Merck SuperVarioFlash, Si60 15-40 µm), eluído com uma mistura de metanol (A)/diclorometano (B), (gradiente: 4% de A: 96% de B a 10% de A: 90% de B) para fornecer 1-(2-(2-metil-2-metil-dissulfanil-propil)-amino-etóxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno (290 mg):

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆, δ em ppm): δ = 1,27 (s, 6H); 1,82 (m amplo, 1H); 2,39 (s, 3H); 2,67 (s, 2H); 2,91 (t, J = 6,0 Hz, 2H); 4,00 (t, J = 6,0 Hz, 2H); 4,43 (d, J = 6,0 Hz, 4H); 5,10 (t, J = 6,0 Hz, 2H); 6,73 (s amplo, 2H); 6,83 (s amplo, 1H).

Exemplo 29:

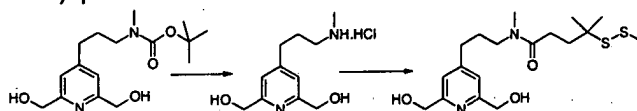
8,8'-[(4-(3-[metil-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]



8,8'-[(4-(3-[metil-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de 8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-propóxi)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona], utilizando-se 4-(3-[metil-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoil)-amino]-propil)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina:

^1H RMN (500 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$, δ em ppm): δ = 1,32 (s, 6H); 1,75 (d, J = 6,5 Hz, 6H); 1,94 (m, 4H); de 2,20 a 4,30 (m, 18H); 4,00 (s, 6H); 4,27 (s amplo, 4H); de 5,21 a 5,68 (m, 6H); de 6,80 a 7,70 (m, 8H).

5 4-(3-[metil-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoil)-amino]-propil)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina



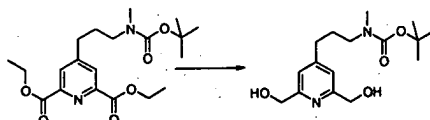
10 4-(3-[metil-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoil)-amino]-propil)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de 4-(2-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-etóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina, utilizando-se 4-(3-(terc-butoxicarbonil-metil-amino)-propil)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina:

LC/MS (Método A3):

ES: m/z = 387 MH^+

Tempo de retenção = 2,5 minutos

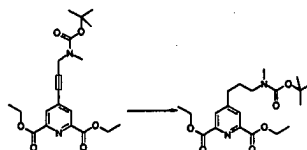
15 4-(3-(terc-butoxicarbonil-metil-amino)-propil)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina



20 4-(3-(terc-butoxicarbonil-metil-amino)-propil)-2,6-bis-(hidroximetil)-piridina pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de 4-(3-terc-butoxicarbonilamino-propóxi)-2,6-bis-(hidroximetil)piridina, utilizando-se éster dietílico de ácido 4-(3-(terc-butoxicarbonil-metil-amino)-propil)-piridina-2,6-bis-dicarboxílico:

CI (Método D) m/z = 311 MH^+

25 Éster dietílico de ácido 4-(3-(terc-butoxicarbonil-metil-amino)-propil)-piridina-2,6-bis-dicarboxílico



Ester dietílico de ácido 4-(3-(terc-butoxicarbonil-metil-amino)-propil)-piridina-2,6-bis-dicarboxílico pode ser preparado seguindo o procedimen-

to para a preparação de éster dietílico de ácido 5-(3-terc-butoxicarbonil-N-metil-amino-propil)-benzeno-1,3-dicarboxílico, iniciando com éster dietílico de ácido 4-[3-(terc-butoxicarbonil-metil-amino)-prop-1-inil]-piridina-2,6-dicarboxílico:

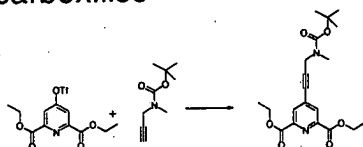
5

LC/MS (Método G2):

ES: $m/z = 395 \text{ MH}^+$ $m/z = 339 \text{ (M} + 2\text{H} - \text{tBu)}^+$

Tempo de retenção = 7,5 minutos

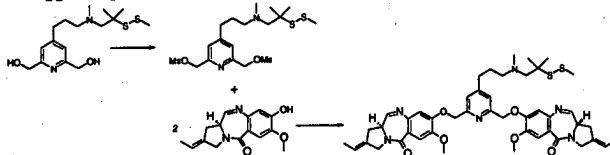
10 Éster dietílico de ácido 4-[3-(terc-butoxicarbonil-metil-amino)-prop-1-inil]-piridina-2,6-dicarboxílico



15 Ester dietílico de ácido 4-[3-(terc-butoxicarbonil-metil-amino)-prop-1-inil]-piridina-2,6-dicarboxílico pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de éster dietílico de ácido 5-(3-terc-butoxicarbonil-N-metil-amino-propin-1-il)-benzeno-1,3-dicarboxílico, iniciando com terc-butoxicarbonil-N-metil-propargilamina.

CI (Método D) $m/z = 391 \text{ MH}^+$ Exemplo 30:

20 8,8'-[(4-(3-[metil-(2-metil-2-metildissulfanil-propil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

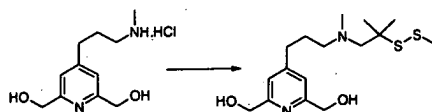


25 8,8'-[(4-(3-[metil-(2-metil-2-metildissulfanil-propil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de 8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-propóxi)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-ona], utilizando-se 4-{3-[metil-(2-metil-2-metildissulfanil-propil)-amino]-propil}-2,6-bis-(hi-

droxi metil)-piridina:

^1H RMN (500 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$, δ em ppm): $\delta = 1,28$ (s, 6H); 1,65 (m parcialmente mascarado, 2H); 1,75 (d, $J = 6,5$ Hz, 6H); 2,29 (s, 3H); 2,38 (s, 3H); 2,46 (m, 4H); 2,65 (m, 2H); 2,97 (m, 4H); 3,89 (m, 2H); 4,00 (s, 6H); 4,27 (s amplo, 4H); 5,29 (s, 4H); 5,60 (q amplo, $J = 6,5$ Hz, 2H); 6,86 (s, 2H); 7,30 (s, 2H); 7,55 (s, 2H); 7,64 (d, $J = 4,5$ Hz, 2H).

4-{3-[metil-(2-metil-2-metildissulfanil-propil)-amino]-propil}-2,6-bis-(hidroxi metil)-piridina



10 P-34409-034-3

4-{3-[metil-(2-metil-2-metildissulfanil-propil)-amino]-propil}-2,6-bis-(hidroxi metil)-piridina pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de 1-(2-(2-metil-2-metildissulfanil-propil)-amino-etóxi)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno, utilizando-se 4-{3-[metil-amino]-propil}-2,6-bis-(hidroxi metil)-piridina:

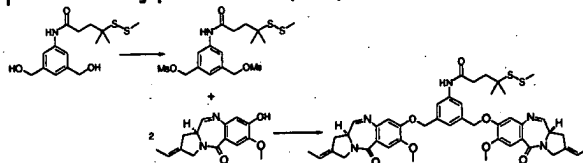
LC/MS (Método A1, Plataforma II):

ES $m/z = 345 \text{ MH}^+$

Tempo de retenção = 1,15 minuto

Exemplo 31:

20 8,8'-[(1-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido)-benzeno-3,5-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] pode ser preparado como segue:



25 8,8'-[(1-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido)-benzeno-3,5-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] pode ser preparado seguindo o procedimento para a preparação de 8,8'-[(4-(2-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-etóxi)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona], iniciando com (1-(4-metil-4-

metildissulfanil)-pentanamido)-3,5-bis-(hidroximetil)-benzeno:

LC/MS (Método A1, Plataforma I):

ES: m/z = 838 MH⁺

Tempo de retenção = 4,11 minutos

5 ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃-d₁, δ em ppm): δ = 1,33 (s, 6H); 1,76 (d, J = 6,5 Hz, 6H); 2,03 (m, 2H); 2,43 (s, 3H); 2,46 (m, 2H); 2,97 (m, 4H); 3,89 (m, 2H); 3,95 (s, 6H); 4,27 (s amplo, 4H); 5,14 (d, J = 12,5 Hz, 2H); 5,19 (d, J = 12,5 Hz, 2H); 5,60 (q, J = 6,5 Hz, 2H); 6,81 (s, 2H); de 7,20 a 7,60 (m, 6H); 7,64 (d, J = 4,5 Hz, 2H)

10 Os derivados de mercapto correspondentes de compostos dos exemplos 19-31 podem ser preparados por aplicação do procedimento descrito no exemplo 18.

Exemplo A: Procedimento geral para preparação de conjugado:

15 Anticorpo anti-B4 que se liga ao antígeno CD19 preferencialmente expresso na superfície de células de linfoma humano é selecionado para conjugação de derivados de tomamicina.

Na primeira etapa, o anticorpo é reagido com o agente de modificação 5-nitro-2-piridilditiobutanoato de N-sulfossucinimidila (SSNPB) para introduzir grupos nitropiridilditio. Uma solução de anticorpo huC242 em uma
20 concentração de 8 mg/mL em um tampão aquoso contendo 0,05 M de fosfato de potássio, 0,05 M de cloreto de sódio e 2 mM de ácido etilenodiamineta-
tra-acético (EDTA), pH 6,5 (65,6 mL) é tratada com um excesso molar de 8 vezes de uma solução de SSNPB em dimetilacetamida (DMA). A mistura reacional é agitada em temperatura ambiente durante 90 minutos e em se-
25 guida carregada em uma coluna de filtração de gel Sephadex G25 (50 mm x 35,5 mm, coluna) que foi previamente equilibrada em um tampão aquoso contendo 0,05 M de fosfato de potássio, 0,05 M de cloreto de sódio e 2 mM de EDTA, pH 7,5. As frações contendo anticorpo modificado são coletadas e reunidas para produzir o produto. Uma alíquota pequena do anticorpo modi-
30 ficado é tratada com ditiotretol para clivar o dissulfeto de nitro-piridila e o nitro-piridina-2-tiona liberado é ensaiado espectrofotometricamente ($\epsilon_{323\text{nm}} = 4,299 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{280\text{nm}} = 565 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o composto, e $\epsilon_{280\text{nm}} = 217,560 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

$^1\text{cm}^{-1}$ para o anticorpo). Uma média de 4 a 6 moléculas de nitro-piridil-dissulfeto é tipicamente ligada por molécula de anticorpo.

O anticorpo modificado é diluído a 2,5 mg/mL no tampão acima em pH 7,5 e em seguida tratado com uma solução do derivado de tomamicina em DMA, de modo que a concentração final de DMA no tampão seja 20%. A mistura de conjugação é agitada em temperatura ambiente durante 16 horas. A mistura reacional é purificada por passagem através de uma coluna de filtração de gel Sephacril S300 (50 mm x 42 cm, coluna que foi previamente equilibrada em um tampão de salina tamponada por fosfato (PBS) em pH 6,5. Frações contendo conjugado anticorpo monomérico-derivado de tomamicina são reunidas e dialisadas no tampão de PBS. O conjugado final é ensaiado espectrofotometricamente utilizando-se os coeficientes de extinção que são determinados separadamente para cada derivado de tomamicina.

15 Conjugados SPDB-PBD e SMCC-PBD dos compostos da invenção

huB4-SPDB - Composto de exemplo 16

Exemplo A1: Anticorpo anti-B4 que se liga ao antígeno CD19 preferencialmente expresso na superfície de células de linfoma humano é selecionado para conjugação de derivados de tomamicina.

20 O anticorpo foi primeiro modificado com éster de N-hidroxisucinimida de ácido 4-(2-piridilditio)butanóico (SPDB) para introduzir grupos piridilditio. Um excesso molar de 4,5 vezes de SPDB (0,25 μmol , 81,1 μg .) em dimetilacetamida (DMA) (50 μL) foi adicionado a uma solução de huB4 (8 mg, 0,055 μmol) em tampão aquoso contendo 50 mM de fosfato de potássio, 50
25 mM de cloreto de sódio e 2 mM de ácido etilenodiaminatetra-acético (EDTA), pH 6,5 (0,95 mL). A concentração de proteína final foi 8 mg/mL com 5% de DMA em tampão. A modificação foi deixada girar em temperatura ambiente durante 90 minutos, e foi em seguida purificada em uma coluna de filtração de gel Sephadex G25 equilibrada em um tampão aquoso contendo 50 mM de
30 fosfato de potássio, 50 mM de cloreto de sódio e 2 mM de EDTA, pH 7,5. Uma alíquota pequena do anticorpo modificado foi tratada com ditioneitol (DTT) para clivar os grupos piridildissulfeto. O anticorpo modificado e tiol de piridina

liberado foram ensaiados espectrofotometricamente ($\epsilon_{343} = 8,080 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o tiol de piridina liberado, $\epsilon_{280} = 5100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para os grupos piridilditio modificados e $\epsilon_{280} = 222,960 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para anticorpo). Uma média de 3,36 moléculas de piridildissulfeto por molécula de anticorpo foi ligada.

- 5 O anticorpo modificado (2,29 mg, 0,016 μmol) foi diluído no tampão acima em pH 7,5 (732,8 μL) e DMA (91,6 μL , 10% de v/v) e em seguida tratado com uma solução de 8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimetilbutanoil)amino-1,3-benzenodiilbis(metilenoóxi)]-bis[7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (Composto de exemplo 16)
- 10 (0,157 μmol , 0,12 mg) em DMA (91,6 μL , 10% de v/v). A concentração de proteína final foi 2,5 mg/mL com 20% de DMA em tampão. A conjugação foi deixada girar em temperatura ambiente durante a noite e em seguida clarificada por sedimentação (13.200 RPM durante 4 minutos). O sobrenadante foi em seguida purificado em uma coluna de filtração de gel Sephadex G25 e
- 15 equilibrada em um tampão de salina tamponada por fosfato (PBS) em pH 6,5. O conjugado purificado foi dialisado em tampão de PBS pH 6,5 (~1:650 de diluição) com quatro permutas de tampão. O conjugado foi clarificado através de um filtro de seringa de 0,22 μm e ensaiado espectrofotometricamente
- 20 ($\epsilon_{280} = 7743 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{318} = 9137 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o PBD, e $\epsilon_{280} = 222,960 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para anticorpo). Uma média de 1,76 moléculas de PBD (Composto de exemplo 16) por molécula de anticorpo foi ligada.

huB4-SMCC - Composto de exemplo 16

- Exemplo A2: Anticorpo anti-B4 que se liga ao antígeno CD19 preferencialmente expresso na superfície de células de linfoma humano é selecionado
- 25 para conjugação de derivados de tomamicina.

- Na primeira etapa, o anticorpo é reagido com o agente de modificação 4-[N-maleimidometil]cicloexano-1-carboxilato de succinimidila (SMCC) para introduzir grupos maleimida. Uma solução de anticorpo huB4 em uma
- 30 concentração de 6 mg/mL em um tampão aquoso contendo 0,05 M de fosfato de potássio, 0,05 M de cloreto de sódio e 2 mM de ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA), pH 6,7 (1 mL) é tratada com um excesso molar de 6,5 vezes de uma solução de SMCC em dimetilacetamida (DMA). A mistura reacional é

agitada em temperatura ambiente durante 90 minutos e em seguida carregada em uma coluna de filtração de gel Sephadex G25 (NAP10) que foi previamente equilibrada em um tampão aquoso contendo 0,10 M de ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-2-etanossulfônico (HEPES), pH 8,0. As frações contendo anticorpo modificado são coletadas e reunidas para produzir o produto. Uma alíquota pequena do anticorpo modificado é tratada com β -mercapto etanol durante 10 minutos seguido por adição de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) para ensaiar o tiol restante ($\epsilon_{412\text{nm}} = 14,150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para ácido 5-tio-2-nitro benzóico (TNB), e $\epsilon_{280\text{nm}} = 222,960 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o anticorpo). A quantidade de tiol consumida na reação com maleimida sobre o anticorpo (comparada a um controle sem anticorpo) é igual aos mols de maleimida ligados ao anticorpo (ensaio de Ellman subtrativo). Aproximadamente 3,2 grupos maleimida reativos por anticorpo foram ligados.

O anticorpo modificado (3 mg, 0,021 μmol) é diluído a 3,0 mg/mL em tampão de HEPES em pH 8,0 e em seguida tratado com uma solução de composto de exemplo 16 em DMA (5 mM), de modo que a concentração final de DMA no tampão seja 15%. Três equivalentes molares de 8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimetilbutanoil)amino-1,3-benzenodilbis(metilenoóxi)]-bis[7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (Composto de exemplo 16) foram adicionados por ligante (9,6 equivalentes por anticorpo, 0,202 μmol , 149 μg). A mistura de conjugação é agitada em temperatura ambiente durante 20 horas. A mistura reacional é purificada por passagem através de uma coluna G25 (NAP 5) que foi previamente equilibrada em 0,05 M de fosfato de potássio (KPi), 0,05 M de NaCl, 0,002 M de tampão de EDTA em pH 6,7. Frações contendo conjugado huB4-composto de exemplo 16 são reunidas e dialisadas no tampão de KPi durante 3 permutas (24 horas). O conjugado final (2,2 mg, 2,3 mg/ml) é ensaiado espectrofotometricamente utilizando-se os coeficientes de extinção que são determinados para o composto de exemplo 16 ($\epsilon_{318\text{nm}} = 9,137 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{280\text{nm}} = 7,743 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e anticorpo B4 ($\epsilon_{280\text{nm}} = 222,960 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Uma média de 2,8 moléculas de PBD (Composto de exemplo 16) por molécula de anticorpo foi ligada.

huB4-SPDB – Composto de exemplo 17

Exemplo A3: Anticorpo anti-B4 que se liga ao antígeno CD19 preferencialmente expresso na superfície de células de linfoma humano é selecionado para conjugação de derivados de tomamicina.

- 5 O anticorpo foi primeiro modificado com éster de N-hidroxi-sucinimida de ácido 4-(2-piridilditio)butanóico (SPDB) para introduzir grupos piridilditio. Um excesso molar de 4,5 vezes de SPDB (0,124 μmol , 40,6 μg) em DMA (25 μL) foi adicionado a solução de huB4 (4 mg, 0,028 μmol) em tampão aquoso contendo 50 mM de fosfato de potássio, 50 mM de cloreto de sódio e 2
- 10 mM de EDTA, pH 6,5 (0,475 mL). A concentração de proteína final foi 8 mg/mL com 5% de DMA em tampão. A modificação foi deixada girar em temperatura ambiente durante 90 minutos, e em seguida purificada em uma coluna de filtração de gel Sephadex G25 equilibrada em um tampão aquoso contendo 50 mM de fosfato de potássio, 50 mM de cloreto de sódio e 2 mM de EDTA, pH 7,5.
- 15 Uma alíquota pequena do anticorpo modificado foi tratada com DTT para clivar os grupos piridildissulfeto. O anticorpo modificado e tiol de piridina liberado foram ensaiados espectrofotometricamente ($\epsilon_{343} = 8,080 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o tiol de piridina liberado, $\epsilon_{280} = 5100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para os grupos piridilditio modificados e $\epsilon_{280} = 222,960 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para anticorpo). Uma média de 3,31 moléculas de piridil-
- 20 dissulfeto por molécula de anticorpo foi ligada.

- O anticorpo modificado (3,06 mg, 0,021 μmol) foi diluído no tampão acima em pH 7,5 (0,976 mL) e DMA (122 μL , 10% de v/v) e em seguida tratado com uma solução de 8,8'-[5-(N-metil-N-(2-mercapto-2,2-dimetiletil)amino-1,3-benzenodiiil(metilenoóxi))-bis[7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-
- 25 pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (Composto de exemplo 17) (0,209 μmol , 0,154 mg) em DMA (122 μL , 10% de v/v). A concentração de proteína final foi 2,5 mg/mL com 20% de DMA em tampão. A conjugação foi deixada girar em temperatura ambiente durante a noite e em seguida clarificada por sedimentação (13.200 RPM durante 4 minutos). O sobrenadante foi em seguida purificado
- 30 em uma coluna de filtração de gel Sephadex G25 equilibrada em um tampão de PBS em pH 6,5. O conjugado purificado foi dialisado em tampão de PBS pH 6,5 (~1:1200 de diluição) com três permutas de tampão. O conjugado foi clarificado

através de um filtro de seringa de 0,22 μm e ensaiado espectrofotometricamente ($\epsilon_{280} = 10736 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{318} = 12053 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o PBD, e $\epsilon_{280} = 222,960 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para anticorpo). Uma média de 3,05 moléculas de PBD (composto de exemplo 17) por molécula de anticorpo foi ligada.

5 huB4-SMCC - Composto de exemplo 17

Exemplo A4: Anticorpo anti-B4 que se liga ao antígeno CD19 preferencialmente expresso na superfície de células de linfoma humano é selecionado para conjugação de derivados de tomamicina.

Na primeira etapa, o anticorpo é reagido com o agente de modifi-
10 cação 4-[N-maleimidometil]cicloexano-1-carboxilato de succinimidila (SMCC) para introduzir grupos maleimida. Uma solução de anticorpo huB4 em uma concentração de 6 mg/mL em um tampão aquoso contendo 0,05 M de fosfato de potássio, 0,05 M de cloreto de sódio e 2 mM de ácido etileno-
15 diaminatetra-acético (EDTA), pH 6,7 (1 mL) é tratada com um excesso molar de 7 vezes de uma solução de SMCC em dimetilacetamida (DMA). A mistura reacional é agitada em temperatura ambiente durante 90 minutos e em seguida carregada em uma coluna de filtração de gel Sephadex G25 (NAP10) que foi previamente equilibrada em um tampão aquoso contendo 0,10 M de
20 ácido N-(2-hidroxi-etil)-piperazina-N'-2-etanossulfônico (HEPES), pH 8,0. As frações contendo anticorpo modificado são coletadas e reunidas para produzir o produto. Uma alíquota pequena do anticorpo modificado é tratada com β -mercapto etanol durante 10 minutos seguido por adição de ácido 5,5'-
25 ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) para ensaiar o tiol restante ($\epsilon_{412\text{nm}} = 14,150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB), e $\epsilon_{280\text{nm}} = 222,960 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o anticorpo). A quantidade de tiol consumida na reação com maleimida sobre o anticorpo (comparada a um controle sem anticorpo) é igual aos mols de maleimida ligados ao anticorpo (ensaio de Ellman subtrativo). Aproximadamente 3,7 grupos maleimida reativos por anticorpo foram ligados.

O anticorpo modificado (4,4 mg, 0,03 μmol) é diluído para 8,7
30 mg/mL em tampão de HEPES em pH 8,0 e em seguida tratado com uma solução de composto de exemplo 17 em DMA (5,4 mM), de modo que a concentração final de DMA no tampão seja 20%. Dois equivalentes molares

de 8,8'-[5-(N-metil-N-(2-mercapto-2,2-dimetiletil)amino-1,3-benzenodiol(metilenoóxi))-bis[7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]-benzodiazepin-5-ona] (Composto de exemplo 17) foram adicionados por ligante (7,4 equivalentes por anticorpo, 0,222 μ mol, 164 μ g). A mistura de conjugação é agitada em temperatura ambiente durante 20 horas. A mistura reacional é purificada por passagem através de uma coluna G25 (NAP 5) que foi previamente equilibrada em 0,05 M de fosfato de potássio (KPi), 0,05 M de NaCl, 0,002 M de tampão de EDTA em pH 6,7. Frações contendo conjugado huB4-composto de exemplo 17 são reunidas e dialisadas no tampão de KPi durante 3 permutas (24 horas). O conjugado final (2,25 mg, 2,25 mg/ml) é ensaiado espectrofotometricamente utilizando-se os coeficientes de extinção que são determinados para o composto de exemplo 17 ($\epsilon_{318\text{nm}} = 12,053 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{280\text{nm}} = 10,736 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e anticorpo B4 ($\epsilon_{280\text{nm}} = 222,960 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Uma média de 2,8 moléculas de PBD (Composto de exemplo 17) por molécula de anticorpo foi ligada.

huMy9-6-SPDB - Composto de exemplo 16

Exemplo A5: O anticorpo foi primeiro modificado com éster de N-hidroxisuccinimida de ácido 4-(2-piridilditio)butanóico (SPDB) para introduzir grupos piridilditio. Um excesso molar de 4,5 vezes de SPDB (0,246 μ mol, 80,1 μ g) em DMA (50 μ L) foi adicionado à solução de huMy9-6 (8 mg, 0,055 μ mol) em tampão aquoso contendo 50 mM de fosfato de potássio, 50 mM de cloreto de sódio e 2 mM de EDTA, pH 6,5 (0,950 mL). A concentração de proteína final foi 8 mg/mL com 5% de DMA em tampão. A modificação foi deixada girar em temperatura ambiente durante 90 minutos, e em seguida purificada em uma coluna de filtração de gel Sephadex G25 equilibrada em um tampão aquoso contendo 50 mM de fosfato de potássio, 50 mM de cloreto de sódio e 2 mM de EDTA, pH 8,5. Uma alíquota pequena do anticorpo modificado foi tratada com DTT para clivar os grupos piridildissulfeto. O anticorpo modificado e tiol de piridina liberado foram ensaiados espectrofotometricamente ($\epsilon_{343} = 8,080 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o tiol de piridina liberado, $\epsilon_{280} = 5100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para os grupos piridilditio modificados e $\epsilon_{280} = 206,460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para anticorpo). Uma média de 3,32 moléculas de piridildissulfeto por molécula de anticorpo foi ligada.

O anticorpo modificado (3,05 mg, 0,0208 μmol) foi diluído no tampão acima em pH 8,5 (976 μL) e DMA (122 μL , 10% de v/v) e em seguida tratado com uma solução de 8,8'-[5-(N-4-mercaptop-4,4-dimetilbutanoil)-amino-1,3-benzenodilbis(metilenoóxi)]-bis[7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona] (Composto de exemplo 16) (0,207 μmol , 0,158 mg) em DMA (122 μL , 10% de v/v). A concentração de proteína final foi 2,5 mg/mL com 20% de DMA em tampão. A conjugação foi deixada girar em temperatura ambiente durante a noite e em seguida clarificada por sedimentação (13.200 RPM durante 4 minutos). O sobrenadante foi em seguida purificado em uma coluna de filtração de gel Sephadex G25 equilibrada em um tampão de PBS em pH 6,5. O conjugado purificado foi dialisado em tampão de PBS pH 6,5 (~1:600 de diluição) com três permutas de tampão. O conjugado foi clarificado através de um filtro de seringa de 0,22 μm e ensaiado espectrofotometricamente ($\epsilon_{280} = 7743 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{318} = 9137 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o PBD, e $\epsilon_{280} = 206,460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para anticorpo). Uma média de 2,58 moléculas de PBD (Composto de exemplo 16) por molécula de anticorpo foi ligada.

Exemplo B: Ensaio de Ligação

As afinidades de ligação relativas do anticorpo anti-B4 e seu conjugado de tomamicina em células Ramos expressando antígeno são determinadas utilizando-se um ensaio com base em fluorescência. O conjugado de anticorpo-tomamicina e anticorpo nu em concentrações de partida de 1 a 10^{-7} M são adicionados à placas de base redonda de 96 cavidades e titulados utilizando-se diluições seriais de 3 vezes de modo que existam duplicatas para cada concentração. As células Ramos são adicionadas a 50.000 células por cavidade para cada cavidade contendo várias concentrações do anticorpo ou conjugado, bem como para controlar as cavidades. As placas são incubadas sobre gelo durante 3 horas. Após o período de incubação, as células na placa são lavadas, e o anticorpo secundário rotulado por fluorescência que liga-se a um IgG humanizado, como anti-B4, é adicionado, e as placas são incubadas durante 1 hora sobre gelo. As placas são lavadas novamente após o período de incubação, e as células são fixadas com solução

a 1% de formaldeído/PBS. A fluorescência em cada cavidade das placas é lida utilizando-se um analisador de fluorescência Becton Dickinson FACSCalibur. Os dados são plotados como um percentual da fluorescência máxima obtida na concentração mais elevada de anticorpo ou conjugado.

- 5 Exemplo C: Potência e especificidade *in vitro* de derivado de tomamicina ou derivado de tomamicina conjugado. Protocolo geral a ser utilizado:

Amostras de derivado de tomamicina livre ou derivado de tomamicina conjugado são adicionadas a uma placa de cultura de tecido de base plana de 96 cavidades e tituladas utilizando-se diluições seriais que variam de 1×10^{-12} M a 3×10^{-7} M. Células de tumor positivas de antígeno ou células de tumor negativas de antígeno são adicionadas às cavidades de uma tal maneira que existam amostras triplicadas para cada concentração de fármaco para cada linhagem celular. As placas são incubadas a 37°C em uma atmosfera de 5% CO₂ durante 4 dias.

15 Ao final do período de incubação, 20 µl do reagente de tetrazólio WST-8 (2-(2-metóxi-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-dissulfofenil)-2-tetrazólio, sal de monossódio) são adicionados a cada cavidade, e as placas são retornadas ao incubador durante 2 horas. A absorvência em cada cavidade das placas é em seguida medida utilizando-se a leitora de placa Molecular Devices a 450 nm. A fração de sobrevivência de células em cada concentração de derivado de tomamicina ou conjugado é plotada.

Compostos	A549 (IC ₅₀)	KB (IC ₅₀)	MCF7 (IC ₅₀)
Exemplo 5	7×10^{-11} M	1×10^{-10} M	1×10^{-10} M
Exemplo 1	$< 10^{-12}$ M	$< 10^{-12}$ M	$< 10^{-12}$ M
Exemplo 2	$< 10^{-12}$ M	$< 10^{-12}$ M	$< 10^{-12}$ M

A citotoxicidade específica dos compostos vs. os conjugados da invenção contra as linhagens celulares MOLT-4 e BJAB ou HL60/GC e Ramos foi testada. Os resultados são ilustrados nas figuras 1a-c, 2a-c e 3a-b.

Figura 1a representa a potência *in vitro* de composto de huB4-SPDB de exemplo 16 para células BJAB positivas de antígeno e células MOLT-4 negativas de antígeno.

Figura 1b representa a potência *in vitro* composto de huB4-SMCC de exemplo 16 para células BJAB positivas de antígeno e células

MOLT-4 negativas de antígeno.

Figura 1c representa a potência *in vitro* de composto livre de exemplo 16 para células BJAB e MOLT-4 .

5 Figura 2a representa a potência *in vitro* de composto de huB4-SPDB de exemplo 17 para células BJAB positivas de antígeno e células MOLT-4 negativas de antígeno.

Figura 2b representa a potência *in vitro* de composto de huB4-SMCC de exemplo 17 para células BJAB positivas de antígeno e células MOLT-4 negativas de antígeno.

10 Figura 2c representa a potência *in vitro* de composto livre de exemplo 17 para células BJAB e MOLT-4 .

Figura 3a representa a potência *in vitro* de composto de huMy9-6-SPDB de exemplo 16 para células HL60/GC positivas de antígeno e células Ramos negativas de antígeno.

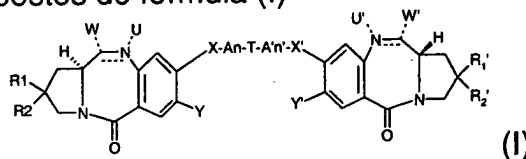
15 Figura 3b representa a potência *in vitro* de composto livre de exemplo 16 para células HL60/GC e Ramos.

Exemplo D: Eficácia *in vivo* de derivado de tomaimicina ou derivado de tomaimicina conjugados.

20 Os testes podem ser realizados por aplicação e/ou adaptação do protocolo descrito no WO 2004/103272, com huB4 como o anticorpo e linhagens celulares positivas de antígeno apropriadas, tal como linhagens de célula de Linfoma de Rajii Burkitt e Ramos.

REIVINDICAÇÕES

1. Compostos de fórmula (I)



em que

5 ---- representa uma ligação simples opcional;

===== representa uma ligação simples ou uma ligação dupla;

contanto que quando ----- representar uma ligação simples, U e

U', iguais ou diferentes, independentemente representem H e W e W', iguais ou diferentes, são independentemente selecionados do grupo consistindo em OH, um éter tal como -OR, um éster (por exemplo um acetato), tal como -OCOR, um carbonato tal como -OCOOR, um carbamato tal como -OCONRR', um carbamato cíclico, de modo que N10 e C11 sejam uma parte do ciclo, uma uréia tal como -NRCONRR', um tiocarbamato tal como -OCSNHR, um tiocarbamato cíclico de modo que N10 e C11 sejam uma parte do ciclo, -SH, um sulfeto tal como -SR, um sulfóxido tal como -SOR, uma sulfona tal como -SOOR, um sulfonato tal como -SO₃⁻, uma sulfonamida tal como -NRSOOR, uma amina tal como -NRR', amina opcionalmente cíclica de modo que N10 e C11 sejam uma parte do ciclo, um derivado de hidroxilamina tal como -NROR', uma amida tal como -NRCOR, um azido tal como -N₃, um ciano, um halo, uma trialquila ou triarilfosfônio, um grupo derivado de aminoácido;

e quando ===== representar uma ligação dupla, U e U' estejam ausentes e W e W' representem H;

R1, R2, R1', R2' são iguais ou diferentes e independentemente escolhidos de Haleto ou Alquila opcionalmente substituída por um ou mais Hal, CN, NRR', CF₃, OR, Arila, Het, S(O)_qR, ou R1 e R2 e R1' e R2' formam juntos uma ligação dupla contendo grupo =B e =B' respectivamente.

B e B' são iguais ou diferentes e independentemente escolhidos de Alquenila sendo opcionalmente substituída por um ou mais Hal, CN, R, CF₃, OR, Arila, Het, S(O)_qR ou B e B' representam um átomo de oxigênio.

X, X' são iguais ou diferentes e independentemente escolhidos de um ou mais -O-, -NR-, -(C=O)-, -S(O)_q-.

A, A' são iguais ou diferentes e independentemente escolhidos de Alquila ou Alquenila opcionalmente contendo um átomo de oxigênio, nitrogênio ou enxofre e cada qual sendo opcionalmente substituída por um ou mais Hal, CN, NRR', CF₃, OR, S(O)_qR, Arila, Het, Alquila, Alquenila.

Y, Y' são iguais ou diferentes e independentemente escolhidos de H, OR;

T é -NR-, -O-, -S(O)_q-, ou uma heteroarila, heterocíclica, cicloalquila, ou arila de 4 a 10 membros, cada qual sendo opcionalmente substituída por um ou mais Hal, CN, NRR', CF₃, OR, S(O)_qR, e/ou ligante(s), ou uma Alquila ramificada, opcionalmente substituída por um ou mais Hal, CN, NRR', CF₃, OR, S(O)_qR e/ou ligante(s), ou uma Alquila linear substituída por um ou mais Hal, CN, NRR', CF₃, OR, S(O)_qR e/ou ligante(s);

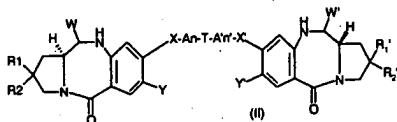
n, n', iguais ou diferentes são 0 ou 1;

q é 0, 1 ou 2;

R, R' são iguais ou diferentes e independentemente escolhidos de H, Alquila, Arila, cada qual sendo opcionalmente substituída por Hal, CN, NRR', CF₃, R, OR, S(O)_qR, Arila, Het;

ou seus sais, hidratos, ou sais hidratados farmacologicamente aceitáveis, ou as estruturas cristalinas polimórficas destes compostos ou seus isômeros óticos, racematos, diastereômeros ou enantiômeros.

2. Derivados como definido na reivindicação 1 tendo a seguinte fórmula (II)



25

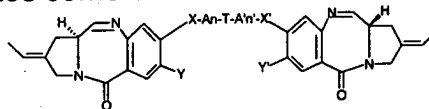
Y, Y', X, X', n, n', R1, R2, R1', R2', R, R', T são como na reivindicação 1 e W e W' iguais ou diferentes são independentemente selecionados do grupo consistindo em OH, um éter tal como -OR, um éster (por exemplo um acetato), tal como -OCOR, -COOR, um carbonato tal como -OCOOR, um carbamato tal como -OCONRR', um carbamato cíclico, de modo que N10 e C11 sejam uma parte do ciclo, uma uréia tal como -NRCONRR', um tiocar-

30

bamato tal como -OCSNHR, um tiocarbamato cíclico de modo que N10 e C11 sejam uma parte do ciclo, -SH, um sulfeto tal como -SR, um sulfóxido tal como -SOR, uma sulfona tal como -SOOR, um sulfonato tal como $-\text{SO}_3^-$, uma sulfonamida tal como -NRSOOR, uma amina tal como -NRR', amina
 5 opcionalmente cíclica de modo que N10 e C11 sejam uma parte do ciclo, um derivado de hidroxilamina tal como -NROR', uma amida tal como -NRCOR, -NRCONRR', um azido tal como $-\text{N}_3$, um ciano, um halo, uma trialkila ou triarilfosfônio, um grupo derivado de aminoácido.

3. Compostos como definidos na reivindicação 1 ou 2 de fórmula:

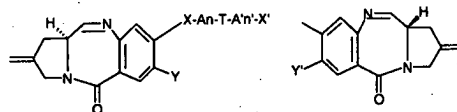
10



em que X, X', A, A', Y, Y', T, n, n' são definidos como na reivindicação 1.

4. Compostos como definidos na reivindicação 1 ou 2 de fórmula:

la:



15 em que X, X', A, A', Y, Y', T, n, n' são definidos como na reivindicação 1.

5. Compostos como definidos em qualquer uma das reivindicações precedentes, em que $X=X'$.

6. Compostos como definidos em qualquer uma das reivindicações precedentes, em que $X=X'=O$.

20

7. Compostos como definidos em qualquer uma das reivindicações precedentes, em que $A=A'$.

8. Compostos como definidos em qualquer uma das reivindicações precedentes, em que $A=A'$ =alkila não-substituída linear.

25

9. Compostos como definidos em qualquer uma das reivindicações precedentes, em que $Y=Y'$.

10. Compostos como definidos em qualquer uma das reivindicações precedentes, em que $Y=Y'$ =OAlquila.

30

11. Compostos como definidos em qualquer uma das reivindicações precedentes, em que T é uma heteroarila, heterocíclica, cicloalkila, ou arila de 4 a 10 membros, cada qual sendo opcionalmente substituída por um

ou mais Hal, CN, NRR', CF₃, R, OR, S(O)_qR, Alquila, e/ou ligante(s).

12. Compostos como definidos em qualquer uma das reivindicações precedentes, em que T é uma fenila ou piridila, cada qual sendo opcionalmente substituída por um ou mais Hal, CN, NRR', CF₃, R, OR, S(O)_qR e/ou ligante(s).

13. Compostos como definidos em qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o referido ligante é escolhido de grupos contendo dissulfeto, grupos tioéter, grupos lábeis ao ácido, grupos fotolábeis, grupos lábeis à peptidase e grupos lábeis à ésterase.

14. Compostos como definidos em qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o referido ligante compreende substituintes contendo tiol, sulfeto ou dissulfeto.

15. Compostos de acordo com a reivindicação 14, em que o referido ligante é de fórmula:

15 -G-D-(Z)p-S-Z'

em que

G é uma ligação simples ou dupla, -O-, -S- ou -NR-;

D é uma ligação simples ou -E-, -E-NR-, -E-NR-F-, -E-O-, -E-O-F-, -E-NR-CO-, -E-NR-CO-F-, -E-CO-, -CO-E-, -E-CO-F-, -E-S-, -E-S-F-, -E-NR-C-S-, -E-NR-CS-F-;

em que E e F são iguais ou diferentes e são independentemente escolhidos de linear ou ramificada -(OCH₂CH₂)_iAlquil(OCH₂CH₂)_j-, Alquil(OCH₂CH₂)_i-Alquil-,

-(OCH₂CH₂)_i-, -(OCH₂CH₂)_iCicloalquil(OCH₂CH₂)_j-,
 25 -(OCH₂CH₂)_iHeterocíclica(OCH₂CH₂)_j-, -(OCH₂CH₂)_iAril(OCH₂CH₂)_j-,
 -(OCH₂CH₂)_iHeteroaril(OCH₂CH₂)_j-, -Alquil-(OCH₂CH₂)_iAlquil(OCH₂CH₂)_j-,
 -Alquil-(OCH₂CH₂)_i-, -Alquil-(OCH₂CH₂)_iCicloalquil(OCH₂CH₂)_j-,
 -Alquil(OCH₂CH₂)_iHeterocíclica(OCH₂CH₂)_j-, -Alquil-
 (OCH₂CH₂)_iAril(OCH₂CH₂)_j-, -Alquil(OCH₂CH₂)_iHeteroaril(OCH₂CH₂)_j-,
 30 Cicloalquil-Alquil-, -Alquil-Cicloalquil-, -Heterocíclica-Alquil-, -Alquil-Heterocíclica-, -Alquil-Aril-, -Aril-Alquil-, -Alquil-Heteroaril-, -Heteroaril-Alquil-;

em que i e j, idênticos ou diferentes são números inteiros e inde-

pendentemente escolhidos de 0,1 a 2000;

Z é -Alquil- linear ou ramificado;

p é 0 ou 1;

Z' representa H, um grupo de proteção de tiol tal como COR, R₂₀ ou SR₂₀, em que R₂₀ representa H, metila, Alquila, Cicloalquila opcionalmente substituída, arila, heteroarila ou heterocíclica, contanto que quando Z' for H, o referido composto esteja em equilíbrio com o composto correspondente formado por ciclização intramolecular resultando de adição do grupo tiol -SH na ligação de imina -NH= de uma das porções PBD.

10 16. Compostos de acordo com a reivindicação 15, em que G é uma ligação simples ou -O- ou -NR-.

17. Compostos de acordo com a reivindicação 15 ou 16, em que G é -O-.

15 18. Compostos de acordo com a reivindicação 15, 16 ou 17, em que D é uma ligação simples ou -E-, -E-NR-, -E-CO-, -CO-E-, -E-NR-CO-.

19. Compostos de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 18, em que D é -E-NR-CO-.

20 20. Compostos de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 19, em que E é um -Alquil-, -(OCH₂CH₂)_i- ou -Alquil-Heterocíclico linear ou ramificado.

21. Compostos de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 20, em que Z é -(CH₂)₂-C(CH₃)₂-.

22. Compostos de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 21, em que p é 1.

25 23. Compostos de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 22, em que Z' é H ou SR₂₀, em que R₂₀ representa Alquila, arila, heterocíclica ou heteroarila.

24. Compostos de acordo com a reivindicação 14 ou 15, em que o referido ligante é escolhido de:

30 -(CR₁₃R₁₄)_i(CR₁₅R₁₆)_u(OCH₂CH₂)_ySZ',

-(CR₁₃R₁₄)_i(CR₁₇=CR₁₈)(CR₁₅R₁₆)_y(OCH₂CH₂)_ySZ',

-(CR₁₃R₁₄)_i(NR₁₉CO)(CR₁₅R₁₆)_u(OCH₂CH₂)_y SZ',

- $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{OCO})(\text{R}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
 $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CO})(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
 $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CONR}_{19})(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
 $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-fenil-CO}(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$, $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-furul-CO}(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$,
5 $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-oxazolil-CO}(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$, $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-tiazolil-CO}(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$,
 $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-tienil-CO}(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$, $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-imidazolil-CO}(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$,
 $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-morfolino-CO}(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$,
 $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-piperazino-CO}(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$, $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-N-metil-piperazi-}$
 $\text{no-CO}(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$, $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-fenil-QSZ}'$, $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-furul-QSZ}'$,
10 $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-oxazolil-QSZ}'$, $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-tiazolil-QSZ}'$, $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-tienil-QSZ}'$,
 $(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-imidazolil-QSZ}'$, $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-morfolino-QSZ}'$, $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-}$
 $\text{piperazino-QSZ}'$, $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-N-metilpiperazino-QSZ}'$, ou
 $-\text{O}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
 $-\text{O}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{NR}_{19}\text{CO})(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
15 $-\text{O}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{17}=\text{CR}_{18})(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_t(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
 $-\text{O-fenil-QSZ}'$, $-\text{O-furul-QSZ}'$, $-\text{O-oxazolil-QSZ}'$, $-\text{O-tiazolil-QSZ}'$, $-\text{O-tienil-}$
 QSZ' , $-\text{O-imidazolil-QSZ}'$, $-\text{O-morfolino-QSZ}'$, $-\text{O-piperazino-QSZ}'$, $-\text{O-N-me-}$
 $\text{tilpiperazino-QSZ}'$,
 $-\text{OCO}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{NR}_{19}\text{CO})_v(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
20 $-\text{OCO}-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{17}=\text{CR}_{18})(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
 $-\text{OCONR}_{12}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
 $-\text{OCO-fenil-QSZ}'$, $-\text{OCO-furul-QSZ}'$, $-\text{OCO-oxazolil-QSZ}'$, $-\text{OCO-tiazolil-QSZ}'$,
 $-\text{OCO-tienil-QSZ}'$, $-\text{OCO-imidazolil-QSZ}'$, $-\text{OCO-morfolino-QSZ}'$, $-\text{OCO-}$
 $\text{piperazino-QSZ}'$, $-\text{OCO-N-metilpiperazino-QSZ}'$, ou
25 $-\text{CO}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
 $-\text{CO}-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{17}=\text{CR}_{18})(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
 $-\text{CONR}_{12}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
 $-\text{CO-fenil-QSZ}'$, $-\text{CO-furul-QSZ}'$, $-\text{CO-oxazolil-QSZ}'$, $-\text{CO-tiazolil-QSZ}'$,
 $-\text{CO-tienil-QSZ}'$, $-\text{CO-imidazolil-QSZ}'$, $-\text{CO-morfolino-QSZ}'$, $-\text{CO-}$
30 $\text{piperazino-QSZ}'$, $-\text{CO-piperidino-QSZ}'$, $-\text{CO-N-metilpiperazino-QSZ}'$,
 $-\text{NR}_{19}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
 $-\text{NR}_{19}\text{CO}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,

- NR₁₉(CR₁₃R₁₄)_t(CR₁₇=CR₁₈)(CR₁₅R₁₆)_t(OCH₂CH₂)_ySZ',
 -NR₁₉CO(CR₁₃R₁₄)_t(CR₁₇=CR₁₈)(CR₁₅R₁₆)_t(OCH₂CH₂)_ySZ',
 -NR₁₉CONR₁₂(CR₁₃R₁₄)_t(CR₁₅R₁₆)_u(OCH₂CH₂)_ySZ',
 -NR₁₉CO NR₁₂ (CR₁₃R₁₄)_t (CR₁₇=CR₁₈)(CR₁₅R₁₆)_t (OCH₂CH₂)_ySZ',
 5 -NR₁₉CO-fenil-QSZ', -NR₁₉CO-furil-QSZ', -NR₁₉CO-oxazolil-QSZ',
 -NR₁₉CO-tiazolil-QSZ', -NR₁₉CO-tienil-QSZ', -NR₁₉CO-imidazolil-QSZ',
 -NR₁₉CO-morfolino-QSZ', -NR₁₉CO-piperazino-QSZ', -NR₁₉CO-piperi-
 dino-QSZ', -NR₁₉CO-N-metilpiperazino-QSZ', -NR₁₉-fenil-QSZ', -NR₁₉-furil-
 QSZ', -NR₁₉-oxazolil-QSZ', -NR₁₉-tiazolil-QSZ', -NR₁₉-tienil-QSZ', -NR₁₉-
 10 imidazolil-QSZ', -NR₁₉-morfolino-QSZ', -NR₁₉-piperazino-QSZ', -NR₁₉-pipe-
 ridino-QSZ', -NR₁₉-N-metilpiperazino-QSZ', -NR₁₉CO-NR₁₂-fenil-QSZ', -
 NR₁₉CO-NR₁₂-oxazolil-QSZ', -NR₁₉CO-NR₁₂-tiazolil-QSZ', -NR₁₉CO-NR₁₂-
 tienil-QSZ', -NR₁₉CO-NR₁₂-piperidino-QSZ',
 -S(O)_q(CR₁₃R₁₄)_t(CR₁₅R₁₆)_u(OCH₂CH₂)_ySZ',
 15 -S(O)_q(CR₁₃R₁₄)_t(CR₁₇=CR₁₈)(CR₁₅R₁₆)_t(OCH₂CH₂)_ySZ',
 -SCONR₁₂(CR₁₃R₁₄)_t(CR₁₅R₁₆)_u(OCH₂CH₂)_ySZ',
 -SCO-morfolino-QSZ', -SCO-piperazino-QSZ', -SCO-piperidino-QSZ', e
 -SCO-N-metilpiperazino-QSZ', em que:

Z' é H, um grupo protetor de tiol, R₂₀' ou SR₂₀' em que R₂₀' re-
 20 apresenta alquila, arila, heterocíclica ou heteroarila,

em que Q é uma ligação direta ou uma alquila linear ou alquila
 ramificada tendo de 1-10 átomos de carbono ou um espaçador de polietileno
 glicol com 2 a 20 unidades etileno óxi de repetição;

R₁₉ e R₁₂ são iguais ou diferentes e são alquila linear, alquila
 25 ramificada ou alquila cíclica tendo de 1 a 10 átomos de carbono, ou hetero-
 cíclica ou arila substituída ou simples, e R₁₂ pode além disso ser H,

R₁₃, R₁₄, R₁₅ e R₁₆ são iguais ou diferentes e são H ou uma al-
 quila linear ou ramificada tendo de 1 a 4 átomos de carbono,

R₁₇ e R₁₈ são H ou alquila,

30 u é um número inteiro de 1 a 10 e pode também ser 0,

T é um número inteiro de 1 a 10 e pode também ser 0,

y é um número inteiro de 1 a 20 e pode também ser 0.

25. Compostos como definidos em qualquer uma das reivindicações precedentes escolhidos de:

- 8,8'-[1,3-benzenodiilbis(metilenoóxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 5 8,8'-[5-metóxi-1,3-benzenodiilbis(metilenoóxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[1,5-pentanodiilbis(óxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 10 8,8'-[1,4-butanodiilbis(óxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[3-metil-1,5-pentanodiilbis(óxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[2,6-piridinadiilbis(óxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 15 8,8'-[4-(3-terc-butoxicarbonilaminopropilóxi)-2,6-piridinadiilbis(metilenoóxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[5-(3-aminopropilóxi)-1,3-benzenodiilbis(metilenoóxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 20 8,8'-[5-(N-metil-3-terc-butoxicarbonilaminopropil)-1,3-benzenodiilbis(metilenoóxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[5-[3-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)propilóxi]-1,3-benzenodiilbis(metilenoóxi)]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 25 8,8'-[5-acetiltiometil-1,3-benzenodiilbis(metilenoóxi)]-bis[(S)-2-metileno-7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 30 Éster terc-butílico de ácido bis-{2-[(S)-2-metileno-7-metóxi-5-oxo-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-ilóxi]-etil}-carbâmico
- 8,8'-[3-(2-acetiltioetil)-1,5-pentanodiilbis(óxi)]-bis[(S)-2-metileno-

- 7-metóxi-1,2,3,11a-tetraidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
 8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimetilbutanoil)amino-1,3-
 benzenodiilbis(metilenoóxi)]-bis[7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-
 pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 5 8,8'-[5-(N-4-metilditio-4,4-dimetilbutanoil)-amino-1,3-
 benzenodiilbis(metilenoóxi)]-bis[7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-
 pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[5-(N-metil-N-(2-mercapto-2,2-dimetiletíl)amino-1,3-
 benzenodiil(metilenoóxi)]-bis[7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-
 10 pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[5-(N-metil-N-(2-metilditio-2,2-dimetiletíl)amino-1,3-
 benzenodiil(metilenoóxi)]-bis[7-metóxi-2-metileno-1,2,3,11a-tetraidro-5H-
 pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 15 8,8'-[(4-(2-(4-mercapto-4-metil)-pentanamido-etóxi)-piridin-2,6-
 dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-
 c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(1-(2-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-etóxi)-
 benzeno-3,5-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-
 tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 20 8,8'-[(4-(3-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-propóxi)-
 piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-
 tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(4-(4-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido-butóxi)-piridin-
 2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-
 25 pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(4-(3-[4-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-
 propil)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-
 tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(1-(3-[4-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoil)-piperazin-1-il]-
 30 propil)-benzeno-3,5-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-
 1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]
- 8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)-etóxi]-

etóxi}-etóxi)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

5 8,8'-[(1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)-etóxi]-etóxi)-etóxi]-etóxi]-etóxi)-benzeno-3,5-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)-etóxi]-etóxi)-etóxi)-benzeno-3,5-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

10 8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoilamino)-etóxi]-etóxi)-etóxi]-etóxi]-etóxi)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

15 8,8'-[(1-(2-[metil-(2-metil-2-metildissulfanil-propil)-amino]-etóxi)-benzeno-3,5-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

8,8'-[(4-(3-[metil-(4-metil-4-metildissulfanil-pentanoil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

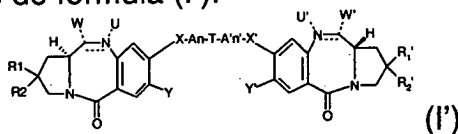
20 8,8'-[(4-(3-[metil-(2-metil-2-metildissulfanil-propil)-amino]-propil)-piridin-2,6-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

25 8,8'-[(1-(4-metil-4-metildissulfanil)-pentanamido)-benzeno-3,5-dimetil)-dióxi]-bis[(S)-2-et-(E)-ilideno-7-dimetóxi-1,2,3,11a-tetraidro-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-ona]

bem como os derivados de mercapto correspondentes, ou seus sais, hidratos, ou sais hidratados farmacêuticamente aceitáveis, ou as estruturas cristalinas polimórficas destes compostos ou seus isômeros óticos, racematos, diastereômeros ou enantiômeros.

30 26. Conjugado compreendendo um ou mais derivados de tomiamicina quimicamente ligados a um agente de ligação celular através de um ligante compreendendo um grupo de ligação.

27. Conjugado de acordo com a reivindicação 26, em que o derivado de tomamicina é de fórmula (I'):



em que

- 5 ---- representa uma ligação simples opcional;
 ---- representa uma ligação simples ou uma ligação dupla;
 contanto que quando ---- representar uma ligação simples, U e U', iguais ou diferentes, independentemente representem H, e W e W', iguais ou diferentes, são independentemente selecionados do grupo consistindo em OH,
 10 um éter tal como -OR, um éster (por exemplo um acetato), tal como -OCOR, um carbonato tal como -OCOOR, um carbamato tal como -OCONRR', um carbamato cíclico, de modo que N10 e C11 sejam uma parte do ciclo, uma uréia tal como -NRCONRR', um tiocarbamato tal como -OCSNHR, um tiocarbamato cíclico de modo que N10 e C11 sejam uma parte do ciclo, -SH,
 15 um sulfeto tal como -SR, um sulfóxido tal como -SOR, uma sulfona tal como -SOOR, um sulfonato tal como -SO₃, uma sulfonamida tal como -NRSOOR, uma amina tal como -NRR', amina opcionalmente cíclica de modo que N10 e C11 sejam uma parte do ciclo, um derivado de hidroxilamina tal como -NROR', uma amida tal como -NRCOR, um azido tal como -N₃, um ciano, um halo, uma trialkila ou triarilfosfônio, um grupo derivado de aminoácido;
 20 e quando ---- representar uma ligação dupla, U e U' estejam ausentes e W e W' representem H;

R1, R2, R1', R2' são iguais ou diferentes e independentemente escolhidos de Haleto ou Alquila opcionalmente substituída por um ou mais
 25 Hal, CN, NRR', CF₃, OR, Arila, Het, S(O)_qR, ou R1 e R2 e R1' e R2' formam juntos uma ligação dupla contendo grupo =B e =B' respectivamente.

B e B' são iguais ou diferentes e independentemente escolhidos de Alquenila sendo opcionalmente substituída por um ou mais Hal, CN, NRR', CF₃, OR, Arila, Het, S(O)_qR ou B e B' representam um átomo de oxigênio.

30 X, X' são iguais ou diferentes e independentemente escolhidos de um ou mais -O-, -NR-, -(C=O)-, -S(O)_q-.

A, A' são iguais ou diferentes e independentemente escolhidos de Alquila ou Alquenila opcionalmente contendo um átomo de oxigênio, nitrogênio ou enxofre e cada qual sendo opcionalmente substituída por um ou mais Hal, CN, NRR', CF₃, OR, S(O)_qR, Arila, Het, Alquila, Alquenila.

5 Y, Y' são iguais ou diferentes e independentemente escolhidos de H, OR;

T é -Alquil-, -NR-, -O-, -S(O)_q-, ou uma heteroarila, heterocíclica, cicloalquila, ou arila de 4 a 10 membros, cada qual sendo opcionalmente substituída por um ou mais Hal, CN, NRR', CF₃, R, OR, S(O)_qR,

10 e substituída por um ou mais dos referidos ligante(s),

n, n', iguais ou diferentes são 0 ou 1;

q é 0, 1 ou 2.

R, R' são iguais ou diferentes e independentemente escolhidos de H, Alquila, Arila, cada qual sendo opcionalmente substituída por Hal, CN, NRR', CF₃, R, OR, S(O)_qR, Arila, Het;

15 ou seus sais, hidratos, ou sais hidratados farmacêuticamente aceitáveis, ou as estruturas cristalinas polimórficas destes compostos ou seus isômeros óticos, racematos, diastereômeros ou enantiômeros,

20 o referido derivado sendo covalentemente ligado a um agente de ligação celular através do referido ligante compreendendo o referido grupo de ligação.

25 28. Conjugado de acordo com a reivindicação 26 ou 27, em que o referido agente de ligação celular é escolhido de anticorpos ou um fragmento de um anticorpo que contém pelo menos um sítio de ligação, linfocinas, hormônios, fatores de crescimento, moléculas de transporte de nutriente, ou qualquer outra substância ou molécula de ligação celular.

30 29. Conjugado de acordo com a reivindicação 26, 27 ou 28, em que o referido agente de ligação celular é escolhido de anticorpos monoclonais; anticorpos quiméricos; anticorpos humanizados; anticorpos totalmente humanos; anticorpos de cadeia simples; fragmentos de anticorpos tal como Fab, Fab', F(ab')₂ e F_v, interferons; peptídeos; linfocinas tal como IL - 2, IL - 3, IL - 4, IL-6; hormônios tal como insulina, TRH (hormônios de liberação de

tirotropina), MSH (hormônio de estimulação de melanócito), hormônios esteróides, tal como androgênios e estrogênios; fatores de crescimento e fatores de estimulação de colônia tal como EGF, TGF α , fator de crescimento tipo insulina (IGF-I, IGF-II) G-CSF, M-CSF e GM-CSF; vitaminas, tal como folato e transferrina.

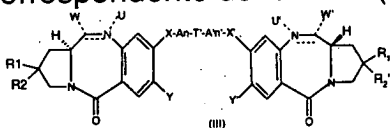
5

30. Conjugado de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 a 29, em que U, U', W, W', R1, R2, R1', R2', Y, Y', X, A, A', X', n, n', ----, ----, T e o referido ligante são definidos como em qualquer uma das reivindicações 2 a 25.

10

31. Conjugado de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 a 30 em que o referido grupo de ligação é um grupo tiol, sulfeto ou dissulfeto.

32. Processo de preparação de um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 25, compreendendo a etapa de desproteção de um composto correspondente de fórmula (III):

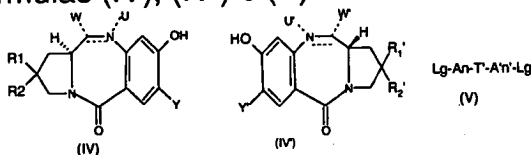


15

em que Y, Y', X, X', A, A', X', U, U', W, W', ----, ----, R1, R1', R2, R2', n, n' são definidos como na fórmula (I) e T' corresponde a T em que os grupo(s) funcionais foram protegidos, e opcionalmente isolamento do composto desejado de fórmula (I).

20

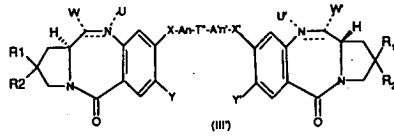
33. Processo de acordo com a reivindicação 32, em que os compostos de fórmula (III) são obtidos de acoplamento de compostos correspondentes de fórmulas (IV), (IV') e (V):



25

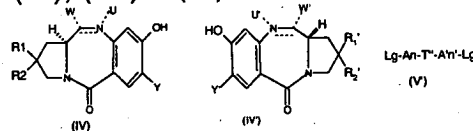
em que U, U', W, W', Y, Y', A, A', n, n', T', ----, ----, R1, R2, R1', R2' são definidos como na fórmula (III), e Lg é um grupo de saída.

34. Processo de preparação de um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 25, do composto correspondente de fórmula (III')



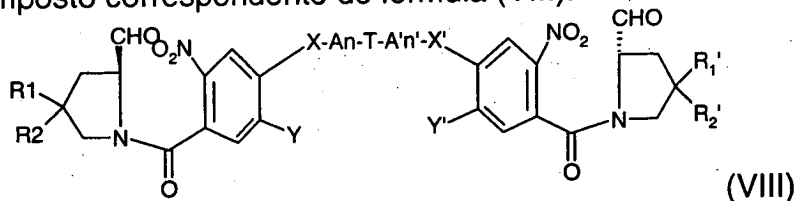
em que Y, Y', X, X', A, A', X', U, U', W, W', ----, -----, R1, R2, R1', R2', n, n' são definidos como na fórmula (I) e T'' é um grupo precursor opcionalmente protegido de T, e opcionalmente isolamento do composto desejado de fórmula (I).

35. Processo de acordo com a reivindicação 34, em que o composto de fórmula (III') pode ser obtido de acoplamento do composto correspondente de fórmulas (IV), (IV') e (V'):



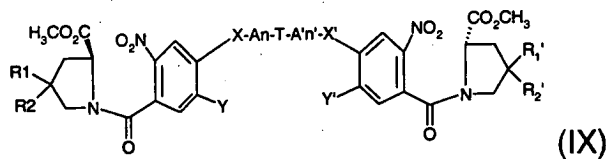
em que U, Q, W, W', Y, Y', A, A', n, n', ----, -----, R1, R2, R1', R2' são definidos como na fórmula (I), T'' é um grupo precursor opcionalmente protegido de T e Lg é um grupo de saída.

36. Processo de preparação de um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 25 compreendendo a etapa de ciclização do composto correspondente de fórmula (VIII):



em que Y, Y', X, A, A', X', n, n', T, R1, R2, R1', R2' são definidos como na fórmula (I).

37. Processo de acordo com a reivindicação 36, em que o composto de fórmula (VIII) pode ser obtido do composto correspondente de fórmula (IX):



em que Y, Y', A, A', n, n', R1, R2, R1', R2', T são definidos como na fórmula (I).

38. Processo de preparação de conjugado como definido em qualquer uma das reivindicações 27 a 31 compreendendo e etapa em que

um composto de fórmula (I) como definido na reivindicação 1 em que T compreende um grupo sulfeto, dissulfeto ou tiol, ou um precursor deste, é reagido com um agente de ligação celular compreendendo uma função reativa com respeito a dissulfeto ou tiol de modo que o composto e o agente de ligação celular sejam ligados juntos por meio de uma ligação de sulfeto ou dissulfeto.

39. Composição farmacêutica compreendendo uma molécula de conjugado como definido em qualquer uma das reivindicações 26 a 31, ou um composto de fórmula (I) como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 25 juntamente com um veículo farmacêuticamente aceitável.

40. Uso de uma quantidade eficaz de um molécula de conjugado como definido em qualquer uma das reivindicações 26 a 31 ou um composto de fórmula (I) como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 25 para a preparação de um medicamento para matar ou inibir crescimento de células compreendendo contatar células-alvo ou tecido contendo células-alvo.

41. Uso de uma quantidade eficaz de um molécula de conjugado como definido em qualquer uma das reivindicações 26 a 31 ou um composto de fórmula (I) como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 25 para a preparação de um medicamento para o tratamento de câncer.

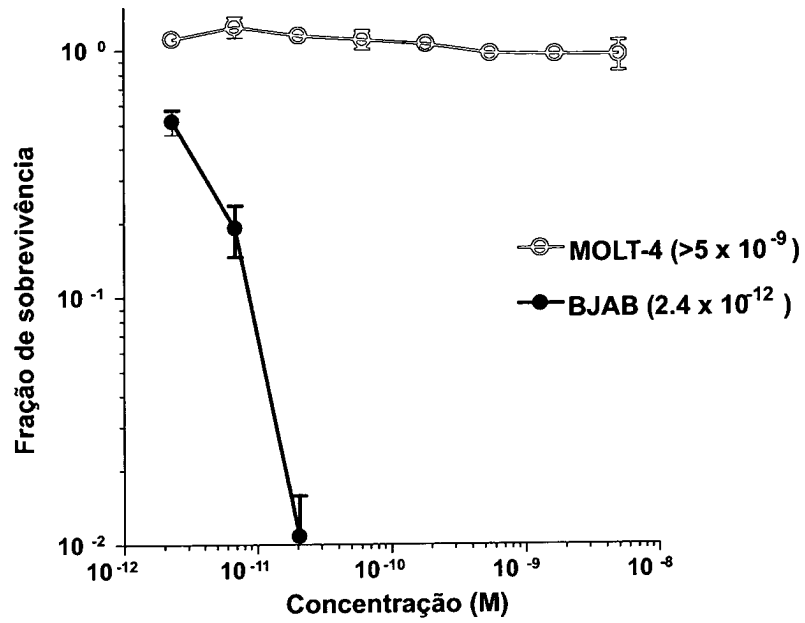


Fig. 1a

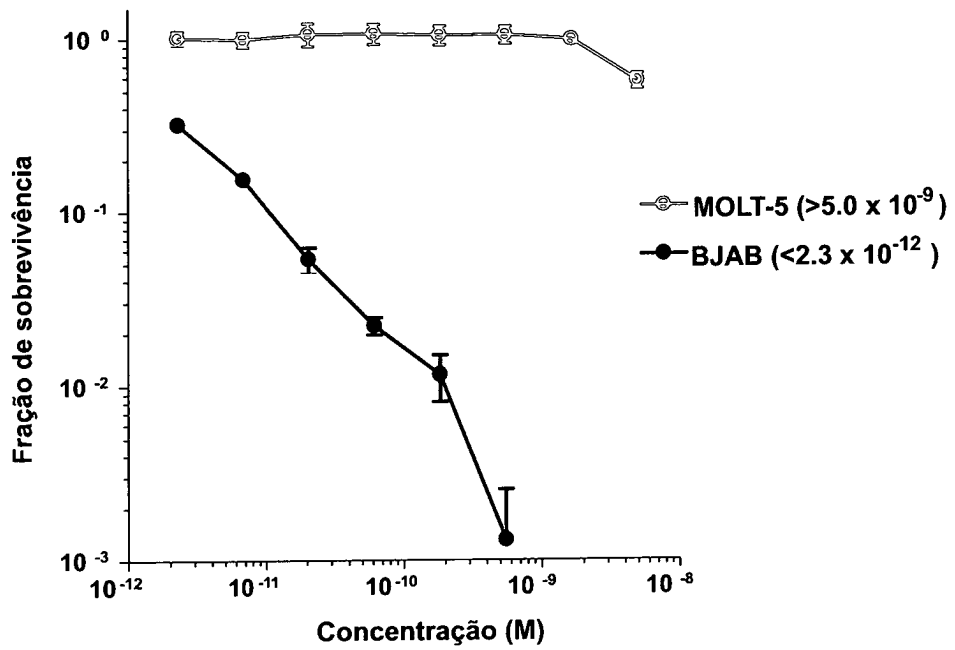


Fig. 1b

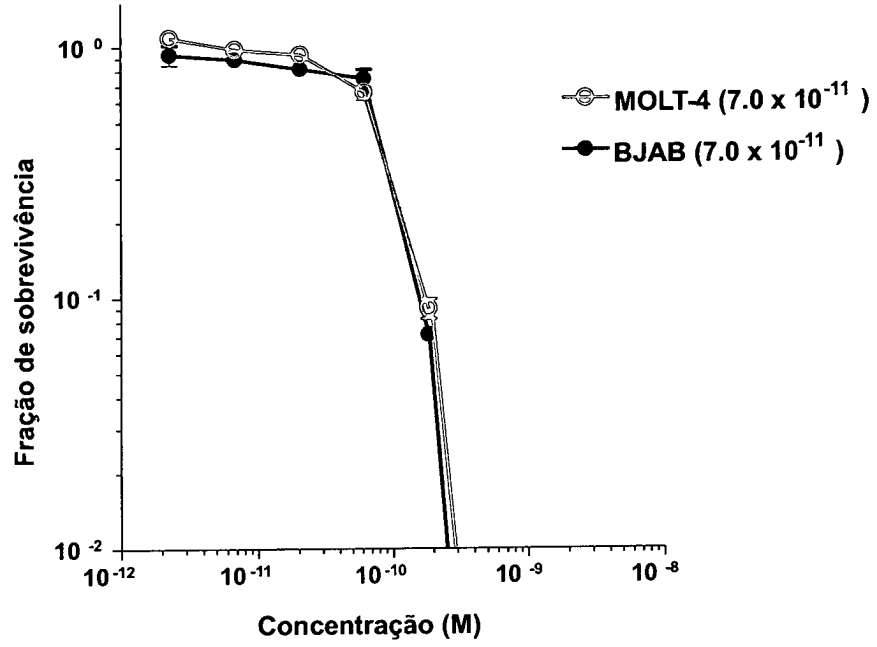


Fig. 1c

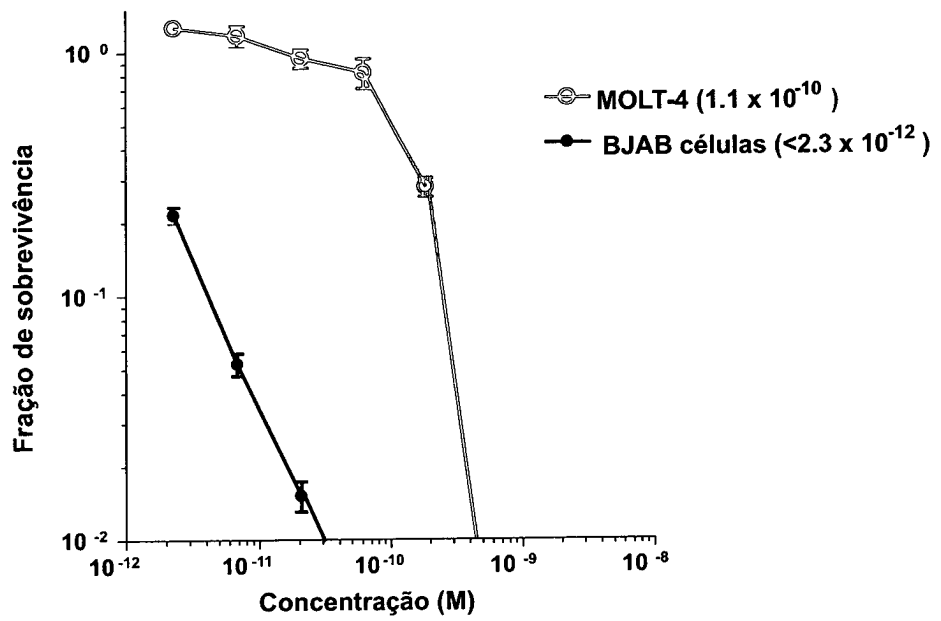


Fig. 2a

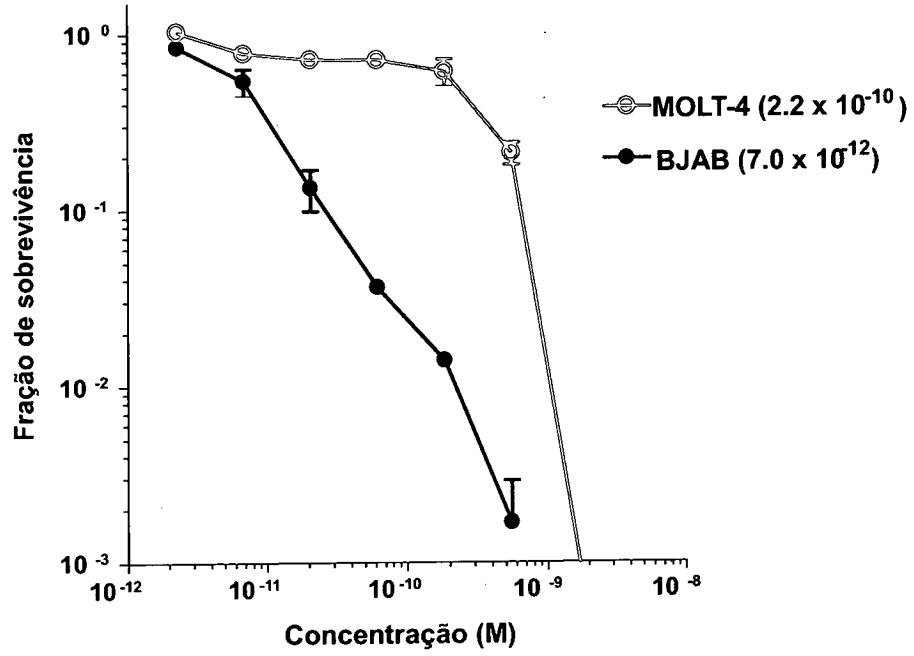


Fig. 2b

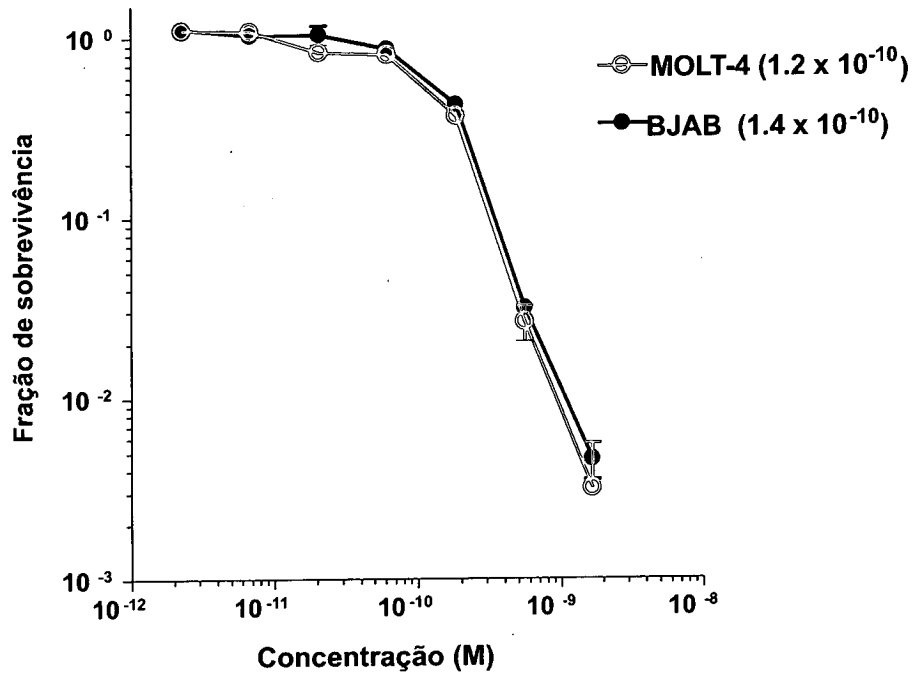


Fig. 2c

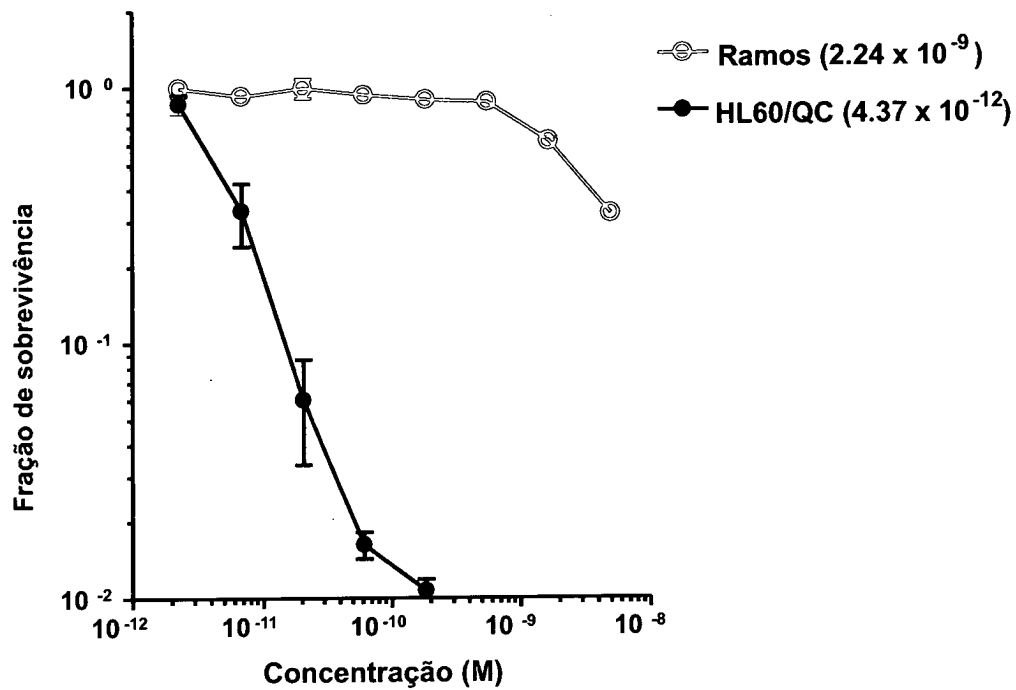


Fig. 3a

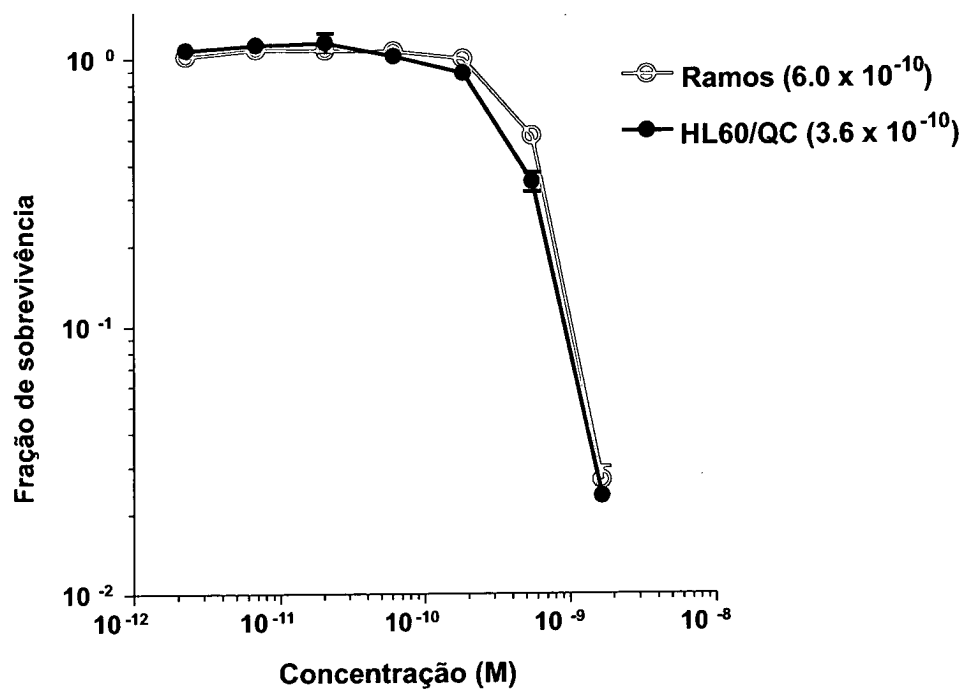
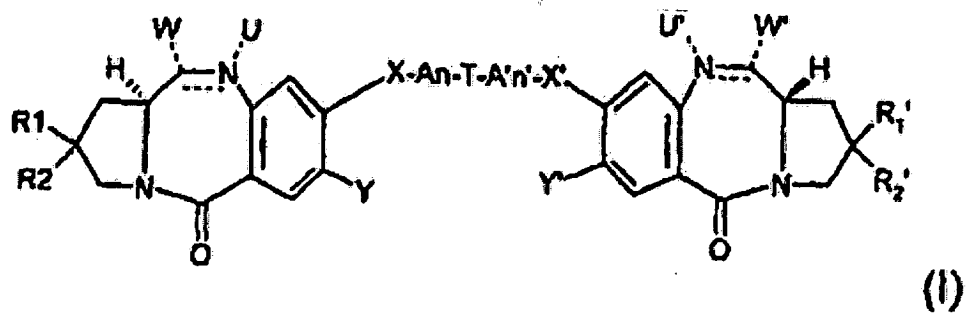


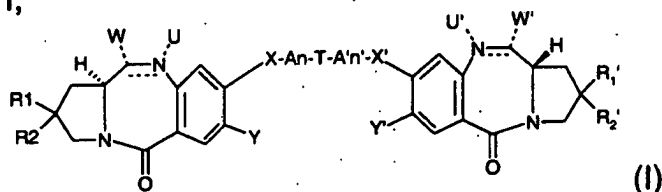
Fig. 3b



RESUMO

Patente de Invenção: "AGENTES CITOTÓXICOS COMPREENDENDO DERIVADOS DE TOMAIMICINA E SEU USO TERAPÊUTICO".

A presente invenção refere-se aos novos derivados de tomaimicina de fórmula I,



seu processo de preparação e seus usos terapêuticos.