

(11) Número de Publicação: **PT 1546152 E**

(51) Classificação Internacional:

C07D 493/04 (2007.10) **C07D 417/06** (2007.10)

C07D 405/06 (2007.10) **C07D 407/06** (2007.10)

A61K 31/427 (2007.10) **A61K 31/4427**

(2007.10)

A61P 35/00 (2007.10) **A61P 17/06** (2007.10)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2003.08.01**

(30) Prioridade(s): **2002.08.02 US 400535 P**
2003.06.24 US 480933 P

(43) Data de publicação do pedido: **2005.06.29**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.12.19**
051/2008

(73) Titular(es):

THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE
10550 NORTH TORREY PINES ROAD LA JOLLA,
CA 92037

NOVARTIS AG

US

CH

(72) Inventor(es):

KYRIACOS COSTA NICOLAOU

KENJI NAMOTO

ANDREAS RITZEN

US

CH

DK

(74) Mandatário:

ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA

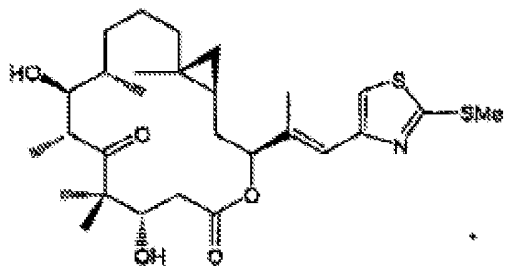
PT

(54) Epígrafe: **DERIVADOS DE EPOTILONA**

(57) Resumo:

RESUMO**"DERIVADOS DE EPOTILONA"**

Esta invenção diz respeito a derivados de epotilona com a fórmula (I), na qual os símbolos e os substituintes são tais como se definem na especificação, a processos para a preparação destes compostos, a composições farmacêuticas que incluam estes derivados, e à utilização de tais derivados, para a preparação de composições farmacêuticas para o tratamento, em especial de uma doença proliferativa, tal como um tumor.



DESCRIÇÃO

"DERIVADOS DE EPOTILONA"

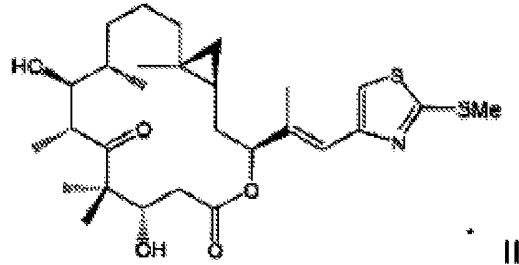
Domínio Técnico:

A invenção diz respeito a agentes antitumorais. Mais especificamente a invenção diz respeito a análogos da epotilona B, a trans-12,13-ciclopropilepotilona B, como agentes antitumorais.

Sumário:

Esta invenção diz respeito a análogos de epotilona B, a trans-12,13-ciclopropilepotilona B que tem actividade citotóxica potente contra uma diversidade de linhas de células, incluindo células tumorais que resistem ao Taxol[®], que tenham uma actividade citotóxica potente contra uma diversidade de linhas de células, incluindo linhas de células resistentes ao Taxol[®]. Inclui-se nas concretizações exemplificativas da invenção o composto **12**, tal como se ilustra na Figura 1. Outro aspecto da invenção diz respeito à utilização destes compostos como agentes citotóxicos.

Um aspecto da invenção diz respeito a um composto representado pela Fórmula I:



ou a um sal de um composto com a Fórmula I, quando estiver presente um grupo formador de sal.

Quando se utilize a forma plural para compostos, sais, e outros semelhantes, isto deve ser entendido como significando também um único composto, sal, ou outro semelhante (em que "um" seja tal como no artigo indefinido ou como no número significando 1).

Os sais são sobretudo os sais aceitáveis do ponto de vista farmacêutico de compostos com a fórmula 1.

Estes sais são formados, por exemplo, sob a forma de sais de adição de ácidos, preferivelmente com ácidos orgânicos ou inorgânicos, a partir de compostos com a Fórmula I que tenham um átomo de azoto básico, em especial os seus sais aceitáveis do ponto de vista farmacêutico. São ácidos inorgânicos, por exemplo, os ácidos halídricos, tais como o ácido clorídrico, o ácido sulfúrico, ou o ácido fosfórico. São ácidos orgânicos aceitáveis, por exemplo, os ácidos carboxílicos, o ácido fosfônico, os ácidos sulfônicos ou os ácidos sulfâmicos, por exemplo ácido acético,

ácido propiónico, ácido octanóico, ácido decanóico, ácido dodecanóico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido 2-hidroxi-butírico, glucónico, ácido glucosemonocarboxílico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido adípico, ácido pimélico, ácido subérico, ácido azelaico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido glucárico, ácido galactárico, aminoácidos tais como o ácido glutâmico, ácido aspártico, N-metilglicina, ácido acetilaminoacético, N-acetilaspargina ou N-acetilcisteína, ácido pirúvico, ácido acetoacético, fosfoserina, ácido 2-, ou 3-glicerofosfórico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido metilmaleico, ácido ciclo-hexanocarboxílico, ácido benzóico, ácido salicílico, ácido 1-, ou 3-hidroxinaftil-2-carboxílico, ácido 3,4,5-trimetoxibenzóico, ácido 2-fenoxibenzóico, ácido 2-acetoxibenzóico, ácido 4-aminosalicílico, ácido ftálico, ácido fenilacético, ácido glucurónico, ácido galacturónico, ácido metanossulfónico, ácido etanossulfónico, ácido 2-hidroxietanossulfónico, ácido etano-1,2-dissulfónico, ácido benzenossulfónico, ácido 2-naftalenossulfónico, ácido 1,5-naftaleno-dissulfónico, ácido N-ciclo-hexilsulfâmico, ácido N-metil-, N-etil-, ou N-propil-sulfâmico, ou outros ácidos protónicos, tais como o ácido ascórbico.

Podem preparar-se sais dos compostos com a fórmula I que possuam um grupo formador de sal, de um modo que é conhecido por si próprio. Podem assim obter-se sais dos compostos com a fórmula I com ácidos, por exemplo por tratamento com um ácido ou com um reagente de permuta iónica adequados.

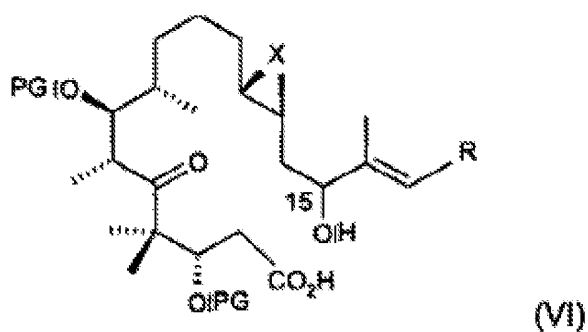
Podem transformar-se os sais do modo habitual nos compostos livres correspondentes, por exemplo tratando-os com agentes básicos adequados, por exemplo com carbonatos, hidrogenocarbonatos, ou hidróxidos de metais alcalinos, tipicamente carbonato de potássio ou hidróxido de sódio.

Para o seu isolamento e a sua purificação também é possível recorrer-se a sais que não sejam aceitáveis do ponto de vista farmacêutico, por exemplo picratos ou percloratos. Só os aceitáveis do ponto de vista farmacêutico ou os compostos livres (caso se apresente uma ocasião adequada, sob a forma de preparações farmacêuticas) conseguem atingir o estatuto de utilização terapêutica, e estes são portanto preferidos.

Atenta a relação próxima entre os novos compostos sob a sua forma livre e sob a forma dos seus sais, incluindo aqueles sais que podem ser utilizados como intermediários, por exemplo na purificação ou na identificação dos novos compostos, qualquer referência feita acima ou adiante neste documento aos compostos livres, deve ser entendida como referindo-se também aos sais correspondentes, tal como seja apropriado e expediente.

Outro aspecto da invenção diz respeito a um processo para se sintetizar qualquer um dos compostos descritos acima ou intermediários para a sua síntese, tal

como se descreve na especificação, em particular um processo para a preparação de um composto com a fórmula I, II, III, IV ou V, num primeiro passo do qual se condensa um composto com a fórmula VI



na qual X seja CH_2 e R seja



e PG seja um grupo protector para a função hidroxilo,

por uma reacção de esterificação, opcionalmente na presença de um catalisador,

e num segundo passo se retire o grupo protector para se obter uma lactona com a fórmula I.

A expressão "grupos protectores para um grupo hidroxilo", tal como se utilize neste documento, refere-se a grupos protectores para o grupo hidroxilo que são lábeis

em meio ácido, grupos estes que são conhecidos por si próprios. É uma característica dos grupos protectores que eles se prestam facilmente, isto é, sem reacções secundárias indesejáveis, a ser removidos, tipicamente por solvólise, redução, fotólise, ou também por actividade enzimática, por exemplo sob condições análogas às condições fisiológicas, e que não estejam presentes nos produtos finais. O especialista sabe, ou pode estabelecer facilmente, quais os grupos funcionais que são adequados para as reacções mencionadas acima e adiante neste documento.

A protecção dos grupos hidroxilo com grupos protectores, os grupos protectores eles próprios, e as suas reacções de clivagem, estão descritos em trabalhos padrão de referência, por exemplo por J. F. W. McOmie, em "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, London e New York 1973, por T. W. Greene, em "Protective Groups in Organic Synthesis", Wiley, New York 1981, em "The Peptides"; Volume 3 (editores: E. Gross e J. Meienhofer), Academic Press, London e New York 1981, em "Methoden der organischen Chemie" (Métodos da Química Orgânica), Houben Weyl, 4ª edição, Volume 15/1, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974, em H.-D. Jakubke e H. Jescheit, "Aminosäuren, Peptide, Proteine" (Aminoácidos, péptidos, proteínas), Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, e Basel 1982, e por Jochen Lehmann, em "Chemie der Kohlenhydrate: Monosaccharide und Derivate" (Química dos Hidratos de Carbono: monossacáridos e seus derivados), Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974.

Os grupos protectores preferidos são os éteres silílicos que sejam lábeis em meio ácido, por exemplo éter terc-butil-dimetil-silílico (TBS), éter trietilsilílico (TES), éter tri-isopropilsilílico (TIPS), éter dietiliso-propilsilílico (DEIPS), éter isopropildimetilsilílico (IPDMS) ou éter hexildimetilsilílico (TDS).

Breve descrição dos desenhos:

A Figura 1 ilustra as estruturas de epotilonas naturais e concebidas. As caixas de fundo cinzento indicam os compostos sintetizados neste trabalho.

A Figura 4 ilustra uma análise retróssintética de análogos (**12**) da trans-ciclopropil-epotilona B.

A Figura 5 ilustra a construção do aldeído **32**.

A Figura 6 ilustra a construção dos iodetos de vinilo **20e**.

A Figura 7 ilustra a síntese do análogo de epotilona **12**.

A Figura 8 ilustra uma tabela em que se descreve a citotoxicidade das epotilonas **1**, **2** e **12** bem como do paclitaxel, contra células de carcinoma do ovário humano e linhas de células mutante de β -tubulina, seleccionadas com paclitaxel ou com epotilona A.

A Figura 9 ilustra uma tabela em que se descreve a potência de polimerização da tubulina bem como a citotoxicidade, das epotilonas **1-2** e **12**, contra linhas celulares de cancro epidermóide de humanos.

A Figura 10 ilustra uma tabela em que se descrevem as afinidades de ligação de análogos da epotilona, em relação ao local de ligação de taxóides nos micro túbulos.

Outros aspecto da invenção diz respeito a uma composição farmacêutica contendo uma dose terapêutica de um composto que corresponda a qualquer uma das fórmulas I, II, III, IV ou à fórmula V, representadas acima, para o tratamento de uma doença proliferativa num mamífero. Num modo preferido, o mamífero é um ser humano.

Descrição Pormenorizada

Descreve-se a construção de uma série de epóxidos e de ciclopropanoepotilonas com cadeias laterais diferentes por síntese química, bem como a sua avaliação biológica.

A concepção da biblioteca presente focada na epotilona foi baseada nos conhecimentos actuais das relações entre a estrutura e a actividade (SAR), e especificamente nos seguintes factos: **(1)** a epotilona B **(2)** é consideravelmente mais potente do que a epotilona A **(1)**;

(2) uma substituição do grupo metilo por um grupo tiometilo na espécie tiazole aumenta a potência (Nicolaou, K. C.; *et al.* *Angew. Chem.* 1998, **110**, 2120-2153; *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998, **37**, 2014-2045; Nicolaou, K. C.; *et al.* *Tetrahedron* 2002, **58**, 6413-6432; Nicolaou, K. C.; *et al.* *Angew. Chem.* 1998, **110**, 89-92; *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998, **37**, 84-87); (3) a substituição do anel de tiazole por um heterociclo tal como a piridina (Nicolaou, K. C.; *et al.* *Chem. Biol.* 2000, **7**, 593-599) obriga a que se mantenha a posição adequada para o azoto para que tenha actividade biológica; e (4) um anel de ciclopropano pode substituir a espécie epóxido sem perda de actividade (Nicolaou, K. C.; *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* 2001, **123**, 9313-9323; Nicolaou, K. C.; *et al.* *ChemBioChem.* 2001, **2**, 69-75; Johnson, J. A.; *et al.* *Org. Lett.* 2000, **2**, 1537-1540). Partindo destes considerandos, considerou-se a epotilona **12** (figura 1) como um candidato especialmente importante para a síntese química e avaliação biológica. A avaliação biológica destes compostos levou à identificação da cadeia lateral de tiazole como sendo um grupo desejável fomentador de propriedades farmacológicas e melhorando a actividade biológica das epotilonas no que toca à sua citotoxicidade e às suas propriedades de polimerização da tubulina. Confirmou-se o aumento da actividade por três ensaios biológicos distintos nos quais se determinaram os efeitos dos compostos testados tanto nas células como *in vitro*.

Concepção e síntese química de análogos de epotilona:

A título de exploração inicial, decidiu-se confirmar o aumento de potência proporcionado ao esqueleto de epotilona pelo grupo substituinte metiltio, em comparação com o substituinte metilo na série da epotilona B. Sintetizou-se assim a metiltiotiazole-epotilona B (**3**) por acoplamento de Stille do estanano **16** (Nicolaou, K. C.; *et al.* *Bioorg. Med. Chem.* 1999, **7**, 665-697) com o iodeto de vinilo **15** (Nicolaou, K. C.; *et al.* *Chem. Eur. J.* 2000, **6**, 2783-2800) (rendimento de 80 %) tal como se ilustra na Figura 3. A elevada potência observada para o análogo **3** contra uma série de linhas de células tumorais (veja-se a Tabela 1) encorajou os autores a prosseguir com a concepção e a síntese de uma família inteira de análogos metiltio, bem como de diversas novas epotilonas contendo piridina.

A Figura 4 delinea, num formato retróssintético, o caminho que se prosseguiu para a construção dos análogos da ciclopropilepotilona B. Com base na estratégia dos autores que foi previamente descrita, a sequência adoptada necessitava de uma reacção de ciclopropanação de Charette (Nicolaou, K. C.; *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* 2001, **123**, 9313-9323; Charette, A. B.; *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* 1998, **120**, 11943-11952) para se estabelecer cedo no percurso sintético o local 12,13-ciclopropilo, de uma reacção aldólica de acordo com o procedimento optimizado dos autores (Nicolaou, K. C.; *et al.* *Chem. Eur. J.* 2000, **6**, 2783-2800) para construir a ligação C6-C7 com os seus dois centros quirais, de um acoplamento de Nozaki-Hiyama-Kishi (Nicolaou, K. C.;

et al. J. Am. Chem. Soc. 2001, **123**, 9313-9323; Takai, K.; *et al.* Tetrahedron Lett. 1983, **24**, 5281-5284; Jin, H.; *et al.* J. Am. Chem. Soc. 1986, **108**, 5644-5646) para introduzir a cadeia lateral, e de uma macrolactonização de Yamaguchi (Inanaga, J.; *et al.* Bull. Chem. Soc. Jpn. 1979, **52**, 1989-1993; Mulzer, J.; *et al.* Synthesis 1992, 215-228; Nicolaou, K. C.; *et al.* J. Am. Chem. Soc. 1997, **119**, 7974-7991) para completar a estrutura macrocíclica. Definiram-se deste modo os blocos de construção chave **18** ou **69** e **19**, e **20** como pontos de partida para estas construções. Encarou-se a construção dos análogos de epotilona A correspondentes na perspectiva de serem levadas a cabo de uma forma igual à que os autores descreveram anteriormente (Nicolaou, K. C.; *et al.* J. Am. Chem. Soc. 2001, **123**, 9313-9323).

A Figura 5 e a Figura 14 delineiam a síntese do aldeído necessário **32** ou **82** a partir do geraniol, facilmente disponível (**18** ou **69**). Desta forma, uma ciclopropanação de Charette de **18** ($\text{Et}_2\text{Zn}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$, na presença do ligando quiral **21**) (Charette, A. B.; *et al.* J. Am. Chem. Soc. 1998, **120**, 11943-11952) permitiu obter o álcool ciclopropílico **22** com um rendimento de 87 % e 93 % de ee, ou **71** com um rendimento de 80 %, e 95 % de ee. Protegendo o grupo hidroxilo em **22** ou em **71** (NaH-BnBr) (para encontrar as abreviaturas dos reagentes e dos grupos protectores vejam-se as legendas nos esquemas) e levando a cabo em seguida uma ozonólise (O_3 ; NaBH_4) da ligação dupla remanescente, obteve-se o composto **23** ou **72** com rendimentos globais de, respectivamente, 89 % ou de 83 %. Levou-se a

cabo a transformação do álcool **23** ou **72** no iodeto correspondente (**24**, com rendimento de 95 % ou 73 com 91 %) por mesitilação e reacção subsequente com NaI. A alquilação da (-)-SAMP hidrazona do propionaldeído (**25**) (Nicolaou, K. C.; *et al.* J. Am. Chem. Soc. 1997, **119**, 7974-7991; Enders, D. Asymmetric Synth. 1984, **3**, 275-339; Enders, D.; Klatt, M. Synthesis **1996**, 1403-1418) com o iodeto **24** ou o **73** sob a influência de LDA obteve-se o composto **26** ou **75** (com rendimentos, respectivamente, de 84 % e de 87 %), cuja clivagem (MeI; HCl aq.) permitiu obter o aldeído **17** com um rendimento de 86 % ou o **76** com um rendimento de 91 %. Determinou-se que a razão entre os epímeros em C-8 resultantes que se obteve era de cerca de 97:3, por análise de RMN de ¹H dos ésteres com MTPA obtidos do aldeído **17** (Tsuda, M.; Endo, T.; Kobayashi, J., J. Org. Chem. 2000, **65**, 1349-1352 e referências citadas neste documento). A condensação aldólica entre a cetona **19** e o aldeído **17** ou o **76** nas condições definidas acima [LDA (2,4 equiv.), cetona **19** (2,3 equiv.), -78 a -40°C, 30 minutos; e depois aldeído **17** ou **76**, -78°C, 5 minutos] (Nicolaou, K. C.; *et al.* Chem. Eur. J. 2000, **6**, 2783-2800) permite obter o produto aldólico **27** ou **78** que se isolou sob uma forma diastereomericamente pura (81 % de rendimento). Uma protecção subsequente do álcool secundário no **27** ou no **78** sob a forma de um éter de TBS (TBSOTf, 2,6-lutidina), seguida por uma clivagem selectiva do grupo TBS primário (HF•piridina) permitiu obter, com um rendimento global de 88 %, o álcool **28** ou com um rendimento global de 86 % o álcool **79**. Oxidou-se o composto em passos ao ácido

carboxílico (DMP; depois NaClO₂) que depois se protegeu sob a forma de éster de TMSE **29** ou **80** (TMSE-OH, EDC, 4-DMAP), com rendimentos globais respectivos de 75 % ou 73 %. Por hidrogenólise do éter benzílico a **29** ou **80** seguida por uma oxidação com DMP obteve-se o aldeído **30** ou **82** (rendimentos de 84 % e de 87 %) cuja homologação (NaHMDS-MeOCH₂Pf₃Cl; e depois PPTS) ao aldeído superior desejado **32** ou **83** prosseguiu sem problemas, e através do éter vinílico **31** (ca. 1:1 de razão E:Z), com um rendimento global de 82 %.

Sintetizou-se a cadeia lateral (**20e**, no Esquema 4) a partir dos halogenetos correspondentes (**33** (Ellingboe, J. W.; *et al.* J. Med. Chem. 1994, **37**, 542-550) **37**) tal como se ilustra no Esquema 4. Fez-se a protecção do brometo de 4-hidroximetil-2-piridilo **33** sob a forma de um éter tritílico (TrCl, 4-DMAP, 100 %), seguida por um acoplamento de Sonogashira (Arcadi, A.; *et al.* Tetrahedron 1994, **50**, 437-452) do brometo de arilo resultante **34** com propino [Pd(Pf₃)₂Cl₂-CuI, 96 %] permitiu obter o composto acetilénico **35** que serviu de precursor do iodeto de vinilo **20c** (n-BuLi; depois (n-Bu₃Sn)₂, CuCN, MeOH; depois I₂, rendimento de 80 %). Permutando o grupo tritilo por um grupo MOM no **35** [HCl (g), CHCl₃; depois NaH, MOM-Cl, 34 % de rendimento global] (Betzer, J.-F.; *et al.* Tetrahedron Lett. 1997, **38**, 2279-2282) permitiu aceder-se ao iodeto de vinilo **20d** (com um rendimento de 67 %) por exposição do intermediário resultante **36** a condições idênticas às descritas acima para a transformação de **35** em **20c**. Empregou-se uma química semelhante para construir o iodeto

de vinilo **20e** a partir de **37**, tal como se ilustra no Esquema 4.

Duas formações de ligação cruciais e duas desprotecções que as acompanharam permitem distinguir os blocos de construção chave **32** (preparado neste estudo para análogos da epotilona B), **40** (preparado tal como anteriormente descrito para análogos de epotilona A) (Nicolaou, K. C.; *et al.* J. Am. Chem. Soc. 2001, **123**, 9313-9323), e **20a-g** (para as cadeias laterais) a partir dos análogos de epotilona alvo. A primeira operação foi o acoplamento de Nozaki-Hiyama-Kishi (Takai, K.; *et al.* Tetrahedron Lett. 1983, **24**, 5281-5284; Jin, H.; *et al.* J. Am. Chem. Soc. 1986, **108**, 5644-5646) dos aldeídos **32** e **40** com o iodeto de vinilo **20e**. Esta reacção de formação de uma ligação carbono-carbono deu neste caso Resultados notáveis (CrCl₂, NiCl₂, 4-t-Bu-Piridina, DMSO), permitindo obter, depois de se gerar o ácido carboxílico graças a uma indução por TBAF, produtos de acoplamento (**41e**) com os rendimentos indicados no Esquema 5 (sob a forma de uma mistura a cerca de 1:1 dos diastereómeros em C-15). A mistura de diastereómeros de hidroxiácido (**41e**) foi então submetida a uma macrociclicização de Yamaguchi (cloreto de 2,4,6-tricloro-benzoílo, 4-DMAP) (Inanaga, J.; *et al.* Bull. Chem. Soc. Jpn. 1979, **52**, 1989-1993; Mulzer, J.; *et al.* Synthesis **1992**, 215-228) para se obter a lactona pretendida 15(S) com os rendimentos indicados (não otimizados) em conjunto com o seu epímero 15(R). A separação dos dois epímeros foi facilitada pelos seus valores bastante drasticamente

diferentes de R_f sobre gel de sílica. Uma desprotecção final dos derivados protegidos, feita com TFA a 20 % em CH_2Cl_2 (**43e**), permitiu obter a epotilona **12** com o rendimento indicado (não optimizado) (Esquema 5). Submeteram-se compostos puros do ponto de vista cromatográfico e do espectroscópico às avaliações biológicas tal como se descrevem adiante.

Biologia química:

Avaliaram-se as actividades biológicas das epotilonas sintetizadas através de ensaios para determinar a sua citotoxicidade, o seu efeito na polimerização *in vitro* da tubulina, e a sua ligação à tubulina.

Avaliou-se a citotoxicidade em primeiro lugar num conjunto de linhas de células de carcinomas do ovário, incluindo uma linha de células de origem (IA9) e três linhas de células resistentes a fármacos, nomeadamente as estirpes resistentes ao paclitaxel (Giannakakou, P.; *et al.* J. Biol. Chem. 1997, **272**, 17118-17125) IA9/PTX10 e IA9/PTX22, e a estirpe resistente a epotilona (Giannakakou, P.; *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2000, **97**, 2904-2909) IA9/A8. Estas linhas de células resistentes contêm diferentes mutações de β -tubulina adquiridas que afectam as interacções dos fármacos com a tubulina e de que resulta um impedimento à polimerização da tubulina catalisada por taxano e por epotilona. Os resultados destas investigações biológicas estão resumidos na Tabela 1 (Skehan, P.; *et al.*

J. Natl. Cancer Inst. 1990, **82**, 1107-1112). Levaram-se a cabo mais estudos de citotoxicidade e de polimerização de tubulina *in vitro* utilizando um conjunto de linhas de células de cancros epidermóides humanos, incluindo uma linha de células de origem (KB-31) e uma linha de células resistente ao paclitaxel (devido à sobre-expressão de Pgp) (KB-8511). Resumem-se os resultados destes estudos na Tabela 2 (Nicolaou, K. C.; *et al.* Chem. Biol. 2000, **7**, 593-599; Meyer, T.; *et al.* Int. J. Cancer 1989, **43**, 851-856).

Em geral, existe uma boa concordância entre a potência para a polimerização da tubulina *in vitro* e o perfil de citotoxicidade dos compostos testados tanto contra a linha de células 1A9 de carcinoma do ovário humano, como contra a das células de carcinoma epidermóide humano KB-31. De acordo com as observações originais relativas às epotilonas A e B de ocorrência natural, nenhum dos análogos das epotilonas A ou B testados neste documento parece ser um bom substrato para a P-glicoproteína (Pgp) da bomba de efluxo do fármaco. Isto é evidente pela falta de uma resistência cruzada de cada um destes análogos em relação à linha de células que expressam Pgp, KB-8511, em contraste com o paclitaxel - que é um substrato conhecido da Pgp - que é 214 vezes menos activo contra as células KB-8511 (veja-se a figura 9 e a figura 17). É digno de nota que todos os análogos de epotilona parecem ser mais activos contra estes mutantes de β -tubulina, em comparação com a epotilona A (1) e com a epotilona B (2) (veja-se os valores de RR na figura 8 e na figura 16). Este efeito é mais

pronunciado com o composto **12** para o qual os valores de resistência relativa (RR) são de entre 1,6 e 9,3 contra células PTX10 (β 270) e contra células A8 (β 274), em comparação com valores de RR de 9,4-24,9 para a Epo A (1) e a Epo B (2) (figura 8). Para além disto, no estudo corrente, e de acordo com publicações anteriores (Nicolaou, K. C.; *et al.* ChemBioChem 2001, **2**, 69-75; Giannakakou, P.; *et al.* J. Biol. Chem. 1997, **272**, 17118-17125; Giannakakou, P.; *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2000, **97**, 2904-2909), verificou-se que o mutante seleccionado com paclitaxel PTX22 (β 364) retém a sua sensibilidade quase integral às epotilonas, e em relação a todos os análogos de epotilona testados neste trabalho (valores de RR de cerca de 3,3).

Existe uma concordância geral entre a potência relativa dos análogos substituídos de epotilona B contra as células de carcinoma do ovário humano 1A9 e as células de cancro epidermóide humano KB-31. No seu conjunto, os resultados destes testes de citotoxicidade revelaram informação interessante em termos das relações estrutura-actividade adentro da família da epotilona. Em primeiro lugar, os compostos 4 e 6 nos quais a espécie epóxido em C12-C13 é substituída por um anel de ciclopropano são os dois compostos mais potentes entre todos os análogos de epotilona B que se apresentam neste documento. Este resultado confirma que a espécie epóxido em C12-C13 não é indispensável para se obter actividade biológica, tal como se anotara anteriormente (Nicolaou, K. C.; *et al.* J. Am.

Chem. Soc. 2001, **123**, 9313-9323; Nicolaou, K. C.; *et al.* ChemBioChem. 2001, **2**, 69-75; Johnson, J. A.; *et al.* Org. Lett. 2000, **2**, 1537-1540). O composto 4 é 6 vezes mais activo do que a epotilona B (2) de que provém, contra células de carcinoma de ovário humano 1A9 (Figura 8) confirmando que a substituição do grupo metilo na cadeia lateral de tiazole por um grupo tiometilo leva a um aumento da actividade. Este resultado concorda com dados anteriormente obtidos para uma substituição semelhante na epotilona B sem substituição do epóxido em C12-C13 (isto é, o composto 3) (Nicolaou, K. C.; *et al.* Tetrahedron 2002, **58**, 6413-6432). Este ultimo composto (3) era cerca de 2 vezes mais activo do que a epotilona B parente, enquanto o composto 4 é 6 vezes mais potente do que a epotilona B. Este resultado faz com que o composto 4 seja o análogo de epotilona B mais potente contra a linha de células 1A9 já sintetizado até à data e sugere que a substituição do epóxido com uma espécie ciclopropano em conjunto com a substituição do substituinte metilo na espécie tiazole por um grupo tiometilo actuam de forma sinérgica, levando ao aumento da actividade biológica que foi observado. De forma interessante, a substituição do grupo metilo do anel de tiazole por espécies maiores (composto 12) levou a uma actividade biológica menor, em comparação com a da epotilona B (Figuras 8 e 9).

Para além dos testes biológicos acima, mediu-se a potência relativa de cada análogo de epotilona em reacções de substituição de taxóides (Andreu, J. M.; Barasoain, I. Biochemistry 2001, **40**, 11975-11984). A razão de ser destas

experiências foi comparar as constantes de equilíbrio com as quais se dá a ligação ao local de ligação de taxano nos microtúbulos por parte dos análogos de epotilona que se investigaram. A inibição da ligação do taxóide fluorescente bem caracterizado Fluta-2 (Souto, A. A.; *et al.* *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1995, **34**, 2710-2712; Diaz, J. F.; *et al.* *J. Biol. Chem.* 2000, **275**, 26265-26276; Abal, M.; *et al.* *Cell. Motil. Cytoskeleton* 2001, **49**, 1-15) aos microtúbulos, por cada um dos análogos de epotilona, foi medida a 37°C (Figura 10). Listam-se as constantes de equilíbrio para a dissociação na Tabela 3, as quais indicam que a epotilona A (1) possui a menor afinidade de ligação entre todos os análogos de epotilona que se testaram ($K_d = 34 \text{ nM}$). O ligando mais potente entre todos os ligandos medidos neste teste é o composto 3, com um valor de K_d de $0,64 \text{ nM}$, seguindo-se o composto 12, com um valor de K_d semelhante a $1,8 \text{ nM}$. As afinidades de ligação dos análogos testados espelham as suas actividades respectivas, tanto quanto ao crescimento de células como nos ensaios *in vitro* de polimerização de tubulina.

É possível obter-se um conjunto de conclusões a partir de todos os três ensaios biológicos empregues neste documento, em termos de relações estrutura-actividade adentro da família da epotilona. Em primeiro lugar, a adição do grupo metilo em C12 não aumenta a actividade na série dos compostos *trans*-ciclopropilo (do composto 5 em relação ao 6, do 7 em relação ao 8, do 9 em relação ao 10), ao contrário do resultado na série de epóxidos *cis*, na qual

a epotilona B (2) é pelo menos 10 vezes mais active do que a epotilona A (1). Isto pode ser devido a uma orientação diferente do grupo metilo em C12 nos compostos cis e nos trans, embora ainda seja necessário esclarecer os pormenores das diferenças conformacionais entre os compostos cis e os trans. Em segundo lugar, a introdução da cadeia lateral de 2-tiometiltiazole aumenta a actividade, em comparação com a observada em presença de uma cadeia lateral de 2-metiltiazole (composto 2 em relação ao 3, composto 5 em relação ao 11, e composto 6 em relação ao 12). Este efeito foi anteriormente observado para análogos da epotilona C e da D (Nicolaou, K. C.; *et al.* Angew. Chem. 1997, **109**, 2181-2187; Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1997, **36**, 2097-2103; veja-se também: Sinha, S. C.; *et al.* ChemBioChem 2001, **2**, 656-665). Em terceiro, a substituição de um grupo metilo por um grupo tiometilo na série que tem uma cadeia lateral de piridina (compostos 8 em relação aos 13) diminui a potência, ao contrário dos resultados obtidos para as cadeias laterais de tiazole acima. Esta conclusão baseava-se na citotoxicidade para células e em dados de polimerização *in vitro* da tubulina, enquanto que no ensaio em que se leva a cabo a substituição do taxóide fluorescente, a substituição do grupo metilo por uma espécie tiometilo, na cadeia lateral de piridina, é indiferente em termos da afinidade de ligação. Esta discrepância pode simplesmente reflectir diferenças na absorção das células e na permeabilidade dos compostos testados ou em diferenças na sensibilidade dos dois testes da tubulina. Apesar desta discrepâncias, é claro a partir destes dados, que a introdução de um grupo tiometilo na cadeia lateral de

tiazole é uma modificação mais favorável do que a introdução de um grupo tiometilo na cadeia lateral de piridina, que pode ser devida a diferentes necessidades estereoquímicas por parte dos dois tipos de esqueletos de cadeia lateral. De acordo com os dados anteriormente obtidos para análogos de cis-piridina-epotilona (Nicolaou, K. C.; *et al.* Chem. Biol. 2000, **7**, 593-599), a alteração da localização do grupo tiometilo da cadeia lateral de piridina a posição 5 (composto 13) para a posição 6 (composto 14) resultou numa significativa perda de actividade. Em quarto lugar, obtiveram-se resultados mistos quando se comparou o composto 7 com o 9 e o 8 com o 10, em que a cadeia lateral 5-metilpiridina (compostos 7 e 8) é substituída pela cadeia lateral 5-hidroximetilpiridina (compostos 9 e 10). Esta substituição parece ser indiferente nos ensaios de toxicidade contra as células de carcinoma do ovário humano 1A9 (Tabela 1), obtendo-se valores de IC₅₀ para cada par (por exemplo 0,6 e 0,7 nM, respectivamente, para os compostos 7 e 9; 1,7 nM para os compostos 8 e 10). Por outro lado, nas células de carcinoma epidermóide humano KB-31, o composto 10 é 2 vezes mais activo do que o seu correspondente composto 8, com valores de IC₅₀ de, respectivamente, 0,44 e 0,9 nM. Atentas as pequenas diferenças das taxas de crescimento das duas linhas de células cancerosas humanas, as quais poderiam explicar a diferença dos resultados, foi possível concluir que a introdução da cadeia lateral 5-hidroximetilpiridina tem uma fraca probabilidade de aumentar a actividade, pelo menos nos análogos da família das epotilonas que contenham trans-12,13-ciclopropilo.

Devidos a estas propriedades, os compostos são adequados para o tratamento de doenças proliferativas, em especial de doenças tumorais, incluindo metástases; por exemplo tumores sólidos tais como tumores do pulmão, tumores do peito, tumores colo-rectais, tumores da próstata, melanomas, tumores cerebrais, tumores do pâncreas, tumores do pescoço, tumores da bexiga, neuroblastomas, tumores da garganta, mas também doenças proliferativas das células sanguíneas, tal como a leucémia; e também para o tratamento de outras doenças que respondam ao tratamento com inibidores de despolimerização dos microtúbulos, tais como a psoríase.

Pode administrar-se um composto com a fórmula I por si só ou em conjunto com um ou mais agentes terapêuticos, em que a terapia de combinação possível pode assumir a forma de combinações fixas ou em que a administração de um composto da invenção e a de um ou mais outros agentes terapêuticos possam ser alternadas ou em que todos estes possam ser administrados independentemente uns dos outros, ou em que se eleva a cabo a administração combinada de combinações bem determinadas e um ou mais agentes terapêuticos adicionais. Para além disto ou adicionalmente pode administrar-se um composto com a fórmula I para a terapia de tumores, em combinação com a quimioterapia, com a radioterapia, com a imunoterapia, com intervenções cirúrgicas, ou com uma combinação destes. É igualmente possível uma terapia a longo termo, tal como uma terapia

adjuvante no contexto de outras estratégias de tratamento, tal como se descrevem acima. Outros tratamentos possíveis são uma terapia para se manter o estado do paciente após a regressão do tumor, mesmo uma terapia quimiopreventiva, por exemplo em paciente de alto risco.

Os agentes terapêuticos para combinações possíveis são em especial um ou mais compostos antiproliferativos, citostáticos ou citotóxicos, por exemplo um ou mais agentes quimioterapêuticos seleccionados de entre o conjunto constituído pelos agentes quimioterapêuticos clássicos, um inibidor da síntese de poliaminas, um inibidor de proteína quinase, em especial de proteína quinase de serina/treonina, tal como a proteína quinase C, ou de proteína quinase de tirosina, tal como a proteína quinase de tirosina do receptor de factor de crescimento epidérmico, uma citoquina, um regulador negativo do crescimento, tal como o TGF- β ou o IFN- β , um inibidor de aromatase, e um citostático clássico.

Os compostos de acordo com a invenção não se destinam apenas ao tratamento (profilático e de preferência terapêutico) de seres humanos, mas também ao tratamento de outros animais com sangue quente, por exemplo de animais comercialmente úteis, por exemplo roedores, tais como os murganhos, os coelhos ou as ratazanas, ou ainda as cobaias. Eles também podem ser usados como padrões de referência nos sistemas de teste que se descreveram acima, para permitir uma comparação com outros compostos.

Pode também utilizar-se um composto com a fórmula I com finalidades de diagnóstico, por exemplo de tumores que tenham sido obtidos a partir de "hospedeiros" animais de sangue quente, em especial de seres humanos, e implantados em murganhos para os testar no que toca a diminuições do seu crescimento após tratamento com um tal composto, para se investigar a sua sensibilidade ao composto referido e portanto melhorar a detecção e a determinação de métodos terapêuticos possíveis para as doenças neoplásicas no hospedeiro original.

As misturas de estereoisómeros, por exemplo as misturas de diastereómeros, podem ser separadas nos seus isómeros correspondentes de um modo conhecido por si próprio, por intermédio de métodos de separação adequados. Podem assim separar-se as misturas de diastereómeros nos diastereómeros individuais, por intermédio de cristalização fraccionada, de cromatografia, de distribuição por solventes, e de procedimentos semelhantes. Esta separação pode acontecer quer na altura em que existe um dos compostos de que se parte, quer num composto com a fórmula I ele próprio. Podem separar-se os enantiómeros pela formação de sais diastereoméricos, por exemplo por formação de sais com um ácido quiral enantiomericamente puro, ou por intermédio de cromatografia, por exemplo por HPLC, utilizando substratos cromatográficos com ligandos quirais. (Em geral a separação dos enantiómeros é feita num passo intermédio).

Preparações farmacêuticas, método e utilizações

A invenção presente também diz respeito a preparações farmacêuticas que contenham um composto com a fórmula I a título de ingrediente activo e que se possam utilizar em especial no tratamento das doenças mencionadas acima. São especialmente preferidas as preparações para administração entérica tal como nasal, bucal, rectal ou, em especial, a administração por via oral, e para administração parentérica, tal como endovenosa, intramuscular ou subcutânea, a animais com sangue quente, em especial seres humanos. As preparações contêm o ingrediente activo por si só ou, de preferência, em conjunto com um veículo aceitável do ponto de vista farmacêutico. A dosagem do ingrediente activo depende da doença que se pretende tratar e da espécie, da sua idade, massa corporal, e estado individual, dos dados farmacocinéticos individuais, e do modo de administração.

A dosagem exacta de compostos com a fórmula I que se vai empregar para se inibir uma doença proliferativa, preferivelmente tumores, depende de diversos factores incluindo do hóspede, da natureza e da severidade do estado que se estiver a tratar, do modo de administração e do composto especificamente utilizado. No entanto, em geral, consegue-se uma inibição satisfatória de tumores quando se administra um a composto com a fórmula I por via parentérica, por exemplo intraperitoneal, endovenosa, intramus-

cular, subcutânea, intratumoral, ou rectal, ou por via entérica, por exemplo oral, preferivelmente por via endovenosa ou oral, mais preferivelmente por via endovenosa a uma dosagem única de 1-300 mg/kg de massa corporal por ciclo (ciclo = 3-6 semanas) ou, para os primatas de maiores dimensões, uma dose única de 50-5.000 mg por ciclo de tratamento. Uma dosagem única preferida por via endovenosa, por ciclo de tratamento de 3-6 semanas, é de 1-75 mg/kg de massa corporal ou, para a maior parte dos primatas maiores, uma dosagem diária de 50-1.500 mg. Uma dosagem endovenosa típica é de 45 mg/kg, uma vez em cada três semanas.

Em geral, administra-se inicialmente uma pequena dose e depois a dosagem é gradualmente aumentada até se determinar a dosagem óptima para o hospedeiro que está a ser tratado. O limite superior de dosagem é aquele que resulta imposto pelos efeitos colaterais e que pode ser determinado experimentalmente para o hospedeiro que está a ser tratado.

A invenção também diz respeito a preparações farmacêuticas para utilização num método para o tratamento profilático ou em especial terapêutico do corpo humano ou do de um animal, a um processo para a sua preparação (em especial sob a forma de composições para o tratamento de tumores) e a um método para se tratarem as doenças mencionadas acima, sobretudo doenças neoplásicas, em especial as que se mencionaram acima.

A invenção também diz respeito a processos e à utilização de compostos com a fórmula I para a preparação de preparações farmacêuticas que contenham compostos com a fórmula I a título de componente activa (o ingrediente activo).

Prefere-se uma composição farmacêutica que seja adequada para administração a um animal de sangue quente, em especial um ser humano ou um mamífero com utilidade comercial, que sofra de uma doença a qual responda à inibição da despolimerização dos microtúbulos, por exemplo a psoríase ou em especial uma doença neoplásica, contendo uma quantidade correspondentemente eficaz de um composto com a fórmula I, ou de um seu aceitável do ponto de vista farmacêutico no caso em que ele possua grupos formadores de sal, em conjunto com pelo menos um veículo aceitável do ponto de vista farmacêutico.

Prefere-se de igual modo uma composição farmacêutica para o tratamento profilático ou especialmente terapêutico de doenças neoplásicas e outras doenças proliferativas de um animal de sangue quente, em especial de um ser humano ou de um mamífero útil do ponto de vista comercial que necessite de um tal tratamento, em especial os que sofram de uma tal doença, que inclua um novo composto com a fórmula I, ou um seu sal aceitável do ponto de vista farmacêutico, a título de ingrediente activo, numa quantidade que seja activa a título profilático ou em especial terapêutico contra as doenças referidas.

As preparações farmacêuticas contêm entre cerca de 0,000001 % e 95 % do ingrediente activo, sendo que as formas de administração de dose única contêm de preferência entre cerca de 0,00001 % e 90 %, e as formas de administração de dose múltipla contêm de preferência entre cerca de 0,0001 e 0,5 % no caso de preparações para administração por via parentérica ou entre 1 % e 20 % de ingrediente activo no caso de preparações para administração por via entérica. As formas de unidade de dosagem são, por exemplo, comprimidos revestidos e não revestidos, ampolas, frascos, supositórios ou cápsulas. São outras formas de dosagem ainda, por exemplo, os unguentos, os cremes, as pastas, as espumas, as tinturas, os batons, as gotas, as aspersões, as dispersões, etc. São exemplos cápsulas contendo entre cerca de 0,0002 g e cerca de 1,0 g de ingrediente activo.

As preparações farmacêuticas da invenção são preparadas de um modo que é conhecido por si próprio, por exemplo por intermédio das operações convencionais envolvendo processos de mistura, granulação, revestimento, dissolução ou liofilização.

As formulações adequadas para a administração por via parentérica são em primeiro lugar as soluções aquosas (por exemplo em soro salino fisiológico, as que se podem obter diluindo soluções de um ingrediente activo sob uma sua forma solúvel em água, por exemplo a de um sal solúvel em água, em polietilenoglicol, tal como polietilenoglicol

(PEG) 300 ou PEG 400), ou suspensões injectáveis de base aquosa contendo agentes que aumentam a viscosidade, por exemplo carboximetilcelulose sódica, sorbitol e/ou dextrano, e quando tal for apropriado, estabilizantes. O ingrediente activo, caso seja necessário em conjunto com excipientes, também pode assumir a forma de um liofilizado e pode ser transformado numa solução antes da sua administração parentérica, pela utilização de solventes adequados.

Podem também utilizar-se soluções tais como, as que se utilizam para administração parentérica, como soluções para infusão.

A invenção diz respeito de igual modo a um processo ou a um método para o tratamento de um dos estados patológicos mencionados acima, em especial uma doença que reage à inibição da despolimerização dos microtúbulos, e nomeadamente uma doença neoplásica correspondente. Pode administrar-se um composto com a fórmula I tal e qual ou sob a forma de composições farmacêuticas, profiláticas ou terapêuticas, preferivelmente numa quantidade eficaz contra as doenças referidas, a um animal de sangue quente, por exemplo um ser humano, que necessite de um tal tratamento, sendo os compostos utilizados sobretudo sob a forma de composições farmacêuticas. Para um indivíduo com uma massa corporal de cerca de 70 kg, a dose administrada é de entre cerca de 0,1 mg e cerca de 1 g, preferivelmente entre cerca de 0,5 mg e cerca de 200 mg, de um composto da invenção presente. Leva-se a cabo a administração, preferivelmente

exemplo com 1 a 4 semanas de intervalo, por exemplo semanalmente, quinzenalmente, de 3 em 3 semanas ou de 4 em 4 semanas.

A invenção presente também diz respeito em especial à utilização de um composto com a fórmula 1, ou de um seu sal aceitável do ponto de vista farmacêutico, em especial de um composto com a fórmula I denominado como sendo um composto preferido, ou de um seu sal aceitável do ponto de vista farmacêutico, tal e qual ou sob a forma de uma formulação farmacêutica contendo pelo menos um veículo utilizável em farmácia, para o tratamento terapêutico e também profilático de uma ou mais das doenças acima.

A invenção presente também diz respeito em particular à utilização de um composto com a fórmula 1, ou de um seu sal aceitável do ponto de vista farmacêutico, em especial de um composto com a fórmula I denominado como sendo um composto preferido, ou de um seu sal aceitável do ponto de vista farmacêutico, para a preparação de uma formulação farmacêutica para o tratamento terapêutico e também profilático de uma ou mais das doenças acima.

Experimental

Geral

Todas as reacções foram levadas a cabo sob uma atmosfera de árgon, com solventes secos e em condições

anidras, a não ser quando se indique algo em contrário. Obtiveram-se os solventes anidros passando-os através de colunas de alumina activada que se pode obter comercialmente. Todos os reagentes foram adquiridos com o grau de pureza mais elevado existente no comércio, e foram utilizados sem purificação adicional. Em geral monitorizaram-se as reacções por cromatografia em camada fina sobre placas de gel de sílica da E. Merck, com 0,25 mm de altura (60F-254). Utilizou-se gel de sílica da E. Merck (60, dimensão de partículas 0,040-0,063 mm) para a cromatografia rápida em coluna. Levaram-se a cabo as separações preparativas em camada fina (PTLC) em placas de gel de sílica da E. Merck (60F-254) com alturas de 0,25, 050 ou 1 mm. Os pontos de fusão (pf) são não corrigidos e foram registados num aparelho de determinação de pontos de fusão em capilar, Thomas-Hoover Unimelt. Registaram-se as rotações ópticas num polarímetro Perkin-Elmer 241. Registaram-se os espectros de RMN em instrumentos Bruker DRX-600, DRX-500, AMX-400 ou AC-250 e calibraram-se utilizando os resíduos de solventes não deuterados a título de referência interna. Toda a marcação de átomos de carbono, por exemplo com C^{15} , refere-se à numeração da epotilona A (1) (veja-se a Figura 1). Os espectros de IV foram registados num espectrómetro de IV-TF da série 1600 da Perkin-Elmer. Registaram-se espectros de massa de alta resolução num espectrómetro de massa IonSpec VoyagerTM da PerSeptive Biosystems (MALDI-EMTF) ou num espectrómetro de massa API 100 da Perkin-Elmer (IEA).

Síntese da Epotilona 3

Acoplamento de Stille do iodeto de vinilo 15 com o estanano 16.

Adicionou-se uma solução de $\text{Pd}_2(\text{dba})_3(\text{CHCl}_3)$ (3,9 mg, 3,8 μmol), $\text{As}\phi_3$ (4,6 mg, 15 μmol), e CuI (7,2 mg, 38 μmol) em DMF (desgasificado, 0,5 mL), a 25°C, uma solução do iodeto **15** (10 mg, 19 μmol) (Nicolaou, K. C., *et al.*, Chem. Eur. J. 2000, 6, 2783-2800) e o estanano **16** (11 mg, 38 μmol) (Nicolaou, K.C., *et al.*, Bioorg. Med. Chem. 1999, 7, 665-697) em DMF (degasificado, 0,5 mL), e agitou-se a solução resultante durante 2 horas. Adicionou-se água (10 mL), e extraiu-se a mistura com EtOAc (3 x 10 mL). Lavou-se o conjunto das fases orgânicas com água (30 mL), com salmoura (30 mL), e secou-se (Na_2SO_4). Depois de se evaporarem os voláteis, purificou-se o resíduo por cromatografia rápida em coluna (sílica, hexanos:EtOAc a 2:1 (1:1) para se obter a epotilona **3** sob a forma de um sólido branco (7,2 mg, 72 %); CCF $R_f = 0,29$ (sílica, hexanos:EtOAc a 1:1); $[\alpha]_D^{22} -53^\circ$ (c 0,51, CH_2Cl_2); IV (filme) ν_{max} 3472 (largo), 2967, 2920, 1731, 1684, 1461, 1420, 1378, 1249, 1143, 1032, 973, 879, 732, 667 cm^{-1} ; MALDI-EMTF m/z 562,2267 (MNa^+), calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{NO}_6\text{S}_2\text{Na}$ 562,2267.

Construção do aldeído 32

Álcool 23. Adicionou-se a uma solução do álcool ciclopropílico **22** (4,08 g, 24 mmol) (Charette, A. B., *et*

al. J. Am. Chem. Soc. 1998, **120**, 11943-11952) em DMF (40 mL), hidreto de sódio (1,45 g, 36 mmol, a 60 % em óleo mineral), em porções, e com agitação, a 0°C. Depois de se agitar a 25°C durante meia hora, arrefeceu-se a mistura até 0°C, e adicionou-se-lhe brometo de benzilo (4,3 mL, 36 mmol) ao longo de 2 minutos, e continuou a agitar-se durante 12 horas a 25°C. Terminou-se a reacção adicionando solução saturada de NH₄Cl à mistura (50 mL), e extraiu-se com EtOAc (3 x 50 mL), lavando-se o conjunto dos extractos com salmoura (2 x 100 mL), secou-se (Na₂SO₄), e evaporou-se. Dissolveu-se o resíduo em CH₂Cl₂:MeOH a 4:1 (60 mL) e ozonizou-se a solução (100 L/h, a ca. 0,5 g O₃/h) a -78°C durante 21 minutos. **(NOTA: Devem evitar-se períodos reaccionais mais longos para evitar a oxidação do éter benzílico ao benzoato correspondente)**. Removeu-se o excesso de ozono borbulhando N₂ durante 1 minuto, e depois adicionou-se NaBH₄ em porções pequenas (2,75 g, 73 mmol) **(CUIDADO: Exotérmico)**, e em seguida metanol (20 mL). Aqueceu-se a mistura reaccional até 25°C ao longo de 1 hora e depois terminou-se a reacção adicionando à mistura uma solução saturada de NH₄Cl (20 mL). Extraiu-se a mistura com CH₂Cl₂ (2 x 50 mL), e lavou-se o conjunto dos extractos com salmoura (100 mL), secou-se (Na₂SO₄) e evaporou-se. Purificou-se o resíduo por cromatografia rápida (sílica, hexanos:EtOAc a 5:2) para se obter **23** sob a forma de um óleo amarelo (5,07 g, 89 %). CCF R_f = 0,20 (sílica, hexanos:EtOAc a 3:1); [α]_D²² -7,5° (c 1,76, CHCl₃); IV (filme) ν_{max} 3390 (largo, 2933, 2859, 1452, 1070, 739, 698 cm⁻¹); MALDI-EMTF m/z 257,1519 (MNa⁺), calculado para C₁₅H₂₂O₂Na 257,1512.

Iodeto 24. Adicionou-se gota a gota, a uma solução do álcool ciclopropílico **23** (10,08 g, 43,0 mmol) em CH_2Cl_2 seco (100 mL) a 0°C , cloreto de metanossulfonilo (4,2 mL, 54 mmol) e em seguida trietilamina (9,0 mL, 65 mmol). Começou imediatamente a formar-se um precipitado branco. Agitou-se a mistura a 25°C durante 1 hora, e depois adicionou-se-lhe NH_4Cl (saturada, 50 mL) e água (50 mL) e separaram-se as fases. Extraíu-se a fase aquosa com EtOAc (100 mL), e depois lavou-se o conjunto das fases orgânicas com salmoura, secou-se (Na_2SO_4) e evaporou-se. Dissolveu-se o resíduo em acetona seca (200 mL), e adicionou-se-lhe iodeto de sódio (19,3 g, 129 mmol). Aqueceu-se a solução que inicialmente estava quase límpida, ao refluxo durante 40 minutos, altura durante a qual se formou um precipitado branco.

Adicionou-se água (100 mL) e extraíu-se a mistura com éter (500 + 250 mL). Secou-se o conjunto dos extractos e evaporou-se, e purificou-se o resíduo por cromatografia rápida (sílica, hexanos:EtOAc a 5:1) para se obter **24** sob a forma de um óleo incolor (14,16 g, 95 %). CCF $R_f = 0,66$ (sílica, hexanos:EtOAc a 5:1); $[\alpha]_D^{22} -16^\circ$ (c 2,05, CHCl_3); IV (filme) ν_{max} 2916, 2848, 1453, 1217, 1098, 1073, 735, 697 cm^{-1} ; EM-IEA m/z 367 (MNa^+), calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{IONa}$ 367.

Hidrazona 26. Preparou-se uma solução de LDA adicionando n-BuLi (13,1 mL, 21,0 mmol, 1,6 M em hexanos) a di-isopropilamina (2,94 mL, 21,0 mmol) em THF (10 mL) a

-78°C, aquecendo-se em seguida a solução até 0°C, e agitando-se durante 10 minutos. Adicionou-se a esta solução de LDA hidrazona de SAMP-propionaldeído **25** (3,32 g, 19,5 mmol) (Nicolaou, K. C., *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 1997, **119**, 7974-7991; Enders, D. *Asymmetric Synth.* 1984, **3**, 275-339; e Enders, D., *et al.*, *Synthesis* **1996**, 1403-1418), e agitou-se a mistura durante 6 h a 0°C, durante as quais se formou um precipitado branco. Arrefeceu-se a mistura até -98°C (banho de MeOH/N₂(l)) e adicionou-se-lhe ao longo de meia hora uma solução do iodeto **24** (5,16 g, 15,0 mmol) em THF (20 mL). Deixou-se então aquecer a mistura reaccional até -10°C ao longo de 14 horas, e depois terminou-se a reacção adicionando à mistura NH₄Cl (saturada, 10 mL). Extraiu-se a mistura com EtOAc (100 mL + 2 x 50 mL), secou-se o conjunto dos extractos (Na₂SO₄) e evaporou-se, e purificou-se o resíduo por cromatografia rápida (sílica, hexanos:EtOAc a 6:1 (4:1) para se obter a hidrazona **26** sob a forma de um óleo amarelo (4,88 g, 84 %). CCF R_f = 0,38 (sílica, hexanos:EtOAc a 5:1); [α]_D²² -61° (c 1,45, CHCl₃); IV (filme) ν_{max} 2926, 1454, 1097, 736, 697 cm⁻¹; MALDI-EMTF m/z 387,3008 (MH⁺), calculado para C₂₄H₃₉N₂O₂ 387,3006.

Aldeído 17. Aqueceu-se uma solução da hidrazona **26** (3,82 g, 9,9 mmol) em iodometano (10 mL) a 60°C (condensador de refluxo) durante 3 horas, e depois arrefeceu-se até 25°C. Evaporou-se o excesso de iodometano e retiraram-se os últimos vestígios utilizando vazio de uma bomba de óleo. Agitou-se vigorosamente o xarope amarelo residual com HCl 3 N (190 mL) e com pentano (190 mL)

durante 3 horas a 25°C, separaram-se as fases e extraiu-se a fase aquosa com pentano (100 mL). Secou-se o conjunto das fases orgânicas (Na₂SO₄, NaHCO₃) e evaporou-se para se obter o aldeído **17** sob a forma de um óleo amarelo (2,38 g, 88 %). $[\alpha]_D^{22} +2^\circ$ (c 1,3, CHCl₃); IV (filme) v_{\max} 2931, 2856, 1724, 1454, 1095, 1074, 736, 698 cm⁻¹; MALDI-EMTF m/z 297,1830 (MNa⁺), calculado para C₁₈H₂₆O₂Na 297,1825.

Devido à labilidade configuracional no C8 (numeração da epotilona), foi necessário utilizar-se o aldeído directamente no passo seguinte o aldeído. Estimou-se o dr no C8 como se segue: Tratou-se uma amostra de **17** com um excesso de NaBH₄ em metanol durante 10 minutos. Terminou-se a reacção adicionando NH₄Cl (saturada) à mistura, que em seguida se extraiu por duas vezes com EtOAc, secando-se o extracto (Na₂SO₄) e evaporando-se. Tratou-se o resíduo com (R)-(-)-MTPACI (2-3 equiv.), com excesso de trietilamina e com 4-DMAP em CH₂Cl₂ durante 3 horas. Uma purificação por CCF preparativa permitiu obter-se uma amostra do éster (S)-MTPA, que por análise de RMN de ¹H mostrou ter um dr = 97:3, com a estereoquímica absoluta correcta no C8 no isómeros principal (Tsuda, M., *et al.*, J. Org. Chem. 2000, **65**, 1349-1352). Obtiveram-se resultados análogos utilizando (S)-(+)-MTPACI.

Produto aldólico 27. Preparou-se uma solução de LDA adicionando n-BuLi (7,5 mL, 12 mmol, 1,6 M em hexanos) a di-isopropilamina (1,68 mL, 12 mmol) em THF (12 mL) a -78°C, aquecendo-se em seguida a solução brevemente até

0°C, e voltando a arrefecer-se até -78°C. Adicionou-se gota a gota ao longo de 2 minutos uma solução de cetona **19** (4,63 g, 11,5 mmol) em THF (12 mL) (Nicolaou, K. C., *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 1997, **119**, 7974-7991), e agitou-se a mistura durante 1 h a -78°C e depois durante meia hora a -40°C. Voltou a arrefecer-se até -78°C, e adicionou-se-lhe utilizando uma cânula e ao longo de 1 minuto, uma solução previamente arrefecida a -78°C de aldeído **17** (1,37 g, 5,0 mmol) em THF (25 mL), tomando cuidado para evitar tanto quanto possível o aquecimento durante a transferência. Agitou-se a mistura durante 5 minutos, e depois terminou-se a reacção injectando rapidamente sobre a mistura uma solução de AcOH (1,4 mL) em THF (4,2 mL). Ao fim de mais 5 minutos a -78°C, aqueceu-se a mistura até 25°C e retomou-se em NH₄Cl (saturada, 50 mL) e éter (50 mL). Extraiu-se a fase aquosa com éter (2 x 50 mL), secou-se o conjunto dos extractos (Na₂SO₄) e evaporou-se, e purificou-se o resíduo por cromatografia rápida (sílica, hexanos:éter a 20:1 (6:1)) para se obter a cetona **19** recuperada (1,71 g, 4,25 mmol) e em seguida o produto aldólico **27** sob uma forma diastereomericamente pura (2,73 g, 81 %). CCF R_f = 0,34 (sílica, hexanos:EtOAc a 5:1); [α]_D²² -40° (c 1,0, CHCl₃); IV (filme) ν_{\max} 3502 (largo), 2954, 2928, 2856, 1681, 1472, 1255, 1098, 836, 776 cm⁻¹; MALDI-EMTF *m/z* 699,4796 (MNa⁺), calculado para C₃₉H₇₂O₅Si₂Na 699,4816.

Álcool 28. Arrefeceu-se até -20°C uma solução de produto aldólico **27** (2,71 g, 4,0 mmol) e de 2,6-lutidina (1,40 mL, 12 mmol) em CH₂Cl₂ (25 mL), e depois adicionou-

se-lhe gota a gota TBSOTf (1,84 mL, 8,0 mmol). Agitou-se a mistura durante 1 h a -20°C e depois terminou-se a reacção adicionando à mistura NH_4Cl (saturada, 25 mL). Aqueceu-se a mistura até 25°C , separaram-se as fases e extraiu-se a fase aquosa com CH_2Cl_2 (25 mL) e com éter (25 mL). Secou-se o conjunto das fases orgânicas (Na_2SO_4) e evaporou-se, e filtrou-se o resíduo através de uma altura de sílica eluindo com hexano:éter a 10:1. Evaporou-se o filtrado e dissolveu-se o éter silílico em bruto resultante (3,14 g, 4,0 mmol, 99 %) em THF (40 mL). Adicionou-se a esta solução uma solução fria (0°C) de complexo de HF com piridina (6,4 mL) e piridina (18 mL) em THF (32 mL) a 0°C (esta solução havia sido preparada adicionando lentamente o complexo de HF com piridina a uma solução de piridina em THF a 0°C ; **(CUIDADO!:** *O complexo de HF com piridina é fortemente corrosivo. A adição de HF-piridina à solução de piridina em THF é fortemente exotérmica, e deve ser levada a cabo sob agitação e arrefecimento sobre banho de gelo, para impedir que ocorram respingos*), e agitou-se a solução resultante a 25°C durante 4 horas. Diluiu-se a mistura com EtOAc (100 mL), colocou-se num banho-maria, e terminou-se a reacção adicionando cuidadosamente à mistura NaHCO_3 (saturada, 100 mL) bem como a quantidade de NaHCO_3 sólido que foi necessária para assegurar uma neutralização completa **(CUIDADO!** *Formação de espuma!*). Extraiu-se a mistura com EtOAc (3 x 100 mL), e secou-se o conjunto dos extractos (Na_2SO_4) e evaporou-se, purificando-se em seguida o resíduo por cromatografia rápida (sílica, hexanos:EtOAc a 5:1) para se obter **28** sob a forma de um óleo incolor (2,40 g, 89 %).

CCF $R_f = 0,39$ (sílica, hexanos:EtOAc a 5:1); $[\alpha]_D^{22} -26^\circ$ (c 1,1, CHCl₃); IV (filme) ν_{\max} 3458 (largo), 2929, 2856, 1693, 1472, 1462, 1255, 1093, 986, 836, 775 cm⁻¹; MALDI-EMTF m/z 699,4807 (MNa⁺), calculado para C₃₉H₇₂O₅Si₂Na 699,4816.

Éster 29. Misturou-se o álcool **28** (2,40 g, 3,5 mmol), periodinano de Dess-Martin (3,75 g, 8,8 mmol), NaHCO₃ (0,74 g, 8,8 mmol) e água (76 µL, 4,2 mmol) em CH₂Cl₂ (80 mL), e agitou-se a suspensão resultante durante 1 hora. Diluiu-se a mistura com éter (200 mL), com água (100 mL) e com NaHCO₃ (saturada, 100 mL), e depois filtrou-se. Separaram-se as fases e extraiu-se a fase aquosa com éter (2 x 100 mL). Secou-se o conjunto dos extractos (Na₂SO₄) e evaporou-se, e filtrou-se o resíduo através de uma altura de sílica, eluindo com hexano:EtOAc a 6:1. Evaporou-se o filtrado e dissolveu-se o aldeído em bruto que se obteve (2,15 g, 3,2 mmol, 90 %) numa mistura de THF (80 mL), t-BuOH (145 mL) e 2-metil-2-buteno (25 mL). Adicionou-se a esta solução uma solução de NaH₂PO₄ (0,95 g, 6,7 mmol) e NaClO₂ (1,14 g, 10 mmol) em água (31 mL), e agitou-se vigorosamente a mistura resultante durante 1 hora. Removeram-se os voláteis por evaporação, e retomou-se o resíduo em EtOAc (100 mL) e salmoura (100 mL). Separaram-se as fases e extraiu-se a fase aquosa com EtOAc (3 x 100 mL). Secou-se o conjunto dos extractos (Na₂SO₄) e evaporou-se, e dissolveu-se o resíduo em DMF (5 mL) e evaporou-se de novo para se removerem vestígios de t-BuOH. Voltou a dissolver-se o resíduo que dessa forma se obteve (2,4 g, ca. 3,2 mmol > 100 %) em DMF (10 mL), a adicionaram-se-lhe 2-(trime-

tilsilil)etanol (1,83 mL, 12,7 mmol), EDC (0,92 g, 4,8 mmol), e 4-DMAP (40 mg, 0,33 mmol). Agitou-se a suspensão resultante durante 14 horas, obtendo-se no final uma solução límpida. Adicionou-se água (10 mL) e extraiu-se a mistura com éter (3 x 50 mL). Lavou-se o conjunto dos extractos com uma mistura de água com salmoura (100 + 100 mL), secou-se (Na_2SO_4) e evaporou-se. Purificou-se o resíduo por cromatografia rápida (sílica, hexanos:EtOAc a 10:1) para se obter o éster **29** sob a forma de um óleo viscoso, amarelo claro (2,08 g, 74 %). CCF $R_f = 0,57$ (sílica, hexanos:EtOAc a 10:1); $[\alpha]_D^{22} -33^\circ$ (c 1,2, CHCl_3); IV (filme) v_{max} 2954, 2930, 2856, 1735, 1695, 1472, 1385, 1252, 1090, 988, 836, 776 cm^{-1} ; MALDI-EMTF m/z 813,5315 (MNa^+), calculado para $\text{C}_{44}\text{H}_{82}\text{O}_6\text{Si}_3\text{Na}$ 813,5311.

Aldeído 30. Adicionou-se a uma solução do éter benzílico **29** (2,08 g, 2,63 mmol) em EtOH:EtOAc a 1:1 (50 mL), $\text{Pd}(\text{OH})_2$ a 20 % sobre carbono (2,1 g, 60 % de humidade), e hidrogenou-se a mistura durante 1 hora. Filtrou-se então através de celite para se separar o catalisador, evaporou-se o filtrado, e co-evaporou-se o resíduo com benzeno para remover os vestígios de EtOH. Dissolveu-se o álcool em bruto resultante (1,89 g, ca. 2,6 mmol, > 100 %) em CH_2Cl_2 (60 mL), adicionaram-se-lhe periodinano de Dess-Martin (2,76 g, 6,5 mmol), NaHCO_3 (0,55 g, 6,5 mmol) e água (56 μL , 3,1 mmol), e agitou-se a suspensão resultante durante 1 hora. Diluiu-se a mistura com éter (150 mL), água (75 mL) e com NaHCO_3 (saturada, 75 mL), e depois filtrou-se. Separaram-se as fases e extraiu-

se a fase aquosa com éter (2 x 75 mL). Secou-se o conjunto dos extractos (Na_2SO_4) e evaporou-se, e purificou-se o resíduo por cromatografia rápida (sílica, hexanos:EtOAc a 15:1) para se obter o aldeído **30** sob a forma de um óleo viscoso (1,55 g, 84 %). CCF $R_f = 0,24$ (sílica, hexanos:EtOAc a 15:1); $[\alpha]_D^{22} -47^\circ$ (c 1,3, CHCl_3); IV (filme) ν_{max} 2954, 2856, 1734, 1703, 1251, 1173, 1084, 988, 837, 776 cm^{-1} ; MALDI-EMTF m/z 721,4671 (MNa^+), calculado para $\text{C}_{37}\text{H}_{74}\text{O}_6\text{Si}_3\text{Na}$ 721,4685.

Éter enólico 31. Adicionou-se gota a gota, a uma suspensão de $\text{MeOCH}_2\text{P}(\text{O})_3\text{Cl}$ (3,09 g, 9,0 mmol) em THF (20 mL) a 0°C , NaHMDS (8,5 mL, 8,5 mmol, 1 M em THF). Desenvolveu-se uma cor vermelha. Agitou-se a mistura a 0°C durante 0,5 h e depois arrefeceu-se até -40°C . Adicionou-se uma solução do aldeído **30** (2,12 g, 3,0 mmol) em THF (7 mL), e deixou-se a mistura aquecer até -10°C ao longo de 2 horas. Terminou-se a reacção adicionando à mistura NH_4Cl (saturada, 15 mL), separaram-se as fases, e extraiu-se a fase aquosa com EtOAc (2 x 75 mL). Secou-se o conjunto dos extractos (Na_2SO_4) e evaporou-se, e purificou-se o resíduo por cromatografia rápida (sílica, hexanos:EtOAc a 30:1) para se obter o éter enólico **31** sob a forma de um óleo incolor e viscoso (1,85 g, 84 %, olefina cis:trans ca. 1:1 por RMN de ^1H). CCF $R_f = 0,23$ (sílica, hexanos:EtOAc a 30:1); $[\alpha]_D^{22} -36^\circ$ (c 1,2, CHCl_3); IV (filme) ν_{max} 2954, 2930, 2856, 1735, 1695, 1251, 1171, 1105, 988, 836, 776 cm^{-1} ; MALDI-EMTF m/z 749,4996 (MNa^+), calculado para $\text{C}_{39}\text{H}_{78}\text{O}_6\text{Si}_3\text{Na}$ 749,4998.

Aldeído 32. Adicionou-se a uma solução do éter enólico **31** (847 mg, 1,16 mmol) em dioxano:água a 9:1 (12 mL) para-toluenossulfonato de piridínio (2,34 g, 9,31 mmol) e agitou-se a mistura a 70°C até uma CCF indicar que a reacção se havia completado (6-10 h). A reacção foi então terminada adicionando à mistura NaHCO₃ (saturada, 15 mL), e extraiu-se a mistura com EtOAc (3 x 50 mL). Secou-se a mistura de extractos (Na₂SO₄) e evaporou-se, e purificou-se o resíduo por cromatografia rápida (sílica, hexanos:EtOAc a 15:1) para se obter **32** sob a forma de um óleo viscoso, incolor (681 mg, 82 %). CCF R_f = 0,29 (sílica, hexanos:EtOAc a 15:1); [α]_D²² -34° (c 1,0, CHCl₃); IV (filme) v_{max} 2954, 2856, 1731, 1695, 1251, 1086, 988, 836, 776 cm⁻¹; MALDI-EMTF m/z 735,4823 (MNa⁺), calculado para C₃₈H₇₆O₆Si₃Na 735,4842.

Construção dos iodetos de vinilo 20e

Acoplamento de Somogashira dos brometos de arilo (38) com propino (procedimento geral)

Adicionou-se, a uma solução desarejada borbulhando ar do brometo de arilo **38** (3,5 mmol) em DMF (3 mL) e di-isopropilamina (2,5 mL), sob atmosfera de argón, adicionaram-se Pd(Pφ₃)₂Cl₂ (25 mg, 36 μmol) e CuI (13 mg, 70 μmol), e depois substituiu-se a atmosfera inerte por propino (1 atm, balão). Agitou-se a mistura a 25°C durante 3 horas. Durante este período de tempo, formou-se um precipitado, e a mistura reaccional virou a castanho escuro.

ro. Adicionou-se água (15 mL), extraiu-se a mistura com EtOAc, e secou-se o conjunto dos extractos (Na_2SO_4) e evaporou-se. Obteve-se o 1-arilpropino puro por cromatografia rápida (sílica, misturas de hexano:EtOAc).

Produto de acoplamento de Sonogashira a partir de

38. Um óleo castanho (97 %); CCF $R_f = 0,21$ (sílica, hexanos:EtOAc a 5:1); IV (filme) ν_{max} 2908, 2226, 1567, 1531, 1461, 1431, 1361, 1108, 1008, 832 cm^{-1} ; MALDI-EMTF m/z 164,0527 (MH^+), calculado para $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{NS}$ 164,0528.

Hidroestanição-iodação (procedimento geral).

Isto é uma adaptação do processo anteriormente descrito (Betzler, J.-F., *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 1997, **38**, 2279-2282). Adicionou-se a uma solução de hexabutildiestanho (10,1 mL, 20 mmol) em THF seco (40 mL) a -78°C , $n\text{-BuLi}$ (12,9 mL, 20 mmol, 1,55 M em hexanos), e agitou-se a solução límpida resultante a -40°C durante 30 minutos. Transferiu-se então esta solução por intermédio de uma cânula para uma suspensão de CuCN (0,90 g, 10 mmol) em THF (2 mL) a -78°C . Formou-se então uma solução amarela límpida que se agitou durante 5 minutos a -40°C antes de se voltar a arrefecer até -78°C . Adicionou-se-lhe então metanol seco (23 mL, 0,57 mol) para se obter uma solução encarnada, que se agitou a -40°C durante 15 minutos, passados os quais se adicionou à mistura uma solução do arilpropino (5,0 mmol) em THF (5 mL). Agitou-se a solução laranja-avermelhada a -10°C de um dia para o outro (precipita algum Cu e/o sais de Cu^{2+}), e depois arrefeceu-se até -20°C , e em seguida

adicionou-se-lhe metanol (10 mL). Passados 15 minutos a -20°C , adicionou-se-lhe água (10 mL). e continuou a agitar-se durante mais 15 minutos, enquanto se aqueceu até 25°C . Extraiu-se a mistura com éter, e lavou-se a fase orgânica com salmoura, secou-se (Na_2SO_4) e evaporou-se. Uma cromatografia rápida (sílica, misturas de hexanos:EtOAc) permitiu obter o vinilestanano intermediário, que se dissolveu em CH_2Cl_2 (5 mL). Adicionou-se então a esta solução, gota a gota, uma solução de iodo (1,05 equiv.) em CH_2Cl_2 (40 mL por g de I_2), a 0°C . Depois das últimas gotas, a cor do I_2 persistia, e deixou-se a reacção prolongar-se mais 5 minutos a 0°C . Em seguida evaporou-se o solvente e dissolveu-se o resíduo em éter. Adicionaram-se então KF (solução 1 M em água, 3 equiv.) e $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (saturada, 10 mL por mmol de substrato), e agitou-se a mistura durante 15 minutos a 25°C , período durante o qual se formou um precipitado branco. Filtrou-se a mistura através de celite, e secou-se a fase orgânica (Na_2SO_4) que em seguida se evaporou. Purificou-se o resíduo por cromatografia rápida (sílica, misturas de hexanos:EtOAc) para se obter o iodeto de vinilo pretendido.

Iodeto de vinilo 20e. O vinilestanano intermediário é facilmente protodesestabilizado; por essa razão, uma cromatografia rápida deste intermediário tem que ser levada a cabo com hexanos:EtOAc:Et₃N a 50:1:1 como eluente, e o vinilestanano que desta forma se obteve continha outros compostos de butilestanho. Seguindo o procedimento geral, fez-se reagir a mistura com uma quantidade suficiente de I_2

para que a cor castanha perdurasse no fim da adição (ca. 2 equiv. de I₂). Após uma cromatografia rápida (hexanos:EtOAc a 50:1), obteve-se o iodeto de vinilo **20e** sob a forma de um óleo amarelo (74 %). CCF R_f = 0,41 (sílica, hexanos:EtOAc a 50:1); IV (filme) v_{max} 3102, 2923, 1620, 1423, 1300, 1065, 1035, 964, 863, 723, 562 cm⁻¹; MALDI-EMTF m/z 297,9215 (MH⁺), calculado para C₇H₉INS₂ 297,9216.

Síntese dos análogos de epotilona 8-144.

Acoplamento de Nozaki-Hiyama-Kishi dos aldeídos (34, 40) com os vinilestananos (20a-g) (procedimento geral)

Adicionou-se, a uma solução contendo o aldeído **32** previamente desgasificada por breve exposição a vácuo (107 mg, 0,15 mmol), o iodeto de vinilo pretendido **20** (0,45 mmol), e 4-terc-butilpiridina (665 µL, 4,5 mmol) em DMSO (3 mL), CrCl₂ anidro (184 mg, 1,5 mmol) e NiCl₂ anidro (4 mg, 0,03 mmol). Agitou-se a mistura durante 3 horas a 25°C, e nessa altura adicionou-se-lhe mais uma porção de iodeto de vinilo (0,45 mmol), continuando a agitar-se durante mais 3 horas. Repetiu-se este procedimento mais uma vez, e em seguida continuou a agitar-se de um dia para o outro. Terminou-se então a reacção adicionando à mistura reac-cional água (5 mL), e piridina (1 mL) para impedir que fossem extraídos para a fase aquosa quaisquer complexos do produto com Cr, e extraiu-se a mistura com EtOAc (3 x 25 mL). Lavou-se o conjunto dos extractos com salmoura (2 x 100 mL), secou-se (Na₂SO₄) e evaporou-se. Uma cromatografia

rápida (sílica, misturas de hexanos:EtOAc) permitiu obter o produto de acoplamento, na maior parte dos casos não sendo possível separá-lo do excesso de 4-terc-butilpiridina.

Produto de 20e e 32. Vidro amarelo (78 %, uma mistura de epímeros em C15 a ca. 1:1). CCF $R_f = 0,40$ (sílica, hexanos:EtOAc a 5:1); $[\alpha]_D^{22} -28^\circ$ (c 2,0, CHCl₃); IV (filme) ν_{\max} 3416 (largo), 2929, 2856, 1732, 1694, 1472, 1251, 1037, 988, 836, 776 cm⁻¹; MALDI-EMTF m/z 906,5021 (MH⁺), calculado para C₄₅H₈₅NO₆S₂Si₃Na 906,5018.

Desprotecção do TBAF (procedimento geral).

Dissolveu-se a mistura de produtos do acoplamento de Nozaki-Hiyama-Kishi em THF (1,5 mL), e adicionou-se-lhe TBAF (1M em THF, 0,30 mL, 0,30 mmol) a 0°C. Ao fim de 1 hora a 0°C, adicionou-se-lhe mais uma porção de TBAF (0,30 mL, 0,30 mmol), e agitou-se a mistura a 25°C durante 1 hora. Terminou-se a reacção adicionando à mistura reac-cional NH₄Cl (saturada, 5 mL), e extraiu-se a mistura com EtOAc (4 x 20 mL). Secou-se o conjunto dos extractos (Na₂SO₄) e evaporou-se, e purificou-se o resíduo por cromatografia rápida (sílica, misturas de hexanos:EtOAc) para se obter o hidroxilácido pretendido sob a forma de uma mistura a ca. 1:1 de epímeros em C15 (que neste estágio não eram separáveis).

Hidroxilácido 41e. Sólido amarelo (79 %, mistura de epímeros em C15 a ca. 1:1). CCF $R_f = 0,37$ (sílica, hexanos:EtOAc a 2:1); $[\alpha]_D^{22} -23^\circ$ (c 2,3, CHCl₃); IV (filme)

v_{\max} 3356 (largo), 2929, 2856, 1712, 1472, 1253, 1085, 1038, 988, 836, 776 cm^{-1} ; MALDI-EMTF m/z 806,4282 (MNa^+), calculado para $\text{C}_{40}\text{H}_{73}\text{NO}_6\text{S}_2\text{Si}_2\text{Na}$ 806,4315.

Macrolactonização de Yamaguchi (procedimento geral). Adicionou-se a uma solução do hidroxiácido (95 μmol) em THF seco (8 mL) a 0°C , trietilamina (79 μL , 0,57 mmol) e cloreto de 2,4,6-triclorobenzoílo (40 μL , 0,23 mmol). Depois de se agitar a 0°C durante 1 hora, adicionou-se a solução resultante ao longo de 2 horas a uma solução de 4-DMAP (26 mg, 0,21 mmol) em tolueno (20 mL) a 75°C utilizando uma bomba de seringa. Continuou a agitar-se a 75°C durante mais 1 h passada a qual se evaporou o tolueno sob pressão reduzida. Submeteu-se directamente o resíduo a uma cromatografia rápida (sílica, misturas de hexanos:EtOAc) para se obter a macrolactona e o seu epímero (15R), facilmente separáveis. Em todos os casos o epímero (15S) pretendido eluía *depois* do epímero (15R) menos polar.

Macrolactona 43e. Isolou-se este produto sob a forma de uma mistura em bruto que se submeteu directamente às condições de des-sililação global (veja-se adiante) sem qualquer purificação adicional.

Des-sililação global (procedimento geral). Dissolveu-se a macrolactona em TFA a 20 % em volume, em CH_2Cl_2 , e manteve-se a solução a 25°C durante 3 horas, passadas as quais se evaporaram os voláteis sem se aquecer. Dissolveu-se o resíduo em EtOAc, e lavou-se a solução com

NaHCO₃ (saturada), secou-se (Na₂SO₄) e evaporou-se. Uma cromatografia rápida (sílica, misturas de hexanos:EtOAc) permitiu obter a epotilona pura.

Epotilona 12. Óleo viscoso (17 % a partir de **41e**); CCF R_f = 0,38 (sílica, hexanos:EtOAc a 2:1); [α]_D²² - 52° (c 0,50, CHCl₃); IV (filme) v_{max} 3490 (largo), 2933, 1732, 1686, 1255, 1038, 756 cm⁻¹; MALDI-EMTF m/z 538,2666 (MH⁺), calculado para C₂₈H₄₄NO₅S₂ 538,2655.

Exemplo: Cápsulas moles

Preparam-se tal como se segue 5000 cápsulas de gelatina mole, contendo cada uma delas como ingrediente activo 0,05 g de um dos compostos com a fórmula I nomeados nos exemplos anteriores:

Composição

ingrediente activo	250 g
Lauroglicol	2 litros

Processo de preparação: Suspende-se o ingrediente activo pulverizado em Lauroglykol[®] (laurato de propilenoglicol, Gattefossé S.A., Saint Priest, França) e moeu-se num pulverizador em húmido até uma dimensão de grão de cerca de 1 a 3 μm. Utilizam-se porções contendo cada uma 0,419 g da mistura como enchimento de cápsulas gelatina mole, por intermédio de uma máquina de enchimento de cápsulas.

Descrição Pormenorizada das Figuras

A Figura 1 mostra as estruturas de epotilonas naturais e concebidas, seleccionadas. As caixas com fundo cinzento indicam compostos sintetizados neste trabalho.

A Figura 4 ilustra a análise retro-sintética do análogo (**12**) à *trans*-ciclopropilepotilona B.

A Figura 5 ilustra a construção do aldeído **32**.
Reagentes e condições: (a) Veja-se Nicolaou, K. C., *et al.* ChemBioChem 2001, **2**, 69-75; Charette, A. B.; *et al.* J. Am. Chem. Soc. 1998, **120**, 11943-11952; (b) NaH (1,5 equiv.), BnBr (1,5 equiv.), DMF, 0 → 25°C, 12 h; (c) O₃, CH₂Cl₂: MeOH a 4:1, -78°C, 21 minutos; depois NaBH₄ (3,0 equiv.), -78 → 25°C, 1 h, 89% para 2 passos; (d) MsCl (1,3 equiv.), Et₃N (1,5 equiv.), CH₂Cl₂, 25°C, 1 h; (e) NaI (3,0 equiv.), acetona, refluxo, 40 minutos, 95 % para 2 passos; (f) LDA (1,4 equiv.), **25** (1,3 equiv.), THF, 0°C, 6 h; depois **24**, -98°C → -10°C, 14 h, 84 %; (g) MeI, 60°C, 3 h; (h) HCl 3 N:pentano a 1:1, 25°C, 3 h, 88 % para 2 passos; (i) LDA (2,4 equiv.), **19** (2,3 equiv.), THF, -78°C, 1 h; depois -40°C, 0,5 h; depois **17** a -78°C, 5 minutos, 81 %; j) TBSOTf (2,0 equiv.), 2,6-lutidina (3,0 equiv.), CH₂Cl₂, -20°C, 1 h; (k) HF-piridina, piridina, THF, 25°C, 4 h, 89 % para 2 passos; (kl) DMP (2,5 equiv.), NaHCO₃ (2,5 equiv.), H₂O, CH₂Cl₂, 25°C, 1 h; (m) NaClO₂ (3,1 equiv.), NaH₂PO₄ (2,1 equiv.), 2-metil-2-buteno (74 equiv.), t-BuOH, THF, H₂O,

25°C, 1 h; (n) 2-(trimetilsilil)etanol (4,0 equiv.), EDC (1,5 equiv), 4-DMAP (0,1 equiv), DMF, 25°C, 14 h, 74 % para 3 passos; (o) Pd(OH)₂/C a 20 %, H₂ (1 atm.), EtOH:EtOAc a 1:1, 25°C, 1 h; (p) DMP (2,5 equiv.), NaHCO₃ (2,5 equiv.), H₂O, CH₂Cl₂, 25°C, 1 h, 84 % para 2 passos; (q) MeOCH₂Pφ₃Cl (3,0 equiv.), NaHMDS (2,8 equiv.), THF, -40 → -10°C, 2 h, 84 %; (r) PPTS (8,0 equiv.), dioxano:H₂O a 9:1, 70°C, 6 h, 82 %. 4-DMAP = 4-(dimetilamino)piridina; DME = 1,2-dimetoxi-etano; DMP = periodinano de Dess-Martin; EDC = cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodi-imida; HF-piridina = complexo de ácido fluorídrico com piridina; NaHMDS = hexametildissilazida de sódio; PPTS = para-toluenossulfonato de piridínio; TMSE = 2-trimetilsilil-etilo.

A Figura 6 ilustra a construção do iodeto de vinilo **20e**. *Reagentes e condições:* (b) Pd (Pφ₃)₂Cl₂ (0,01 equiv.), CuI (0,02 equiv.), HC≡CCH₃ (1 atm), DMF, i-Pr₂NEt, 25°C, 3 h, **35**: 96 %; (c) (i) n-BuLi (4,0 equiv.), (n-Bu₃Sn)₂ (4,0 equiv.), CuCN (2,0 equiv.), MeOH, THF, -10°C, 12 h; (ii) **12** (1,05 equiv), CH₂Cl₂, 0°C, 5 minutos, **20e**: 37 % a partir de **37**. TrCl = cloreto de trifenilmetilo; 4-DMAP = 4-(dimetilamino)piridina; MOMCl = éter metilclorometílico.

A Figura 7 é a síntese do análogo de epotilona **12**. *Reagentes e condições:* (a) CrCl₂ (10 equiv.), NiCl₂ (0,2 equiv), 4-t-butilpiridina (30 equiv.), **20** (3,0 equiv.), DMSO, 25°C, de um dia para o outro; (b) TBAF (4,0 equiv.), THF, 0°C, 1 h; e depois 25°C, 1 h; (c) Et₃N (6,0

equiv.), cloreto de 2,4,6-triclorobenzoílo (2,4 equiv.), **41** ou **42**, THF, 0°C, 1 h; e depois 4-DMAP (2,2 equiv.), tolueno, 75°C, 3 h; (d) TFA a 20 % em volume, em CH₂Cl₂, 25°C, 3 h (excepto **43d**); (e) Estimado por RMN de ¹H; (f) Desprotecção de **43d**: TMSBr (10 equiv.), PM de 4Å, CH₂Cl₂, -30°C, 1 h; e depois TFA a 20 % em volume, em CH₂Cl₂, 25°C, 3 h. TBAF = fluoreto de tetrabutílamónio; 4-DMAP = 4-(dimetilamino)piridina; TFA = ácido trifluoroacético; TMSBr = brometo de trimetilsililo; PM = peneiros moleculares.

A Figura 8 ilustra uma tabela descrevendo a citotoxicidade das epotilonas **1** a **14** e do paclitaxel contra as linhas de células de carcinoma do ovário em humanos 1A9 e de células com β-tubulina mutante seleccionadas com paclitaxel ou com epotilona A. Os efeitos anti-proliferativos dos compostos testados contra a linha de origem 1A9 e contra os clones resistentes ao fármaco seleccionados com epotilona (PTX10, PTX22 e A8, respectivamente) foram avaliados num ensaio de inibição de crescimento com a duração de 72 h, utilizando o ensaio SRB (sulforrodamina-B) (Skehan, P.; *et al.* J. Natl. Cancer Inst. 1990, **82**, 1107-1112). Os valores de IC₅₀ para cada composto são apresentados em nM e representam a média de 3-9 experiências independentes ± erro padrão da média. Calcula-se a resistência relativa (RR) sob a forma de um valor de IC₅₀ para a sub-linha resistente dividido pelo relativo à linha de origem (1A9). CP = ciclopropilo; py = cadeia lateral de 5-metilpiridina; pyOH = cadeia lateral de 5-hidroximetilpiridina; 5tmpy = cadeia lateral de 5-tiometilpiridina;

6tmpy = cadeia lateral de 6-tiometilpiridina; tmt = cadeia lateral de 2-tiometiltiazole.

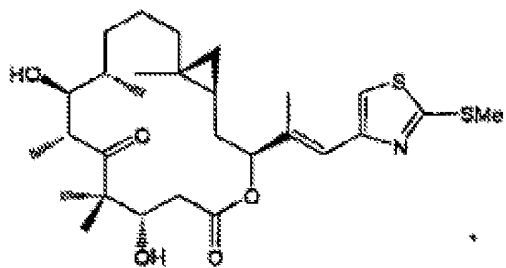
A Figura 9 ilustra uma tabela na qual se listam os valores da potência de polimerização da tubulina e a citotoxicidade das epotilonas **1-8**, **10-14**, e do paclitaxel contra linhas de células de cancro epidermóide em humanos. (a) A extensão da polimerização da tubulina suína (TP) por um composto 4 μM foi quantificada em relação ao efeito de epotilona B 25 μM (o qual foi definido como 100 %) tal como foi descrito (Nicolaou, K. C.; *et al.* Chem. Biol. 2000, **7**, 593-599). (b) Avaliou-se a concentração de fármaco necessária para uma inibição máxima do crescimento de células (valores de IC_{50} apresentados em nM) após um período de 96 horas de exposição ao fármaco, quantificando a massa de células por intermédio de um método de contra-*tação* da proteína tal como havia sido descrito (Meyer, T.; *et al.* Int. J. Cancer 1989, **43**, 851-856). KB-31: células epidermóides sensíveis ao Taxol[®], KB-8511: células epidermóides resistentes ao Taxol[®], (devido a uma sobre-expressão da Pgp). Calculou-se a resistência relativa (RR) dividindo o valor de IC_{50} para a linha celular resistente pelo valor correspondente relativo à linha celular sensível. (c) Dados da referência 3 (valores de % de TP para o Taxol[®]; para a Epo A e para a Epo B eram respectivamente de 49, 69 e 90). CP = ciclopropilo; py = cadeia lateral de 5-metilpiridina; pyOH = cadeia lateral de 5-hidroximetilpiridina; 5tmpy = cadeia lateral de 5-tiometilpiridina; 6tmpy = cadeia lateral de 6-tiometilpiridina; tmt = cadeia lateral de 2-tiometiltiazole.

A Figura 10 ilustra uma tabela que lista as afinidades de ligação de análogos de epotilona para o local de ligação de taxóides nos microtúbulos. (a) A ligação dos diferentes ligandos foi medida pela substituição do derivado fluorescente de Taxol[®] (Flutax-2) do seu local de ligação (Figura 2) (Diaz, J. F.; *et al.* J. Biol. Chem. 2000, **275**, 26265-26276). Mediu-se a isotérmica de substituição do Flutax-2 por cada ligando, pelo menos duas vezes, com um leitor de polarização de fluorescência de microplacas, num procedimento modificado a partir do da descrição anterior (Andreu, J. M.; Barasoain, I. Biochemistry 2001, **40**, 11975-11984). Empregaram-se microtúbulos estabilizados, com ligações cruzadas, que haviam sido armazenados sob azoto líquido. Mediu-se a constante de ligação do ligando de referência Flutax-2 por centrifugação e por anisotropia de fluorescência, a cada temperatura (Diaz, J. F.; *et al.* J. Biol. Chem. 2000, **275**, 26265-26276). O valor de referência obtido foi de $2,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ a 37°C. (b) As constantes de equilíbrio de dissociação (Kd) são apresentadas em nM. (c) As energias livres padrão de ligação (DG_{app}^0) são apresentadas em kJ mol^{-1} .

Lisboa, 29 de Fevereiro de 2008

REIVINDICAÇÕES

1. Um composto representado pela fórmula I:

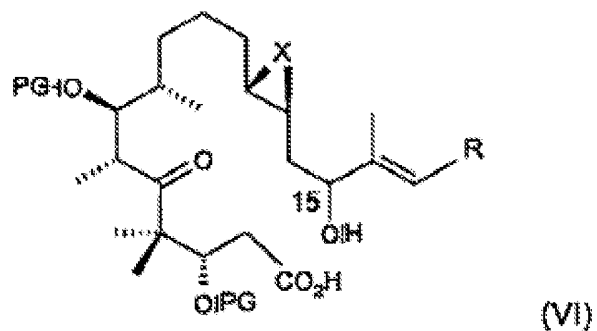


2. Uma composição farmacêutica que contenha um veículo ou um diluente aceitável do ponto de vista farmacêutico, bem como um composto de acordo com a reivindicação 1, ou um seu sal de adição aceitável do ponto de vista farmacêutico a um ácido ou a uma base, quando tal seja possível.

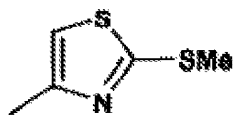
3. A utilização de um composto de acordo com a reivindicação 1 para a preparação de um medicamento para o tratamento de uma doença proliferativa.

4. Um processo para a preparação de um composto de acordo com a reivindicação 1,

em que num primeiro passo se condense por esterificação um composto com a fórmula VI



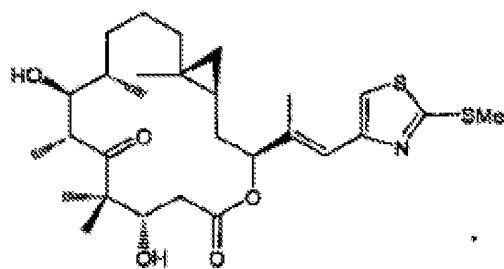
em que X seja CH₂ e R seja



e PG seja um grupo protector para a função hidroxilo,

opcionalmente na presença de um catalisador,

e num segundo passo se retire o grupo protector obtendo-se desta forma a lactona com a fórmula I.



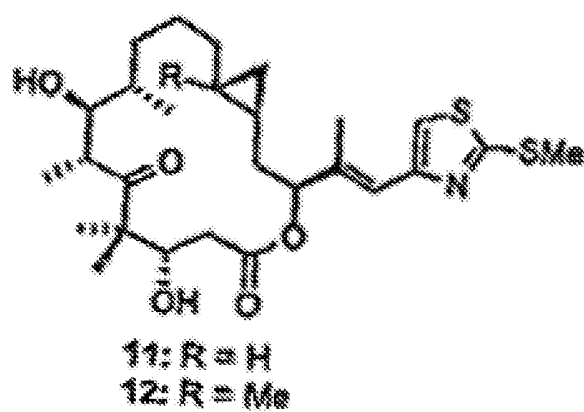


Figura 1

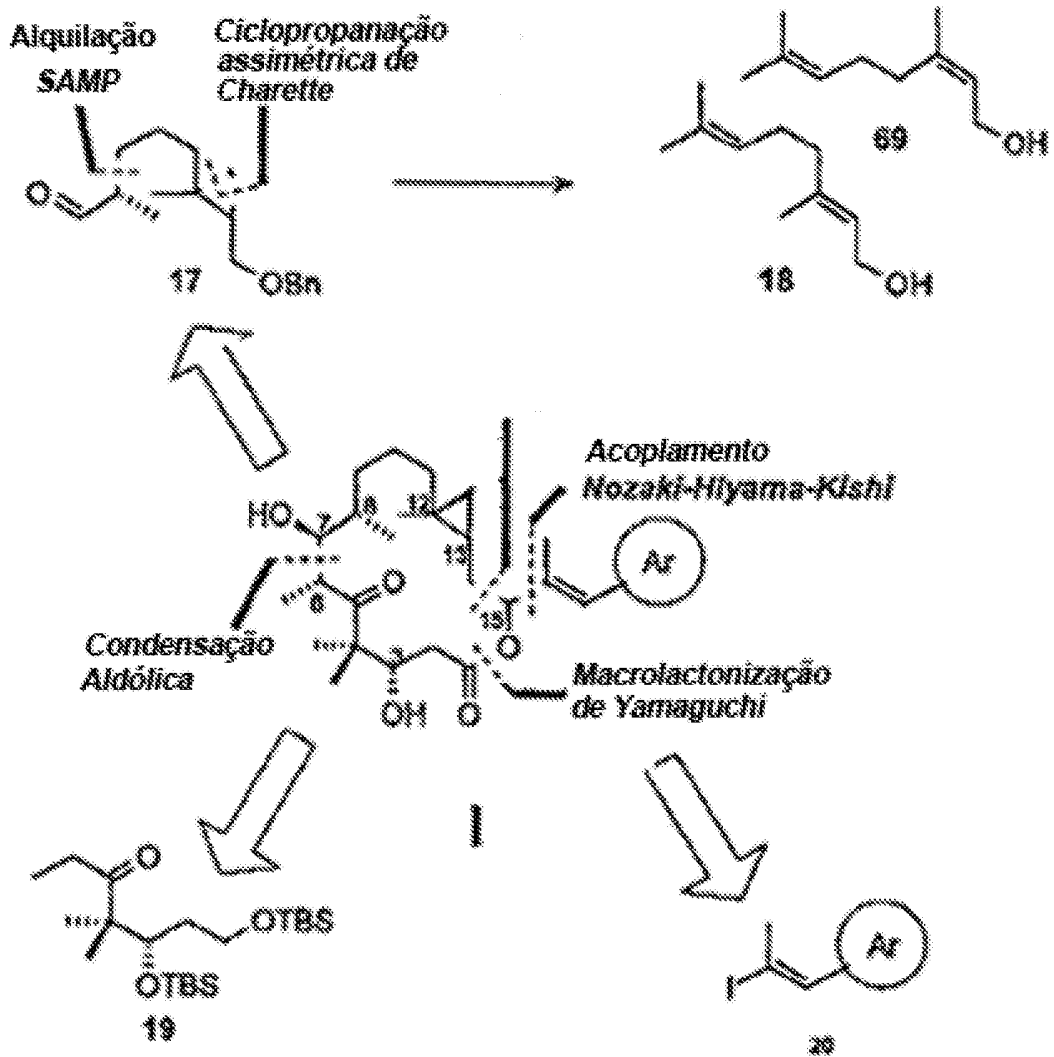


Figura 4

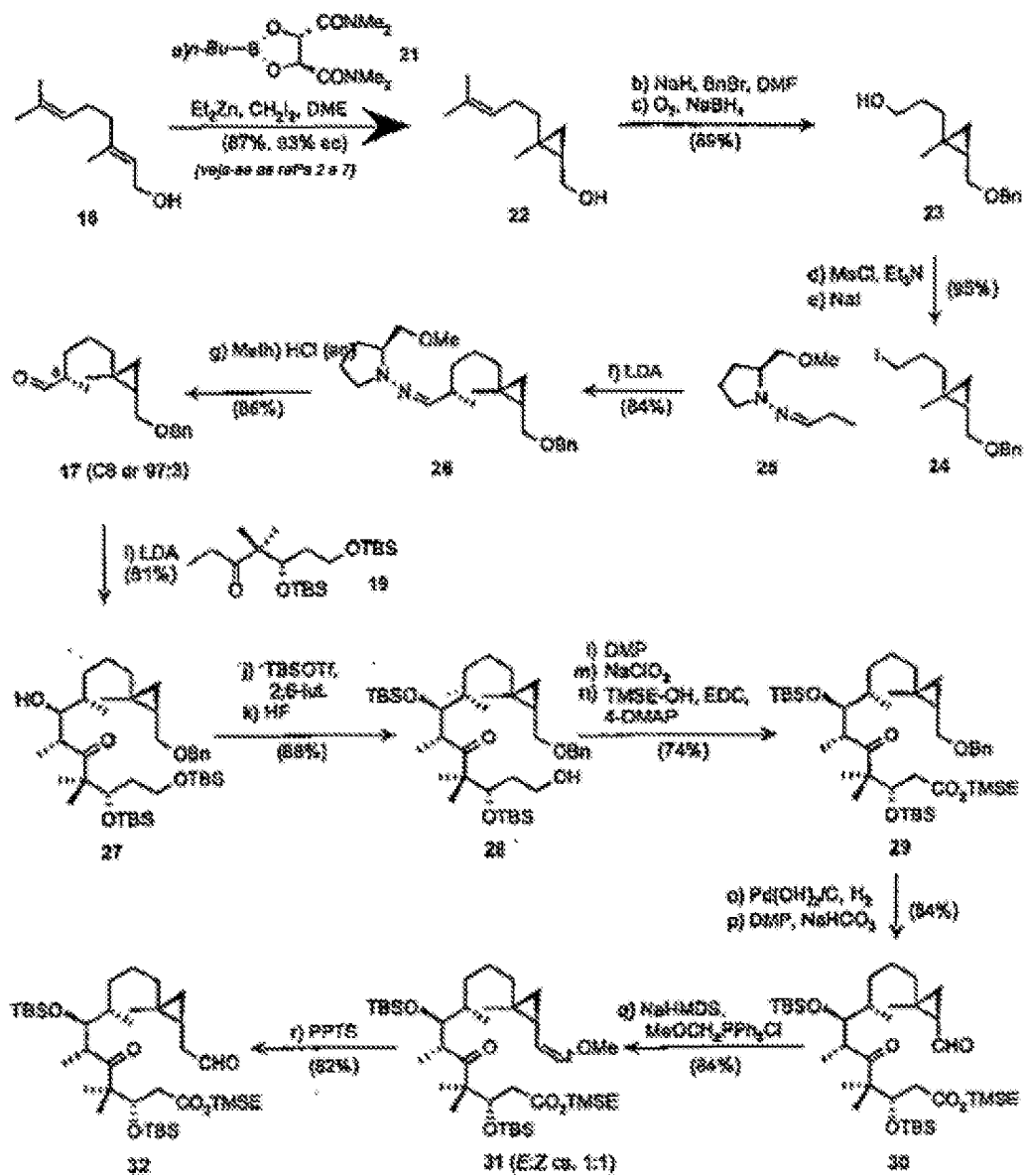


Figura 5

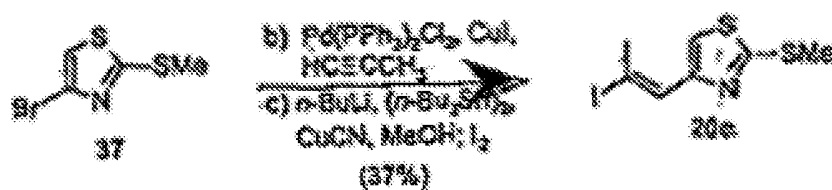


Figura 6

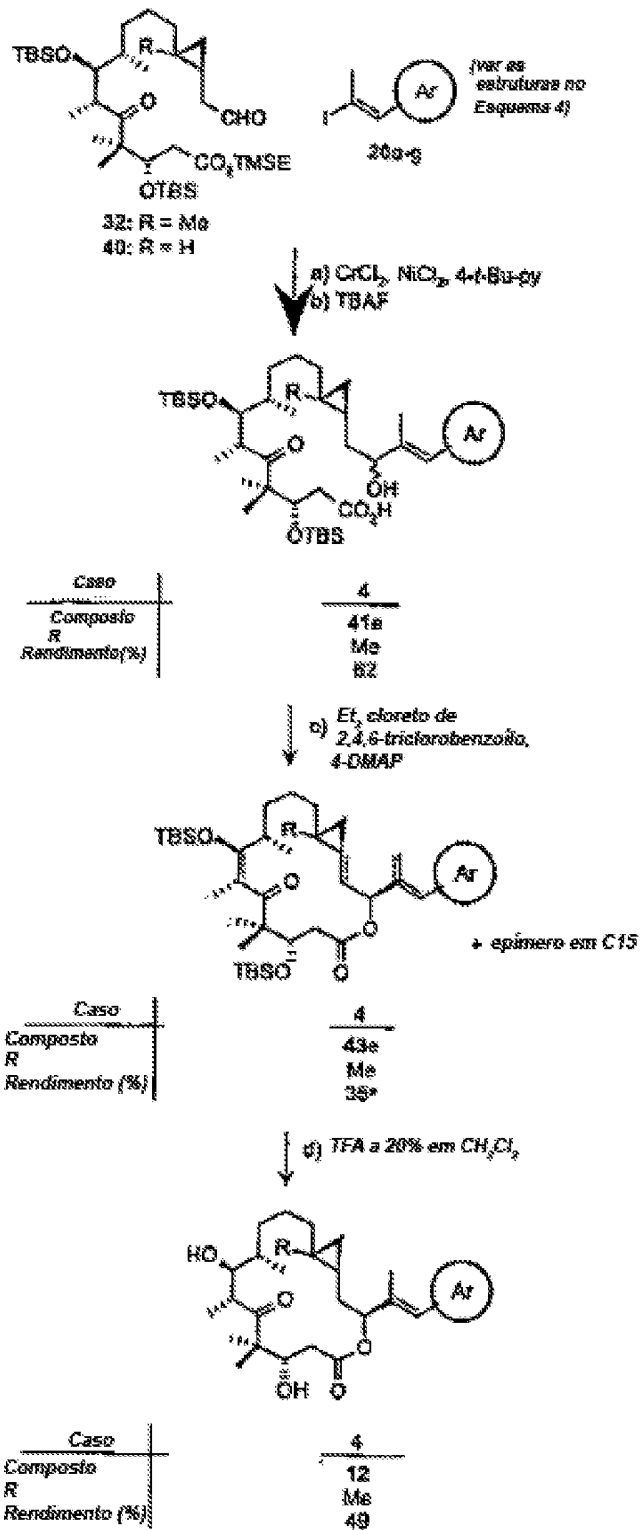


Figura 7

Figura 8

Composto	Linha de Células						
	IA9	A8 (β 274)		PTX10 (β 270)		PTX22 (β 364)	
	IC ₅₀	IC ₅₀	RR	IC ₅₀	RR	IC ₅₀	RR
Epotilona							
A (Epo A)	3,1 \pm 0,72	77,3 \pm 9,25	24,9	29,1 \pm 7,24	9,4	10,1 \pm 2,10	3,3
Epotilona							
B (Epo B)	0,3 \pm 0,05	6,5 \pm 0,7	21,7	3,7 \pm 1,83	12,3	2,1 \pm 1,45	7
<i>trans</i> -CP-	3,5 \pm 1,64	28,9 \pm 8,01	8,3	5,7 \pm 1,96	1,6	11,5 \pm 3,86	3,3
tmt-epo B							

Figura 9

Composto	% de TP ^a	KB-31 ^b	KB-8511 ^b	RR
Epotilona A				
(Epo A) 1	78	2,15 ^c	1,91 ^c	0,88 ^c
Epotilona B				
(Epo B) 2	93	0,19 ^c	0,18 ^c	0,95 ^c
<i>trans</i> -CP-tmt- epo B 12	91	0,67	0,45	0,67

Figura 10

Composto	$Kd (37^{\circ}C)^b$	$\Delta G_{ap}^0 (37^{\circ}C)^b$
Epotilona A (Epo A) 1	34±4	-44,5±0,3
Epotilona B (Epo B) 2	1,6±0,1	-52,6±0,5
<i>trans</i> -CP-tmt-epo B 12	1,8±0,2	-51,8±0,3

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- J. F. W. MCOMIE. *Protective Groups in Organic Chemistry*. Plenum Press, 1973
- T. W. GREENE. *Protective Groups in Organic Synthesis*. Wiley, 1981
- *The Peptides*. Academic Press, 1981, vol. 3
- *Methoden der organischen Chemie. Methods of organic chemistry*. Georg Thieme Verlag, 1974, vol. 15
- Aminosäuren, Peptide, Proteine. H.-D. JAKUBKE ; H. JESCHKEIT. *Amino acids, peptides, proteins*. Verlag Chemie, 1982
- *Chemie der Kohlenhydrate: Monosaccharide und Derivate*. JOCHEN LEHMANN. *Chemistry of carbohydrates: monosaccharides and derivatives*. Georg Thieme Verlag, 1974
- NICOLAOU, K. C. et al. *Angew. Chem.*, 1996, vol. 110, 2120-2153
- *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1998, vol. 37, 2014-2045
- NICOLAOU, K. C. et al. *Tetrahedron*, 2002, vol. 58, 6413-6432
- NICOLAOU, K. C. et al. *Angew. Chem.*, 1996, vol. 110, 89-92
- *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1996, vol. 37, 84-87
- NICOLAOU, K. C. et al. *Chem. Biol.*, 2000, vol. 7, 593-599
- NICOLAOU, K. C. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, vol. 123, 9313-9323
- NICOLAOU, K. C. et al. *ChemBioChem*, 2001, vol. 2, 69-75
- JOHNSON, J. A. et al. *Org. Lett.*, 2000, vol. 2, 1537-1540
- NICOLAOU, K. C. et al. *Bioorg. Med. Chem.*, 1999, vol. 7, 665-697
- NICOLAOU, K. C. et al. *Chem. Eur. J.*, 2000, vol. 6, 2783-2800 [0017] [0048]
- NICOLAOU, K. C. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, vol. 123, 9313-9323
- CHARETTE, A. B. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, vol. 120, 11943-11952
- NICOLAOU, K. C. et al. *Chem. Eur. J.*, 27 June 2000, 83-2800
- NICOLAOU, K. C. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, vol. 123, 9313-9323
- TAKAI, K. et al. *Tetrahedron Lett.*, 1983, vol. 24, 5281-5284
- JIN, H. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, vol. 108, 5644-5646
- INANAGA, J. et al. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1979, vol. 52, 1989-1993
- MULZER, J. et al. *Synthesis*, 1992, 215-228
- NICOLAOU, K. C. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, vol. 119, 7974-7991
- CHARETTE, A. B. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, vol. 120, 11943-11952
- NICOLAOU, K. C. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, vol. 119, 7974-7991
- ENDERS, D. *Asymmetric Synth.*, 1984, vol. 3, 375-339
- ENDERS, D.; KLATT, M. *Synthesis*, 1996, 1403-1418
- TSUDA, M.; ENDO, T.; KOBAYASHI, J. *J. Org. Chem.*, 2000, vol. 65, 1349-1352
- NICOLAOU, K. C. et al. *Chem. Eur. J.*, 2000, vol. 6, 2783-2800
- ELLINGBOE, J. W. et al. *J. Med. Chem.*, 1984, vol. 37, 542-550
- BETZER, J.-F. et al. *Tetrahedron Lett.*, 1997, vol. 38, 2279-2282
- *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, vol. 108, 5644-5646
- INANAGA, J. et al. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1979, vol. 52, 1989-1993
- GIANNAKAKOU, P. et al. *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, 17118-17125
- GIANNAKAKOU, P. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2000, vol. 97, 2984-2989
- SKEHAN, P. et al. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1990, vol. 82, 1107-1112
- MEYER, T. et al. *Int. J. Cancer*, 1989, vol. 43, 851-856
- NICOLAOU, K. C. et al. *ChemBioChem*, 2001, vol. 2, 69-75
- ANDREU, J. M.; BARASOAIN, I. *Biochemistry*, 2001, vol. 40, 11975-11984
- SOUTO, A. A. et al. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1995, vol. 34, 2710-2712
- DIAZ, J. F. et al. *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, 26265-26276
- ABAL, M. et al. *Cell. Motil. Cytoskeleton*, 2001, vol. 49, 1-15
- NICOLAOU, K. C. et al. *Angew. Chem.*, 1997, vol. 109, 2181-2187 [0026]
- *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1997, vol. 36, 2097-2103
- SINHA, S. C. et al. *ChemBioChem*, 2001, vol. 2, 656-665

- ENDERS, D. et al. *Synthesis*, 1996, 1403-1419
- CHARETTE, A. B. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, vol. 120, 11943-11952
- TSUDA, M. et al. *J. Org. Chem.*, 2000, vol. 65, 1349-1352